

Ю. Б. КУДРЯШОВ,
Б. С. БЕРЕНФЕЛЬД

ОСНОВЫ РАДИАЦИОННОЙ БИОФИЗИКИ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебника для студентов университетов, обучающихся по специальности «Биофизика».

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1982

Кудряшов Ю. Б., Беренфельд Б. С. Основы радиационной биофизики: Учебник. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. — 304 с., ил.

В учебнике (первом в радиационной биофизике) последовательно рассматриваются этапы развития лучевого поражения биологических систем — от первичных актов поглощения энергии ионизирующей радиации до гибели клеток и многоклеточных организмов. Большой раздел посвящен тканевой и органной радиочувствительности. Рассматриваются экспериментальные подходы к анализу механизмов лучевой инактивации ферментов, нуклеиновых кислот, клеток млекопитающих. Критически излагаются гипотезы о механизмах природной и модифицированной радиорезистентности организмов.

Для студентов биологов, медиков, физиков, химиков, специализирующихся по радиационной биологии и медицине.

Библиогр. 57 назв. Ил. 81.

Рецензенты:

кафедра биофизики МИФИ
(зав. кафедрой докт. физ.-мат. наук,
проф. В. И. Иванов),
докт. биол. наук С. И. Аксёнов,
докт. биол. наук С. П. Ярмоненко

К $\frac{2001040000-093}{077(02)-82}$ 157—82

Изучение биологического действия ионизирующей радиации потребовало концентрации усилий обычно мало соприкасающихся научных направлений — ядерной физики, цитологии, радиохимии, фармакологии, гистологии, классической генетики, молекулярной биологии, физиологии и ряда областей математики. Занимаясь анализом первичной ионизации в тканях, построением математических моделей или описанием морфологических и функциональных последствий лучевого поражения, исследователи стремятся решать конкретные задачи, позволяющие им оставаться в привычных границах собственных наук.

Интегральный подход к анализу радиобиологических эффектов характерен для радиационной биофизики, которая не только анализирует природу первичных радиационных повреждений, но и расшифровывает механизмы реализации этих повреждений до многообразных конечных эффектов, тестируемых на клеточном и организменном уровнях. Необходимо было в той или иной мере отразить физические процессы поглощения энергии, физико-химическое усиление начального поражения, структурные и функциональные исследования, феноменологию лучевого поражения, включая патогенез лучевой болезни. Хотелось также ввести читателя в «борьбу идей», существующую по многим кардинальным вопросам радиационной биологии, что сделало изложенный материал во многом дискуссионным. К сожалению, обилие экспериментальных работ, выполненных в рассматриваемых областях радиобиологии, не позволило достаточно подробно остановиться даже на наиболее важных из них и тем более дать полный перечень их авторов.

В написании раздела, посвященного модификации лучевого поражения, приняли участие Е. Н. Гончаренко, Г. Г. Афанасьев и И. И. Пелевина. Важные замечания по материалу книги были высказаны А. Б. Рубиным, Е. Ф. Романцевым, Л. Х. Эйдусом, В. И. Ивановым, Д. М. Спитковским и С. П. Ярмоненко — авторы выражают им благодарность.

ВВЕДЕНИЕ

Все живое существует и развивается в мире излучений — от высокоэнергетических гамма-квантов до низкочастотных радиоволн. Для биосферы Земли излучения — это источник энергии, способ получения информации, важнейший фактор изменчивости. Такие фундаментальные биологические процессы, как фотосинтез, фототаксис, фотопериодизм, зрение, радиационный мутагенез, в своей физической основе представляют особые случаи взаимодействия излучений с биологическими структурами.

Различные виды электромагнитных и корпускулярных излучений — важнейший инструмент познания живой материи. Современная биология немыслима без методов ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной спектрометрии, рентгеноструктурного анализа, ЭПР- и ЯМР-спектроскопии, лучевой ультрамикрометрии, световой и электронной микроскопии. Большинство наиболее впечатляющих успехов в познании структуры и свойств живой материи достигнуто благодаря широкому внедрению этих методов исследований.

В отличие от физиологических и биохимических исследований, которые в той или иной мере учитывают или используют уникальные свойства излучений, биофизические исследования главным образом направлены на расшифровку механизмов, лежащих в основе взаимодействия излучений с живой материей. Решение этой проблемы требует комплексного подхода, основанного, с одной стороны, на знании уникальных особенностей структурной и функциональной организации живого, а с другой — на учете физических принципов передачи энергии излучений, их дискретной природы и характера взаимодействия с атомами и молекулами, составляющими живую материю.

В таблице схематически представлен диапазон электромагнитного спектра от γ -лучей до радиоволн и указан характер биологического действия соответствующих видов излучения, а также перечислены наиболее распространенные методы биофизического анализа и получаемая с их помощью информация о структуре и свойствах биологических систем.

Специальная область биофизики — радиационная биофизика — исследует механизмы биологического действия ионизирующих излучений. К ионизирующим относятся корпускулярные излучения (ускоренные элементарные частицы и ядра различных элементов) и фотоны электромагнитного излучения (γ - и рентгеновское излучение с длиной волны менее 10 нм). Термин «ионизирующие» выбран для этой разнообразной по природе группы излучений для того, чтобы подчеркнуть наиболее характерное их свойство — способность непосредственно или косвенно вызывать ионизацию

атомов в веществе-поглотителе (таблица). Актуальность исследований биологического действия ионизирующих излучений продиктована по крайней мере тремя обстоятельствами: 1) все живые организмы подвергаются действию естественного радиационного фона, который составляют космические лучи и излучения радиоактивных элементов земной коры; 2) с появлением ядерных технологий и внедрением радиоактивных излучений в медицинскую практику возникла опасность облучения человека смертельными дозами радиации; 3) разработка эффективных методов лучевой терапии опухолей и других патологических состояний невозможна без средств направленного изменения чувствительности клеток и тканей к радиационному воздействию. В соответствии с этими практическими задачами в настоящее время интенсивно развиваются многие направления радиационной биологии: радиационная генетика и радиоэкология, радиационная биохимия и цитология, радиационная медицина и радиационная гигиена. В ряду этих исследований особое место принадлежит радиационной биофизике, так как ее задача — выяснение физико-химических и молекулярных механизмов первичных процессов лучевого поражения, протекающих с момента возникновения ионизированных и возбужденных атомов и молекул до появления видимых структурных и функциональных изменений. Для решения такой задачи необходим углубленный анализ процессов, происходящих на каждом этапе «размена энергии» излучения в живой системе, описание этих этапов в терминах молекулярных изменений и создание единой картины, отражающей всю последовательность реакций, приводящих к лучевому поражению.

Чтобы определить круг задач, стоящих перед современной радиационной биофизикой, необходимо кратко рассмотреть основные этапы развития представлений о механизме биологического действия ионизирующей радиации.

Мысль о том, что неизвестная ранее проникающая радиация может оказывать выраженное влияние на биологические процессы, возникла среди биологов вскоре после того, как Вильгельм Конрад Рентген описал свойства «Х-лучей» и продемонстрировал фотографию костей руки, сделанную с помощью открытого им излучения. Уже в 1896 г. было выполнено около тысячи работ, посвященных влиянию рентгеновского излучения на биологические объекты. Подводя итог этим работам, И. Р. Тарханов писал: «Х-лучами можно не только фотографировать, но и влиять на ход жизненных функций...» — таковы были первые радиобиологические обобщения.

1901 год приносит сообщения о выраженном действии на кожу лучей радия: лучевые ожоги кожи описали Анри Беккерель, первооткрыватель радиоактивности, Пьер Кюри и другие исследователи, работающие с радиоактивными минералами. Более грозные последствия облучения для человека выявились позднее, когда погибли многие техники, врачи и рентгенологи, системати-

Таблица

Действие электромагнитных излучений на биологические объекты

Название излучения	Диапазон длин волн, нм	Энергия излучений, эВ	Излучение как инструмент исследования структуры и свойств молекул	
			методы исследований	получаемая информация
Ионизирующее	0,03 и меньше, γ -лучи	больше $40 \cdot 10^3$	рентгеноструктурный анализ	изучение структуры молекул, расположения атомов в кристалле, формы молекул, измерение межатомных расстояний
	0,03—10, рентгеновские лучи	$40-0,12 \times 10^3$	лучевая ультрамикрометрия	определение размеров макромолекул, фагов, вирусов, внутреннего строения бактериальных спор, размеров генов, конформации белков, ДНК и ДНП
			радиационно-химические	исследование процессов радиолиза молекул
Ультрафиолетовое	10—400	120—3	спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области.	изучение переходов валентных электронов, электронной структуры, молекулярных колебаний и вращения молекул, внутреннего вращения
Видимое	400—760	3—1,7	Лазерная спектроскопия, исследования электронно-вращательных спектров фотохимические	исследование фотохимических процессов
Инфракрасное	0,76—200 10^3	2—0,006	инфракрасная спектроскопия	колебание атомов внутри молекул
Радиочастоты СВЧ (микроволновые излучения)	0,2— 10×10^6 1— 15×10^7 1,5— 30×10^8 3—100 10^9 (УВЧ) 0,1— 10^{12} (ВЧ) более 10^{13} (НЧ)	$6 \cdot 10^{-3}$ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ $1,2 \cdot 10^{-4}$ $6,2 \cdot 10^{-8}$ $6,2 \cdot 10^{-8}$ $4,1 \cdot 10^{-7}$ $4,1 \cdot 10^{-7}$ $1,2 \cdot 10^{-8}$ $1,2 \cdot 10^{-8}$ — $1,2 \cdot 10^{-10}$ ниже $1,2 \cdot 10^{-10}$	микроволновая спектрометрия спектроскопия ЭПР спектроскопия ядерного магнитного резонанса; диэлектрическая спектроскопия; методы электропроводности	вращение поляризованных молекул и групп резонанс неспаренных электронов, исследование радикалов, ион-радикалов и парамагнитных центров резонансное поглощение ядерными спинами, характеристика химического окружения атомов и молекул, изучение строения молекул по химическим сдвигам и спин-спиновому расщеплению сигнала; определение диэлектрической проницаемости и проводимости биологических систем, исследование свойств надмолекулярных структур и межмолекулярных взаимодействий

Предмет исследования	Биологическое действие излучений	
	некоторые особенности действия	эффект облучения
радиобиология	ионизирующая радиация обладает высокой проникающей способностью, фотоны излучения поглощаются всеми атомами и молекулами независимо от их химической структуры и локализации в клетке	образование ионов, радикалов, возбужденных и сверхвозбужденных атомов и молекул, образуются стабильные пораженные структуры; первичные радиационно-химические изменения усиливаются во времени за счет метаболических процессов и приводят в зависимости от дозы, способа и времени облучения к разрушению всех биохимических и физиологических процессов в клетке и организме
фотобиология	избирательное поглощение сравнительно невысокой энергии квантов строго зависит от молекулярной структуры вещества	эффект определяется фотохимическими реакциями с участием возбужденных молекул (или других, по которым передается энергия); в зависимости от типа молекул-реципиентов и условий облучения реакции носят либо полезный приспособительный характер (фототаксис, фотосинтез, зрение), либо приводят к разрушению и денатурации структур (бактерицидное действие, фотодинамический эффект и др.)
электромагнитная биология	область γ-дисперсии электропроводности; энергия электромагнитного поля поглощается за счет колебания ионов и релаксации дипольных молекул, в значительной мере переходит в тепловую; в дециметровом диапазоне возможно избирательное поглощение молекулами воды в биомембранах, а также резонансное поглощение водородными атомами; релаксация внутриклеточных органелл Максвелла—Вагнера (β-дисперсия электропроводности) и дипольных молекул белка; релаксация зарядов на мембранах (α-дисперсия электропроводности)	поглощение энергии электромагнитного поля может приводить к разрыву водородных и межмолекулярных связей, нарушению гидрофобного белок-липидного взаимодействия в биомембранах, изменению гидратации молекул, внутримолекулярным перестройкам, денатурации; в зависимости от интенсивности воздействия тепловой эффект может вызвать повреждение структур, нарушение физиологических процессов и даже гибель клеток и организма; в области УВЧ-диапазона возможно избирательное поглощение энергии дипольными молекулами белка и поляризация надмолекулярных структур

чески использовавшие ионизирующие излучения в терапевтических целях¹. В 1903 г. Е. С. Лондон описал летальное действие лучей радия, которые убивали животных на расстоянии: мыши гибли через 4—10 дней после облучения. Под влиянием работ Е. С. Лондона Хейнеке в Германии исследовал летальное действие рентгеновских лучей. Ему удалось вызвать гибель животных, которой предшествовало поражение кроветворной системы. В 1904 г. Пертес обнаружил появление хромосомных аберраций при облучении делящихся клеток; через год в работах Линзера и Хельбера было выявлено накопление в крови облученных животных «лейкотоксинов» — веществ, способных разрушать лейкоциты; в 1908 г. Бенжамин и Слюк обнаружили угнетение антителообразования, а Вернер (1909) — усиление автолитических процессов у облученных животных.

В этот период делаются первые важные обобщения: французские исследователи Бергонье и Трибондо на основании экспериментов с клетками, находящимися на разных стадиях дифференцировки, сформулировали в 1906 г. правило, согласно которому «ионизирующее излучение тем сильнее действует на клетки, чем интенсивнее они делятся и чем менее законченно выражена их морфология и функции». Начиная с 1910 г. большой цикл работ по выяснению роли обменных процессов в лучевом поражении выполняется М. И. Неменовым. Он приходит к интересному выводу о том, что в результате облучения возникают изменения в обмене веществ, сходные с наблюдаемыми при патологическом старении.

Роль обмена веществ в формировании лучевых реакций наглядно продемонстрировали Анцель и Витембергер в экспериментах с куриным эмбрионом, который выдерживался после облучения при различных температурах. Лучевое поражение развивалось в зависимости от интенсивности обменных процессов. Это наблюдение позволило авторам предсказать наличие трех существенных моментов в развитии лучевого поражения: 1) первичное радиационное повреждение; 2) факторы, способствующие проявлению этого повреждения; 3) восстанавливающие факторы. Так постепенно формировалось представление, согласно которому степень лучевого поражения определяется не только интенсивностью первичного повреждения, но и физиологическим состоянием организма и характером метаболических процессов.

Середина 20-х гг. ознаменовалась одним из крупных открытий в радиационной биологии: было обнаружено мутагенное действие рентгеновских лучей. Пионерские работы в этом направлении были предприняты Н. К. Кольцовым с сотр. и Г. А. Надсоном. В 1920—1925 гг. были опубликованы работы Г. А. Надсона и Г. С. Филиппова по появлению новых стабильных рас у дрож-

¹ В 1936 г. у здания Рентгеновского института в Гамбурге был открыт памятник, на котором высечены имена 169 человек — врачей, рентгенологов, физиков, химиков, лаборантов, ставших первыми жертвами облучения.

жей, подвергнутых радиационному воздействию. В этих экспериментах впервые было показано появление мутаций под влиянием облучения. Однако генетика дрожжей в то время была мало разработана, и авторам не удалось привести строгих доказательств индуцированного мутагенеза. Наиболее точные и обширные эксперименты по влиянию рентгеновских лучей на мутационный процесс были проведены Г. Мёллером на специально созданных культурах дрозофилы. Им были получены строгие доказательства возникновения мутаций под влиянием облучения. Впервые биологи получили возможность экспериментально воздействовать на наследственную изменчивость.

С открытием мутагенного действия излучений многие радиобиологи перешли к изучению единичной реакции дискретных биологических структур (генов, хромосом) на радиационное воздействие. В это же время значительно совершенствуются методы дозиметрии излучений, вводится ионизационная единица дозы — рентген. Появляется возможность количественного анализа биологического действия излучений, основанного на выяснении зависимости между наблюдаемым биологическим эффектом и дозой радиации, поглощенной изучаемой системой. Такие эксперименты проводились не только на ядерных наследственных структурах, но и на клонах клеток, вирусных частицах, препаратах ферментов. Результаты, полученные в точных количественных опытах, свидетельствовали о **вероятностном характере** проявления единичной реакции объекта в ответ на облучение в данной дозе радиации. Иначе говоря, при облучении однородных объектов (клетки одного клона, молекулы одного типа и т. д.) наблюдали, что при любой малой дозе радиации некоторое число объектов оказывается пораженным, а другие сохраняют исходные свойства; при самой большой дозе радиации небольшая доля объектов все еще остается непораженной. Кривые «доза — эффект» в этих случаях имели экспоненциальный характер и надежно экстраполировались к нулевой точке. Обнаруженный эффект нельзя было объяснить естественной вариабельностью: речь шла о генетически однородных клетках и вирусных частицах или молекулах одного типа. Его трактовка потребовала привлечения фундаментальных физических концепций, прежде всего представлений о вероятностном характере поглощения энергии излучений, о дискретной природе частиц, составляющих ионизирующие излучения, о физически микрогетерогенной организации биологических структур.

По-видимому, этот период (конец 20-х гг.) следует считать датой рождения радиационной биофизики, так как впервые для объяснения радиобиологических феноменов и создания общей теории биологического действия ионизирующих излучений в качестве отправных концепций потребовалось использовать теоретические положения квантовой механики и ядерной физики. Одним из первых это сделал Ф. Дессауэр в своей теории «точечного нагрева». Ионизирующие излучения обладают малой объемной плот-

ностью, однако отдельные фотоны несут гигантский запас энергии. Исходя из этого, Ф. Дессауэр предположил, что при поглощении системой относительно небольшой общей энергии (смертельная для человека доза облучения вызывает нагрев тела всего на $0,001^{\circ}\text{C}$) некоторые дискретные микрообъемы поглощают настолько большие порции энергии, что действие ионизирующих излучений можно сравнить с микролокальным нагревом, вследствие которого возникают глубокие структурные изменения и в конечном счете биологическое поражение. Вероятностный характер проявления эффекта у отдельных объектов автор гипотезы объяснял статистическим распределением «точечного тепла». Так впервые статистический принцип попадания был введен в радиобиологию. Дальнейшее его развитие связано с работами Дж. Кроутера, Д. Ли, Р. Циммера, Н. В. Тимофеева-Рессовского, В. И. Коргодина.

Работы этого периода оказали большое влияние на дальнейшее развитие радиационной биофизики, превратили ее в одну из самых точных биологических дисциплин. Математический аппарат, развитый в этих работах, позволяет с достаточной надежностью судить о «пусковых событиях», приводящих к регистрируемым в эксперименте биологическим реакциям (мутации, гибель клетки и др.); оценивать параметры «мишени», ответственной за наблюдаемый радиобиологический эффект.

Наряду с успехами количественных исследований интересные результаты были получены в 40-е гг. при анализе физико-химической природы процессов, происходящих в период между первичной абсорбцией энергии излучения и конечным биологическим эффектом. Было обнаружено зарождение в облучаемом растворе высокоактивных продуктов радиолиза воды — свободных радикалов, способных диффундировать на значительные расстояния и поражать биологические структуры. Радиационная биофизика начинает оперировать представлениями о «непрямом действии» излучения, опосредованном активными продуктами радиолиза воды; были изучены физико-химические свойства первичных продуктов радиолиза воды и характер их взаимодействия с макромолекулами клетки. Эти исследования были выполнены в содружестве со специалистами в области радиационной химии. Полученные данные породили гипотезы о возможности ослабления лучевого поражения за счет введения в систему веществ — перехватчиков свободных радикалов, конкурирующих с биологическими структурами за продукты радиолиза воды.

И действительно, В. Дейлу в 1942 г. удается снизить поражающее действие радиации на ферменты введением в раствор ряда веществ — перехватчиков радикалов. В 1948 г. был получен аналогичный защитный эффект в опытах с бактериофагами. Эти работы логически привели радиобиологов к открытию, практическую важность которого трудно переоценить: в 1949 г. была доказана способность ряда веществ защищать млекопитающих от луче-

вого поражения. В опытах Х. Патта с соавторами введение цистина за 10 мин до облучения защищало крыс от действия смертельной дозы радиации; З. Бак и А. Эрв обнаружили аналогичное действие цианида на мышах. Начинается интенсивный поиск эффективных радиозащитных препаратов во многих лабораториях мира. Формируется самостоятельное направление радиационной биофизики — выяснение механизмов модифицированной радиочувствительности биологических объектов. Помимо практической значимости эти работы представляли теоретический интерес, поскольку были детально исследованы многие физико-химические процессы как возможная точка приложения радиозащитного агента. Так, наблюдения, согласно которым многие эффективные радиозащитные препараты снижают содержание кислорода в тканях животных, стимулировали углубленные исследования роли молекулярного кислорода в лучевом поражении (работы Н. Н. Суворова, П. Г. Жеребченко, С. П. Ярмоненко в нашей стране; Л. Грея, Д. Кейтера, Х. Лангендорфа и других авторов за рубежом). Первоначально были высказаны гипотезы, связывающие защиту исключительно с инактивацией свободных радикалов и торможением свободнорадикальных окислительных процессов. Эти гипотезы находили хорошее подтверждение в модельных экспериментах на простых молекулярных системах. Однако для сложных биологических систем такого объяснения было явно недостаточно.

Анализ многогранных физиологических и биохимических изменений, возникающих в тканях животных после введения радиозащитных соединений, привел в середине 60-х гг. З. Бака и П. Александера к формулировке гипотезы «биохимического шока», согласно которой различные радиопротекторы односторонне изменяют метаболические процессы, переводя клетки в состояние повышенной устойчивости к действию ионизирующей радиации. В дальнейшем появился ряд обширных исследований, посвященных анализу конкретных биохимических изменений, возникающих под влиянием радиозащитных агентов и способных изменять радиорезистентность организма. Так, возникли гипотезы «комплексного биохимического механизма действия радиозащитных средств» (Е. Ф. Романцев), «сульфгидрильная гипотеза» (Э. Я. Граевский и др.).

Несмотря на стремление некоторых исследователей придать исключительное значение какому-то одному фактору, экспериментальные данные указывают на существование альтернативных путей реализации защитного эффекта даже для одного и того же радиопротектора. В 70-е гг. Ю. Б. Кудряшов и Е. Н. Гончаренко установили, что различные радиозащитные агенты к моменту своей максимальной эффективности снижают в тканях животных уровень продуктов перекисного окисления липидов — природных сенсibilизаторов лучевого поражения — и увеличивают содержание биогенных аминов, которые наряду с тиолами относятся

к природным противолучевым веществам. На основании этих данных авторы предложили гипотезу «эндогенного фона радиорезистентности».

Эти исследования привели к накоплению обширного фактического материала по общей картине лучевого поражения и его модификации, позволили наметить пути к выяснению основных закономерностей зарождения «пусковых», «запальных» физико-химических процессов, механизмов ослабления или усиления первичных лучевых реакций. В результате на первый план выдвинулись исследования, посвященные анализу физико-химических процессов, протекающих в клетке от момента возникновения начальных структурных повреждений до проявления выраженных биохимических и морфологических изменений. С этой целью анализируется модифицирующее действие кислорода, температуры и других агентов, влияющих на развитие лучевого поражения биологических объектов. Большое число работ посвящается проблеме миграции энергии и заряда в облученной системе, анализируется роль свободных радикалов, относительный вклад прямого и непрямого действия ионизирующей радиации.

Значительный вклад в расшифровку биофизических механизмов лучевого поражения внесли работы Б. Н. Тарусова. Согласно выдвинутой им теории немногочисленные первичные повреждения инициируют цепные процессы окисления, в которые вовлекаются множественные субклеточные структуры. Такая теория физико-химического механизма усиления начального радиационного повреждения позволила объяснить многие радиобиологические феномены: развитие процессов лучевого поражения во времени, влияние температуры, газового состава атмосферы и т. д. Начинается поиск субстратов, в которых с наибольшей вероятностью могут протекать окислительные процессы, инициируемые облучением.

В середине 50-х гг. Ю. Б. Кудряшов обнаружил, что высшие ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточных липидов, обладают значительной уязвимостью к радиационному воздействию, а продукты перекисного окисления липидов во многом имитируют действие излучения на разнообразных биологических объектах и системах (автор показал радиомиметическое и радиосенсибилизирующее действие продуктов окисления высших ненасыщенных жирных кислот). Эти и другие исследования позволили предположить, что в результате облучения происходит активное вовлечение липидов биомембран в процессы перекисного окисления, приводящее впоследствии к множественным поражениям и гибели клетки. Б. Н. Тарусов обосновал предположение о том, что в норме окислительные процессы в тканевых липидах протекают на низком уровне и находятся в стационарном режиме. После облучения процессы окисления могут переходить в нестационарный режим и вовлекать различные компоненты внутриклеточных мембранных структур, обуславливая динамику лучевого пораже-

ния. Для развития этих представлений большое значение имели классические исследования механизмов окислительных реакций, проведенные Н. Н. Семеновым и его школой. В настоящее время значительное число работ Н. М. Эмануэля, Е. Б. Бурлаковой и ряда других авторов посвящено выяснению механизмов окисления липидов, в первую очередь индуцированного ионизирующей радиацией.

В последние годы значительных успехов добилась молекулярная радиобиология (прежде всего в расшифровке механизма лучевой инактивации ферментов и нуклеиновых кислот), использовавшая весь экспериментальный арсенал, накопленный ею за два десятилетия бурного развития. Сформировалось новое, молекулярное, направление радиационной биофизики, которое основывается на фундаментальных физических и квантовомеханических принципах, опыте количественной радиобиологии и новейших открытиях молекулярной биологии о причинно-следственных отношениях между структурой и биологическими функциями макромолекул. Феномен клеточного восстановления от радиационного поражения, описанный в 60-е гг. благодаря развитию методов культивирования клеток, начинает приобретать объяснение на молекулярном уровне: был открыт и детально проанализирован механизм репарации радиационных повреждений ДНК. Это крупнейший вклад радиобиологии в науку о живом. Оказалось, что в клетках функционирует сложнейшая ферментативная система, поддерживающая структурную целостность генома. Эти ферменты способны распознавать и исправлять дефекты структуры ДНК, возникающие вследствие радиационного воздействия. Функционирование репаративных систем зависит от состояния внутриклеточного метаболизма, интенсивности энергетических процессов. Становится понятным молекулярный механизм известных радиобиологических эффектов, таких, как зависимость лучевого поражения от условий пострадиационного культивирования клеток, состояния метаболических систем и других физиологических факторов. Для современной радиационной биофизики становится общепринятым рассмотрение конечного радиобиологического эффекта как результата интерференции двух противоположно направленных процессов: реализации первичного поражения и его восстановления репаративными системами. Все большее распространение получает структурно-метаболическая теория лучевого поражения, развиваемая А. М. Кузиным.

В 70-е гг. появляются интересные исследования, посвященные формально-статистическому анализу радиобиологических процессов. Эти работы основываются на достижениях количественной радиационной биофизики и современных представлениях о динамическом характере формирования лучевого поражения. На смену классическим представлениям о наличии статичной мишени, попадание в которую однозначно приводит к тестируемому биологическому эффекту облучения, приходят динамические модели, учи-

тывающие вероятность реализации повреждений и их восстановления за счет протекания репаративных процессов. Такова «стохастическая гипотеза» О. Хуга и А. Келлерера, «вероятностная модель» Ю. Г. Капульцевича. Разработанные в этих исследованиях математические построения позволяют на основании экспериментальных кривых «доза—эффект» получать информацию о характере пусковых событий лучевого поражения и особенностях их реализации в клетках.

Во многих радиационно-биофизических исследованиях рассматривается вопрос о степени специфичности ответной реакции биологических систем на радиационное воздействие. В 60-е гг. В. П. Парибок высказал предположение, согласно которому известная способность репаративных систем устранять радиационные повреждения ДНК — это лишь одно из проявлений неспецифической реакции живой системы на повреждающее воздействие. Иначе говоря, предполагается, что в клетках существуют системы, поддерживающие нативное состояние ее структур и реагирующие на любое повреждающее воздействие. В исследованиях Л. Х. Эйдуса, продолжающихся в настоящее время, анализируется биофизический механизм неспецифической реакции клеток на повреждающие воздействия, к которым автор наряду с ионизирующей радиацией относит и действие различных радиопротекторов. Согласно развиваемой им гипотезе под влиянием повреждающего агента возникают однотипные изменения, включающие нарушение мембранного транспорта и соответствующих градиентов концентрации низкомолекулярных соединений, которые локально накапливаются в компартментах клеток, сорбируются на макромолекулах и изменяют их конформационную подвижность. В конечном итоге может наступить состояние паранекроза, обратимое при умеренно повреждающих воздействиях. При этом изменяется соотношение скоростей конкурирующих между собой процессов реализации и репарации «скрытых повреждений» в уникальных структурах, ответственных за гибель клеток.

Представления о молекулярных механизмах неспецифической реакции клеток на повреждающие воздействия безусловно нуждаются в дальнейшей конкретизации. Однако сама постановка вопроса о неспецифичности рассматриваемых радиационной биофизикой процессов и систем позволяет рассматривать известные радиобиологические феномены как одно из проявлений общебиологической реакции живых систем на любые повреждающие воздействия. Это означает, что методологические подходы, математический аппарат и методические приемы, накопленные радиационной биофизикой, приобретают важное значение для современной биологии в целом.

В кратком обзоре трудно перечислить все направления, по которым развивается радиационная биофизика. Много интересных исследований выполняется на простых модельных системах. Полученный на них экспериментальный материал пока еще находит-

ся в отрыве от работ, проведенных на клетках и целостном организме. В настоящее время намечается объединение этих крайних полюсов ценнейшей информации. Очевидно, в этом — ближайшее будущее радиационной биофизики. Можно ожидать, что синтез физико-химических, молекулярных и традиционных биологических (радиобиологических) подходов позволит вскоре ответить на ключевой вопрос радиационных исследований: каков механизм первичных пусковых процессов лучевого поражения и как наиболее эффективно управлять им.

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭНЕРГИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА ПОГЛОЩЕНИЯ ЭНЕРГИИ

Прохождение через вещество фотонов рентгеновского или γ -излучения, потока нейтронов, электронов или ускоренных ядер элементов может привести к поглощению части энергии этим веществом. При облучении живой материи мы наблюдаем определенные биологические последствия радиационного воздействия. Тестируемый биологический эффект — результат поглощения энергии излучения атомами и молекулами, составляющими клетки и ткани. Иначе говоря, в радиобиологии выполняется общий принцип Гроттгуса, согласно которому только та часть энергии излучения может вызвать изменения в веществе, которая поглощается этим веществом; отраженная или проходящая энергия не оказывает никакого действия.

При прохождении ионизирующих частиц в веществе выделение энергии происходит в отдельных редкорасположенных микрообъемах, так как обмен энергией между фотонами излучения и атомами поглотителя носит дискретный вероятностный характер. Во многих облучаемых областях излучение вообще не передает энергию веществу. Эти области, следовательно, «не знают» о том, что облучение имело место, и испытывают лишь вторичное воздействие измененных структур, поглотивших энергию. Дискретный характер поглощения энергии приводит к необходимости представления ряда радиационных величин в терминах статистики. Статистические флуктуации радиационных величин существенны, следовательно, действие излучения должно определяться фактическими, а не средними значениями (математическим ожиданием) соответствующих величин. Поэтому стохастические величины рассматриваются в радиобиологии наряду с нестохастическими.

Энергия, переданная излучением веществу, является стохастической величиной и определяется по формуле

$$\varepsilon = \Sigma E_1 - \Sigma E_2 - \Sigma Q, \quad (I-1)$$

где ΣE_1 — сумма энергий (исключая энергию покоя) всех ионизирующих частиц, которые вошли в данный объем; ΣE_2 — сумма энергий (исключая энергию покоя) всех ионизирующих частиц, которые покинули объем; ΣQ — сумма всей энергии, освобожденной в любых превращениях ядер и элементарных частиц

внутри объема, за вычетом суммы всей энергии, затраченной в этих превращениях.

Частное от деления ϵ (энергии, переданной ионизирующим излучением элементу объема) на m (массу вещества в этом объеме) называют удельной переданной энергией Z :

$$Z = \epsilon/m. \quad (I-2)$$

Стохастическая величина — удельная переданная энергия — может значительно отклоняться от нестохастической величины — поглощенной дозы (D). Предел Z при приближении массы к нулю есть D :

$$D = \lim_{m \rightarrow 0} Z. \quad (I-3)$$

Альтернативным определением величины поглощенной дозы D может рассматриваться соотношение

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm}, \quad (I-4)$$

где $d\bar{\epsilon}$ — ожидаемая (нестохастическая) величина переданной энергии, т. е. средняя энергия, переданная ионизирующим излучением веществу в элементе объема, а dm — масса вещества в этом объеме.

Специальной единицей поглощенной дозы является грэй (Гр). $1 \text{ Гр} = 1 \text{ Дж} \cdot \text{кг}^{-1}$.

Мощность поглощенной дозы D' — частное от деления dD на dt , где dD — приращение поглощенной дозы за интервал времени dt :

$$D' = \frac{dD}{dt}. \quad (I-5)$$

Специальной единицей мощности поглощенной дозы служит частное от деления грея на единицу времени ($\text{Гр} \cdot \text{с}^{-1}$, $\text{Гр} \cdot \text{ч}^{-1}$).

Объективные методы количественной оценки поглощенной энергии ионизирующих излучений разрабатываются специальной областью измерительной техники — дозиметрией ионизирующих излучений¹. Существуют различные методы дозиметрии.

Метод ионизационной камеры. Локальную поглощенную энергию можно измерить с помощью ионизационной камеры на основании принципа Брега—Грэя. Если среда пересекается пучком фотонов и в ней имеется небольшая полость, размеры которой достаточно малы по сравнению с пробегом возникающих электронов, то ионизация, происходящая в такой полости, связана с энергией, по-

¹ Подробнее о методах дозиметрии см.: Практикум по общей биофизике, вып. 5 Под ред. Б. Н. Тарусова. М., Высшая школа, 1961.

Теория и методы микродозиметрии описаны в кн.: Иванов В. И., Лысов В. Н. Основы микродозиметрии. М., Атомиздат, 1979.

глощенной в окружающем полость веществе, соотношением

$$\frac{\Delta E}{\Delta m} = S_m \omega N, \quad (I-6)$$

где $\frac{\Delta E}{\Delta m}$ — энергия, поглощенная единицей массы вещества;

N — число пар ионов, образованных в единице массы полости;
 ω — средняя энергия, затрачиваемая на образование одной пары ионов в газе, которым заполнена полость. Величина S_m носит название массовой тормозной способности и зависит от энергии излучения, характера среды и газа, которым заполнена полость.

Калориметрический метод. Основан на измерении количества тепла, создаваемого поглощенной дозой излучения.

Сцинтилляционный метод. Световой выход ряда веществ (сцинтилляторов) линейно зависит от поглощенной дозы в достаточно широком диапазоне доз. Такие вещества в сочетании с фотоэлектронным умножителем используют в качестве дозиметров. В каждом случае стараются максимально приблизить химический состав вещества-поглотителя и сцинтиллятора, т. е. сделать его «ткане-эквивалентным».

Химические методы. Любую радиационно-химическую реакцию, выход которой зависит от дозы ионизирующего излучения, можно использовать для определения поглощенной дозы. Необходимо, чтобы такая реакция не зависела от мощности дозы, от плотности ионизации и могла происходить в системах, по составу близких к биологическим тканям. Тип выбираемой реакции определяется диапазоном измеряемых доз. Так, дозы более 10^6 Гр определяют по окрашиванию кристаллов и стекол, дозы от 10^4 до 10^5 Гр — по реакциям в жидкой фазе, дозы менее 10^4 Гр — по обесцвечиванию ряда красителей. Один из наиболее распространенных химических дозиметров — «дозиметр Фрике», действие которого основано на измерении количества ионов Fe^{3+} , образовавшихся в результате облучения водных растворов двухвалентного железа.

Пользуясь количественными методами дозиметрии, можно установить зависимость между величиной поглощенной энергии и степенью биологического действия излучения, например определить минимальную поглощенную дозу, вызывающую гибель различных видов млекопитающих. Установлено, что поглощение 10 Гр ионизирующей радиации достаточно для возникновения острой формы лучевой болезни и последующей гибели большинства млекопитающих и в том числе человека. Согласно определению доза в 1 Гр соответствует поглощению 1 Дж энергии 1 кг ткани. Следовательно, смертельная для млекопитающих доза ионизирующей радиации (10 Гр) приводит к поглощению одним граммом ткани 10^5 эрг энергии излучения. Удивительно, что столь незначительная порция энергии вызывает фатальные последствия для организма. Если такое же количество энергии сообщить ткани не в виде потока ионизирующих частиц, а квантами теплового (инфракрасного) излуче-

ния, то регистрируемым результатом воздействия будет незначительное повышение температуры тела — всего на $0,002^\circ$. Вряд ли такое повышение температуры тела хоть как-то скажется на состоянии организма. Этот «энергетический парадокс» указывает на глубокое несоответствие между количеством энергии, оставляемой в тканях ионизирующим излучением, и теми биологическими последствиями, к которым приводит облучение.

Следовательно, регистрация величины поглощенной дозы ничего не говорит о причинах необыкновенно высокой биологической эффективности ионизирующих излучений. Необходимо отчетливо представлять элементарные физические процессы, в результате которых осуществляется передача энергии ионизирующих частиц атомам и молекулам вещества.

Механизм поглощения рентгеновского и γ -излучения

Рентгеновское излучение — высокоэнергетическое электромагнитное излучение, которое генерируется при торможении ускоренных электронов в кулоновском поле ядер атомов вещества-поглотителя.

В соответствии с законами электродинамики электрон, испытывающий торможение, теряет часть своей энергии за счет излучения:

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_{\text{радиация}} \sim Z^2 E_k N, \quad (I-7)$$

где E_k — кинетическая энергия электрона, Z — заряд ядра материала поглотителя, N — число атомов в 1 см^3 поглотителя.

Из соотношения (I-7) следует, что энергия квантов рентгеновского излучения пропорциональна кинетической энергии электрона и находится в квадратичной зависимости от атомного номера материала поглотителя. Это учитывается при конструировании рентгеновских трубок (рис. I-1), в которых электроны приобретают большой запас кинетической энергии при ускорении в электрическом поле, создаваемом за счет приложения высокого напряжения (сотни тысяч вольт) между катодом и анодом. Анод изготавливают из материалов с большим атомным номером, так как именно в кулоновском поле атомов анода и происходит торможение ускоренных электронов. При бомбардировке анода электронами только 0,2% их кинетической энергии испускается в виде квантов рентгеновского излучения, остальная энергия рассеивается в виде тепла. Поэтому необходимо надежное охлаждение рентгеновских трубок.

Для некоторых экспериментальных исследований в качестве источника рентгеновского излучения используют бетатроны, в которых электроны могут ускоряться до околосветовых скоростей.

γ -Излучение — коротковолновое электромагнитное излучение с дискретным спектром, возникающее при изменении энергетического состояния атомного ядра или аннигиляции частиц.

Во многих биологических исследованиях в качестве источника γ -излучения используют радиоактивный изотоп кобальта ^{60}Co (так называемая «кобальтовая пушка»); в этом случае γ -кванты генерируются в процессе радиоактивного распада ^{60}Co до ^{60}Ni . Возбужденное ядро никеля переходит в стабильное состояние с последовательным испусканием двух квантов с энергией 1,17 и 1,33 МэВ¹.

Рентгеновское и γ -излучение по своей физической природе относятся к высокочастотным (коротковолновым) электромагнитным излучениям. Частота их квантов, и соответственно энергия, в десятки

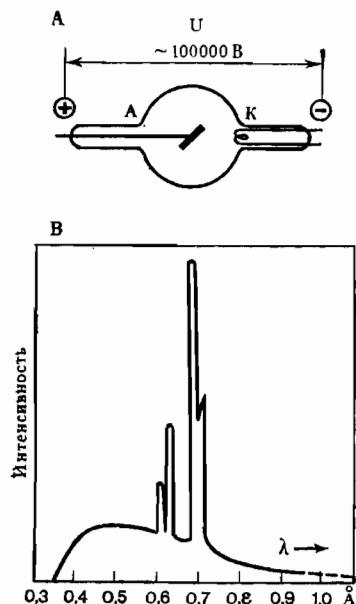


Рис. 1—1. Рентгеновская трубка: А — принципиальная схема включения трубки — источник высокого напряжения (U) включается между анодом (А) и катодом (К); В — спектр излучения трубки с молибденовым антикатодом

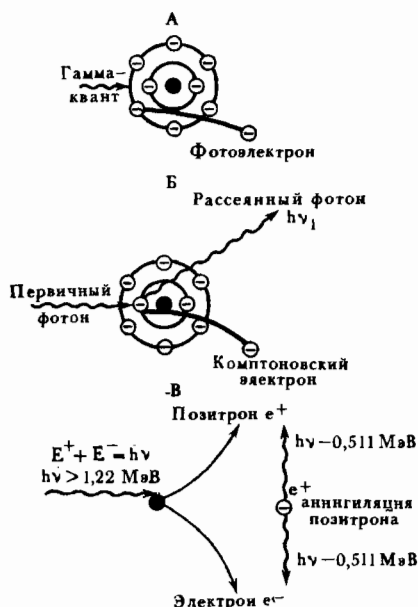


Рис. 1—2. Схема основных процессов поглощения энергии фотонов рентгеновского и γ -излучения (по Фриц-Ниггли, 1961): А — фотоэффект, Б — эффект Комптона, В — эффект образования электроинно-позитронных пар

и сотни тысяч раз выше, чем у квантов ультрафиолетового излучения.

Используя различные источники, можно получить рентгеновские и γ -кванты сравнимой энергии, которые будут оставлять в тканях одинаковое количество энергии и образовывать одно и то же число ионов на единицу пути. Следовательно, различие этих

¹ Энергию квантов излучения принято измерять в электрон-вольтах — эВ, тысячах эВ — кэВ, миллионах эВ — МэВ, миллиардах эВ — ГэВ.

двух видов излучения связано лишь с происхождением: рентгеновские лучи генерируются при торможении ускоренных электронов в кулоновском поле ядер атомов, а γ -излучение испускается возбужденными ядрами или возникает при аннигиляции частиц.

Поглощение рентгеновского и γ -излучения в веществе подчиняется закону

$$I = I_0 e^{-NSI}, \quad (I-8)$$

где I и I_0 — соответственно значения интенсивности излучения до и после прохождения через слой толщины l ; N — число поглощающих частиц; S — сечение процесса, характеризующее вероятность поглощения.

Энергия квантов рентгеновского и γ -излучения поглощается веществом в результате одного из следующих процессов.

Фотоэлектрический эффект (фотоэффект) состоит в том, что квант излучения полностью передает энергию атому; этой энергии достаточно для того, чтобы атом испустил электрон (рис. I-2, А). В результате фотоэффекта из атома высвобождается электрон, обладающий запасом кинетической энергии, равным энергии падающего кванта $h\nu$ за вычетом энергии связи электрона с соответствующим атомом или молекулой:

$$E_{\text{кин электрона}} = h\nu - E_{\text{связи}}. \quad (I-9)$$

Вероятность фотоэффекта зависит от энергии падающего кванта и атомного номера поглощающей среды. Сечение процесса определяется по формуле

$$S_{\phi} = (2,04 \cdot 10^{-30}) \frac{Z^3}{E^3} (1 + 0,008 Z), \quad (I-10)$$

где Z — заряд ядра атома, E — энергия кванта в МэВ. Как видно из уравнения (I-10), с увеличением атомного номера растет вероятность фотоэффекта, а для одной и той же среды вероятность процесса обратно пропорциональна величине энергии кванта ($S \sim 1/E^3$).

Эффект Комптона можно рассматривать как результат упругого соударения кванта излучения со свободным электроном (рис. I-2, Б). При этом квант отдает электрону не всю энергию, а лишь некоторую ее часть, причем сам он продолжает движение в качестве рассеянного кванта в новом направлении и с меньшей энергией. В отличие от фотоэлектрона комптон-электрон (его еще называют электроном отдачи) приобретает не всю энергию первичного кванта.

Истинный коэффициент комптоновского поглощения на электрон определяется по формуле Клейна—Нишины:

$$\begin{aligned} \sigma_a = \frac{2\pi e^4}{m^2 c^4} & \left\{ \frac{2(1+2a)^2}{a^2(1+2a)} - \frac{1+3a}{(1+2a)^2} + \frac{(1+a)(1+2a-2a^2)}{a^2(1+2a)^3} \right. \\ & \times \frac{4a^2}{3(1+2a)^3} - \left. \left(\frac{1+a}{a^3} - \frac{1}{2a} + \frac{1}{2a^3} \right) \lg(1+2a) \right\}, \quad (I-11) \end{aligned}$$

где $e = 4,802 \cdot 10^{-10}$ — заряд электрона; $a = h\nu/mc^2$; ν — частота падающего кванта; $m = 9,107 \cdot 10^{-28}$ — масса электрона; $c = 299\,790$ км/с — скорость света; $h = 6,62 \cdot 10^{-27}$ эрг·с — постоянная Планка.

Определив величину $e\sigma_a$ для кванта определенной энергии и умножив этот коэффициент на число электронов, находящихся в 1 г ткани, получим величину комптоновского поглощения на 1 г ткани (так называемый массовый коэффициент комптоновского поглощения). Как видно из табл. I-1, электронный коэффициент комптоновского поглощения возрастает с увеличением энергии кванта излучения. Следовательно, с увеличением энергии падающих квантов увеличивается число комптоновских электронов и уменьшается число фотоэлектронов (уравнение I-9 для сечения фотоэффекта).

Таблица I-1

Электронные коэффициенты комптоновского поглощения
(по Фриц — Ниггли, 1961)

Энергия квантов, $h\nu$, КэВ	$a = h\nu/mc^2$	$e\sigma_a \cdot 10^{28}$	Энергия квантов, $h\nu$, КэВ	$a = h\nu/mc^2$	$e\sigma_a \cdot 10^{28}$
5,108	0,01	0,0638	137,9	0,27	0,7812
25,54	0,05	0,2731	199,2	0,39	0,8793
45,98	0,09	0,4276	306,5	0,6	0,9562
76,62	0,15	0,5914	715,2	1,4	0,9711

Таблица I-2

Комптоновские и фотоэлектроны, возникающие в воде при облучении рентгеновскими и γ -лучами
(по Ли, 1963)

Длина волны излучения, λ , Å	Энергия квантов, E, КэВ	Вклад в полное число электронов для	
		фотоэлектронов	комптоновских электронов
2,4265	5,108	0,994	0,006
0,4853	25,542	0,676	0,424
0,2696	45,975	0,195	0,805
0,1618	76,625	0,052	0,948
0,0899	137,92	0,010	0,990
0,0622	199,22	0,004	0,996
0,04044	306,50	0,001	0,999

В табл. I-2 представлены данные об относительном числе фото- и комптоновских электронов, образующихся при облучении воды рентгеновскими и γ -лучами.

В воде и биологических тканях поглощение излучения с энергией квантов более 300 кэВ в основном происходит за счет эффекта Комптона.

В результате нескольких последовательных комптоновских взаимодействий энергия кванта снижается настолько, что он уже может полностью поглотиться в результате фотоэффекта.

Если энергия падающего кванта превышает 1,022 МэВ, становится возможным третий тип взаимодействия — эффект образования пар.

Электронно-позитронные пары возникают в результате взаимодействия кванта излучения с ядерными полями. Квант высокой энергии, приближаясь к полю ядра атома, исчезает, и одновременно возникает пара элементарных частиц позитрон—электрон (рис. 1-2 В): $h\nu \rightarrow e^+ + e^-$.

Вся энергия падающего кванта используется на образование пары, причем энергия, равная 1,022 МэВ, всегда преобразуется в «массу покоя» элементарных частиц, а остаток — в их кинетическую энергию. Суммарную кинетическую энергию пары

$$E_{\text{кин}e^-} + E_{\text{кин}e^+} = h\nu - 1,022 \text{ (МэВ)} \quad (\text{I-12})$$

можно условно разделить поровну между электроном и позитроном, но в действительности она зависит от углов их эмиссии.

Образование пары может закончиться аннигиляцией электрона и позитрона, в результате образуется γ -квант, способный передать энергию веществу за счет комптоновского и фотоэффекта.

Вероятность рождения пары электрон—позитрон увеличивается с ростом энергии кванта и пропорциональна Z^2 . В биологических системах этот эффект выражен слабо, так как средний эффективный атомный номер Z имеет малые значения.

Относительная частота трех перечисленных процессов поглощения веществом квантов ионизирующего излучения показана на рис. 1-3.

Как видно из рисунка, кванты с энергией 10—100 кэВ в биологических тканях поглощаются преимущественно за счет фотоэффекта, в диапазоне энергий 0,3—10 МэВ основной тип взаимодействия — эффект Комптона, а при энергиях квантов более 10 МэВ начинает преобладать эффект образования пары электрон—позитрон. Аннигиляция пары приводит к образованию γ -кванта с энергией 0,511 МэВ (рис. 1-2), который теряет свою энергию в результате комптоновского и фотоэффекта. Поэтому в даль-

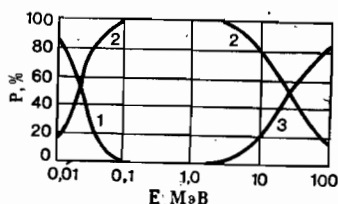


Рис. 1—3. Относительная частота фотоэлектрического эффекта и образования пар в углероде (по Фано, 1954): 1 — фотоэффект, 2 — комптоновский эффект, 3 — образование пар

нейшем мы ограничимся рассмотрением характера взаимодействия с веществом фото- и комптоновских электронов.

Поглощение квантов электромагнитного излучения высокой энергии приводит к возникновению в веществе небольшого числа атомов, утративших электроны. Эта первичная ионизация — следствие фото- и комптоновского эффектов. Высвободившиеся электроны обладают огромным запасом кинетической энергии (к ним перенесена большая часть энергии падающего кванта) и могут многократно взаимодействовать с атомами и молекулами, отдавая энергию на их ионизацию и возбуждение. Так продолжается до тех пор, пока энергия свободного электрона не снизится до того минимального уровня, при котором электрон уже сможет поглотиться нейтральным атомом с образованием отрицательного иона. Каждый первичный электрон от момента своего рождения до захвата нейтральным атомом или молекулой многократно взаимодействует с атомами, расположенными вдоль направления его движения, генерируя большое число вторичных электронов. Распределение энергии вторичных электронов точно может быть рассчитано лишь для атома водорода. Для более сложных молекул возможны лишь качественные рассуждения (подробнее см. главу III). В среднем около 70% энергии первичных электронов переносится к вторичным электронам, обладающим энергией, достаточной для того, чтобы индуцировать дальнейшую ионизацию. Остальные 30% энергии первичного электрона расходуются на возбуждение молекул и высвобождение электронов с «нулевой» кинетической энергией. Незначительная доля энергии затрачивается на тормозное излучение. Следовательно, перенос веществу энергии квантов излучения осуществляют главным образом высокоэнергетические вторичные электроны.

Первичная ионизация при действии рентгеновского или γ -излучения пренебрежимо мала по сравнению с тем количеством ионизированных и возбужденных атомов, которое возникает в результате взаимодействия вторичных электронов с веществом. Поэтому фотоны рентгеновского и γ -излучения следует относить к косвенно ионизирующим частицам, высвобождающим в веществе непосредственно ионизирующие частицы — высокоэнергетические вторичные электроны.

Поглощение нейтронного излучения

Нейтронное излучение представляет собой поток элементарных частиц с массой 1,0089 атомной единицы и нулевым зарядом. Нейтронные излучения в зависимости от энергии частиц подразделяются на группы: быстрые, промежуточные и медленные нейтроны.

Вследствие электронейтральности нейтроны не взаимодействуют с кулоновскими полями атомов и молекул и могут проходить

значительные расстояния в веществе, мало отклоняясь от первоначального направления. Нейтрон, не имея заряда, тем не менее вызывает ионизацию атомов и молекул. Происходит это за счет косвенных эффектов, связанных со следующими типами взаимодействия нейтронов с ядром атома.

Упругое рассеяние — результат соударения нейтрона с ядром атома. Кинетическая энергия нейтрона распределяется между ним и «ядром отдачи» согласно уравнению

$$E = \frac{4(m_n/M)}{1 + m_n/M} E_n \cos^2 \theta, \quad (\text{I-13})$$

где m_n и E_n — масса и энергия нейтрона, M и E — масса и энергия ядра отдачи, θ — угол между направлением движения падающего нейтрона и ядра отдачи. Из уравнения (I-13) следует, что ядру отдачи передается максимальная энергия, если это ядро имеет минимальную массу M . Значит, в результате упругого рассеяния наибольшее количество энергии нейтронного излучения поглощает водород ($M=1$). Поэтому для экранирования нейтронных источников используют не свинец, а материал, богатый водородом, например парафин.

Биологические ткани богаты водородом, следовательно, в результате нейтронного облучения в них появляются ядра водорода, обладающие значительным запасом кинетической энергии, — так называемые «протоны отдачи». Эти протоны, обладая электрическим зарядом, могут взаимодействовать с электронными оболочками атомов, вызывая ионизацию. Упругое рассеяние нейтронов в тканях можно рассматривать как способ генерирования в глубине биологического объекта протонного излучения.

В биологических тканях нейтроны с энергией от 20 до 0,5 МэВ передают протонам отдачи соответственно от 78 до 96% своей энергии.

Неупругое рассеяние нейтронов состоит в том, что часть их энергии идет на сообщение ядру запаса кинетической энергии, а часть — на возбуждение ядра. Возбужденное ядро переходит в основное состояние с испусканием одного или нескольких γ -квантов.

Неупругое рассеяние становится возможным при энергии нейтронов больше нескольких кэВ. В результате этого эффекта помимо непосредственно ионизирующих частиц (ядра элементов) в веществе возникают γ -кванты, косвенное ионизирующее действие которых обсуждалось выше.

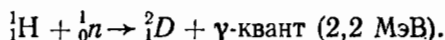
Радиационный захват нейтрона ядром. Этот эффект становится вероятным при низких значениях скоростей нейтронов. Согласно уравнению Ферми

$$\sigma_{(n, \gamma)} \sim 1/\sqrt{E_n} \sim 1/v_n, \quad (\text{I-14})$$

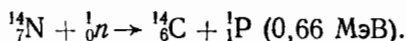
где E_n и v_n — энергия и скорость нейтрона соответственно, а σ — эффективное «сечение реакции», т. е. величина, количествен-

но характеризующая вероятность взаимодействия нейтронов с ядром.

В результате захвата нейтрона образуется короткоживущее высоковозбужденное ядро (его называют «сложным ядром»), которое переходит в стабильное состояние с испусканием γ -квантов, протонов или α -частиц. При захвате нейтрона легкими ядрами, например ядром водорода, испускается γ -квант:



Если же нейтрон захватывается промежуточным или тяжелым ядром, то могут испускаться протоны или α -частицы. Так, в случае захвата нейтрона ядром азота образуется изотоп углерода ${}^{14}_6\text{C}$ и испускается протон с энергией 0,66 МэВ:



Среди элементов, составляющих основную долю биологических тканей, наибольшее значение сечения реакции радиационного захвата медленных нейтронов установлено для водорода и азота. В результате этой ядерной реакции возникает высокоэнергетическое γ - и протонное излучение.

Соотношение каждого из перечисленных процессов поглощения нейтронного излучения зависит от энергии частиц. Если ткань облучают потоком быстрых или сверхбыстрых нейтронов, то вначале преобладает упругое соударение с выбиванием ядер отдачи. После нескольких упругих соударений энергия нейтронов снижается и нейтрон переходит в разряд медленных. Теперь преобладающим становится процесс радиационного захвата с испусканием вторичного излучения. В конечном счете облучение ткани нейтронами приводит к появлению протонов отдачи, ускоренных ядер других элементов и γ -излучения. Все эти продукты взаимодействия нейтронов с атомными ядрами могут вызывать значительную ионизацию в веществе.

Таким образом, ионизация поглотителя происходит косвенным путем. Нейтрон сам не в состоянии взаимодействовать с орбитальными электронами. Взаимодействие осуществляют ускоренные заряженные частицы, высвобождаемые в веществе в результате поглощения кинетической энергии нейтронов. Это обстоятельство позволяет отнести нейтроны к разряду косвенно ионизирующих частиц и объединить их по принципу действия в одну группу с фотонами рентгеновского и γ -излучения.

Согласно принятому определению *косвенно ионизирующие частицы — это незаряженные частицы, которые могут высвободить непосредственно ионизирующие частицы или вызывать ядерные превращения.*

Поглощение энергии ускоренных заряженных частиц

Облучение тканей косвенно ионизирующими частицами в конечном счете заканчивается появлением заряженных частиц: фотоны рентгеновского и γ -излучения высвобождают в тканях высокоэнергетические электроны, нейтроны вызывают появление в тканях протонов отдачи, α -частиц и ядер других элементов. Все эти заряженные частицы обладают значительной энергией и способны многократно вызывать ионизацию и возбуждение атомов и молекул. Для того чтобы описать характер ионизации поглотителя, необходимо построить качественную картину и выяснить количественные закономерности взаимодействия ускоренных заряженных частиц с атомами.

Помимо косвенно ионизирующих частиц в радиобиологических экспериментах используют так называемые корпускулярные излучения — потоки атомных и субатомных частиц, движущихся с изменяющимися скоростями. К их числу относятся потоки β -частиц, т. е. быстрых электронов, испускаемых в процессе радиоактивного распада; потоки электронов, ускоренные в электрическом поле; протонное излучение, генерируемое специальными ускорителями; α -частицы, испускаемые радиоактивными веществами; продукты деления урана и т. д.

Ускоренные заряженные частицы, которыми облучают ткани, вызывают возбуждение и ионизацию атомов точно так же, как и те заряженные частицы, которые высвобождаются нейтронами или фотонами рентгеновского и γ -излучения (различие, естественно, связано с неодинаковой энергией и зарядом высвобождающихся в каждом отдельном случае ионизирующих частиц). Важно знать, как зависит ионизирующая способность заряженных частиц от величины их энергии, от массы и величины заряда, который они несут.

Ускоренную заряженную частицу можно рассматривать как перемещающийся в пространстве источник электрического поля. За счет взаимодействия электрического поля частицы с полем орбитального электрона последний приобретает определенный запас энергии. Если заряженная частица пролетает достаточно близко от орбитального электрона, то перенесенной энергии достаточно для ионизации: электрон отрывается от соответствующего атома или молекулы, и в результате образуются положительно заряженный ион и свободный электрон. Если же частица значительно удалена от электронных оболочек, то электрон приобретает запас энергии, недостаточный для ионизации, и переходит на более удаленную энергетическую орбиту в состоянии возбуждения. Такая схема, основанная на принципе упругого и неупругого соударений, еще не позволяет определить зависимость характера поглощения энергии ускоренной заряженной частицы от ее параметров — заряда, массы, скорости. Качественно на эти

вопросы можно ответить, рассмотрев простую модель, предложенную Дертингером и Юнгом (рис. 1-4), которая учитывает изменение поля частицы во времени.

В верхней части рис. 1-4 показан путь летящей частицы через область с высокой плотностью атомов. Стрелками обозначено возникновение ионизаций (в данном случае двух), а пунктирными кружками — возбужденные атомы. Ниже (рис. 1-4, Б) изображена траектория частицы при ее прохождении вблизи одного из атомов. На рис. 1-4, В вычерчена зависимость поля, действующего в атоме, от положения частицы, а на рис. 1-4, Г — зависимость этого поля от времени, прошедшего пос-

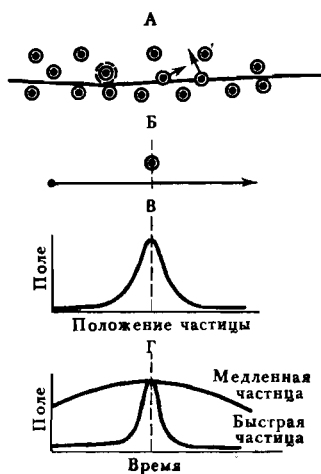


Рис. 1—4. Модель, поясняющая характер взаимодействия ускоренных заряженных частиц с атомом (по Дертингеру и Юнгу): А — частица проходит через некоторую совокупность атомов, производя несколько ионизаций и возбуждений; Б — атом и частица, проходящая мимо него; В — зависимость величины поля, создаваемого в атоме быстрой заряженной частицей, от положения частицы; Г — зависимость того же поля от времени

ле приближения частицы к атому. Для медленной частицы это поле существует длительное время, для быстрой оно сначала резко возрастает, а затем быстро уменьшается. Значит, медленная частица будет вызывать возмущение в атоме в течение длительного времени и передаст ему гораздо больше энергии, чем быстрая частица.

Рассмотрение такой модели позволяет сформулировать ряд следствий, к которым приведет наложение на атом дополнительного поля заряженной частицы:

- 1 — действие поля ускоренной частицы вызывает временное возмущение каждого атома, вблизи которого эта частица проходит;
- 2 — это возмущение существует тем дольше, чем медленнее движется частица;
- 3 — частицы, несущие несколько зарядов, вносят большее возмущение, чем однозарядные;
- 4 — величина массы движущейся частицы не влияет на количество перенесенной энергии, т. е. при равных скоростях электроны и протоны переносят веществу одинаковое количество энергии, хотя массы их различаются почти в две тысячи раз.

При возмущении атомов существует вероятность перехода их в возбужденное состояние, или их ионизации; эта вероятность воз-

растает при увеличении длительности возмущения или его интенсивности, поэтому медленные частицы вызывают больше переходов, чем быстрые, а многократно заряженные — больше, чем однократно заряженные; масса частицы не оказывает влияния на эти эффекты.

Количественно дифференциальная потеря энергии (или тормозящая сила) заряженной частицы, т. е. потеря энергии на единицу длины трека, определяется из уравнения Бете—Блоха:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 z^2 NZ}{mv^2} \left[\ln \frac{2mv^2}{I_0} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 \right], \quad (I-15)$$

где m — масса электрона; e — заряд электрона; v — скорость частицы; z — заряд частицы в единицах элементарного заряда e ; N — число атомов в 1 см^3 вещества; Z — среднее число электронов в атоме, т. е. «эффективный» атомный номер; I_0 — средний потенциал ионизации или возбуждения атома, определяемый экспериментально; $\beta = \frac{v}{c}$ (отношение скорости заряженной частицы к скорости света).

Анализируя уравнение (I-15), можно количественно обосновать те качественные представления, которые были основаны на простой модели взаимодействия (рис. I-4). Действительно, член $e^4 z^2$ соответствует взаимодействию между полем заряженной частицы и электроном (это становится яснее, если записать его в виде $(e^2 z)^2$, т. е. в виде квадрата произведения заряда летящей частицы на заряд электрона в атоме). Зависимость от скорости определяется в основном первым множителем, в который входит $1/v^2$, так как во втором множителе скорость частицы входит в медленно изменяющуюся функцию $\ln 2mv^2$. В формуле фигурирует только масса электрона как масса возбуждаемой в атоме частицы. Масса летящей частицы в уравнение (I-15) не входит. Потеря энергии пропорциональна NZ , т. е. зависит от числа атомов в единице объема и от числа электронов в атоме (для многих биологических тканей и воды среднее число электронов на 1 г примерно одинаково и находится в пределах $3 \cdot 10^{23}$ — $3,48 \cdot 10^{23}$). Боковое сжатие электрического поля при больших скоростях частицы (рис. I-4) учитывается с помощью членов, зависящих от β — отношения скорости частицы к скорости света.

Следует учесть одну особенность, вытекающую из уравнения (I-15). Так как dE/dx пропорционально $1/v^2$, то можно ожидать бесконечно большой перенос энергии излучения при низких скоростях частицы. Однако этого не происходит. Кажущаяся прогноречивость устраняется, если принять во внимание, что заряд частицы по мере замедления ее движения не остается постоянным. Так, по мере снижения скорости α -частицы увеличивается вероятность захвата ею электрона. При этом она продолжает свой путь как частица, имеющая одиночный заряд (ион гелия He^+ , а не He^{2+}). При достаточно низких скоростях одиночно заряженный

ион гелия захватывает еще один электрон и превращается в атом гелия. Для учета такого рода процессов в формулу Бете—Блоха вводится уточнение, связывающее изменение заряда частицы со скоростью:

$$z^* = z [1 - \exp(-125 \beta z^{-2/3})], \quad (\text{I-16})$$

где z^* — заряд частицы, зависящий от скорости. Если $v \rightarrow 0$, то и член $\beta = v/c \rightarrow 0$, а следовательно, и $z^* \rightarrow 0$, т. е. при достаточно низких скоростях частицы величина дифференциальной потери энергии dE/dx снижается и стремится к нулю.

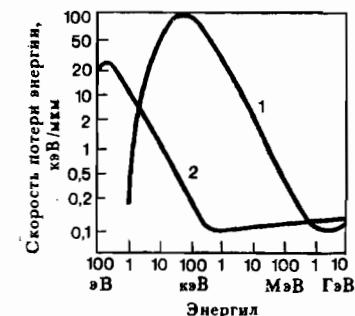


Рис. 1—5. Зависимость дифференциальной потери энергии в воде от величины энергии заряженных частиц (по Нейфельд и Снайдер, 1961): 1 — протоны, 2 — электроны

При высоких скоростях величина dE/dx также снижается пропорционально $1/v^2$. Тогда при определенных скоростях (а значит, энергиях) частиц величина dE/dx должна пройти максимум. Этот максимум экспериментально доказан и известен под названием «пик Брэгга». Для электронов пик Брэгга наблюдается при энергии примерно 200 эВ, для протонов — между 60 и 100 кэВ. На рис. 1-5 показано изменение величины дифференциальной потери энергии электронов и протонов в воде в зависимости от энергии частиц.

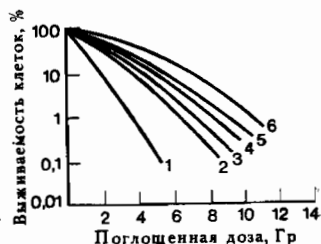
Существование пика Брэгга позволяет, например, с максимальной эффективностью проводить лучевую терапию опухолей. При этом в зависимости от локализации опухолей выбирают вид излучения и его энергетическую характеристику такими, чтобы пик Брэгга приходился на топографически обозначенный очаг злокачественных клеток.

2. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Одно и то же количество энергии можно сообщить биологическому объекту при облучении различными типами ионизирующих частиц. Поглощенная энергия затрачивается на возбуждение и ионизацию атомов и молекул. В основе конечного радиобиологического эффекта лежат физико-химические превращения возбужденных и ионизированных молекулярных структур. Так как число возбуждений и ионизаций определяется величиной поглощенной дозы излучения, можно было бы ожидать, что различные виды

ионизирующих частиц приводят к одному и тому же биологическому эффекту при условии, что объект поглотил одинаковую дозу (т. е. энергию) излучения. В действительности это не так. На рис. 1-6 приведены результаты эксперимента по определению выживаемости клеток, облученных различными типами ионизирующих частиц. Поглощение одной и той же дозы излучения приводит к различным эффектам. Так, сообщение популяции клеток 4—6 Гр энергии потоком α -частиц приводит к гибели 99,9% клеток, а при такой же поглощенной дозе рентгеновского или β -излучения гибнет только 20—30% облученных клеток (рис. 1-6).

Рис. 1—6. Выживаемость культуры Т-клеток почки человека при действии различных типов ионизирующих частиц (по Барендсену, 1964): 1 — α -частицы с энергией 2,5 МэВ, ЛПЭ = 165 КэВ/мкм; 2 — α -частицы с энергией 27 МэВ, ЛПЭ = 25 КэВ/мкм; 3 — дейтроны с энергией 3,0 МэВ, ЛПЭ = 20 КэВ/мкм; 4 — рентгеновские лучи, 20 кВ, ЛПЭ = 6 КэВ/мкм; 5 — рентгеновские лучи, 250 кВ, ЛПЭ = 2,5 КэВ/мкм; 6 — β -частицы с максимальной энергией 2,2 МэВ, ЛПЭ = 0,3 КэВ/мкм



Следовательно, интегральная поглощенная доза, по величине которой судят о суммарном числе образованных возбуждений и ионизаций, не может использоваться для сопоставления эффективности различных типов излучения. Точно так же не совпадает со степенью конечного биологического эффекта величина энергии ионизирующих частиц: α -частицы с энергией 2,5 МэВ эффективнее α -частиц с энергией 27 МэВ, а β и α -частицы примерно равной энергии значительно различаются по степени поражающего действия.

Критерием «качества» излучения, эффективности его биологического действия, служит величина дифференциальной потери энергии частиц на единицу длины пути dE/dx , которая получила название «линейная передача энергии» (ЛПЭ). В математических выражениях ЛПЭ обозначается символом L :

$$L = \frac{\text{энергия, переданная частицей веществу, кэВ}}{\text{расстояние, пройденное частицей, мкм}} \quad (I-17)$$

Величина ЛПЭ в кэВ/мкм зависит от плотности вещества. При делении ЛПЭ на плотность вещества ρ получаем значение L/ρ , которое не зависит от плотности. Эту величину тоже называют ЛПЭ или тормозной способностью вещества, и измеряется она в МэВ/см²·г⁻¹. Как видно из определения, величина ЛПЭ характеризует распределение энергии, переданной веществу, вдоль трека частицы. Зная ЛПЭ, легко определить среднее число ионов, образованных на единицу пути частицы. Для этого достаточно разделить значение ЛПЭ на величину энергии, необходимой для об-

разования одной пары ионов (W). Отношение L/W называют линейной плотностью ионизации (ЛПИ). Точное значение W для тканей неизвестно. Для газов значение W было измерено многими исследователями, оно составляет около 34 эВ. Для приблизительной оценки плотности ионизации в конденсированных системах обычно используют соотношение

$$\text{ЛПИ} = \text{ЛПЭ}/34 \text{ (пар ионов на мкм пути)}. \quad (\text{I-18})$$

Чем выше значение ЛПЭ, тем больше энергии оставляет частица на единицу пути, тем плотнее распределены создаваемые ею ионы вдоль трека.

Обратимся еще раз к данным рис. I-6. Наклон кривых на этом рисунке отражает эффективность, с которой различные виды излучения вызывают гибель клеток. Чем больше наклон кривой, тем меньше клеток выживает в популяции, поглотившей определенную дозу излучения, т. е. тем эффективнее биологическое действие данного типа ионизирующих частиц. Наклон кривых увеличивается с ростом ЛПЭ излучения. Наибольшей эффективностью в рассматриваемом эксперименте обладали α -частицы с $\text{ЛПЭ} = 165 \text{ кэВ/мкм}$.

Величина ЛПЭ — важнейшая радиобиологическая характеристика излучения, показатель его биологической эффективности, или, как иногда говорят, «качества»; физическая природа частиц или квантов не сказывается на специфике биологического действия, например, при равных ЛПЭ наблюдают одинаково эффективное подавление размножения клеток как в результате рентгеновского облучения, так и при действии α -частиц.

Для того чтобы представить возможную причину различной эффективности излучений с высокими и низкими значениями ЛПЭ, рассмотрим схематическое изображение треков некоторых частиц (рис. I-7). Здесь представлены участки треков частиц, сферическая молекула белка толщиной 310° нм , распределение актов возбуждения и ионизации, произведенных частицами вдоль направления своего движения; α -частицы, обладающие энергией 4 МэВ, передают веществу 130 кэВ на 1 мкм пути, что соответствует примерно 3800 ионизациям на 1 мкм. При такой высокой плотности ионизации в масштабе белковой молекулы частица может произвести несколько следующих друг за другом актов ионизации и возбуждения. Электроны с энергией 0,5 МэВ имеют величину $\text{ЛПЭ} = 0,2 \text{ кэВ/мкм}$. Такие электроны образуют около 6 пар ионов на 1 мкм пути, т. е. вероятность возникновения ионизации в пределах белковой молекулы толщиной около 0,003 мкм весьма мала.

При облучении клеток ионизирующими излучениями величина поглощенной дозы показывает лишь среднее количество энергии, переданной облучаемой системе. О плотности ионизации в клетке можно судить по величине ЛПЭ. Если движущаяся частица производит ионизации, значительно удаленные друг от друга, то вероятность возникновения нескольких ионов в пределах макромо-

лекулы, субклеточной органеллы или клетки в целом сравнительно невелика. Напротив, когда акты ионизации следуют непрерывно вдоль трека частицы, можно ожидать возникновения многих ионов в пределах одной субклеточной структуры, например двух ионизаций в комплементарных участках двухнитевой молекулы ДНК. Конечно, биологические последствия поражения (в результате ионизации) обеих нитей этой уникальной молекулярной струк-

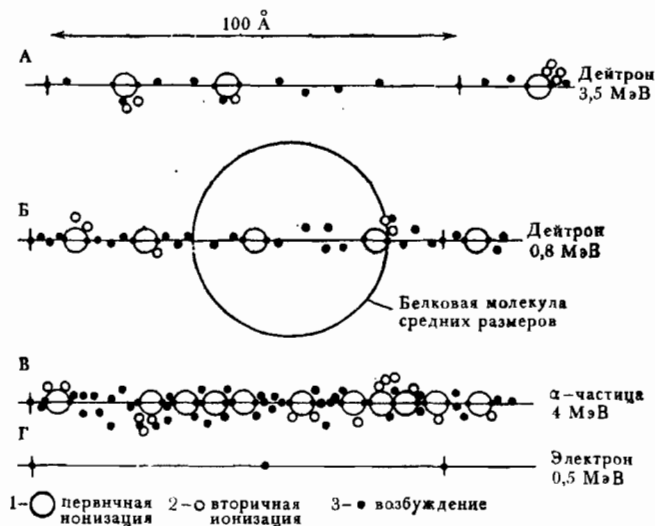


Рис. 1—7. Схематическое изображение отрезка траектории различных заряженных частиц, показывающее распределение актов ионизации и возбуждения вдоль трека частицы в указанном масштабе (по Сетлоу и Полларду, 1964): А — трек дейтрона, $E=4$ МэВ, ЛПЭ=19,4 КэВ/мкм, ЛПИ=570 ионов/мкм; Б — трек дейтрона, $E=1$ МэВ, ЛПЭ=54,0 КэВ/мкм, ЛПИ=1600 ионов/мкм; В — трек α -частицы, $E=4$ МэВ, ЛПЭ=130 КэВ/мкм, ЛПИ=3800 ионов/мкм; Г — трек электрона, $E=0,5$ МэВ, ЛПЭ=0,2 КэВ/мкм, ЛПИ=6 ионов/мкм; 1 — первичная ионизация; 2 — вторичная ионизация; 3 — возбуждение

туры значительно ощутимее для клетки, чем разрушение какого-либо участка одной спирали ДНК при сохранении целостности комплементарной цепи. Так как с ростом линейной плотности ионизации возрастает вероятность именно такого «двухнитевого разрыва», ясно, что плотноионизирующие частицы (с высоким ЛПЭ) должны значительно эффективнее поражать ДНК и связанные с ней клеточные функции, чем редкоионизирующее излучение.

На различных биологических объектах было проведено сопоставление эффективности различных типов ионизирующих частиц. В опытах на млекопитающих критерием эффективности служило летальное действие излучений, различные отдаленные эффекты, такие, как появление лучевых катаракт и злокачественных опухолей, снижение продолжительности жизни. При облучении клеточ-

ных суспензий оценивали выживаемость клеток при действии одинаковых доз радиации, сообщенных различными типами ионизирующих частиц, подсчитывали число индуцированных облучением хромосомных aberrаций и мутаций. Эти и другие эксперименты позволили количественно оценить эффективность различных видов ионизирующих излучений и ввести коэффициенты, которые для каждой конкретной биологической системы показывают эффективность данного типа излучения по сравнению с выбранным стандартным излучением. Коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) определяется из соотношения

$$\text{ОБЭ} = \frac{\text{биологическая эффективность исследуемого излучения}}{\text{биологическая эффективность рентгеновского излучения с энергией примерно 200 кэВ}} = \frac{\text{поглощенная доза, необходимая для получения данного биологического эффекта при воздействии рентгеновским излучением 200 кэВ (в грях)}}{\text{поглощенная доза исследуемого излучения, необходимая для получения того же биологического эффекта (в грях)}}$$

Как видно из определения, в качестве стандартного выбирают рентгеновское излучение с энергией квантов 200 кэВ, которое образует примерно 100 пар ионов на 1 мкм пути в воде. Для такого излучения ОБЭ принимают равным единице. Для каждой изучаемой системы коэффициент ОБЭ находят путем сопоставления эффектов стандартного и исследуемого излучений, примененных в одинаковой дозе. При этом необходимо учитывать, что значение ОБЭ может изменяться в зависимости от того, однократно или дробно поглощалась объектом определенная доза излучения, а также от мощности дозы. Желательно, чтобы сравниваемые виды излучения имели одинаковую кинетику действия на выбранную тест-систему.

В качестве примера рассмотрим результаты одного из экспериментов по определению ОБЭ нейтронов по критерию — возникновению лучевых катаракт у мышей. Оказалось, что стандартное рентгеновское излучение в дозе 8 Гр приводило к появлению катаракты у 50% мышей. Такой же эффект достигался в результате нейтронного облучения (0,5 МэВ) в дозе 2 Гр. Коэффициент ОБЭ для этой системы равен четырем. Однако если облучение в той же дозе производили отдельными фракциями, то коэффициент ОБЭ значительно возрастал.

Для расчетов различных санитарных норм принимают относительные величины ОБЭ, которые являются усредненными результатами экспериментов на различных системах. Эти величины приведены в табл. I-3.

Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучения графически представлена на рис. I-8. Из рисунка видно, как в широком диапазоне ЛПЭ излучений (от 0,02 до 100 кэВ/мкм) относительная биологическая

Таблица 1-3

Относительная биологическая эффективность
различных видов излучения

Виды излучения	Относительная биологическая эффективность (ОБЭ)
Рентгеновские и γ -лучи до 3 МэВ	1
β -лучи до 3 МэВ	1
α -лучи	20
Протоны и дейтроны (0,5—10 МэВ)	10
Медленные нейтроны	3
Быстрые нейтроны (до 20 МэВ)	10
Тяжелые ускоренные ионы	20

эффективность ионизирующих частиц растет по мере увеличения ЛПЭ. Таким образом, экспериментально установлена ведущая роль плотности распределения ионов вдоль пути ионизирующей частицы для эффективности биологического действия радиации.

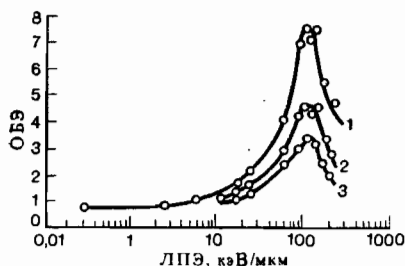


Рис. 1—8. Зависимость ОБЭ излучения от ЛПЭ по критерию выживаемости клеток в культуре ткани (по Барендсену, 1968): 1, 2, 3 — результаты облучения в дозах, при которых доля выживших клеток составляет соответственно 0,8, 0,1 и 0,01



Рис. 1—9. Изменение линейной плотности ионизации при прохождении ускоренной заряженной частицы через вещество

При значениях ЛПЭ выше 90—100 кэВ/мкм кривая зависимости ОБЭ от ЛПЭ проходит максимум и снижается. Вероятно, это связано с тем, что уже при значении ЛПЭ=100 кэВ/мкм в клетке возникает «критическое» число ионизаций, достаточное для ее гибели. Дальнейшее увеличение плотности ионизации неэффективно.

Величина ЛПЭ излучения зависит от скорости частицы и величины ее заряда (рис. 1-5 и уравнение Бете—Блоха 1-5). Так как $dE/dx \sim z^2$, то величина ЛПЭ многозарядных частиц значительно превосходит ЛПЭ однозарядных при равных скоростях.

Согласно уравнению Бете—Блоха величина ЛПЭ обратно пропорциональна квадрату скорости заряженной частицы. Следовательно, по мере замедления частицы в веществе увеличивается ЛПЭ и резко возрастает число образованных ионов (рис. 1-9). Таким образом, в радиобиологических экспериментах возможно использование излучений с различной величиной ЛПЭ, а следовательно и ОБЭ. Для этого необходимо выбирать ионизирующие частицы с определенным зарядом и скоростью (т. е. энергией).

Знание механизма взаимодействия ионизирующих частиц с атомами поглотителя позволяет судить о характере ионизации в облученном биологическом субстрате, что необходимо при использовании ионизирующих излучений в радиотерапии и радиодиагностике, при определении оптимальных режимов облучения различных объектов.

Ионизация ткани при действии тяжелых заряженных частиц

Этот вопрос рассмотрим на примере ускоренных ядер гелия (α -частицы). В табл. I-4 представлены результаты количественных измерений ионизирующей способности α -частиц и глубины их проникновения в ткань. На основании этих данных можно оценить картину первичной ионизации вещества. α -Частицы с энергией 1 МэВ теряют свою энергию в первых 5,3 мкм ткани, в среднем на каждый микрон пути веществу переносится 263,9 кэВ энер-

Таблица I-4

Длина пробега, потеря энергии и число первичных ионов при прохождении α -частиц в тканях плотностью 1 г/см³ (по данным Ли, 1963)

Энергия α -частиц, МэВ	ЛПЭ, КэВ/мкм	Длина пробега, мкм	Число первичных ионов на 1 мкм пути в ткани, пар ионов/мкм
1	263,9	5,3	6207,0
3	134,6	16,8	2031,0
6	82,01	47,0	1109,0
9	60,41	91,6	775,4
10	55,71	108,4	706,4

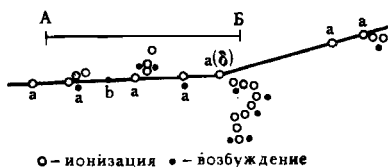


Рис. 1—10. Передача энергии по траектории тяжелой заряженной частицы (по Полларду, 1964). Для α -частицы с энергией 6 МэВ расстояние $AB=31 \text{ \AA}$, что соответствует толщине средней молекулы белка: а — «рой ионов»; а (δ) — δ -излучение

гии (табл. I-4), которая расходуется на возбуждение и ионизацию атомов. По мере того как α -частица теряет свою энергию, ее скорость снижается и, следовательно, возрастает число образованных первичных ионов. В среднем на каждый микрон пути образуется около 6,2 тыс. пар ионов, неравномерно распределенных вдоль трека частицы. Плотность ионизации резко возрастает к

концу трека (рис. I-9). По мере торможения частицы плотность ионизации проходит через максимум, а затем резко падает, что вызвано захватом электронов α -частицей и превращением ее последовательно в однозаряженный ион, а затем в нейтральный атом гелия (см. уравнение I-16). В момент остановки частицы плотность ионизации равна нулю.

Тяжелые заряженные частицы практически не отклоняются от своего первоначального направления распространения благодаря значительной разнице их массы и массы электрона, с которым они взаимодействуют, т. е. их треки можно считать прямолинейными и имеет смысл говорить об определенной «глубине проникновения» в вещество.

Энергия α -частиц затрачивается на ионизацию и возбуждение атомов, которые обусловлены кулоновским взаимодействием заряженной частицы со связанными электронами. Не вся энергия заряженной частицы «оставляется» вдоль ее прямолинейного трека, иначе тяжелые частицы были бы идеальным «щупом», позволяющим зондировать клетки, строго избирательно повреждая микроструктуры, расположенные на определенной глубине. Некоторая доля энергии частицы выносится за пределы ее трека выбитыми из атомов электронами, обладающими значительным запасом энергии и большой длиной пробега. Эти электроны образуют треки, отвечающие от трека первичной частицы, и вызывают на пути ионизации и возбуждения, плотность распределения которых зависит от энергии выбитого электрона. Так, например, α -частицы с энергией 1 МэВ могут генерировать вторичные электроны, длина пробега которых вдвое превосходит трек самой тяжелой частицы.

Вторичные электроны, энергия которых превосходит 100 эВ, называют δ -излучением (иногда этот предел приравнивают к 1 кэВ). На их долю приходится приблизительно 25% всей ионизации, вызываемой первичной частицей. Схема, иллюстрирующая этот процесс, представлена на рис. I-10.

Большая часть энергии тяжелой заряженной частицы переносится к вторичным электронам, «малыми порциями», т. е. образуются свободные электроны с энергией менее 100 эВ. Вызванная ими ионизация происходит в непосредственной близости от места первичной ионизации, на расстоянии порядка нескольких десятков нанометров от трека частицы. Таким образом, в относительно небольшом объеме вдоль трека частицы возникает некоторое число пар ионов (положительные ионы и электроны), порожденных первичной ионизацией и вторичными электронами с энергией менее 100 эВ. Эти скопления получили название «рой ионов», они и формируют трек частицы. Термины «первичная ионизация», «рой ионов» и «событие потери энергии» можно считать эквивалентными.

Данные о распределении ионизаций получают путем фотографирования треков частиц в камере Вильсона или в пузырьковой

камере. Тяжелые заряженные частицы образуют короткие плотные треки, имеющие форму основного стержня с высокой удельной плотностью ионизации (рои ионов плотно прилегают друг к другу, образуя сплошной столбик, или «колонну» ионов), от которого во все стороны отходят стержни, соответствующие δ -лучам со значительно более низкой плотностью ионизации. Такая картина характерна не только для α -частиц, но и для протонов, дейтронов, тритонов и ускоренных ядер различных элементов.

Ионизация при действии ускоренных электронов

Картина, наблюдаемая при облучении тканей потоком β -частиц, отличается от рассмотренной выше прежде всего криволинейной траекторией частиц в веществе. Это связано с равенством масс взаимодействующих частиц: в единичном акте соударения с орбитальным электроном β -частица теряет большое количество энергии и изменяет первоначальное направление движения (рис. I-11).

Длина пробега β -частиц определяется их энергией: при энергии 150 кэВ они проникают в ткань на глубину 278 мкм, а очень быстрые частицы с энергией 50 МэВ — на глубину до 19 см.

Таблица I-5

Длина пробега, потеря энергии и число первичных ионов, вызываемых электронами в ткани плотностью 1 г/см³ (по Ли, 1963)

Энергия электронов, КэВ	Длина пробега, мкм	Потеря энергии, КэВ/мкм	Число первичных ионов на 1 мкм/ткани, пар ионов/мкм
0,1	0,003	33,23	1697
0,2	0,006	28,71	843,1
0,8	0,038	14,17	285,3
2,0	0,1595	7,680	127,8
9,5	2,303	2,367	31,90
22,5	10,51	1,233	15,06
45,0	35,76	0,7255	8,452
90,0	118,0	0,4462	4,986
150,0	278,1	0,3278	3,567
450,0	1508,5	0,2108	2,166

Величина ЛПЭ электронов и плотность распределения генерируемых ими ионов быстро убывает с увеличением скорости частиц (табл. I-5). Если медленные электроны с энергией до 1 кэВ дают очень короткие треки с высокой плотностью ионизации (вся энергия частицы передается веществу на первых 0,1—1 мкм пути),

то электроны с энергией в несколько сотен кэВ и более производят всего несколько ионизаций на 1 мкм пути в тканях, т. е. рои ионов отдалены друг от друга расстояниями в десятки тысяч нанометров. Как уже говорилось выше, каждый рой — это скопление ионов, возникших в результате первичной ионизации атома заряженной частицей, а также за счет ионизирующего действия вы-

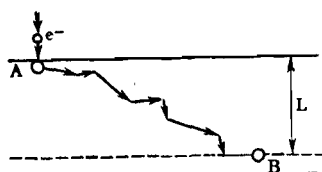


Рис. 1—11. Истинная и практическая длина пробега электронов в веществе (по Фриц-Ниггли). Путь от А до В — истинная длина пробега; L — практическая длина пробега (глубина проникновения)



Рис. 1—12. Трек быстрого электрона (по фотографии в камере Вильсона): 1 — трек быстрого электрона ($E \approx 200$ КэВ), 2 — трек медленных электронов ($E \approx 20$ КэВ). При низкой энергии изгибание трека вызвано рассеянием (по Баку и Александру)

битых из атома электронов с энергией менее 100 эВ. Помимо таких низкоэнергетических электронов β -частицы могут с определенной вероятностью генерировать δ -излучение, за счет которого от основного трека отходят более короткие треки высокоэнергетических δ -электронов. На рис. 1-12 представлен участок трека электрона, каким он виден в камере Вильсона.

Ионизация тканей косвенно ионизирующими частицами

Нейтронное, рентгеновское и γ -излучение генерируют в веществе ионизации, пространственное распределение которых существенно отличается от такового при действии ускоренных заряженных частиц. Электронейтральные частицы, обладая высокой проникающей способностью, углубляются в ткани на значительные расстояния. Они формируют большинство ионизаций косвенным путем: фотоны рентгеновского и γ -излучения — за счет ускоренных электронов, а нейтроны — за счет ядер отдачи. Эти заряженные частицы в основном и осуществляют перенос энергии излучения веществу, вызывая ионизации и возбуждения атомов.

Мягкие рентгеновские лучи (до 100 кэВ) поглощаются в поверхностных слоях ткани за счет фотоэффекта. Длина пробега фотоэлектронов не превышает 2 мм, поэтому биологически существенный эффект, связанный с ионизацией атомов и молекул, возникает вблизи места поглощения падающего кванта. Пространственное распределение ионов определяется энергией выбитых фотоэлектронов. Так, фотоны мягкого рентгеновского излучения с энергией 10 кэВ (это соответствует $\lambda = 10$ нм) передают фото-

электроны около 9,5 кэВ энергии (0,5 кэВ — средняя энергия ионизации атомов в биологических системах). Из табл. I-5 видно, что длина пробега такого электрона в ткани — 2,3 мкм, ЛПЭ = 2,4 кэВ/мкм, а плотность ионизации — около 32 пар ионов на 1 мкм пути. Число таких треков, т. е. количество выбитых фотоэлектронов в результате первичной ионизации, определяется поглощенной дозой. Картина ионизации ткани мягким рентгеновским излучением при поглощенной дозе 10^4 Гр показана на рис. I-13А.

Жесткие рентгеновские и γ -лучи с энергией фотоионов выше 300 кэВ поглощаются в основном за счет эффекта Комптона. Максимум их поглощения лежит на глубине нескольких сантиметров.

Так, γ -лучи ^{60}Co теряют 60% всей энергии при прохождении первых 5—6 см ткани, а фотоны с энергией 35 МэВ, генерируемые в бетатронах, отдают максимум своей энергии на глубине 6—8 см. Эта важ-

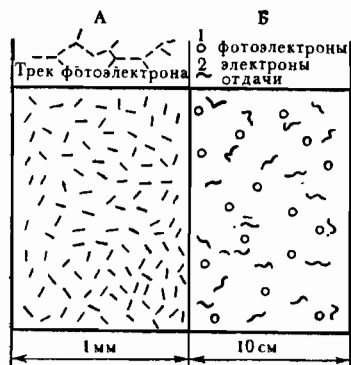


Рис. I—13. Характер ионизации вещества фотонами мягкого (А) и жесткого (Б) рентгеновского и γ -излучения (по Сэтлоу и Полларду, 1964): 1 — фотоэлектроны (выбиты рассеянным квантом); 2 — трек электронов отдачи



Рис. I—14. Кривые поглощения энергии в воде для рентгеновского и γ -излучения с разной энергией квантов (по Линденбранту, 1969)

ная особенность действия жесткого электромагнитного излучения позволяет воздействовать на глубоко расположенные опухоли без чрезмерного повреждения кожи и промежуточной ткани. Существование такого максимума (рис. I-14) объясняется тем, что в результате комптоновского взаимодействия фотонов высокой энергии и электронов атома последним передается значительная часть энергии фотона (чем выше энергия излучения, тем более вероятен перенос к электрону отдачи максимальной энергии, вплоть до 99,9% энергии кванта). Электроны таких высоких энергий (несколько тысяч кэВ) проникают в ткань на глубину в несколько сантиметров, образуя максимальное число ионизаций и возбуждений в конце пробега, когда скорость их значительно снижается.

Следовательно, электроны, высвобождаемые квантами излучения на поверхности облучаемого объема, образуют максимальное

число ионов на глубине ткани в несколько сантиметров, т. е. они осуществляют перенос энергии излучения в глубь ткани. Так, например, γ -лучи с энергией квантов 1 МэВ высвобождают в результате комптоновского взаимодействия электроны отдачи с максимальной энергией 817 кэВ и средней энергией 452,5 кэВ. При энергии 450 кэВ электрон теряет около 0,2 кэВ на 1 мкм пути и способен пройти путь в 1500 мкм от места своего образования. В среднем он образует 2 пары ионов на 1 мкм пути, однако ионизации распределены неравномерно, резко выраженный максимум наблюдается в конце трека (рис. 1-9). На рис. 1-13, Б показан характер ионизации вещества жестким рентгеновским излучением при общей поглощенной дозе 10^4 Гр.

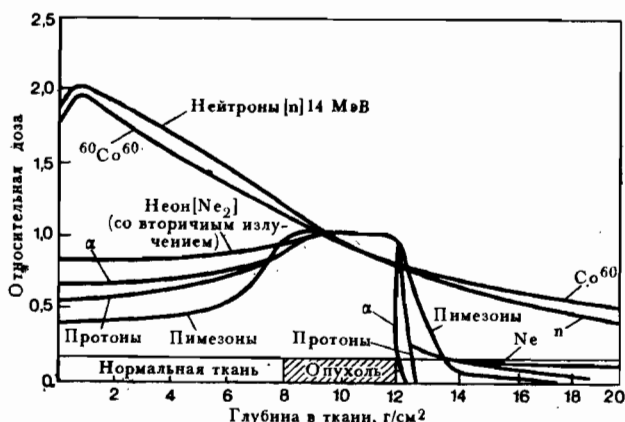


Рис. 1—15. Пространственное распределение поглощенной дозы для разных видов излучения (по Тобиасу и др., 1971). Все кривые проведены так, что относительная доза, равная 1,0, лежит в центре опухоли диаметром 4 см; уплощение и расширение пика Брэгга достигается установкой по ходу пучков специальных ребенчатых фильтров

Облучение нейтронами высоких энергий (10—15 МэВ) приводит к пространственному распределению ионов в поглощающей ткани, которое сходно с картиной ионизации жестким γ -излучением. Отличие состоит в том, что энергия нейтрона переносится не к электронам, а к ядрам отдачи, т. е. к тяжелым ускоренным частицам, несущим положительный заряд. Наибольшее количество энергии переносится протонами отдачи, т. е. ускоренными ядрами водорода. Так, при облучении тканей нейтронами с энергией 14 МэВ 25% поглощенной дозы на глубине 15 см создают тяжелые ядра отдачи с ЛПЭ выше 50 кэВ/мкм и 70% — протоны отдачи с ЛПЭ = 16 кэВ/мкм¹. В рассматриваемом случае

¹ См.: Я. Р. Монаенко С. П. и др. Биологические основы лучевой терапии опухолей. М., Медицина, 1976.

на значительной глубине ткани высвободились тяжелые заряженные частицы с высокой плотностью ионизации — протоны с ЛПЭ = 16 кэВ/мкм имеют длину пробега около 70 мкм и образуют в среднем 218 пар ионов на 1 мкм пути, однако максимальное ионизирующее действие, как уже говорилось, наблюдается в конце трека частицы, когда скорость ее значительно снижается. Таким образом, в результате облучения тканей нейтронами высоких энергий в редкорасположенных микрообъемах возникают короткие треки с высокой плотностью ионизации. Это служит причиной значительно более высокого, чем для рентгеновского и γ -излучения, значения ОБЭ нейтронов высоких энергий.

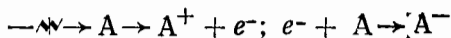
Подбирая соответствующий тип излучения и варьируя энергию ионизирующих частиц, можно добиться оптимального распределения поглощенной дозы, в частности благоприятного соотношения между степенью поражения нормальных тканей и опухолей, залегающих на значительной глубине, что показано на рис. 1-15.

* * *

Наиболее существенной особенностью ионизирующих излучений, как следует из самого названия этой группы высокоэнергетических электромагнитных и корпускулярных излучений, является их способность прямо или косвенно приводить к одному результату — возникновению ионизированных атомов и молекул.

Всего 10^{-13} с занимает первая, или физическая, стадия действия ионизирующего излучения на биологические системы. За это время энергия поглощенных живой тканью фотонов или заряженных частиц полностью растрачивается на ионизацию атомов и молекул.

Процесс «размена энергии» излучения на этой начальной стадии можно условно разделить на два этапа. Вначале происходит акт первичной ионизации, при котором связанному электрону различными способами сообщается запас энергии, достаточный для того, чтобы он с некоторой скоростью v покинул пределы атома. Возникают положительно заряженный ион и свободный электрон с запасом кинетической энергии $E_k = 1/2 m_e v^2$. Свободный электрон проходит в ткани определенное расстояние, осуществляя вдоль своего трека акты вторичной ионизации. На этом этапе происходит дальнейшая передача энергии излучения веществу. Растратив запас кинетической энергии на ионизацию и возбуждение, свободный электрон замедляет движение, захватывается нейтральным атомом с образованием отрицательного иона. В результате этих процессов энергия ионизирующей частицы израсходовалась на образование пары ионов (положительно заряженный ион A^+ и отрицательный — A^-):



и возбуждение атомов: $-\gamma \rightarrow A \rightarrow A^*$.

На ионизацию атомов H, N, O, C, S, P затрачивается 10—15 эВ. Значительно меньше энергии необходимо для их возбуждения, поэтому летящая заряженная частица способна возбуждать атомы, расположенные на значительном расстоянии от ее трека. На один ионизированный атом приходится несколько возбужденных. Поэтому одна пара ионов образуется при поглощении около 34 эВ — величины, значительно большей потенциала ионизации. Избыток энергии растрачивается на возбуждение.

Сведения о начальных процессах поглощения энергии излучения необходимы для выяснения механизмов радиобиологических процессов. Возникающие на физической стадии ионизированные и возбужденные молекулы запускают сложную цепь реакций, приводящих в конечном счете к тестируемому биологическому эффекту. Поэтому информация о первичных событиях (число ионизаций, характер их распределения и т. д.) служит отправной точкой биофизического анализа механизмов биологического действия ионизирующих излучений.

В качестве примера рассмотрим несколько упрощенную картину ионизации, возникающую в клетке в результате облучения суспензии клеток α -частицами с энергией 2,5 МэВ и рентгеновскими квантами с энергией 200 кэВ. Так как поглощение энергии ионизирующих излучений происходит в результате дискретных событий, при которых энергия частицы или фотона с определенной вероятностью переносится атомам или молекулам поглотившего, можно говорить об определенной вероятности «попадания» фотона или частицы в данный объект, например в клетку. Вероятность попадания в данном случае соответствует вероятности абсорбции энергии фотона или частицы в пределах клетки. Величина интегральной поглощенной дозы, которую определяют при облучении суспензии клеток, показывает, какое число «бомбардирующих» данный объем частиц оставляет в пределах этого объема свою энергию. Существует такая доза D , при которой каждая клетка испытывает в среднем одно попадание. В случае α -частиц с энергией 2,5 МэВ в результате одного попадания в клетке формируется короткий трек длиной 13 мкм с очень высокой плотностью ионизации — в среднем образуется 2,5 тыс. пар ионов на 1 мкм пути. Большая часть ионизаций представляет собой скопления из одной-двух пар ионов, практически непрерывно следующих друг за другом вдоль прямолинейного трека частицы; некоторая часть ионизаций произведена высокоэнергетическими δ -электронами, которые ответвляются от основного трека во всех направлениях (суммарная длина пробега δ -электронов вдвое превышает путь α -частицы). В принципе, в клетке может существовать некая микроструктура (мишень), поражение которой прямо или косвенно приведет к конечному биологическому эффекту. Например, глубокая деградация какого-либо мембранного участка может резко нарушить ионный гомеостаз и привести к быстрой гибели клетки, а поражение определенного участка хромосомы может привести к

метаболическим изменениям, которые постепенно приведут к нарушению жизненно важных функций и гибели клетки. Априори можно предполагать, что прохождение трека α -частицы через «мишень» приведет к ее поражению вследствие ионизации большого числа атомов, составляющих такую мишень.

Если же клетка поглотила фотон рентгеновского излучения с энергией 200 кэВ, то это означает, что порожденный в пределах клетки свободный электрон (он возник в результате первичной ионизации какого-либо атома) израсходовал запас кинетической энергии на ионизацию и возбуждение субклеточных структур. Вероятнее всего, что рассматриваемый рентгеновский квант (200 кэВ) высвободил электрон в результате комптоновского взаимодействия. Тогда средняя энергия электрона около 45 кэВ, а плотность ионизации — 8,5 пары ионов на 1 мкм пути. При такой низкой плотности ионизации в пределах мишени малого размера может возникнуть в лучшем случае одна ионизация (толщина клеточной мембраны около 0,01 мкм, хромосомы — около 0,1 мкм). Если при этом тестируемый биологический эффект (например, разрыв хромосомы) все же наблюдается, то это можно объяснить тем, что для его возникновения достаточно одной ионизации в пределах определенной структуры, так называемой мишени.

Такого рода соображения открывают широкие возможности для формального анализа первичных процессов, приводящих к тестируемому биологическому эффекту облучения. Проводя соответствующую математическую обработку кривых, отражающих зависимость биологического эффекта от поглощенной дозы излучения, можно попытаться оценить минимальное количество актов ионизации, достаточное для возникновения эффекта, примерный размер мишени, в которой должны произойти акты ионизации, и т. д. Такой анализ (подробнее он будет рассмотрен в следующей главе) позволяет получить важную информацию о характере ионизации, которая произошла в объекте на начальной стадии действия излучения и спустя определенное время (секунды, часы или даже месяцы) приведет к конечному биологическому эффекту. Выяснение механизма биологического действия ионизирующих излучений состоит в расшифровке всей последовательности процессов, которая начинается с возникновения в облученном объекте определенного числа ионизированных и возбужденных молекул, составляющих биологический субстрат.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ОТ ПОГЛОЩЕННОЙ ДОЗЫ ИЗЛУЧЕНИЯ. ПРИНЦИП ПОПАДАНИЯ И КОНЦЕПЦИЯ МИШЕНИ

Исследования, выполненные на начальном этапе развития радиобиологии, позволили в общих чертах установить качественную картину лучевого поражения клеток и разнообразных многоклеточных организмов. Экспериментаторы с большим интересом подвергали биологические объекты «рентгенизации» или действию эманации радия. Они отмечали, что в результате облучения угнетается клеточное деление, возникает аномалия роста и развития, происходит атрофия кроветворных органов, дегенерация семенников и яичников, гибель различных организмов, включая млекопитающих. В этот период установлено бластомогенное действие радиации и другие отдаленные эффекты облучения.

Строгие количественные эксперименты впервые были проведены в конце 20-х гг. Этому способствовало два обстоятельства. Во-первых, широкое распространение получают ионизационный метод дозиметрии излучения и международная единица экспозиционной дозы — рентген (Р); облучение экспериментальных объектов строго дозируется, и условия опыта могут многократно воспроизводиться. Во-вторых, для количественных экспериментов исследователи стали использовать клоны генетически однородных клеток, вирусные частицы, препараты макромолекул, т. е. такие системы, в которых легко определить реакцию единичного объекта на действие данной дозы излучения.

На рис. II-1 представлены результаты некоторых таких работ. Зависимость биологического эффекта от дозы облучения отражают кривые «доза—эффект». Для построения этих кривых объекты облучают в широком диапазоне доз, после действия каждой дозы определяют долю особей, сохранивших исходные свойства, по отношению к их общему числу до облучения.

Кривые «доза—эффект» (рис. II-1, А—Г) построены авторами на основании экспериментов с простейшими, яйцами аскариды, вирусами, ферментами. Разнообразны объекты, различны диапазоны использованных доз излучения, но во всех случаях наблюдается интересная закономерность: при самых малых дозах облучения уже обнаруживаются инактивированные клетки, вирусные частицы или макромолекулы (все кривые надежно экстраполируются к нулевой точке), а при дозах, в сотни и тысячи раз больших, все еще удается обнаружить объекты, сохранившие исходные биологические свойства, т. е. не пораженные излучением.

Обнаруженный в строгих количественных экспериментах характер зависимости биологического эффекта от дозы облучения трудно объяснить, оставаясь в рамках только биологических закономерностей, т. е. исходя лишь из особенностей объекта (клетки, вируса или фермента). Отсутствие нижнего порога на кривой «доза—эффект» означает, что в пределах генетически однородной популяции существуют объекты, которые гибнут при самых малых дозах, тогда как другие выживают при действии огромных доз облучения. Естественная вариабельность (минималъ-

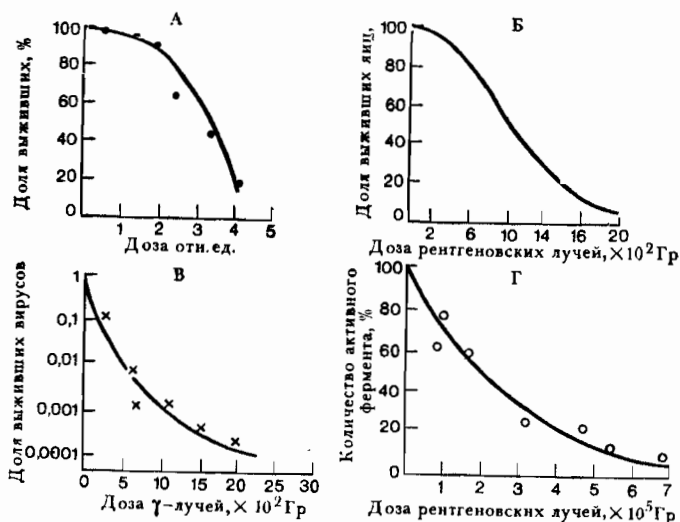


Рис. II—1. Зависимость биологического эффекта от дозы облучения: А — гибель инфузорий *Colpidium colpoda* через 2 часа после облучения (Кроутер, 1926), Б — гибель яиц аскариды после облучения в аэробных условиях (Браун, Хольтузен, 1929), В — инактивация вируса табачной мозаики γ -лучами (Ли, Смит, 1940), Г — инактивация сухой рибонуклеазы (Ли др., 1944)

ная для клеток одного клона) не может служить причиной этого эффекта. Еще труднее предполагать, что среди макромолекул рибонуклеазы (рис. II-1, Г), обладающих одинаковыми физико-химическими свойствами, одни молекулы утрачивают каталитическую активность при действии малых доз, а другие сохраняют активность при действии тысячекратно превосходящих доз лишь в силу особенностей самого объекта, подвергающегося облучению. Объяснение, вероятно, следует искать в особенностях воздействия — ионизирующего излучения.

Рассматриваемые кривые «доза—эффект» показывают, какая доля объектов инактивируется при поглощении системой определенного количества энергии ионизирующих излучений. Предста-

дим, что эта же система (суспензия клеток, препарат вирусных частиц или макромолекул) получает энергию иным путем, например за счет нагревания от какого-либо источника тепла. В этом случае кривая «доза—эффект» примет иной вид. Вплоть до некоторой температуры T_1 не обнаруживаются инактивированные объекты, после этой пороговой температуры число пораженных объектов возрастает до максимального значения, и, если процесс термоинактивации необратим, при достижении некоторой температуры T_2 мы не обнаружим ни одного вируса, макромолекулы и тем более клетки, оставшихся непораженными. Таким образом, решающее влияние на характер дозной кривой оказывают не особенности объектов, а способ сообщения энергии. В опытах по термоинактивации, о которых шла речь, энергия от источника тепла сообщалась всем объектам равномерно и одинаково за счет теплопроводности воды или воздуха (в жидких или сухих препаратах соответственно). Ионизирующие частицы, напротив, сообщают системе энергию дискретными порциями, и процесс передачи энергии носит статистический характер. Поэтому среди совокупности облучаемых микроструктур одни из них с определенной вероятностью поглощают энергию излучения, тогда как другие вообще «не знают», что облучение имело место. Такие представления, основанные на фундаментальных физических концепциях о механизме взаимодействия ионизирующих излучений с веществом, позволяют объяснить количественные закономерности, наблюдаемые в радиобиологических экспериментах.

Ф. Дессауэр в 20-е гг. подошел к проблеме биологического действия ионизирующей радиации, исходя из физической природы излучения. Выдвинутая им гипотеза «точечного нагрева» основывалась на следующих положениях¹:

- 1 — ионизирующие излучения обладают очень малой объемной плотностью по сравнению с видимым или ультрафиолетовым светом энергетически эквивалентной дозы;
- 2 — фотоны рентгеновского или γ -излучения, ускоренные электроны или тяжелые заряженные частицы обладают огромной энергией, величина которой значительно превосходит энергию любой химической связи;
- 3 — облучаемый биологический объект, например клетка, состоит, с одной стороны, из относительно безразличных и, с другой — весьма существенных для жизни микрообъемов и структур;
- 4 — в облучаемом объекте при поглощении относительно небольшой общей энергии в отдельных случайных и редко расположенных микрообъемах оставляются настолько большие порции энергии, что их можно сравнить с микро-

¹ Цит. по: Тимофеев-Рессовский Н. В. и др. Применение принципа попадания в радиобиологии. М., Атомиздат, 1968.

локальным нагреванием и они могут производить почти любые узколокальные изменения в веществе.

- 5 — так как распределение «точечного тепла» является чисто статистическим, то конечный эффект в клетке будет зависеть от случайных попаданий дискретных порций энергии в жизненно существенные микрообъемы внутри клетки. С повышением дозы увеличивается вероятность таких попаданий, и наоборот, при понижении дозы вероятность снижается. Из этого следует, что любая самая малая доза может соответственно с малой вероятностью и, следовательно, малой частотой вызывать экстремальный биологический эффект (например, гибель или инактивацию клетки), но даже при очень высокой дозе могут с малой вероятностью и малой частотой сохраниться отдельные неповрежденные клетки.

В последующих работах, выполненных Дж. Кротутером, Д. Ли, К. Циммером, Н. В. Тимофеевым-Рессовским и др., были предложены и успешно использованы для анализа радиобиологических эффектов принцип попадания и концепция мишени (или мишеней).

В общем виде количественный анализ, основанный на принципе попадания, состоит в том, что полученные в эксперименте кривые «доза—эффект» интерпретируют на основании следующих физических принципов:

- 1 — ионизирующие излучения переносят энергию в дискретном виде;
- 2 — акты взаимодействия (попадания) не зависят друг от друга и подчиняются пуассоновскому распределению;
- 3 — исследуемый эффект наступает, если число попаданий в некоторую чувствительную область, так называемую мишень, равно по крайней мере n .

Рассмотрим простейший случай «одноударного процесса», когда попаданием считают одиночный перенос некоторого минимального количества энергии. Энергия попадания определяется характером повреждения и спецификой облучаемой системы, т. е. тестируемый эффект наступает лишь тогда, когда определенное минимальное количество энергии поглощено чувствительной областью — мишенью.

Представим, что облучаемая система состоит из N_0 объектов, каждый из которых обладает мишенью сечением S и объемом v . Пусть для инактивации объекта достаточно, чтобы трек плотной ионизирующей частицы прошел через сечение мишени S ; такое событие будем именовать попаданием. Это предположение имеет смысл. Так, например, α -частица с энергией 2,5 МэВ (табл. I-7) образует около 3000 пар ионов на 1 мкм пути. Если пренебречь неравномерностью распределения ионов вдоль трека, то даже при толщине мишени 10^{-3} мкм с большой вероятностью в пределах мишени, через которую проходит трек частицы, возникнет несколько ионизаций. Если траектории частиц распределяются по попе-

речному сечению объекта случайным образом и не зависят друг от друга, то вероятность одного, двух, ..., n попаданий в мишень, находящуюся в пределах объекта, описывается соотношением

$$P(n) = \frac{\alpha^n e^{-\alpha}}{n!}, \quad (\text{II-1})$$

где α — среднее число попаданий в мишень. Если D — среднее число частиц, пролетающих через единичную площадку сечением S , а S — сечение мишени, то

$$\alpha = SD. \quad (\text{II-2})$$

При как угодно малой дозе излучения существует вероятность прохождения частицы через одну из мишеней. С увеличением потока частиц (т. е. с ростом дозы излучения) возрастает число мишеней, претерпевших попадание, т. е. величина D пропорциональна поглощенной дозе излучения.

Если N_0 — общее число объектов в облучаемой системе, а N — число объектов, сохранивших после облучения исходные свойства (т. е. «выживших»), то величина N/N_0 соответствует вероятности непопадания ($n=0$). Из уравнения (II-1) для случая $n=0$ (учитывая, что $0!=1$) получим

$$N/N_0 = \frac{(SD)^0 e^{-SD}}{0!} = e^{-SD}. \quad (\text{II-3})$$

При некоторой дозе облучения выполняется условие $SD=1$. Это соответствует случаю, когда в среднем число попаданий равно числу мишеней. В действительности же часть попаданий испытали уже однажды пораженные мишени, а некоторые не претерпели ни одного попадания. Согласно статистике Пуассона при $SD=1$ реально поражается только 63% мишеней, а 37% оказываются непораженными. Действительно, подставив в уравнение (II-3) значение $SD=1$, получим

$$N/N_0 = e^{-SD} = e^{-1} = 0,37. \quad (\text{II-4})$$

Отношение N/N_0 легко определить в эксперименте: это доля «выживших» объектов по отношению к их общему числу до облучения. Узнав, при какой дозе облучения выживает 37% объектов, т. е. $N/N_0=0,37$ (эту дозу излучения обозначают символом D_{37} и называют 37%-ной, инактивирующей или средней летальной), мы можем определить сечение мишени из соотношения

$$SD_{37}=1, \text{ или } S=1/D_{37}. \quad (\text{II-5})$$

На рис. II-2 (А—В) представлена схема, иллюстрирующая зависимость числа пораженных мишеней от дозы облучения. Из рис. II-2, А видно, что даже при малой дозе облучения некоторое число частиц проходит через мишени и вызывает их инактивацию, а с ростом дозы число пораженных объектов возрастает резко,

почти линейно, а затем все более вероятно повторное прохождение частиц через однажды пораженные мишени. При дозе D_{37} общее число частиц соответствует числу мишеней ($SD=1$), но 37% объектов остаются непораженными, так как некоторые из 63% мишеней испытали по два и более попаданий (рис. II-2, Б). Даже при очень большой дозе облучения все же какое-то число объектов оказалось не пораженным облучением (рис. II-2, В). Графически зависимость доли выживших от величины дозы выражается экспонентой (рис. II-2, Г).

$$N/N_0 = e^{-SD} = e^{-D/D_{37}}. \quad (\text{II.6})$$

Аналогичные рассуждения можно использовать для анализа «одноударных процессов» при действии рентгеновского или γ -излучения, вызывающего редкорасположенные акты ионизации по всему объему облучаемого объекта. В этом случае можно установить еще один важный параметр мишени — ее объем.

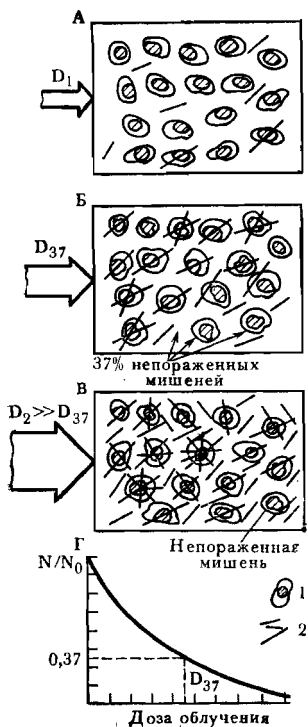


Рис. II-2. Зависимость между числом пораженных мишеней и поглощенной дозой: 1 — объект с мишенью сечением S , 2 — треки частиц

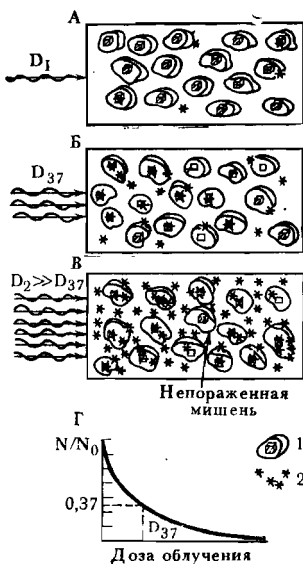


Рис. II-3. Зависимость между числом непораженных объектов и дозой γ - или рентгеновского облучения: 1 — объект с мишенью объемом V , 2 — акты ионизации

Пусть в системе имеется N_0 объектов с мишенью объемом v , и для инактивации достаточно одиночной ионизации в пределах этой мишени. Если акты ионизации подчиняются распределению Пуассона, то вероятность 1, 2, ..., n попаданий в мишень описывается уравнением

$$P(n) = \frac{\alpha^n e^{-\alpha}}{n!}, \quad (\text{II-7})$$

где $\alpha = vD$, а D — среднее число ионизаций, возникающих в единице объема. Для случая $n=0$ доля выживших определяется из соотношения

$$N/N_0 = \frac{(vD)^0 e^{-vD}}{0!} = e^{-vD}. \quad (\text{II-8})$$

На рис. II-3 (А—В) показано, как с ростом числа ионизаций в облучаемой системе (т. е. с ростом дозы ионизирующего излучения) увеличивается доля пораженных объектов. Как и в случае плотной ионизации, при самой малой дозе вероятно возникновение ионизации хотя бы в одной из мишеней объемом v ; при дозе D_{37} число ионизаций в среднем соответствует числу мишеней. Зависимость между долей непораженных объектов N/N_0 и поглощенной дозой экспоненциальна (рис. II-3, Г), а по величине дозы D_{37} можно определить объем мишени из соотношения

$$v = 1/D_{37}. \quad (\text{II-9})$$

Теоретические положения теории мишени, основанные на предположении об «одноударности процесса» попадания, предсказывают экспоненциальную зависимость «доза—эффект». В реальных условиях эксперимента такую зависимость наблюдали при облучении макромолекул, вирусов, бактериальных спор, некоторых одноклеточных организмов (см., например, рис. II-1, А—Г). Чтобы выявить существование экспоненциальной зависимости эффекта облучения от поглощенной дозы, поступают следующим образом. Объекты облучают в широком диапазоне доз, для каждой дозы определяют долю выживших N/N_0 и находят значение натурального логарифма этой величины. Если на графике, отражающем зависимость $\ln N/N_0$ от поглощенной дозы, все точки укладываются на прямую, значит выполняется соотношение

$$\ln N/N_0 = -\alpha D, \text{ или } N/N_0 = e^{-\alpha D}. \quad (\text{II-10})$$

На рис. II-4 представлена кривая «доза—эффект», полученная преобразованием в полулогарифмических координатах кривой из рис. II-1, В. Видно, что доля вирусов, сохранивших исходную активность, экспоненциально зависит от дозы излучения, так как все экспериментальные точки укладываются на прямую, т. е. выполняется уравнение (II-10).

Экспоненциальная зависимость «доза—эффект» — важный, но не единственный критерий одноударности процесса инактивации.

Если действительно одного попадания в мишень достаточно для инактивации объекта, то должны выполняться следующие требования:

- 1 — эффект, вызываемый данной дозой, не зависит от интенсивности излучения (мощности дозы) и от того, какими частями доза сообщалась объекту;
- 2 — при одинаковом эффекте вызывающая его доза различных излучений возрастает при переходе от редко- к плотноионизирующим частицам.

Рассмотрим значение этих ограничительных условий. Если выполняется первое требование, значит, тестируемый эффект не возникает вследствие кумулятивного действия нескольких последовательных ионизаций (иначе эффект зависел бы от распределения ионизации во времени). Каждая ионизация, возникающая в пределах облучаемых объектов, имеет определенную вероятность оказаться причиной эффекта, но эта вероятность, при одноударном процессе не должна зависеть от времени, прошедшего с мо-

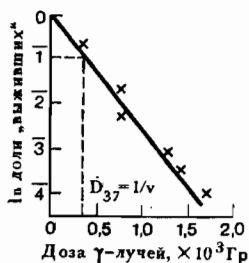


Рис. II—4. Инактивация вируса табачной мозаики γ -лучами (по Ли, Смит, 1940). Кривая «доза — эффект» преобразована из соответствующей кривой на рис. II—1, В

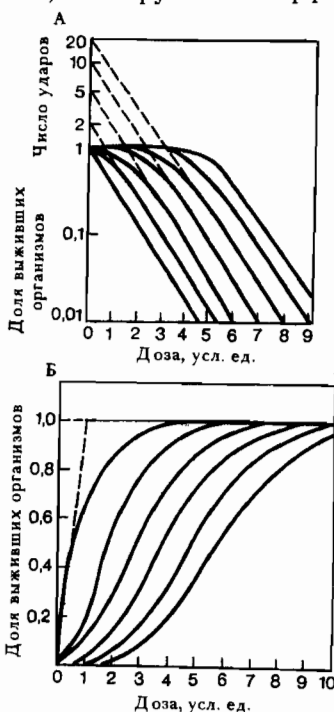


Рис. II—5. Теоретические кривые выживаемости для объектов, инактивируемых в результате нескольких попаданий (по Дессауэру, 1954): а — в полулогарифмическом масштабе, б — в обычном масштабе. Цифры на кривых означают «ударность» процесса инактивации

мента предыдущей ионизации, ни от времени, отделяющего ее от последующей ионизации. Следовательно, эффект данной дозы должен определяться только ее величиной (т. е. числом возник-

ших актов ионизации); интенсивность излучения и распределение дозы во времени не должны играть никакой роли.

Выполнение второго требования означает, что плотноионизирующие излучения менее эффективны, чем редкоионизирующие. Действительно, если одиночной ионизации достаточно для возникновения тестируемого эффекта, то частицы, производящие большое число ионов на единицу пути, вызовут в пределах мишени множество «ненужных» ионизаций. Редкоионизирующие излучения генерируют сгустки ионов, значительно удаленные друг от друга, и вероятность возникновения нескольких ионизаций в пределах мишени малого размера незначительна. Величина поглощенной дозы определяет общее число ионизаций, произведенных данным видом излучения в единице объема. При одноударном процессе большинство ионизаций, вызванных плотноионизирующим излучением, «бесполезно». Поэтому при равной дозе, т. е. при равном общем числе ионизаций, редкоионизирующие излучения окажутся более эффективны.

Напротив, если тестируемый эффект наступает вследствие большого числа ионизаций в пределах мишени (многоударный механизм инактивации), то частицы с высокой плотностью ионизации окажутся значительно эффективнее, чем редкоионизирующие.

Кривые «доза—эффект» при многоударном механизме инактивации отличаются от экспоненциальных дозовых кривых, наблюдаемых в случае одноударного процесса. В полулогарифмическом масштабе семейство дозовых кривых для случая $n=2, 3, \dots, k$ представлено на рис. II-5. Чем больше «ударность» мишени, тем заметнее «плечо» — начальный, более горизонтальный участок кривой. Вслед за плечом следует переход к прямолинейному участку, наклон которого совпадает с наклоном соответствующей одноударной кривой. Вид дозной кривой при многоударном механизме инактивации определяется тем, что при малых дозах лишь небольшое число объектов может испытать требуемое число попаданий (k), а все остальные — не более ($k-1$) попаданий. По достижении ($k-1$) попаданий во все или большинство объектов возникает ситуация, при которой последнее, k -тое, попадание приводит к тестируемому эффекту. Начиная с этой дозы кривая принимает вид, характерный для одноударного процесса.

Формально такие кривые могут быть получены суммированием всех объектов, получивших 0, 1, 2, ..., ($n-1$) попаданий; согласно распределению Пуассона их точное число выражается соотношением (II-1), а доля выживших, т. е. претерпевших от 0 до ($n-1$) попаданий, определяется следующей формулой:

$$N/N_0 = e^{-\alpha D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\alpha D)^k}{k!}, \quad (\text{II-11})$$

где N — число выживших, а N_0 — общее число индивидов в облученной совокупности объектов. Уравнение для одноударного процесса легко получить из (II-11), подставив $n=0$.

На основании принципа попадания и концепции мишени можно анализировать кривые «доза—эффект», полученные в эксперименте. В зависимости от вида объекта и характера излучения получают различные дозные кривые — от простых экспоненциальных до сигмоидальных с различной величиной плеча. Наиболее надежно поддаются формальному анализу одноударные радиобиологические реакции, в которых попаданием служит одиночная ионизация или рой ионов в пределах мишени. В этом случае, располагая кривыми «доза — эффект» для излучений с различными значениями ЛПЭ, можно рассчитать размеры и число мишеней, отражающие размеры и число тех элементарных биологических структур, поражение которых вследствие ионизации приводит к регистрируемому биологическому эффекту. Подобное применение теории попадания позволило впервые определить размеры некоторых макромолекул, вирусов, генов, получить сведения о внутренней структуре бактериальных спор и т. д.

Кривые «доза—эффект», полученные при облучении клеток, как правило, не удовлетворяют требованиям одноударного процесса. Для интерпретации кривых «доза—эффект» с различной величиной плеча используют сложные математические построения, основанные на различных гипотетических моделях. Ранее мы упоминали, что такого рода кривые можно объяснить многоударностью процесса. Другая возможность формального описания сигмоидальных кривых «доза—эффект» состоит в том, что предполагают наличие в объекте нескольких чувствительных объемов — мишеней — и что реакция наступает лишь после того, как все они получили определенное число попаданий. Согласно теории вероятностей уравнение, описывающее «кривую гибели» для системы из m мишеней, имеет вид

$$N^+/N_0 = \left(1 - e^{vD} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(vD)^k}{k!} \right)^m, \quad (\text{II-12})$$

где N^+ соответствует числу нежизнеспособных объектов. Эта формула может быть распространена и на описание мишени с варьирующим размером v_i и неодинаковым числом попаданий, необходимых для инактивации различных мишеней n_i :

$$N^+/N_0 = \prod_{i=1}^{m!} (1 - B_i), \quad \text{где } B_i = e^{-v_i D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(v_i D)^k}{k!}. \quad (\text{II-13})$$

Такие сложные выражения теряют свое практическое значение. На основании этих уравнений можно построить теоретические кривые «доза—эффект», однако с большой точностью сопоставлять их с кривыми, получаемыми в реальном эксперименте, не представляется возможным. Еще более сложно вычислить на основании экспериментальных дозных кривых параметры мишени — v ,

n и *m*. Иначе говоря, математический аппарат теории попадания и мишени не позволяет определить размеры и форму тех элементарных биологических структур, которые отвечают за биологические эффекты, описываемые дозными кривыми, более сложными, чем одноударная кривая. Помимо чисто технических трудностей существует целый ряд теоретических ограничений для использования формальных построений теории попадания в анализе сложных радиобиологических процессов. При облучении растворенных объектов попадание ионизирующей частицы в мишень вносит меньший вклад в поражающее действие излучения, чем активные продукты, возникающие в окружающем растворителе (радикалы воды). При облучении клеток биологический эффект может быть обусловлен попаданием в различные мишени, параметры которых зависят от физиологического состояния объекта. В каждом отдельном случае поражение определенной структуры может вызываться различными по своей физической природе событиями попадания. В результате мы будем наблюдать появление у клеток генетически однородной популяции одного и того же тестируемого эффекта вследствие различных первичных повреждений. И наконец, трудно ожидать, что клетка «пассивно» воспринимает нанесенные повреждения. За счет работы репаративных или компенсаторных систем некоторая часть повреждений может быть восстановлена. Вследствие этих и ряда других причин наблюдают самые разнообразные формы кривых «доза—эффект», их вид может меняться в зависимости от физиологических особенностей объекта и условий, в которых проводится их облучение.

* * *

Развитие количественного направления в радиобиологии привело к накоплению таких экспериментальных данных, которые не могли быть истолкованы в рамках чисто биологических феноменов. Отсутствие порога на кривых «доза—эффект», полученных в опытах по облучению макромолекул, вирусов, бактерий, изолированных клеток, указывало на то, что любая как угодно малая доза облучения может вызвать появление у некоторой части особей наблюдаемой реакции. В то же время поглощение облучаемой системой очень больших доз излучения не приводило к инактивации всех объектов, некоторые из них сохраняли исходные биологические свойства. Следовательно, с ростом дозы повышается не столько степень проявления эффекта у отдельных особей облучаемой популяции, сколько количество (доля) объектов, реагирующих данным образом, т. е. возрастает вероятность проявления данной реакции на облучение.

Для интерпретации вероятностного характера биологического действия ионизирующего излучения были использованы фундаментальные физические концепции о вероятностном характере взаимодействия квантов высоких энергий и ускоренных заряжен-

ных частиц с веществом. При каждом акте взаимодействия к атому или молекуле переносится такая дискретная порция энергии, которая может заведомо привести к разрыву любой химической связи. Поэтому можно было рассматривать каждый акт такого одиночного переноса энергии как событие попадания, приводящее к поражению определенной структуры. Акты попадания статистически распределяются по всей облучаемой системе, так же статистически будут распределены микрообъемы, поврежденные излучением. Если часть микрообъемов — это мишени, ответственные за наблюдаемую реакцию, то на основании соответствующих математических построений можно оценить их параметры — сечение, объем, молекулярную массу.

Подобные соображения стимулировали большое число исследований, посвященных формальному анализу экспериментальных кривых «доза—эффект». Хотя такой анализ не может раскрыть последовательность физико-химических процессов, приводящих к поражению мишени в результате попадания, он позволяет получить важные сведения о характере первичных физических событий (попаданий) и оценить параметры структур, ответственных за наблюдаемый биологический эффект.

ИНАКТИВАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ПРЯМЫМ ДЕЙСТВИЕМ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В результате облучения макромолекул их биологические функции могут полностью или частично утрачиваться. В этом случае говорят об инактивации макромолекул ионизирующей радиацией. Инактивация макромолекулы может произойти вследствие прямого и опосредованного действия ионизирующего излучения. Прямое действие состоит в том, что инаktivированными оказываются те молекулы, которые непосредственно поглощают энергию излучения. Если молекула была поражена активными реакционноспособными продуктами, возникшими за счет поглощения энергии излучения ее окружением, то говорят о непрямом действии радиации.

Прямое действие радиации представляет собой сложную последовательность событий, происходящих от момента передачи энергии излучения макромолекуле и до появления стойких структурных и функциональных изменений. Условно этот процесс может быть поделен на три стадии. На первой, или физической, стадии энергия излучения переносится веществу, возникают возбужденные и ионизированные молекулы, неравномерно распределенные в пространстве. Эти события происходят в первые 10^{-16} — 10^{-13} с. Следующая, физико-химическая, стадия состоит из различных типов реакций, приводящих к перераспределению возбужденными молекулами избыточной энергии — появляются разнообразные активные продукты: ионы, радикалы. Эти реакции протекают за время порядка 10^{-13} — 10^{-10} с. Облученные молекулы, находящиеся в различных электронно-возбужденных состояниях, в течение физико-химической стадии имеют много возможностей для дальнейших превращений. Поэтому в веществе, состоящем даже из одного типа молекул, облучение генерирует ионы и радикалы с широким спектром химических свойств. В течение третьей, или химической, стадии действия ионизирующих излучений ионы и радикалы взаимодействуют друг с другом и с окружающими молекулами, формируя различные типы структурного повреждения. Реакции химической стадии заканчиваются в первые 10^{-6} — 10^{-3} с после облучения¹.

Определенные типы структурных повреждений, например разрушение ряда аминокислотных остатков в белковой молекуле или нуклеотидов в молекуле ДНК, влекут за собой изменения функ-

¹ Рассматриваемая классификация и порядок величин для продолжительности отдельных стадий предложены Платцманом (1958, 1962).

циональных свойств соответствующих макромолекул. Выяснение причинно-следственных отношений между типами структурных повреждений и характером инактивации макромолекул составляет заключительный этап биофизического анализа механизмов лучевого поражения биологически активных молекул. Такие исследования имеют важное значение не только для радиационной биофизики, но и для молекулярной биологии в целом, так как позволяют выявить функциональную роль отдельных субмолекулярных структур.

В последние два десятилетия успешно развивается особое направление радиационной биофизики — «молекулярная радиобиология», основная задача которой «состоит в исследовании физических и химических процессов, вызывающих повреждение биомолекул, а также в объяснении нарушений жизненно важных процессов в терминах молекулярных изменений»¹.

Биофизический анализ механизмов лучевой инактивации макромолекул состоит в описании в терминах физики и химии всей последовательности процессов, которые начинаются с поглощения молекулой дискретной порции энергии излучения и заканчиваются видимыми, доступными экспериментальному анализу изменениями ее биологических свойств. Такой анализ включает следующие логически связанные этапы.

1. Феноменологический анализ картины лучевого поражения молекул, включающий построение кривых «доза—эффект», изучение радиочувствительности отдельных биологических функций макромолекул.

В расшифровке понятия «биологические функции макромолекул» существует известная неопределенность, связанная с тем, что в настоящее время мы не в состоянии указать весь круг функциональных признаков, определяющих уникальную роль данного типа молекул в жизнедеятельности клеток и организмов. Еще труднее охарактеризовать эти признаки количественно. Однако для некоторых биомолекул уже сейчас можно указать ряд свойств, определяющих их значение в процессах обмена веществ, в хранении и передаче наследственных свойств, в возникновении естественной изменчивости. Анализируя влияние облучения на ферменты, мы прежде всего должны оценить их каталитическую активность, субстратную специфичность, чувствительность к соответствующим активаторам и ингибиторам, возможность их аллостерического регулирования. Если по любому из этих функциональных признаков отмечается эффективность облучения, то мы будем называть такое событие инактивацией фермента ионизирующей радиации. Соответствующими биохимическими методами можно оценить степень инактивации количественно.

В экспериментах по облучению нуклеиновых кислот критерием инактивации ДНК может служить изменение ее инфекционности,

¹ Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. М., Атомиздат, 1973.

трансформирующей активности, способности служить матрицей синтеза соответствующих комплементарных полинуклеотидных последовательностей. Влияние излучения на молекулы тРНК оценивают по их способности связывать специфические аминокислоты. В подобных опытах удастся количественно оценить инактивирующее действие излучения на нуклеиновые кислоты.

2. Выяснение природы первичных физических процессов, приводящих к инаktivации макромолекул, определение параметров «мишени», ответственной за инаktivацию. Для решения этой задачи необходим формальный анализ кривых «доза—эффект», сопоставление эффективности излучений с различными ЛПЭ и с различной мощностью дозы, теоретические исследования величин «энергетических пакетов», переносимых молекуле в единичном акте взаимодействия излучения с веществом. Для этой цели привлекаются квантовомеханические представления и сложный математический аппарат.

3. Изучение спектра первичных продуктов, возникающих в результате физико-химических процессов перераспределения избыточной энергии, поглощенной молекулами. Особая роль здесь принадлежит методу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и другим способам идентификации свободных радикалов.

4. Выявление всех типов структурного повреждения молекул. На этом этапе используется современный арсенал физических и химических методов анализа макромолекул.

5. Установление причинно-следственной связи между типами структурного поражения и характером инаktivации макромолекулы. Для решения этих вопросов перспективно использование модифицирующих агентов, видоизменяющих типы структурного повреждения и (или) характер инаktivации. Сочетание различных модифицирующих агентов позволяет дифференциально оценить роль тех или иных типов повреждений в инаktivации макромолекулы.

Детальное описание всех этапов лучевой инаktivации макромолекул составляет одну из важнейших задач современной радиационной биофизики. Эта проблема еще далека от полного решения. Однако уже сегодня можно говорить о важнейших деталях и указать основные направления, по которым развиваются исследования.

1. ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Прямое действие ионизирующей радиации на макромолекулы исследуют на обезвоженных или кристаллических препаратах ферментов и нуклеиновых кислот. В этом случае большинство молекул инаktivируются в результате прямого поглощения энергии излучения¹.

¹ Даже при облучении высокоочищенных препаратов в высоком вакууме наличие только прямого действия маловероятно: активные продукты, возникаю-

Прямое действие излучения на ферменты

Схема эксперимента по определению числа инактивированных молекул фермента при действии данной дозы состоит в том, что ампулу с гомогенным препаратом (сухим или кристаллическим) подвергают облучению, а затем сопоставляют активность опытного и контрольного образцов. Путем соответствующего пересчета можно перейти от доли инактивированных молекул (или процента инактивации) к истинному числу молекул фермента, инактивированные данной дозой радиации. Используя соответствующие биохимические методы, можно дифференциально оценить изменение различных функциональных свойств облученного фермента — каталитической активности, субстратной специфичности, аллостерического регулирования и т. д.

На рис. III-1, А, Б представлены результаты одного из экспериментов с кристаллической рибонуклеазой. В широком диапазоне доз излучения оценивали каталитическую активность и субстратную специфичность облученного фермента.

Так как деградация РНК под действием рибонуклеазы осуществляется в два этапа (вначале расщепляется фосфодиэфирная связь в РНК и образуется циклический диэфир, а на второй стадии пириимидин-2', 3'-циклическая фосфатная связь гидролизуетс до нуклеотид-3-фосфата), то, используя РНК в качестве субстрата, можно исследовать общую реакцию, а с помощью цитидин-2', 3'-циклофосфата — только вторую реакцию. Одинаковую инактивацию облученной РНКазы наблюдали при использовании обоих субстратов (рис. III-1), т. е. в равной мере поражаются обе функциональные единицы фермента.

Зависимость эффекта от дозы облучения экспоненциальна. При самых малых дозах обнаруживаются молекулы фермента, утратившие способность расщеплять субстраты обоих типов; с ростом поглощенной дозы число таких молекул возрастает вначале резко, почти линейно, а затем мы видим, как значительно приращению дозы соответствует лишь небольшое увеличение доли инактивированных молекул. Для проверки экспоненциального характера зависимости «доза—эффект» необходимо преобразовать кривую III-1, А в полулогарифмических координатах, как это сделано на рис. III-1, Б (по оси ординат откладывается не доля молекул, сохранивших исходную активность, а натуральный логарифм этой величины). Все экспериментальные точки укладываются на прямую, проходящую под углом к оси ординат, следовательно, $\ln N/N_0 = -kD$ или $N/N_0 = e^{-kD}$ (см. уравнение II-9).

Экспоненциальная зависимость «доза—эффект» обнаружена в экспериментах по лучевой инактивации различных ферментов

щие при поражении одних молекул, могут индуцировать структурные изменения среди своего ближайшего окружения.

(рис. III-2) и может рассматриваться как общая закономерность прямого действия радиации на ферменты.

Сравнивая кривые «доза—эффект», можно сопоставить радиочувствительность различных ферментов. Из рис. III-2 видно, что для получения сравнимой инактивации изученных ферментов требуются существенно различающиеся дозы. Обычно в качестве критерия радиочувствительности выбирают такую же дозу излучения,

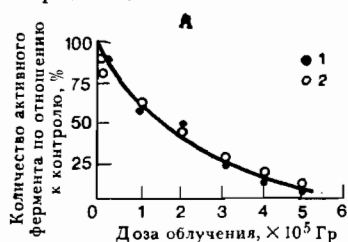


Рис. III—1. Инактивация РНКазы рентгеновскими лучами. Ферментативная активность определялась с помощью двух различных субстратов: 1 — ДНК; 2 — цитидин-2',3'-циклофосфата (по Юнгу и Дертингеру, 1973); А — зависимость «доза — эффект» выражена в линейных координатах; Б — эти же данные представлены в полулогарифмических координатах, экспериментальные точки укладываются на прямую

которая необходима для инактивации 63% молекул в облученном препарате фермента. Так как при этом 37% молекул сохраняют нативные свойства, эта доза получила название «доза 37%-ной сохранности», или доза D_{37} . По рис. III-2 можно установить, что для инвер-



Рис. III—2. Радиочувствительность ряда ферментов, облученных γ -лучами в вакууме

тазы D_{37} в данных условиях около 80 кГр, а для рибонуклеазы — 280 кГр, т. е. при одинаковой дозе первый фермент поражается со значительно большей вероятностью. Это может быть связано с различными размерами макромолекулы, особенностями аминокислотного состава, характером миграции энергии

или другими причинами, которые должны быть установлены в ходе биофизического анализа.

Известно, что функциональные свойства фермента определяются его различными структурными участками. Так как поглощение энергии излучения может приводить к различным типам структурного повреждения, следует ожидать, что не все функции фермента подавляются радиацией в равной степени. В табл. III-1 сведены результаты различных авторов, которые подтверждают такую возможность. В опытах с рибонуклеазой обнаружено, что об-

Радиочувствительность функций, определяющих биологическую активность ферментов
(по Окада, 1972)

Фермент	Радиочувствительность функций, связанных с ферментативной активностью (сопоставляются соответствующие величины доз D_{50})
Химотрипсин	эстераза > протеаза > связывание диизопропилфосфата > уменьшение максимальной скорости > увеличение константы Михаэлиса — Ментен*
Трипсин	протеаза > эстераза
Глутаматдегидрогеназа	уменьшение максимальной скорости и увеличение константы Михаэлиса — Ментен > поражение активного центра и способности связывать кофермент
Рибонуклеаза	уменьшение максимальной скорости; константа Михаэлиса — Ментен без изменения
Аспартаттранскарбамоилтрансфераза	поражение активного центра > инактивация участка ингибирования по принципу обратной связи (аллостерические свойства)

* Более высокая радиочувствительность (т. е. меньше дозы D_{50}) обозначена символом >. Например, эстераза > протеаза означает, что эстеразная активность фермента более радиочувствительна, чем протеазная.

лучение приводит к снижению максимальной скорости реакции, а величина константы Михаэлиса—Ментен остается без изменения. Это означает, что число каталитически активных молекул снижается в облученном препарате, однако пораженные молекулы сохраняют сродство к субстрату. Вероятно, возникающие структурные поражения затрагивают активный центр, но не препятствуют взаимодействию фермента со специфическим субстратом. В случае с трипсином протеазная активность поражается в большей мере, чем эстеразная, т. е. в результате облучения возникают повреждения главным образом в тех структурных звеньях, которые определяют протеазную активность фермента. Если ионизирующие излучения в состоянии вызывать специфические структурные повреждения в молекуле фермента и приводить к определенному изменению его функциональных характеристик, то с помощью радиационного воздействия можно исследовать причинную связь между структурой и функцией фермента.

Рассмотрение феноменологии лучевого поражения ферментов позволяет заключить, что в результате прямого действия излучения возникают различные нарушения функциональных свойств фермента; наблюдается экспоненциальная зависимость биологического эффекта от величины поглощенной дозы, т. е. с увеличением поглощенной дозы излучения доля макромолекул, сохранивших нативные свойства, убывает по закону e^{-kD} , где k — константа, а D — поглощенная доза. Облученный фермент может утрачивать одни функциональные свойства при сохранении других, т. е. наблюдается неодинаковая радиочувствительность различных био-

логических свойств фермента; по одному и тому же критерию, например каталитической активности, различные ферменты обладают неодинаковой радиочувствительностью.

Прямое действие излучения на нуклеиновые кислоты

Существуют определенные трудности количественного измерения степени инаktivации нуклеиновых кислот. Ниже перечислен ряд модельных систем, которые позволяют количественно оценить важнейшие из функциональных характеристик этих макромолекул, и перечислены основные феноменологические данные, полученные при изучении характера инаktivации облученных нуклеиновых кислот.

Инфекционность облученных нуклеиновых кислот была изучена в экспериментах с ДНК и РНК, изолированных из бактериофагов. Термином «инфекционность» обозначают способность вирусной ДНК или РНК индуцировать образование бактериальной клеткой новых полноценных фагов. Методически эксперимент выглядит так: бактерии обрабатывают лизоцимом, и они теряют часть клеточной стенки — образуются сферопласты, которые можно инфицировать нуклеиновой кислотой, выделенной из бактериофага. Если в инфицированной бактерии возникают новые полноценные фаги, то бактериальная стенка разрывается и из лизировавшей бактерии высвобождается 100—200 бактериофагов; количество вирусных частиц, высвободившихся из лизированных сферопластов, в определенных пределах пропорционально количеству молекул ДНК или РНК, сохранивших инфекционные свойства. Так как высвободившиеся фаги лизируют новые сферопласты вблизи места своего возникновения, то на сплошном газоне бактериальных клеток, выращенных на агаре, образуется пятно лизиса — «бляшка» (количество бляшек можно подсчитать визуально), — их число служит количественным критерием инфекционности вирусной нуклеиновой кислоты. Этим методом определяют инаktivацию вирусной ДНК в результате облучения. Результаты одного из таких экспериментов приведены на рис. III-3.

Доля молекул ДНК, сохранивших инфекционность, отложена по оси ординат в логарифмическом масштабе, все экспериментальные точки укладываются на прямую, т. е. $\ln N/N_0 = -kD$, кривая «доза—эффект» экспоненциальна.

Трансформирующую активность бактериальной ДНК можно оценить по появлению специфических генетических маркеров у бактерий-реципиентов, «поглотивших» трансформирующую ДНК донора. Например, извлекают ДНК из бактерий, устойчивой к стрептомицину, и в ее присутствии инкубируют стрептомицинчувствительных мутантов. Если в результате рекомбинации произошло встраивание специфической последовательности нуклеотидов ДНК донора в геном реципиента, т. е. мутанты стали устойчивы

Таблица III-1

Радиочувствительность функций, определяющих биологическую активность ферментов
(по Окада, 1972)

Фермент	Радиочувствительность функций, связанных с ферментативной активностью (сопоставляются соответствующие величины доз D_{37})
Химотрипсин	эстераза > протеаза > связывание диизопропилфосфата > уменьшение максимальной скорости > увеличение константы Михаэлиса — Ментен*
Трипсин	протеаза > эстераза
Глутаматдегидрогеназа	уменьшение максимальной скорости и увеличение константы Михаэлиса — Ментен > поражение активного центра и способности связывать кофермент
Рибонуклеаза	уменьшение максимальной скорости; константа Михаэлиса — Ментен без изменения
Аспартаттранскарбамо- илтрансфераза	поражение активного центра > инаktivация участка ингибирования по принципу обратной связи (аллостерические свойства)

* Более высокая радиочувствительность (т. е. меньше дозы D_{37}) обозначена символом >. Например, эстераза > протеаза означает, что эстеразная активность фермента более радиочувствительна, чем протеазная.

лучение приводит к снижению максимальной скорости реакции, а величина константы Михаэлиса—Ментен остается без изменения. Это означает, что число каталитически активных молекул снижается в облученном препарате, однако пораженные молекулы сохраняют сродство к субстрату. Вероятно, возникающие структурные поражения затрагивают активный центр, но не препятствуют взаимодействию фермента со специфическим субстратом. В случае с трипсином протеазная активность поражается в большей мере, чем эстеразная, т. е. в результате облучения возникают повреждения главным образом в тех структурных звеньях, которые определяют протеазную активность фермента. Если ионизирующие излучения в состоянии вызывать специфические структурные повреждения в молекуле фермента и приводить к определенному изменению его функциональных характеристик, то с помощью радиационного воздействия можно исследовать причинную связь между структурой и функцией фермента.

Рассмотрение феноменологии лучевого поражения ферментов позволяет заключить, что в результате прямого действия излучения возникают различные нарушения функциональных свойств фермента; наблюдается экспоненциальная зависимость биологического эффекта от величины поглощенной дозы, т. е. с увеличением поглощенной дозы излучения доля макромолекул, сохранивших нативные свойства, убывает по закону e^{-kD} , где k — константа, а D — поглощенная доза. Облученный фермент может утрачивать одни функциональные свойства при сохранении других, т. е. наблюдается неодинаковая радиочувствительность различных био-

логических свойств фермента; по одному и тому же критерию, например каталитической активности, различные ферменты обладают неодинаковой радиочувствительностью.

Прямое действие излучения на нуклеиновые кислоты

Существуют определенные трудности количественного измерения степени инактивации нуклеиновых кислот. Ниже перечислен ряд модельных систем, которые позволяют количественно оценить важнейшие из функциональных характеристик этих макромолекул, и перечислены основные феноменологические данные, полученные при изучении характера инактивации облученных нуклеиновых кислот.

Инфекционность облученных нуклеиновых кислот была изучена в экспериментах с ДНК и РНК, изолированных из бактериофагов. Термином «инфекционность» обозначают способность вирусной ДНК или РНК индуцировать образование бактериальной клеткой новых полноценных фагов. Методически эксперимент выглядит так: бактерии обрабатывают лизоцимом, и они теряют часть клеточной стенки — образуются сферопласты, которые можно инфицировать нуклеиновой кислотой, выделенной из бактериофага. Если в инфицированной бактерии возникают новые полноценные фаги, то бактериальная стенка разрывается и из лизированной бактерии высвобождается 100—200 бактериофагов; количество вирусных частиц, высвободившихся из лизированных сферопластов, в определенных пределах пропорционально количеству молекул ДНК или РНК, сохранивших инфекционные свойства. Так как высвободившиеся фаги лизируют новые сферопласты вблизи места своего возникновения, то на сплошном газоне бактериальных клеток, выращенных на агаре, образуется пятно лизиса — «бляшка» (количество бляшек можно подсчитать визуально), — их число служит количественным критерием инфекционности вирусной нуклеиновой кислоты. Этим методом определяют инактивацию вирусной ДНК в результате облучения. Результаты одного из таких экспериментов приведены на рис. III-3.

Доля молекул ДНК, сохранивших инфекционность, отложена по оси ординат в логарифмическом масштабе, все экспериментальные точки укладываются на прямую, т. е. $\ln N/N_0 = -kD$, кривая «доза—эффект» экспоненциальна.

Трансформирующую активность бактериальной ДНК можно оценить по появлению специфических генетических маркеров у бактерий-реципиентов, «поглотивших» трансформирующую ДНК донора. Например, извлекают ДНК из бактерии, устойчивой к стрептомицину, и в ее присутствии инкубируют стрептомицинчувствительных мутантов. Если в результате рекомбинации произошло встраивание специфической последовательности нуклеотидов ДНК донора в геном реципиента, т. е. мутанты стали устойчивы

к стрептомицину (генетический маркер), то на среде, содержащей стрептомицин, мутанты будут образовывать колонии. Число клонов пропорционально доли молекул ДНК, сохранивших трансформирующую активность.

На рис. III—4 показаны результаты опытов, в которых изучали трансформирующую активность ДНК после облучения электронами с энергией в 1 МэВ. Для этого сухие споры *Bacillus subtilis* подвергали облучению, затем выделяли ДНК и инкубировали с клетками, не способными синтезировать индол (генетический маркер); зависимость «доза—эффект» экспоненциальна.

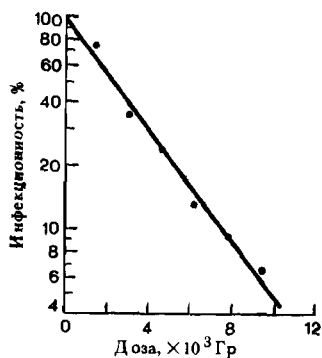


Рис. III—3. Инфекционность ДНК фага фХ174 после облучения препарата γ -лучами ^{60}Co в вакууме (по Юнгу, 1968)

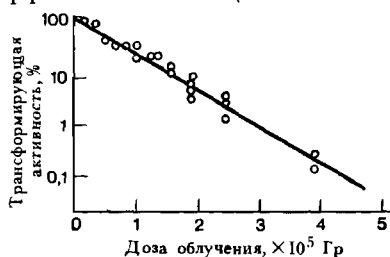


Рис. III—4. Инактивация трансформирующей ДНК *Bacillus subtilis* при облучении сухих спор электронами с энергией 1 МэВ (по Танукэ и Хатчинсону, 1967)

Затравочная активность ДНК, т. е. ее способность служить матрицей для синтеза комплементарных нитей ДНК или РНК, также служит важным критерием инактивации нуклеиновых кислот ионизирующим излучением. Путем соответствующей постановки эксперимента можно дифференциально оценить способность ДНК служить матрицей для синтеза ДНК или РНК. Для этого облученную ДНК инкубируют в полной ДНК-полимеразной (или РНК-полимеразной) системе, содержащей меченые нуклеозидтрифосфаты, а затем измеряют индекс метки в кислотонерастворимой фракции. Интересно, что для подавления способности молекул ДНК служить матрицей для синтеза ДНК необходима доза облучения, в 40 раз меньшая, чем для синтеза комплементарных РНК. Это можно объяснить, если учесть, что в первом случае транскрибируется вся матрица, а во втором — только ее ограниченные участки.

Способность ДНК образовывать гибриды с иРНК также позволяет количественно оценить инактивацию ДНК в результате облучения. Для проведения такого эксперимента получают РНК, меченную радиоактивным фосфором, затем ее смешивают с предварительно облученной ДНК и инкубируют смесь в определенных

Таблица III-2

Сравнительная радиочувствительность различных тРНК,
(способность связывать соответствующие аминокислоты)
(по данным Сэтлоу и др., 1964)

Изученный комплекс: аминокислота/тРНК	$D_{37}, \times 10^4$ Гр	Изученный комплекс: аминокислота/тРНК	$D_{37}, \times 10^4$ Гр
Лейцин	25	Пролин	58
Аланин	43	Метионин	62
Изолейцин	46	Валин	86

условиях. В ряде опытов изучали торможение образования гибридов ДНК—РНК после рентгеновского облучения ДНК из *E. coli* В (препарат иРНК выделяли из того же объекта). Молекула иРНК воспринимала ДНК как «комплементарную», даже если она уже содержала несколько индуцированных облучением повреждений; только после накопления определенного числа повреждений резко снижалась способность облученной ДНК образовывать гибриды с иРНК.



Рис. III—5. Инактивация сухих препаратов тРНК электронами с энергией 1 МэВ (по Сэтлоу и др., 1964). 1, 2, 3, 4, 5, 6 — соответственно комплексы лейцина, аланина, изолейцина, пролина, метионина и валина со специфическими тРНК



Рис. III—6. Инактивация лиофилизированных рибосом из *E. coli* В γ -лучами ^{60}Co (по Кукану, 1966)

Способность транспортных РНК связывать соответствующие аминокислоты можно оценить в специальных модельных системах и, таким образом, количественно оценить их инактивацию ионизирующими лучами. Для этого облучают препарат тРНК и инкубируют его с аминокислотами, меченными по углероду ^{14}C , затем осаждают тРНК и определяют содержание меченых аминокислот в кислотонерастворимой фракции. Результаты такого эксперимента приведены в табл. III-2. Относительную радиочувствительность различных тРНК оценивали по величине дозы D_{37} — наиболее радиочувствительной оказалась лейциновая тРНК.

Кривые «доза—эффект» для лучевой инактивации тРНК представлены на рис. III-5, из которого видно, что доля молекул, сохранивших способность связывать аминокислоты, экспоненциально убывает с ростом поглощенной дозы излучения.

Функциональную активность рибосом, облученных *in vitro*, можно оценить по количеству белка, синтезированного в единицу времени в полной системе, содержащей соответствующие иРНК, тРНК и аминокислоты (рис. III-6). Рибосомы выделяли из *E. coli*, облучали и инкубировали в системе, содержащей в качестве иРНК полиуридиловую кислоту (поли-У), которая инициирует синтез полифенилаланина. Как видно из рис. III-6, с ростом дозы экспоненциально снижается доля рибосом, сохранивших исходную синтетическую активность.

Таким образом, в модельных системах *in vitro* можно анализировать инактивацию нуклеиновых кислот и надмолекулярных комплексов, в которые входят эти макромолекулы. В последние годы исследователи уделяют большое внимание изучению радиационного поражения хроматина. Эти эксперименты приближают нас к пониманию реальных процессов инактивации ДНК в клетке.

Прямое действие радиации на молекулы ДНК, иРНК, тРНК и сложные надмолекулярные ансамбли — рибосомы — приводит к утрате их биологических функций, связанных с репликацией, транскрипцией и трансляцией генетического кода. Такого рода эффекты имеют решающее значение при действии радиации на вирусы, бактерии, клетки и сложные многоклеточные системы. Поэтому в настоящее время изучению механизмов инактивации нуклеиновых кислот ионизирующим излучением уделяется большое внимание.

В настоящем разделе описаны некоторые экспериментальные подходы, позволяющие изучать характер инактивации белков и нуклеиновых кислот ионизирующей радиацией. Феномены, наблюдаемые в такого рода экспериментах, отражают заключительный этап лучевого поражения, когда стойкие структурные повреждения уже привели к необратимым изменениям биологических свойств макромолекулы. Эти данные могут служить отправной точкой биофизического анализа механизма инактивации при прямом действии излучения. Биофизический анализ должен воссоздать все предшествующие этапы «размена энергии» излучения, которые в конечном счете и сформировали наблюдаемые функциональные нарушения.

2. ПЕРВИЧНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОВОДЯЩИЕ К ИНАКТИВАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ ПРИ ПРЯМОМ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЯ

В главе II рассматривался формальный подход, позволяющий на основании экспериментальных кривых «доза—эффект» судить о природе первичных событий, приводящих к конечному радио-

биологическому эффекту. В частности, там обсуждались критерии «одноударности» процесса инактивации и перечислялись условия, выполнение которых показывает, что радиобиологический эффект вызван одиночным переносом дискретной порции энергии излучения к мишени, находящейся в пределах объекта.

Рассмотрим, выполняются ли эти условия в случае инактивации белков и нуклеиновых кислот. Первое требование — экспоненциальный характер кривых «доза—эффект». Как указывалось в данной главе, при облучении сухих или кристаллических белков и нуклеиновых кислот эффект облучения экспоненциально зависит от поглощенной дозы радиации. Второе условие — независимость эффекта от мощности дозы и от того, какими частями она сообщалась объекту, — также выполняется на различных изученных системах. О выполнении третьего условия — снижения эффективности излучения с ростом ЛПЭ — свидетельствуют многочисленные опыты, результат одного из которых представлен на рис. III-7. Трипсин облучали сравнимыми дозами γ -излучения и α -частиц полония (с энергией 5,25 МэВ). Во всем диапазоне исследованных доз γ -излучение оказалось примерно вдвое более эффективным: доза D_{37} для γ -лучей составляла 180 кГр, а для α -частиц — 320 кГр. При одинаковой поглощенной дозе γ -излучение генерирует редкорасположенные одиночные ионизации, а α -частицы — плотные колонны ионов, практически непрерывно следующие вдоль трека частиц. Если одиночной ионизации достаточно для инактивации макромолекулы, то α -частицы образуют множество «ненужных» ионизаций в пределах мишени, а большинство редкорасположенных ионизаций, вызванных γ -лучами, эффективно и приведет к поражению большого числа молекул.

Если представление об одноударности процесса инактивации макромолекулы справедливо, то, исходя из величины дозы D_{37} , можно определить параметры мишени — ее геометрические размеры и молекулярную массу (см. уравнение II-8).

Определение параметров мишени проводится на основании следующих рассуждений. Согласно «теории мишени» в случае одноударного процесса выполняется соотношение (II-8), т. е. масса мишени обратно пропорциональна величине дозы D_{37} , выраженной в числе попаданий на грамм:

$$M = 1/D_{37} \text{ [г]}. \quad (\text{III-1})$$

Переход от дозы, выраженной в гряхх, к дозе в числе попаданий на грамм осуществляют следующим образом. Согласно определению

$$1 \text{ Гр} = \text{Дж} \cdot \text{кг}^{-1} = 6,24 \cdot 10^{15} \text{ эВ} \cdot \text{г}^{-1}. \quad (\text{III-2})$$

Энергию одного попадания, т. е. необходимую для возникновения одиночной ионизации или скопления из 2—3 пар ионов, примем равной 75 эВ (на образование пары ионов расходуется 32—34 эВ, а на рой из 2—3 пар ионов — около 110 эВ).

Теперь можно перейти от дозы в гряхх к дозе в числе попаданий на один грамм:

$$1 \text{ Гр} = 6,24 \cdot 10^{15} \text{ эВ/г} : 75 \text{ эВ/попадание} = 0,82 \cdot 10^{14}$$

попаданий/г.

(III-3)

Зная массу мишени в граммах, ее молекулярную массу легко определить умножением массы на число Авогадро.

На основании экспериментально установленных величин D_{37} были рассчитаны молекулярные массы мишеней, ответственных за инактивацию большого числа молекул. Во всех случаях, начиная от небольшой молекулы пенициллина, имеющей молекулярную массу около 10^3 дальтон, и до трансформирующей ДНК массой в 10^7 дальтон, наблюдается хорошее соответствие между молекулярной массой мишени и истинной молекулярной массой соответствующей молекулы.

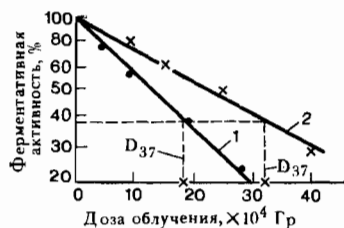


Рис. III-7. Инактивация трипсина γ -лучами ^{60}Co (1) и α -частицами полония (2) в вакууме (по Александру, 1957)

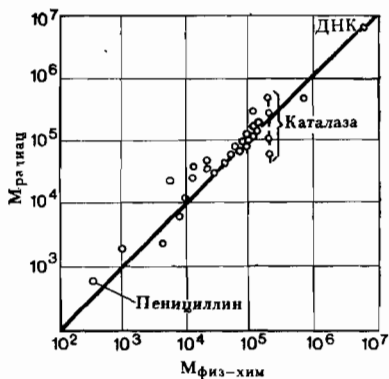


Рис. III-8. Корреляция между молекулярным весом молекул, определенным физико-химическими методами ($M_{\text{физ-хим}}$) и молекулярным весом мишени, ответственной за инактивацию ($M_{\text{радиацион}}$) (по Хатчинсону и Полларду, 1961)

Представление о корреляции этих двух групп дает рис. III-8, где по оси абсцисс отложены истинные молекулярные массы молекул, а по оси ординат — молекулярные массы мишеней, ответственных за инактивацию соответствующих молекул. Если отрезки осей равны, то пересечение их проекций дает точку, лежащую на прямой, проходящей под углом 45° , как это в действительности и имеет место.

В большинстве случаев размер мишени близок к геометрическим размерам молекул, т. е. одиночное событие потери энергии в любой точке молекулы приводит к ее инактивации. Этот вывод имеет важное значение. Дальнейший биофизический анализ должен исходить из того факта, что в результате одиночного взаимодействия ионизирующей частицы с молекулой с затратой энергии около 75 эВ молекула белка или нуклеиновой кислоты утрачивает

различные функциональные свойства. Между двумя этими событиями — переносом дискретной порции энергии излучения к макромолекуле и ее инактивацией — происходит ряд последовательных физико-химических процессов, которые требуют детального описания.

**Количество энергии,
приходящее на взаимодействие.
Первичные продукты радиационного
превращения молекул**

Представление о вероятностном характере взаимодействия излучения с веществом, в результате которого некоторые атомы или молекулы поглощают дискретные порции энергии, сформировалось в 20-е гг. Оно привело к формулировке принципа попадания в радиобиологии. Однако до настоящего времени не создана строгая теория, позволяющая на основании строения молекулы предсказать вероятность поглощения ею определенного количества энергии ионизирующего излучения, т. е. оценить относительную частоту поглощения различных «энергетических пакетов».

Такие исследования интенсивно проводятся в последнее десятилетие. Намечилось два направления: теоретическое, основанное на квантовомеханических моделях, и экспериментальное, связанное с поиском методов прямого измерения потерь энергии в результате одиночного взаимодействия заряженной частицы с молекулой.

Теория, развитая Бете (см. гл. I), позволяет количественно оценить потерю энергии частицы при ее прохождении в веществе. На основании уравнения (I-14) можно рассчитать дифференциальную потерю энергии частицей определенного заряда, движущейся со скоростью v в веществе данной плотности. Однако величина потери энергии dE/dx еще ничего не говорит о том, какие «энергетические пакеты» переносятся к молекуле. В принципе, передача энергии может происходить за счет двух типов взаимодействия — лобового и скользящего соударения.

Лобовое соударение достаточно точно описывается классической электродинамикой. При этом типе взаимодействия осуществляется «прямое попадание» заряженной частицы в орбитальный электрон, который приобретает необыкновенно большой момент количества движения. Вероятность этого эффекта низка. В 8—10 раз чаще происходит скользящее соударение, которое служит основным типом взаимодействия заряженной частицы с молекулами.

При описании скользящего соударения частица рассматривается как источник электрического поля, в котором содержатся фотоны всех возможных частот. Такое поле может взаимодействовать с орбитальными электронами на значительных расстояниях. В газах это расстояние (прицельный параметр) порядка 100 нм, в плотном веществе — около 10 нм. Взаимодействие электриче-

ского поля заряженной частицы с молекулой переводит ее в то или иное возбужденное состояние, в том числе и соответствующее ионизации (рис. III-9).

Силу, с которой электрическое поле действует на молекулы, можно разложить на две составляющие: параллельную пути частицы (продольный компонент) и перпендикулярную (поперечный компонент).

Каждый компонент можно изобразить рядом Фурье как сумму чисто гармонических функций времени:

$$E_{\text{поперечн}} = \sum k_i \cdot \cos(2\pi \nu_i t). \quad (\text{III-4})$$

Продольный компонент так мал, что им можно пренебречь (частица проходит на значительном расстоянии от молекулы).

Анализ Фурье-функции для $E_{\text{поперечн}}$ показывает, что сила поперечного компонента постоянна от низких до почти максимальных частот; каждый интервал частоты включает одно и то же количество энергии фотонов, составляющих поле частицы. Таким образом, действие заряженной частицы (ее электрического поля) на молекулу совпадает с действием света источника, дающего равное число фотонов для каждого интервала частот от видимого света до рентгеновского излучения («белый свет»).

В теории, развитой в 50-е гг. Платцманом, для характеристики молекулы, взаимодействующей с заряженной частицей, вводится величина «силы осциллятора» этой молекулы, которая выражает

вероятность перехода, приводящего к возбуждению или ионизации молекулы.

Силу осциллятора, пропорциональную коэффициенту макроскопического оптического поглощения света соответствующей частоты, обозначают через f_s для перехода из основного состояния в дискретное возбужденное состояние s , которое появляется в результате поглощения света частотой $\nu_s = E_s/h$, где E_s — энергия молекулы в возбужденном состоянии относительно энергии в основном состоянии (энергия возбуждения). Для переходов внутри непрерывного спектра дискретную силу осциллятора нужно заменить на $df/d\nu$ или df/dE , зависящую от энергии $E = h\nu$. Обе формы выражения силы осциллятора нужно понимать как величины, усредненные по всем возможным ориентациям молекулы.

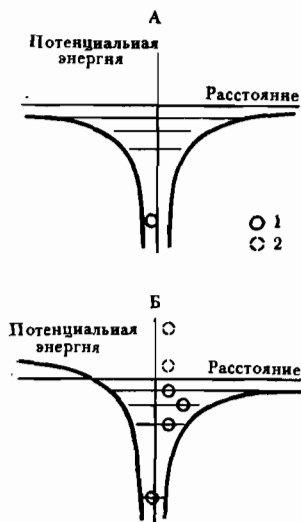


Рис. III-9. Кривая потенциальной энергии молекулы, взаимодействующей с полем заряженной частицы (по Сэтлу и Полларду, 1964): А — молекула до наложения поля; Б — после взаимодействия с полем; 1 — возбужденная молекула; 2 — нонизированная молекула

Если молекула возбуждается светом источника, дающего равное число фотонов для каждого интервала частот — от видимого света до рентгеновского излучения (белый свет), то число молекул, активированных до состояния s , пропорционально силе осциллятора этого состояния:

$$N_s = \text{const} \cdot f_s. \quad (\text{III-5})$$

Уравнение (III-5) показывает, что при постоянном распределении частоты величина N_s пропорциональна силе осциллятора. Если частота падающего света характеризуется распределением $1/h\nu_s = 1/E_s$, то число молекул, возбужденных до состояния s прохождением быстрой заряженной частицы, описывается уравнением

$$N_s \sim f_s/E_s. \quad (\text{III-6})$$

Аналогичное выражение для непрерывного спектра:

$$N(E) \sim (df/dE)/E. \quad (\text{III-7})$$

Уравнение (III-7) называют «оптическим приближением». Основное ограничение этого метода — значительная погрешность при малых значениях f_s . Однако применение оптического приближения дает хорошие результаты для анализа энергетического спектра первичных активаций, генерируемых излучением, в действующем спектре которого преобладают быстрые заряженные частицы.

Сила осциллятора f_s пропорциональна числу электронов в оболочке, в которой индуцируется активация, т. е. она максимальна для внешних оболочек; E_s пропорциональна квадрату эффективного заряда ядра и меньше для внешних оболочек, так как электроны внутренних оболочек экранируют поле ядра. Тогда согласно уравнениям (III-6), (III-7) можно сделать вывод: активация валентных электронов — преобладающий первичный процесс, происходящий в результате прохождения заряженной частицы через вещество.

Если бы существовала возможность теоретически рассчитать силу осциллятора молекулы, то можно было бы предсказать уровни активации молекул в результате взаимодействия с заряженной частицей. Такой расчет, основанный на квантовомеханических представлениях, был проведен лишь для атома водорода. Уже для малых многоатомных молекул эта задача практически невыполнима (не говоря уже о макромолекулах). Оценить спектр сил осциллятора удастся на основании косвенных данных, полученных при изучении коэффициентов поглощения в области непрерывного абсорбционного спектра, показателя преломления и оптической дисперсии, сечения неупругого рассеяния электронов и др.

Согласно уравнению (III-7) в области непрерывного спектра вероятность создания данного возбужденного состояния пропорциональна $(df/dE)/E$. Представив на основании косвенных данных

спектр сил осциллятора многоатомной молекулы, можно для нее построить спектр возбуждения как функцию $R(df/dE)/E$, константа Ридберга R вводится для единства размерности. При таком определении спектр возбуждения совпадает со спектром первичных активаций, создаваемых заряженной частицей при ее первом столкновении. Анализ спектра возбуждения молекул, состоящих из атомов с $Z < 10$ и поэтому имеющих кроме валентных электронов только k -оболочку, показал, что практически все возбуждения сосредоточены в области сравнительно больших значений E . Непрерывный спектр поглощения молекул, в котором сосредоточена сила осциллятора, содержит в себе непрерывные спектры, обусловленные процессом ионизации и процессом диссоциации, а также спектр, создаваемый процессами, в которых возможна как ионизация, так и диссоциация молекулы, конкурирующие между собой (сверхвозбужденное состояние).

На рис. III-10 показан спектр возбуждения метана, построенный на основании экспериментальной оценки силы осциллятора молекулы.

Видно, что из всех первичных событий, которые не приводят к ионизации, 45% составляют сверхвозбужденные состояния. Среднее значение энергии, соответствующее полосе сверхвозбуждения, равно приблизительно 15 эВ, т. е. более чем в 3 раза превосходит энергию диссоциации $\text{CH}_3\text{—H}$, равную 4,4 эВ. В этом сверхвозбужденном состоянии существует конкуренция между явлениями ионизации и диссоциации. Часть спектра, обозначенная как «ионизация», соответствует тем уровням возбуждения, которые всегда приводят к ионизации.

Анализ спектров возбуждения показывает, что для большинства органических молекул спектр сил осцилляторов лежит в области примерно 10—30 эВ над основным состоянием. Сила более длинноволновых осцилляторов невелика (исключение составляют молекулы, имеющие двойные и тройные связи; они могут возбуждаться и при меньших энергиях). В большинстве случаев спектры энергий осцилляторов превышают потенциал ионизации. Однако не все состояния с энергиями, превосходящими потенциал ионизации, непременно приводят к ионизации молекулы. «Сверхвозбужденные состояния» могут рассеивать энергию при внутримолекулярных изменениях или при диссоциации молекулы на два радикала. Только часть спектра, обозначаемая как «ионизация», относится к тем переходам, которые всегда приводят к потере электрона.

Знание спектра возбуждения для биологически активных макромолекул позволило бы оценить распределение и частоту переносимых к молекуле дискретных порций энергии. Теоретический расчет сил осцилляторов многоатомных молекул, как уже говорилось, задача практически невыполнимая. Отсутствуют и экспериментальные исследования, которые позволили бы представить спектр возбуждения макромолекул. Величину «пакетов энергии»,

передаваемых макромолекуле в результате одиночного взаимодействия, можно получить путем прямого измерения потери энергии электронами, проходящими через тонкие пленки, для которых вероятность более чем одного взаимодействия с электроном крайне мала. Для этого электроны с энергией 20 кЭв пропускали через тонкие пленки полимера (формваровая фольга) толщиной 13 нм и слои ДНК толщиной 200 нм. Исходя из величины неупругого рассеяния определяли частоту различных событий потери энергии электроном (рис. III-11). Вероятность более чем одного

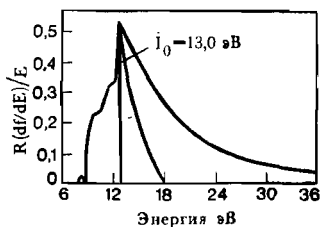


Рис. III-10. Спектр возбуждения метана (по Платцману, 1962)

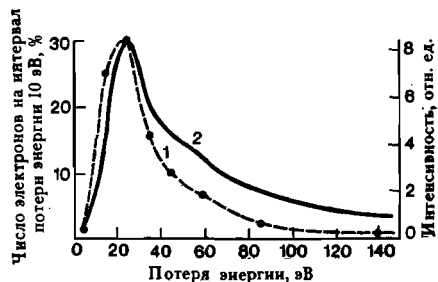


Рис. III-11. Распределение потери энергии электронами, проходящими через тонкие слои органического вещества: 1 — электроны 20 КэВ проходят через слой полимера «формвар» толщиной 130 А (по Раус, Симпсон, 1964); 2 — электроны с энергией 150 КэВ проходят через пленку ДНК толщиной 2000 А (по Джонсону, Римеру, 1967)

события потери энергии при прохождении электроном слоя толщиной в 13 нм очень мала. Поэтому данные рис. III-11,1 можно рассматривать как меру распределения частоты различных событий потери энергии. Из рисунка видно, что чрезвычайно редко величина потери энергии меньше 10 эВ. С наибольшей частотой при каждом первичном взаимодействии переносится пакет энергии в 22эВ, в то время как среднее количество потери энергии на одно событие взаимодействия 60 эВ.

Спектры потери энергии в формваре и ДНК качественно схожи. Различие, вероятно, связано с неодинаковой толщиной пленок (технически очень трудно получить пленки ДНК тоньше 200 нм). При такой толщине слоя ДНК можно ожидать более одного события потери энергии. Следует также учесть, что оба рассматриваемых спектра включают и небольшое число лобовых соударений. Если сделать необходимые поправки на эти эффекты, то мы получим спектр возбуждения ДНК, который позволил бы оценить спектр сил осцилляторов этой молекулы.

Итак, прямые эксперименты показывают, что на одно событие потери энергии к макромолекулам в среднем переносится 60 эВ энергии излучения. Эта величина значительно превосходит потенциал ионизации молекулы. Перенос такого большого количества энергии с высокой вероятностью переводит молекулу в иони-

зированное состояние. Помимо ионизированных возникают возбужденные и сверхвозбужденные молекулы. Относительный вклад ионизации и возбуждения в биологический эффект можно оценить некоторыми специальными методами.

Обратимся еще раз к рис. III—11. Возбуждение различных осцилляторов приводит к появлению возбужденных, сверхвозбужденных и ионизированных молекул. Теоретический расчет выхода этих первичных продуктов требует знания действующего спектра, сечения возбуждения и ионизации и представляет пока еще не решенную задачу. Метод «оптического приближения» позволяет оценить соотношение этих продуктов исходя из распределения спектра сил осциллятора молекулы. Информацию о распределении силы осциллятора молекулы можно получить на основании косвенных экспериментов с использованием различных физических методов.

Образованием первичных продуктов, т. е. возбужденных, сверхвозбужденных и ионизированных молекул, неравномерно распределенных в пространстве, заканчивается первая, или физическая, стадия действия излучения.

3. ДАЛЬНЕЙШАЯ СУДЬБА ВОЗБУЖДЕННЫХ МОЛЕКУЛ. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ СТАДИЯ ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЯ

С того момента, как в облученной системе возникли первичные возбужденные продукты, и до момента установления температурного равновесия протекает сложная цепь реакций, относящихся к «физико-химической стадии» действия излучения. На этом этапе высоковозбужденные продукты перераспределяют свою избыточную энергию или избавляются от нее.

В ряде работ, которые носят пока отнюдь оценочный характер, рассматривается возможная судьба первичных возбужденных продуктов, генерируемых высокоэнергетическим излучением среди молекул поглощающей среды.

На рис. III—12 представлена временная шкала различных процессов, в результате которых молекула перераспределяет избыточную энергию или избавляется от нее.

Рассмотрим различные характеристики процессов в молекуле, представленные на рис. III—12. Нижний предел времени, необходимого для передачи энергии от частицы к частице, устанавливает принцип неопределенности Гейзенберга. Передача энергии E , сравнимой с энергией связи электрона в молекуле, требует времени, равного по порядку величины периоду колебаний электрона 10^{-16} — 10^{-15} с. Любая перестройка электронной системы сильно возбужденной молекулы может произойти за время такого порядка. Однако некоторые из сильно возбужденных состояний существуют в сотни раз дольше. Это означает, что с про-

цессами ионизации в молекулах могут конкурировать процессы внутренней перестройки, сопровождающиеся смещением атомов.

Эти изменения в молекуле происходят со скоростью, ограниченной инерцией атомов и силами, действующими между ними. Для этого необходимо время, сравнимое с периодом нормальных колебаний для данной связи. Инфракрасная спектрометрия позволяет получить сведения о частоте таких колебаний. Для целого ряда молекулярных колебаний (растяжение связей, изгиб линейных молекул и т. д.) периоды лежат в сравнительно узком

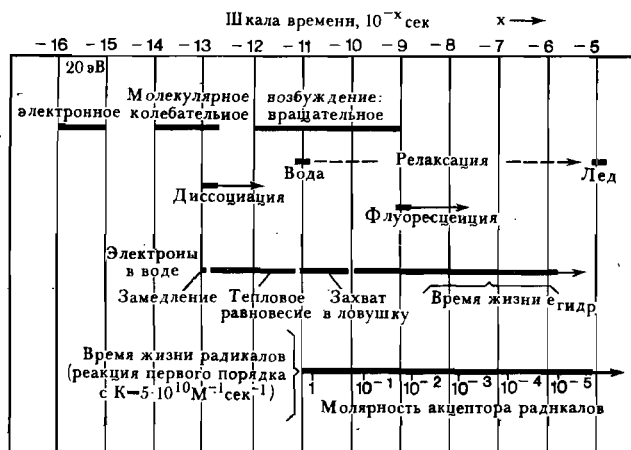


Рис. III—12. Временная шкала процесса деградации энергии, передаваемой заряженными частицами молекулам среды (по Бругу, 1972)

диапазоне — от 10^{-14} до $2 \cdot 10^{-13}$ с. Следовательно, в результате внутренней конверсии долгоживущие сильновозбужденные состояния могут перейти в слабозбужденные.

В больших молекулах избыточная энергия электронов легко переходит в колебательную энергию из-за наличия целого ряда возможных электронных и колебательных энергетических состояний, причем некоторые из поверхностей потенциальной энергии перекрываются. В точках их пересечения переход от более высоких электронных возбужденных состояний к более низким может происходить без испускания излучения, и избыточная энергия будет переходить в колебательную форму. Такая внутренняя конверсия приводит к переходу молекулы в низшее возбужденное состояние с сохранением той же мультиплетности за время, примерно равное 10^{-13} — 10^{-12} с. Накопление колебательной энергии в отдельных связях может привести к диссоциации молекулы с образованием радикальных продуктов, находящихся в возбужденном состоянии.

В конденсированной системе вероятность такого распада молекулы сильно снижается за счет двух обстоятельств. 1. Высокая частота столкновений молекул вызывает перераспределение колебательной энергии в результате внутренней конверсии. Таким образом, исключается накопление ее в той молекуле, которая получила первичное возбуждение. 2. Окружающие молекулы образуют «клетку», которая затрудняет расхождение фрагментов; вместо этого они, вероятно, испытывают ряд столкновений и рекомбинируют. Молекулы распадаются на два фрагмента, один из которых — атом водорода. Большую часть кинетической энергии уносит атом водорода, и поэтому он легче проникает через стенки «клетки».

Сверхвозбужденные молекулы — это молекулы, обладающие избыточной энергией, которая превышает потенциал ионизации (рис. III—10). Существуют экспериментальные данные, подтверждающие представления о том, что сверхвозбужденное состояние в сложных молекулах сохраняется в течение времени, примерно в 100 раз превышающего период колебаний, т. е. больше 10^{-13} с.

Некоторые из сверхвозбужденных состояний возникают в результате одновременного перехода двух или нескольких электронов на более высокие энергетические уровни. Взаимодействие таких уровней может привести к концентрации энергии в одном из электронов. Если этот эффект произойдет, то электрон будет выброшен из молекулы, а сама она станет положительным ионом. С такой «автоионизацией» конкурируют процессы внутренней перестройки молекулы, в том числе и те, которые приводят к смещению атомов и переходу избыточной энергии в химическую и тепловую, что ведет к уменьшению имеющейся энергии до значений, меньших порога ионизации. Таким образом, в сверхвозбужденных молекулах существует конкуренция между процессом ионизации и диссоциации.

Ионизированные молекулы. Ионизацию можно рассматривать как одну из форм возбуждения, при которой электрон или группа электронов приобретает настолько большой запас энергии, что выбрасывается из молекулы. Образуются ионы, находящиеся в состоянии электронного и, как правило, некоторого колебательного возбуждения. Это происходит потому, что межатомные расстояния в ионе, находящемся в основном состоянии, и в нейтральной молекуле различаются между собой, акт же ионизации происходит значительно быстрее перестройки связи (принцип Франка — Кондона); в результате ион начинает свое существование с атомными расстояниями, отличающимися от нормальных и соответствующими некоторой колебательной потенциальной энергии. Процесс внутренней конверсии, рассмотренный выше для возбужденных молекул, происходит аналогичным образом и в ионе, если ион изолирован; концентрация колебательной энергии на определенных связях может привести к его распаду.

В жидкостях и твердых телах быстрое рассеяние колебательной энергии в состоянии предотвратить распад и позволить иону перейти в низшее электронное состояние, в котором он способен существовать некоторое время. Если затем ион встретится с каким-либо отрицательно заряженным образованием (ион, сольватированный электрон и т. д.), энергия соединения может оказаться достаточной для распада молекулы на два свободных радикала.

Таким образом, дальнейшие превращения, которые испытывает ионизированная молекула, вероятнее всего приведут ее к распаду на два свободных радикала.

Судьба электронов, испущенных молекулой. Электроны, выбитые из молекулы, обычно делят на две группы в соответствии с тем, больше их кинетическая энергия энергии низшего уровня электронного возбуждения молекул окружающей среды или меньше ее. Электроны первой группы взаимодействуют с электронной системой молекул, с которыми они сталкиваются, и теряют энергию в неупругих соударениях. В конце концов они переходят во вторую группу, оставляя на своем пути ряд молекул с электронными возбуждениями. В дальнейшем эти электроны теряют энергию за счет возбуждения колебательных и вращательных движений в сталкивающихся с ними молекулах. Если в среде преобладают молекулы, энергия низшего уровня электронного возбуждения которых существенно превышает кинетическую энергию электрона, и имеется небольшая доля молекул с низкими энергиями электронного возбуждения, то электроны, теряющие мало энергии при столкновении с молекулами первого типа, будут «разыскивать» и возбуждать молекулы второго типа, передавая значительно большую часть поглощенной энергии, чем это соответствовало бы их малой концентрации в среде. По данным Платцмана 15—20% всей энергии, поглощенной при воздействии высокочастотного излучения, передается медленными электронами и среднее время, необходимое для достижения ими теплового равновесия со средой, составляет примерно 10^{-11} с. За время такого же порядка происходит поляризация среды вокруг замедлившегося электрона. Возникает чрезвычайно активное в химическом отношении образование, названное сольватированным электроном (в водной среде это так называемый «гидратированный электрон», о котором подробнее сказано в следующей главе).

Процессы, происходящие на физико-химической стадии, приводят к различным типам перераспределения возбужденными молекулами избыточной энергии и, таким образом, обуславливают появление разнообразных активных продуктов (ионов, радикалов и т. д.). Эти процессы протекают в течение очень короткого интервала времени, порядка 10^{-14} – 10^{-11} с, их экспериментальное исследование представляет значительную трудность. При облучении вещества, состоящего из одного сорта молекул, с опреде-

ленной вероятностью возникают возбужденные, сверхвозбужденные и ионизированные молекулы, а каждый из этих первичных продуктов имеет много возможностей для дальнейших превращений. В результате образуются ионы и радикалы разнообразной природы с широким спектром химических свойств, взаимодействующие друг с другом и с окружающими молекулами. Эти процессы составляют третью, или химическую, стадию действия ионизирующего излучения. Реакции ионов и радикалов формируют различные типы структурного поражения молекул. Если исследуемые молекулярные структуры входят в состав биологических систем, то их повреждение может повлечь за собой такие нарушения в системе, которые, проходя биологическую стадию, в конечном счете ведут к развитию наблюдаемого биологического эффекта облучения. Если процессы, происходящие на химической стадии, заканчиваются в первые 10^{-6} — 10^{-3} с после облучения, то биологическая стадия может длиться от нескольких секунд до многих лет (например, вызванное облучением уменьшение средней продолжительности жизни млекопитающих).

4. СТРУКТУРНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ОБЛУЧЕННЫХ МАКРОМОЛЕКУЛАХ

Повреждения, возникающие в структуре облученной макромолекулы, могут привести к изменению ее биологических свойств. Поэтому важнейший этап биофизического анализа механизмов инактивации макромолекул ионизирующим излучением состоит в выявлении всех типов структурного повреждения молекул, выяснении природы процессов, приводящих к данному типу повреждения, и в установлении причинно-следственной связи между типом структурного повреждения и характером изменения биологических свойств макромолекулы. Эти вопросы изучены все еще недостаточно.

Анализ структурных повреждений, возникающих в облученной макромолекуле, представляет сложную экспериментальную задачу, требующую использования высокочувствительных методов анализа.

Структурные повреждения, выявляемые в облученных нуклеиновых кислотах. При облучении сухих препаратов ДНК возникает ряд структурных повреждений, которые удается количественно оценить, как правило, при использовании высоких доз излучения, порядка 10^4 Гр. Это значительно превосходит значение дозы D_{37} для различных типов инактивации. Не исключено, что в действительности инактивация нуклеиновых кислот возникает в результате единичных повреждений, например вследствие разрушения нескольких нуклеотидов. Однако ни одним из современных методов анализа не удается обнаружить столь незначительные повреждения среди десятков тысяч нуклеотидов, составляющих полинуклеотидную последовательность ДНК или РНК.

Для выявления структурных повреждений нуклеиновых кислот используют различные методы измерения молекулярной массы облученного препарата (седиментационный анализ, изменение светорассеяния, осмоса, характеристической вязкости и т. д.), так как молекулярная масса ДНК или РНК изменяется вследствие двухнитевого разрыва или из-за возникновения сшивок между молекулами. Если разрыв произошел только в одной из цепей ДНК, то снижение молекулярной массы выявляется после щелочной денатурации или нагревания до 90°. Количественно число однонитевых разрывов определяют с помощью фермента фосфомоноэстеразы, который отщепляет неорганический фосфат от всех концевых монофосфорных групп (возможное место разрыва), а количество отщепившегося фосфата измеряют фотометрически. Влияние облучения на число водородных связей в молекуле оценивают по степени ее денатурации, например сопоставив количество кислоты, необходимое для денатурации нативной и облученной ДНК (электрометрическим титрованием). Один из способов определения степени денатурации ДНК основан на использовании гиперхромного эффекта (коэффициент оптического поглощения нативной ДНК примерно на 30% ниже, чем для одиночной цепи или смеси соответствующих нуклеотидов): возрастание коэффициента оптического поглощения облученной ДНК указывает на ее денатурацию. Еще один метод выявления денатурированных участков основан на хроматографическом отделении неповрежденных молекул от молекул, имеющих денатурированные участки. Разрушение азотистых оснований в облученной нуклеиновой кислоте можно обнаружить с помощью специфических химических реакций или по уменьшению оптического поглощения.

Использование перечисленных и ряда других методов позволило установить, что в результате облучения сухих препаратов ДНК возникают следующие типы структурного повреждения макромолекулы:

- 1 — одно- и двухнитевые разрывы;
- 2 — межмолекулярные поперечные сшивки полинуклеотидных цепей;
- 3 — разветвленные цепи вследствие суммарного эффекта одиночных и двойных разрывов (за счет присоединения обломков молекулы, образовавшихся в результате двойного разрыва, к местам одиночных разрывов в цепи ДНК).

Результаты одного из экспериментов по определению одно- и двухнитевых разрывов в ДНК приведены на рис. III-13.

Одиночные разрывы нити ДНК и разрывы в комплементарных участках обеих нитей пропорциональны поглощенной дозе излучения. Это означает, что двойной разрыв вызывается одиночным событием потери энергии, а не случайным совпадением двух соседних однонитевых разрывов (в противном случае кривая B_2 имела бы иной вид). Вероятность двойного разрыва возрастает с увеличением ЛПЭ-излучения). Так, при облучении ус-

коренными ионами аргона ДНК из фага Т7 однострунные разрывы встречаются только в 2—3 раза чаще двухструнных, в то время как для γ -облучения это отношение достигает 5 или 6.

После облучения сухой ДНК возникают не только разрывы полинуклеотидных нитей, но и сшивки между ними (рис. III-14). По сравнению с контрольными образцами максимум коэффициента седиментации облученной ДНК сдвигается в область меньших значений, т. е. молекулярная масса основной части облученного препарата снижается вследствие одиночных и двойных

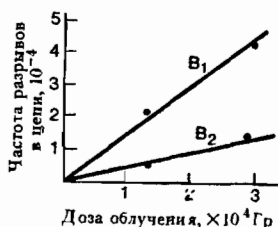


Рис. III-13. Однострунные (B_1) и двухструнные (B_2) разрывы в сухой ДНК тимуса теленка при рентгеновском облучении в вакууме (по Хагену, Вельштейну, 1965)

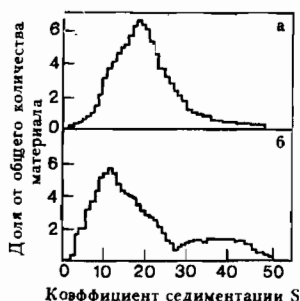


Рис. III-14. Профиль седиментации ДНК тимуса теленка при облучении сухих препаратов в вакууме в дозе $3 \cdot 10^4$ Гр. (по Хагену, Вельштейну, 1965)

разрывов. Однако наряду с этим наблюдается небольшой пик в области 30—50 S, который не отмечен в контрольном образце. Эта фракция возникла вследствие сшивки между полинуклеотидными тяжами ДНК.

Механизм возникновения структурных повреждений ДНК в результате поглощения энергии ионизирующего излучения выяснен недостаточно. Работы в этом направлении интенсивно проводятся в настоящее время. Большое число исследований посвящено анализу начальной стадии химических изменений в облученных нуклеиновых кислотах, для которой характерно появление свободных радикалов. Методом ЭПР-спектроскопии изучают выход и структуру радикалов, возникающих при облучении свободных азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов. Сопоставление этих спектров с наблюдаемыми при облучении сухой ДНК позволяет в ряде случаев идентифицировать радикалы, определяющие спектр облученных нуклеиновых кислот. Один из компонентов сигнала ЭПР облученной ДНК — радикал тимина, образованный, по мнению ряда авторов, продуктом присоединения атомарного водорода к C_6 -атомам тимина. Аналогичный эффект можно продемонстрировать при действии на порошкообразный образец атомарным водородом, полученным при газовом разряде:

образующиеся сигналы ЭПР сходны с наблюдаемыми в облученных нуклеотидах и препаратах ДНК. При облучении атомарный водород отщепляется от остатка дезоксирибозы, радикалы которой образуются посредством утраты атома водорода и раскрытия кольца.

В биофизических исследованиях последних лет анализируется роль эффектов миграции энергии в пределах двухнитевой ДНК или между молекулами. Ряд данных указывает на возможность передачи энергии от одной цепи к другой посредством системы водородных связей. Так, при облучении при 77 К 1:1—кокристиалла, состоящего из 9-метиладенина и 1-метилтимина, обнаружили неспецифический сигнал ЭПР. После нагревания образца до комнатной температуры спектр приобретал характерные очертания радикала тиминового кольца. Обработанная таким образом эквимольная смесь указанных соединений давала сигнал ЭПР, характерный для суммарного спектра аденина и тимина. Этот опыт свидетельствует о переносе энергии или спина через водородные мостики в кокристалле от аденина к тимину. В облученной ДНК также наблюдают ярко выраженный сигнал тимина и слабый — аденина. О существовании внутримолекулярного переноса спина в облученной ДНК свидетельствует изменение сигнала ЭПР при нагревании облученных образцов от 77 К до комнатной температуры. Анализ форм спектра, полученного при комнатной температуре, показывает, что он не образуется простым наложением первичного спектра отдельных составных частей ДНК, а на него оказывают влияние эффекты перестройки.

Интересные данные о механизме возникновения структурных повреждений в облученной ДНК получены в экспериментах с использованием модифицирующих агентов (см. гл. VI).

Структурные повреждения облученных ферментов. Большинство исследований выполнено на белках с известной первичной структурой. Это позволило выявить тонкие различия облученных и нативных препаратов.

Анализ структурных повреждений, возникающих в облученных препаратах рибонуклеазы, показал, что при дозах, близких к D_{37} , наблюдается:

- изменение аминокислотного состава. Заметнее всего в образцах снижалось содержание 6 аминокислот: метионина, фенилаланина, лизина, гистидина, тирозина и цистина;
- нарушение третичной структуры макромолекулы, оцениваемое по изменению оптического поглощения и оптического вращения, доступности остатков тирозина, степени переваривания белка трипсином и т. д.;
- возникновение разрывов полипептидной цепи, приводящее к появлению свободных амидных групп и фрагментов молекулы;
- появление агрегатов, о наличии которых судили по изменению константы седиментации и скорости элюции

при хроматографии на сефадексе;

- разрыв сульфгидрильных связей и появление свободных SH-групп.

При облучении лизоцима обнаружен несколько иной характер структурных повреждений:

- изменяется конформация макромолекулы;
- появляется несколько компонентов, обладающих ферментативной активностью;
- не обнаруживаются изменения в аминокислотном составе макромолекулы.

Исследование структурных повреждений облученного химотрипсина показало, что поглощение энергии ионизирующих излучений вызывает:

- появление новых хроматографических пиков при элюции облученного препарата. Эти фрагменты утратили ферментативную активность;
- возникновение конформационных изменений, выявляемых по изменению оптического вращения и уменьшению прочносвязанных амидных атомов водорода;
- разрушение аминокислотных остатков серина и триптофана (в среднем одна молекула серина и одна триптофана на молекулу фермента при дозе D_{37});
- снижение способности связывать субстрат активным центром.

Структурные повреждения, о которых говорилось выше, наблюдаются после облучения в дозе, меньшей или равной D_{37} , т. е. в случаях, когда в среднем каждая молекула испытывает только одно событие попадания (см. «одноударные» кривые инактивации, гл. II). В диапазоне больших доз картина существенно усложняется за счет возникновения повторных актов взаимодействия, вызывающих дополнительные повреждения.

Сложность построения реальной картины возникновения структурных повреждений в облученных белках заключается прежде всего в том, что необходимо выявить те физико-химические процессы, в результате которых одиночное событие потери энергии в пределах белковой молекулы, т. е. поглощение структурой около 60 эВ, вызывает ее генерализованное повреждение, такое, как изменение конформации. Следует также объяснить причину селективного поражения отдельных структурных звеньев, например только шести аминокислот в первичной структуре рибонуклеазы, или серина и триптофана в молекуле химотрипсина. Первичное событие абсорбции энергии носит вероятностный характер, т. е. любая из аминокислот с равной вероятностью поглощает энергию излучения, а конечное структурное поражение локализуется в специфических участках. Для объяснения этого эффекта, вероятно, необходимо допустить возможность миграции энергии и заряда по полипептидной цепи вплоть до локализации в определенном структурном звене.

Исследования, которые проводятся в последние годы, посвящены идентификации свободнорадикальных состояний, возникающих в облученных белках. Для этого используются ЭПР-спектроскопия и другие специальные методы анализа. Установлено, что после облучения сухих ферментов при температуре 77 К на спектрах ЭПР обнаруживается недискретный синглет. При нагревании образцов до комнатной температуры спектр ЭПР представляет собой уже спектр вторичных радикалов, состоящих из дублета (возможно, α -углеродных радикалов) и сложного спектра радикалов серы (рис. III-15). Дальнейший анализ должен установить роль наблюдаемых вторичных радикалов в появлении конечных структурных повреждений и в эффекте инактивации фермента. Перспективным для этого может оказаться использование модифицирующих агентов, т. е. воздействий, способных изменить характер возникающих радикальных продуктов. Например, если эти агенты параллельно изменяют и спектр ЭПР вторичных радикалов, и характер структурных изменений в ферменте, то можно предположить причинную связь между появлением

вторичных радикалов и потерей ферментативной активности облученными молекулами.

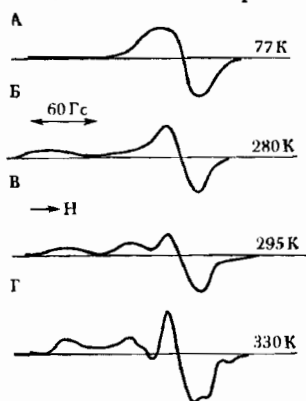


Рис. III—15. Спектр ЭПР рибонуклеазы, облученной при температуре 77 К (по Копелану и др., 1968): А—Г — измерение сигнала ЭПР при различных температурах

Для локализации радикалов, возникающих в полипептидной цепи после облучения, применяют метод, основанный на использовании тритированного сероводорода. Образованные облучением радикалы должны взаимодействовать с $^3\text{H}_2\text{S}$ согласно уравнению

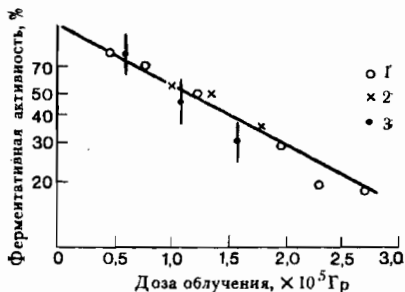
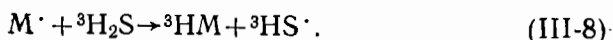


Рис. III—16. Корреляция между потерей ферментативной активности, поражением активных центров и конформационными изменениями химотрипсина, облученного γ -лучами ^{137}Cs (по Толберту, 1966): 1 — остаточная ферментативная активность; 2 — оставшиеся непораженными активные центры; 3 — изменение конформации, определяемое по оптическому вращению λ_c

Помещая облученную рибонуклеазу в атмосферу $^3\text{H}_2\text{S}$ и далее подвергая ее гидролизу, устанавливают, в каких аминокислотах содержится радиоактивная метка (^3H), т. е. определяют локализацию возникших радикалов. Опыты показали, что тритий включался (в убывающем количестве) в лизин, метионин, пролин, гистидин; в небольших концентрациях тритий обнаруживался в фенилаланине, изолейцине и валине. В общем, это соответствует количественному распределению поврежденных аминокислот в облученной РНКазе.

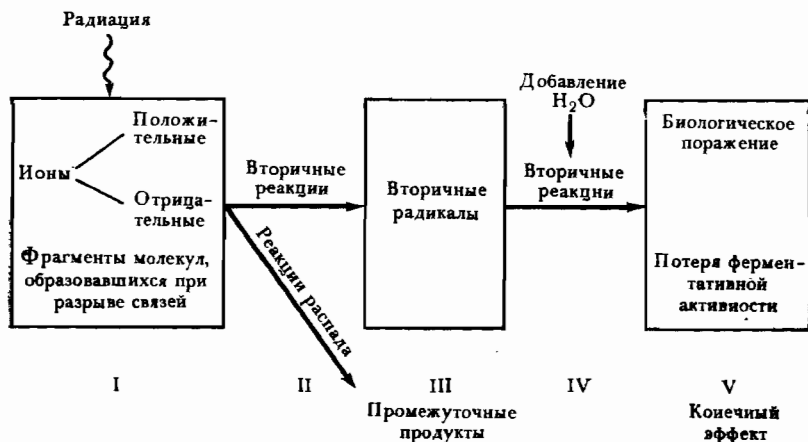


Рис. III—17. Свободнорадикальная модель радиационной инактивации сухих ферментов (по Хенриксену, 1966): I — спектр первичных продуктов; II — процессы, протекающие на физико-химической стадии; III — образовавшиеся промежуточные продукты; IV, V — конечный эффект — инактивация фермента

При комнатной температуре в облученных молекулах всех еще содержится много нестабильных продуктов. При растворении фермента (необходимом для определения его активности) нестабильные промежуточные продукты превращаются в стабильные пораженные структуры. Это может быть связано с реакцией белковых радикалов или лабильных химических связей с водой либо с увеличением подвижности в растворе отдельных полипептидных цепей. В опытах с рибонуклеазой было показано, что растворение облученной молекулы приводит к ее денатурации. Появление свободных амидных групп и фрагментов после раскручивания облученных белков указывает на существование замаскированных разрывов полипептидной цепи. В случае с лизоцимом при дозе 300 кГр не обнаружено изменения аминокислотного состава (D_{37} инактивации — 266 кГр). Однако выявлены конформационные изменения. Вероятно, они и приводят к инактивации.

В случае с химотрипсином нет единства взглядов на роль отдельных структурных нарушений в эффекте инактивации. Данные

на рис. III-16 свидетельствуют о параллелизме между инактивирующим действием излучения, возникновением конформационных изменений в облученной молекуле и потерей способности связывать субстрат активным центром. Эти результаты объясняют поразному. Первое объяснение состоит в том, что поглощение энергии излучения приводит к нарушению конформации белковой молекулы; это, в свою очередь, вызывает изменение конформации активного центра и его способности связывать субстрат и, как следствие, инактивацию фермента. Другая точка зрения основана на том, что один сериновый и (или) триптофановый остаток в особом участке химотрипсина, например в активном центре, более радиочувствителен, чем такие же аминокислоты в других участках белковой молекулы. При дозе D_{37} в среднем на одну молекулу фермента разрушается по одному сериновому и триптофановому остатку; если эти ключевые аминокислоты регулируют конформацию активного центра, то их разрушение приведет к поражению активного центра и, тем самым, к инактивации химотрипсина.

Схема отдельных этапов лучевой инактивации сухих ферментов приведена на рис. III-17. Она нуждается в дальнейших уточнениях.

В последние годы особое внимание уделяют анализу скрытых повреждений, возникающих в облученных белках, и изучению механизмов миграции энергии в макромолекулах.

Миграция энергии излучения в биологических структурах

Анализ кривых «доза — эффект» свидетельствует о том, что инактивация фермента может произойти в результате одиночного события потери энергии излучения в любой точке макромолекулы (параметры мишени совпадают с истинными размерами макромолекулы). Теоретический анализ спектра сил осцилляторов молекулы и результаты прямых измерений потери энергии, приходящейся на одно взаимодействие, показывают, что ускоренные заряженные частицы с большой вероятностью переносят к макромолекуле значительные порции энергии, в среднем около 60 эВ. Этого более чем достаточно для разрыва любой химической связи и удаления электрона из молекулы.

Однако при объяснении механизма инактивации фермента в результате одиночного события попадания следует иметь в виду, что определенный тип инактивации (например, утрата субстратной специфичности) может быть связан со структурным повреждением, возникшим не в любом, а, скорее всего, в определенном участке макромолекулы. В то же время представление об одноударности процесса инактивации означает, что поглощение энергии в любой точке молекулы однозначно приводит к изменению

ее биологических свойств. Можно было бы думать, что разрыв химической связи, в какой бы точке макромолекулы он ни произошел, приведет к ее денатурации и потере функциональной активности. Это не всегда так. Для многих ферментов показано, что при дозе D_{37} , когда в среднем каждая макромолекула испытывает одиночное попадание, одни функциональные свойства утрачиваются, в то время как другие остаются без изменения (для рибонуклеазы, облученной в дозе D_{37} , отмечена потеря каталитической активности при сохранении способности связывать специфический субстрат). Это подтверждает точку зрения, согласно которой в результате одиночного акта абсорбции энергии структурное повреждение локализуется в определенном звене макромолекулы, обуславливая специфический характер инактивации.

Возможно, объяснение селективного действия облучения состоит в том, что, хотя первоначальное событие поглощения энергии с одинаковой вероятностью происходит в любом звене макромолекулы (например, в любой из сотен аминокислот, составляющих фермент), существует возможность миграции поглощенной энергии и ее локализации в определенном «слабом звене», которое будет претерпевать дальнейшие химические изменения.

Существует ряд прямых доказательств миграции энергии возбуждения внутри молекулы и между молекулами.

Термолюминесценция. Суть эффекта состоит в том, что при нагревании молекул, облученных при температуре жидкого азота, происходит испускание квантов света. Это свечение легко зарегистрировать. Интенсивность свечения зависит от температуры. Для белков, облученных при 77 К, максимальная люминесценция наблюдается при 120 К. Источником люминесценции трипси-на может служить остаток триптофана, к которому переносится энергия, поглощенная остатками тирозина и фенилаланина (механизм такого рода переноса энергии между ароматическими аминокислотами изучен при фотовозбуждении люминесценции). Интересно, что рибонуклеаза не содержит остатка триптофана и не обладает заметной люминесценцией.

Измерение сигнала ЭПР. Метод электронного парамагнитного резонанса основан на исследовании магнитного поля неспаренного электрона. Характерный для данного радикала сигнал ЭПР возникает в результате взаимодействия магнитного поля неспаренного электрона с магнитными полями окружающих ядер и электронов, т. е. сигнал ЭПР изменяется в зависимости от локализации неспаренного электрона. На рис. III-18 приведен характерный спектр ЭПР белка, облученного при 77 К, при комнатной температуре. С повышением температуры, как было показано на рис. III-15, сигнал ЭПР изменяется от недискретного синглета до характерного спектра, в котором можно выявить сигнал глицинподобного радикала и радикала серы. Убедиться в этом можно при сопоставлении спектра ЭПР облученного белка и облученного полиглицина или цистина. По мнению ряда ис-

следователей, сразу после облучения происходит неупорядоченное образование электронных «дырок»; свободный электрон или электронная «дырка» мигрируют по белковой молекуле к серо-содержащим группам или остаткам глицина, где в результате отрыва атома водорода происходит образование вторичных радикалов, выявляемых после нагревания облученных образцов. Такой механизм миграции энергии предполагает быстрое перемещение электрона (или «дырки») вдоль белковой молекулы и может обеспечиваться перекрыванием волновых функций пептидных групп через асимметричный атом углерода.

Использование метода ЭПР позволяет выявить межмолекулярный перенос энергии от макромолекулы, поглотившей энергию излучения, к окружающим молекулам. Ранее мы упоминали, что при облучении смеси молекул двух типов суммарный сигнал ЭПР отличается от теоретической суммы спектров ЭПР этих молекул. Еще одно доказательство получено при изучении облученной глицеральдегиддегидрогеназы. В спектре ЭПР этого фермента после облучения не обнаруживается си-

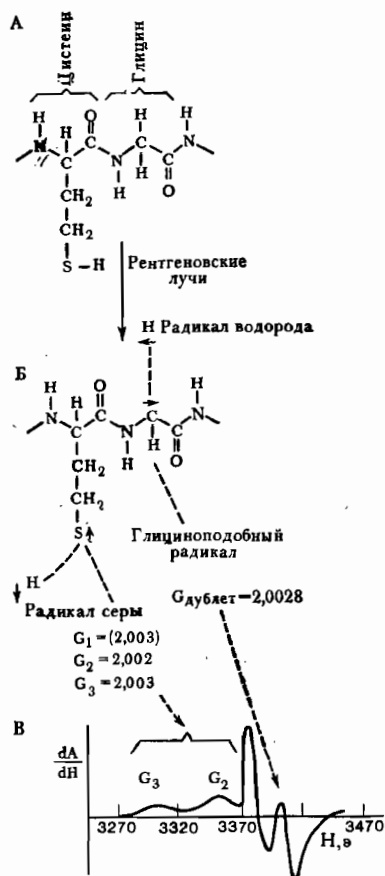
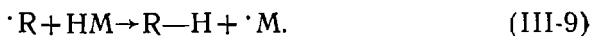


Рис. III—18. Схема образования вторичных радикалов в облученных белках при комнатной температуре (по Хенриксену, 1966): А — полипептидная цепь до облучения; Б — полипептидная цепь после облучения, стрелки обозначают спины электронов; В — спектр ЭПР облученного белка (трипсин) при 295 К, облучение в вакууме электронами с энергией 6,5 МэВ

гнал радикала серы. Если же к облученному ферменту добавить цистеамин, то в спектре ЭПР этой смеси регистрируют появление сигнала, характерного для радикала серы, т. е. можно предположить, что в результате межмолекулярного переноса энергии от облученного белка к необлученному цистеамину в последнем произошел отрыв атома водорода от SH-группы.

Реакция присоединения. Существование этого типа реакций прямо указывает на возможность переноса энергии от облученных белков к низкомолекулярным молекулам — примесям. Перенесенная энергия расходуется на отрыв от молекулы — приме-

си «Н—М» атома водорода, который присоединяется к радикалу белка:



Протекание такой реакции доказано в экспериментах с сероводородом, меченным тритием — 3H . Белок после облучения помещают в атмосферу тритированного сероводорода, затем переносят в нормальные условия и оценивают количество включенного радиоактивного трития. После гидролиза можно дифференциально оценить включение метки в различные типы аминокислот. В экспериментах с облученной рибонуклеазой, обработанной 3H_2S , были отмечены следующие эффекты:

- исчезновение сигнала ЭПР облученного белка;
- преимущественное включение метки в определенные типы аминокислот, главным образом в остаток цистина;
- соответствие между количеством включенного трития и числом свободных радикалов, возникающих в облученном белке при данной величине поглощенной дозы радиации.

Такие результаты свидетельствуют о межмолекулярном переносе энергии от облученной рибонуклеазы к необлученному сероводороду. Соответствие между общим количеством включенного в аминокислоты трития и радиационно-химическим выходом радикалов указывает на возникновение в облученном белке нескольких типов радикалов из различных аминокислотных остатков.

Механизмы переноса энергии выяснены недостаточно. Эксперименты по изучению термолюминесценции свидетельствуют о переносе энергии возбуждения с помощью особых структур, таких, как триптофановые кольца и кольца тирозина и фенилаланина, а в нуклеиновых кислотах — за счет расположенных в одной плоскости пуриновых и пиримидиновых оснований. Еще один возможный механизм переноса энергии — это миграция электронов через зону проводимости и последующий захват электронов положительно заряженными «дырками».

Эксперименты с 3H_2S и анализ спектров ЭПР указывают на перенос энергии за счет миграции малых радикалов, таких, как атом водорода, NH_3 и другие небольшие фрагменты облученных молекул.

Перенос энергии возбуждения и перенос электронов требуют участия специальных структур и, возможно, высоких энергий активации, тогда как экспериментально наблюдаемые значения энергии активации радикалообразования и инактивации различных молекул довольно малы. Эти факты позволяют предположить, что именно перенос радикалов имеет большое значение в процессах миграции энергии при прямом действии радиации.

Модифицирующие агенты в анализе механизмов лучевого поражения макромолекул

Чувствительность макромолекул к радиационному воздействию можно изменить по меньшей мере в два или три раза в зависимости от условий во время облучения или после него. К числу агентов, которые модифицируют радиочувствительность макромолекул, относятся кислород, температурное воздействие, добавление молекул — примесей — и др. Каждый из этих «комнатных факторов», естественно, не может повлиять на физический акт переноса энергии излучения к макромолекуле, и все-таки эти воздействия способны усилить или ослабить лучевое поражение. Поэтому считают, что модифицирующие агенты влияют

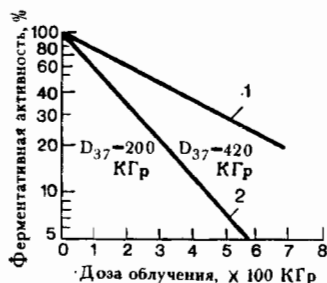


Рис. III-19. Инактивация сухой РНКазы γ -излучением ^{60}Co в вакууме (1) и в присутствии кислорода (2) (по Гюнтеру и Юнгу, 1967)

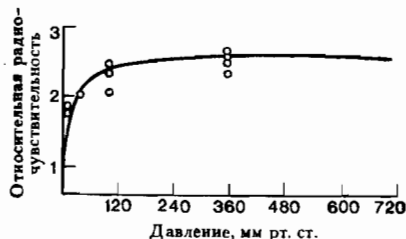


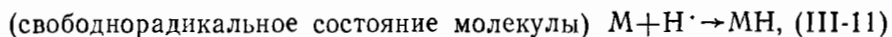
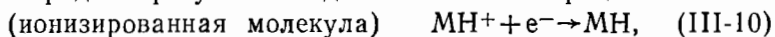
Рис. III-20. Относительная чувствительность сухого трипсина к действию γ -излучения в зависимости от содержания кислорода во время облучения (за единицу принята радиочувствительность трипсина в вакууме) (по Хатчинсону, 1961)

не на первичные акты абсорбции энергии, а на более поздние этапы лучевого поражения. Например, они могут изменить характер миграции энергии внутри макромолекулы или между молекулами, избирательно защитить определенные функциональные группы или изменить характер физико-химических реакций, в которые вступают облученные молекулы.

Модифицирующее действие кислорода. В экспериментах с сухими препаратами ферментов было установлено, что их радиочувствительность значительно возрастает, если облучение проводится в атмосфере кислорода, а не в вакууме. На рис. III-19 представлены результаты эксперимента по сопоставлению эффективности инактивации сухой РНКазы γ -лучами в вакууме и в атмосфере кислорода. Значение дозы D_{37} для инактивации рибонуклеазы в вакууме примерно вдвое выше, чем в атмосфере O_2 .

На рис. III-20 показано, как изменяется радиочувствительность сухого трипсина при изменении атмосферы во время облучения. За единицу принята чувствительность трипсина к радиационному воздействию в вакууме. Даже незначительное содержание кислорода в среде приводит к резкому возрастанию инактивирующего действия данной дозы облучения, эффект инактивации возрастает при увеличении давления O_2 примерно до 120 мм рт. ст., дальнейшее увеличение неэффективно.

Механизм кислородного эффекта выяснен недостаточно. Ряд исследователей (см., например, Дертингер и Юнг, 1973) объясняют способность кислорода повышать чувствительность макромолекул к прямому действию тем, что некоторые молекулы, изначально получившие повреждение, восстанавливаются в отсутствие кислорода в результате одного из таких процессов:



а кислород ингибирует обе реакции либо за счет перехвата электрона, либо за счет превращения радикала $M\dot{H}$ в перекисный радикал $MO_2\cdot$ (в последнем случае возникает необратимое повреждение, связанное с пероксидацией радикала $M\cdot$).

В обоих случаях предполагается, что кислород оказывает потенцирующее действие, т. е. он не увеличивает истинное число первичных повреждений, а тормозит или полностью прекращает протекание восстановительных процессов.

В последние годы Л. Х. Эйдуc и его сотр. обнаружили пострадиационное действие кислорода на ферменты, которое было названо кислородным последствием. Один из экспериментов, в которых был обнаружен этот эффект, состоял в следующем. Ампулы с сухим пепсином облучали в анаэробных условиях в дозах, в 1,5 раза превышающих дозу D_{37} , затем облученный фермент переносили (без доступа O_2) в герметическую камеру, наполненную аргоном, где и проверяли активность фермента. Было показано, что при облучении ферментативная активность не теряется и в анаэробных условиях может сохраняться длительное время. В отсутствие воды кислород также не оказывал инактивирующего действия, и лишь при увлажнении препарата происходила его инактивация под действием кислорода, степень которой увеличивалась с ростом поглощенной дозы.

Существование долгоживущих скрытых повреждений¹, реализуемых при взаимодействии с кислородом, доказано, по крайней мере для некоторых ферментов по критерию их инактивации.

¹ Согласно принятому определению «скрытое (потенциальное) повреждение — это состояние, при котором исследуемые свойства объекта после его облучения не отличаются от исходных, но могут стать иными в силу дополнительных внешних воздействий или в результате процессов, происходящих в объекте» (Эйдуc Л. Х. Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучений. М., Атомиздат, 1972).

ции. По мнению Л. Х. Эйдуса, отсутствие поражения некоторых объектов при анаэробном облучении свидетельствует, что кислород не просто один из агентов, модифицирующих поражение, а необходимый участник определенных видов поражения. При этом кислород может оказывать поражающее действие, присутствуя не только во время облучения, но и после его окончания.

По мнению ряда исследователей, в облученном образце возникают два вида поражения: первый требует присутствия кислорода непосредственно «под лучом», второй способен длительное время сохраняться в отсутствие кислорода, т. е. соответственно короткоживущие и долгоживущие «скрытые» повреждения.

Анализ физико-химических процессов, приводящих к возникновению скрытых повреждений, требующих для своей реализации кислорода, проводится в настоящее время. В частности, анализируется связь этих эффектов с возникающими в результате облучения свободными радикалами (кислород влияет на спектр ЭПР облученных биомакромолекул и в ряде случаев даже приводит к исчезновению сигнала ЭПР облученных белков). Проблема возникновения и реализации скрытых повреждений далека от разрешения и служит предметом радиационно-биологического анализа.

Изменение температуры во время облучения. Радиочувствительность многих макромолекул зависит от температуры во время облучения. Пример этого приведен на рис. III-21, где показана инактивация сухой РНКазы γ -излучением при трех различных температурах. Механизм температурного эффекта окончательно не установлен. Предполагают, что константа скорости реакции (или реакций), определяющей инактивацию макромолекулы, зависит от температуры. По крайней мере некоторыми из таких реакций могут быть взаимодействия макромолекул с атомарным водородом и другими малыми радикалами, которые высвобождаются при облучении органических материалов и, вероятно, атакуют непораженные молекулы.

Температурное последствие. В облученных белковых молекулах возникают скрытые повреждения, переходящие в явные при дополнительном тепловом воздействии, например, возникающие внутримолекулярные повреждения приводят к инактивации фермента после обработки облученного препарата теплом. Тепловое воздействие эффективно и после аэробного облучения,

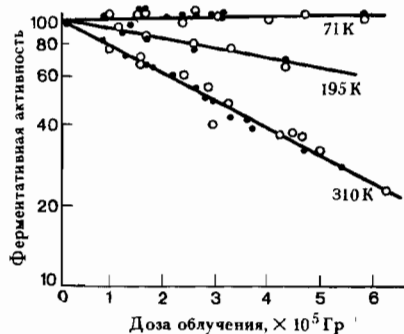


Рис. III—21. Инактивация РНКазы γ -лучами ^{60}Co в вакууме при различных температурах (по Окада и др., 1970)

т. е. нагревом реализуются иные скрытые повреждения, чем те, на которые способен воздействовать кислород. Таким образом, в одной и той же макромолекуле могут возникать по крайней мере два типа скрытых повреждений. Под влиянием тепла не могут быть реализованы все типы скрытых повреждений, в том числе чувствительные к O_2 . Природа скрытых повреждений, требующих для своей реализации дополнительного теплового воздействия, исследуется в настоящее время.



Рис. III-22. Влияние глутатиона на радиочувствительность инвертазы (смесь 5% инвертазы и глутатиона в разных концентрациях высушивали, а затем облучали рентгеновскими лучами) (по Брамсу, 1960)

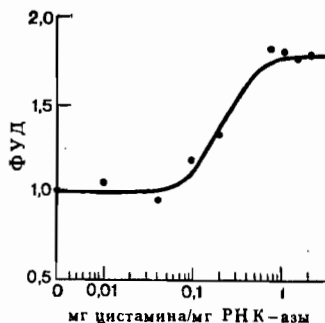


Рис. III-23. Зависимость фактора уменьшения дозы ФУД от концентрации добавленного цистамина при лучевой инактивации рибонуклеазы. $ФУД = D_{37} \text{ в условиях защиты} / D_{37} \text{ при облучении чистого фермента}$ (по Юнгу, 1966)

Присутствие молекул-примесей во время облучения. Облучение белка в смеси с рядом низкомолекулярных веществ может либо уменьшить его радиочувствительность (эффект защиты), либо увеличить ее (эффект сенсibilизации). Наиболее выраженным защитным действием в сухих системах обладают вещества, содержащие сульфгидрильную группу или дисульфидную связь. На рис. III-22 показано, как изменяется относительная радиочувствительность инвертазы (ее оценивали по величине дозы D_{37}) в зависимости от концентрации добавленного глутатиона.

Для количественной оценки эффективности защитного агента часто определяют величину «ФУД» — фактора уменьшения дозы, которая определяется как отношение дозы D_{37} (или D_{50}) в присутствии и в отсутствие защитного агента. На рис. III-23 показано изменение величины ФУД в зависимости от концентрации цистамина, добавленного в качестве «защитного» агента.

Не все примесные молекулы защищают белки — добавление сахарозы увеличивает степень инактивации рибонуклеазы в 2,6 раза. Аналогичным действием обладает целый ряд углеводов.

Выяснение механизма защитного и сенсibilизирующего действия примесных молекул служит в настоящее время предметом радиационно-биофизического анализа. Прогресс в этой области

во многом зависит от понимания природы начальных поражений, возникающих в облученных макромолекулах. В настоящее время обсуждается ряд гипотез о механизме защиты макромолекул низкомолекулярными соединениями. Во-первых, их действие может осуществляться за счет конкуренции за высокоактивные свободные радикалы (атомарный водород и другие фрагменты облученных молекул), которые могут вызывать структурные поражения макромолекулы. Другая возможность состоит в том, что защитный агент способствует восстановлению пораженной макромолекулы за счет переноса водорода с защитного вещества (РН) на свободный радикал пораженной биомacroмолекулы ($R^{\cdot}$) по типу реакции (III-9).

Были предложены гипотезы, связывающие защитное действие низкомолекулярных веществ с процессами межмолекулярной миграции энергии, т. е. полагают, что в облученном межмолекулярном комплексе «макромолекула — примесь» возможна миграция энергии и заряда. В зависимости от того, какая из компонент этого комплекса является донором или акцептором, возможно ослабление или усиление повреждения биомacroмолекулы. Эффективность миграции энергии зависит от степени комплексообразования. Показано, что в механической смеси (комплексообразование отсутствует) защитный агент обладает гораздо более слабым действием, чем при наличии комплекса защитного соединения и макромолекулы (комплекс получают из раствора при совместном осаждении макромолекулы и защитного соединения). В то же время известно, что при комплексообразовании миграция заряда гораздо сильнее, чем в механической смеси этих же веществ. Вероятно, за счет миграции энергии и заряда защитный агент «отводит» избыточную энергию, поглощенную облученной макромолекулой.

Модифицирующее действие низкомолекулярных примесных молекул используют для выяснения роли миграции энергии в начальных радиобиологических процессах, тем более что в реальных условиях (в ядре, цитоплазме или органоидах) биомacroмолекулы окружены низкомолекулярными субстратами, которые могут служить донорами или акцепторами поглощенной энергии излучения.

В последние два десятилетия использование модифицирующих агентов становится традиционным приемом биофизического анализа первичных процессов лучевого поражения макромолекул и значительно более сложных систем, включая клетку и многоклеточный организм. Таким образом, пытаются подойти к выяснению роли свободных радикалов в возникновении структурных повреждений и последующей инактивации макромолекул. Представляет интерес использование агентов, видоизменяющих выход первичных радикалов или их характер, с последующим изучением структурных повреждений, возникающих в модифицированных условиях.

Проводимый в последние годы анализ кислородного и температурного последствий выявил существование «скрытых» повреждений, требующих для своей реализации дополнительного, нерадиационного воздействия во время облучения и после него, т. е. возникло представление о том, что в ряде случаев одного лишь лучевого поражения недостаточно для инактивации макромолекулы.

Перспективно использование модифицирующих агентов для выяснения причинно-следственной связи между различными типами поражения макромолекулы и характером изменения ее биологических свойств. Логика такого исследования состоит в следующем. Пусть модифицирующий агент видоизменяет характер инактивации макромолекулы, например в его присутствии облученный фермент сохраняет сродство к субстрату, хотя и утрачивает каталитическую активность, а без модифицирующего агента облучение инактивирует обе функции макромолекулы. В этом случае интересно сопоставить структурные повреждения, возникающие в присутствии модифицирующего агента и без него. Если в отсутствие модифицирующего агента наблюдаются какие-то дополнительные структурные повреждения, то можно предположить, что с ними связана потеря субстратной специфичности облученного фермента. Для проверки такого предположения необходимы строгие количественные исследования, например сопоставление радиационно-химического выхода данного типа структурного поражения и выхода инактивированных молекул, концентрационных зависимостей и т. д. Если это возможно, следует вызвать такие же повреждения иными, нерадиационными воздействиями и оценить, к каким последствиям для фермента это приведет.

* * *

Материал этой главы посвящен рассмотрению биофизических подходов к анализу механизмов инактивации биомacroмолекул ионизирующей радиацией. В общем ряду радиобиологических проблем этот вопрос имеет первостепенное значение: лучевое поражение любой биологической системы, от вируса до многоклеточного организма, начинается с инактивации небольшого числа молекул, составляющих биологический субстрат. В то же время облученные сухие гомогенные препараты ферментов или нуклеиновых кислот — «идеальная» система для биофизического анализа. В живой клетке на первичные радиационные повреждения макромолекул накладываются эффекты, гораздо более сложные и пока еще не определенные: расширение поражения за счет метаболических реакций, восстановление пораженной молекулы за счет функционирования репарирующих систем, эффекты, связанные с гетерогенностью облучаемой системы, присутствием воды и низкомолекулярных субстратов и т. д. Следовательно, изу-

чение механизмов инактивации сухих препаратов — только первый необходимый этап на пути познания природы радиобиологических процессов, протекающих при облучении клетки и организма.

Изучение инактивирующего действия ионизирующей радиации на макромолекулах представляет еще и самостоятельный интерес как метод анализа функциональных свойств отдельных субмолекулярных структур. В этом случае ионизирующее излучение выступает в качестве уникального «инструмента» биофизического анализа ферментов, нуклеиновых кислот и различных надмолекулярных комплексов: ДНП, хроматина, рибосом и т. д. Используя математический аппарат теории мишени, можно на основании экспериментальных кривых «доза — эффект» установить геометрические размеры мишени, ответственной за данный тип инактивации макромолекулы. Модифицируя условия облучения, в ряде случаев можно добиться возникновения селективных поражений макромолекулы и оценить их роль в эффекте инактивации (например, если в результате облучения фермента разрушается определенный аминокислотный остаток и при этом нарушается конформация активного центра и исчезает сродство к субстрату, то можно предположить, что данный структурный участок регулирует конформацию активного центра). Преимущество радиационного воздействия состоит еще и в том, что с его помощью можно добиться возникновения узколокальных повреждений в любом участке молекулы, при этом другие структурные звенья останутся неповрежденными (существенно, что при этом макромолекулы могут оставаться сухими, находиться в вакууме или в любой газовой смеси, быть замороженными до любой температуры или параллельно подвергаться иным воздействиям).

Предстоит еще многое сделать для воссоздания целостной картины, которая разворачивается от момента ионизации или возбуждения макромолекулы, поглотившей энергию излучения, до ее химического повреждения и инактивации. Необходим глубокий теоретический анализ спектра первичных возбуждений макромолекул, детальное выяснение процессов миграции энергии и заряда внутри молекулы и между молекулами. Экспериментальные исследования должны установить спектр первичных продуктов и характер их дальнейших преобразований до возникновения стабильного радиационного повреждения. И наконец, в содружестве с биохимиками предстоит выяснить вклад определенных типов структурного повреждения в эффект инактивации.

ИНАКТИВАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ. НЕПРЯМОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В общих чертах механизм лучевого поражения биомакромолекул представляет следующую цепь процессов: к молекуле переносится дискретная порция энергии излучения (вероятнее всего, она составляет 10—30 эВ над основным состоянием); поглощенная энергия растрачивается на ионизацию, сверхвозбуждение и возбуждение; ионизированные и возбужденные молекулы нестабильны — для образования стабильных структур электронные конфигурации должны претерпеть определенную перестройку за счет миграции энергии внутри молекулы или между молекулами; в конечном итоге избыточная энергия локализуется в определенном «слабом звене», которое испытывает химическое изменение; возникшее структурное повреждение может привести к определенному типу инактивации (характер инактивации определяется функциональной ролью пораженного структурного звена макромолекулы).

Представим, что облучению подвергаются не высушенные или кристаллические препараты, а водные растворы низкой концентрации, в которых каждую биомакромолекулу окружает множество молекул воды. Вероятность поглощения энергии ионизирующего излучения водой или органической молекулой примерно одинакова (см. уравнение I-15), поэтому в разбавленных водных растворах большая часть энергии будет поглощаться молекулами воды, которых значительно больше, чем растворенных биомакромолекул. Если в результате поглощения энергии ионизирующего излучения вода становится «химически активной», то растворенные молекулы будут испытывать дополнительное поражение. В этом случае эффективность лучевого поражения макромолекул в водных растворах должна быть значительно выше, чем в сухих препаратах.

На рис. IV-1 сопоставлена радиочувствительность рибонуклеазы в сухих препаратах и водном растворе. Как следует из данных эксперимента, значение дозы D_{37} для инактивации сухого фермента 420 кГр, в водном растворе сравнимая инактивация достигается после облучения в дозе 4 кГр. Такой результат характерен для различных макромолекул — белков, нуклеиновых кислот и др.; в разбавленном водном растворе их радиочувствительность возрастает в десятки и сотни раз.

Зависимость «доза — эффект» при облучении водных растворов макромолекул носит экспоненциальный характер, аналогич-

но наблюдаемому при облучении сухих препаратов. Это указывает на одноударность процесса инактивации. При одноударном механизме объем мишени, ответственной за инактивацию, пропорционален $1/D_{37}$ (см. уравнение II-8). Из сравнения доз D_{37} для инактивации сухого и в растворе ферментов можно было бы заключить, что в растворе размер чувствительной мишени, одиночное попадание в которую приводит к инактивации, возрастает в сотни раз по сравнению с размером мишени для инактивации этого же фермента в высушенном состоянии. Такое предположение маловероятно. Объем макромолекулы не может увеличиться в сотни раз в результате растворения ее в воде. Убедительнее предположение, согласно которому в растворе формальная мишень охватывает область, превосходящую линейные размеры макромолекулы, — эта область включает прилегающие к ферменту молекулы воды. Тогда одиночное попадание не только в пределы рассматриваемой белковой молекулы, но и в окружающие ее молекулы воды может привести к инактивации. Для рассматриваемого случая поражения мишеней, растворенных в воде, вводится понятие «эффективного объема», или такого объема, из любого места которого энергия попадания, не растроченная до уровня, более низкого, чем порог работы, тем или иным путем достигнет «места действия» (например, определенного структурного звена макромолекулы, ответственного за инактивацию) и приведет к возникновению «единицы реакции» (т. е. инактивации фермента). В водном растворе энергия, поглощенная растворителем, может передаваться растворенной макромолекуле за счет диффузии активных продуктов радиолиза воды.

В принципе, более высокую радиочувствительность макромолекулы в водном растворе можно было бы объяснить снижением энергии активации. В этом случае на каждые 100 эВ поглощенной энергии в растворе инактивировалось бы значительно больше молекул, чем в сухом препарате. Для сравнения энергий активации необходимо определить величину радиационно-химического выхода (G) инактивации фермента в растворе и в сухом препарате из соотношения

$$G = \frac{\text{число образовавшихся или пораженных молекул}}{100 \text{ эВ поглощенной энергии}}. \quad (\text{IV—I})$$

В опытах с РНКазой установлено, что G в сухом препарате рав-

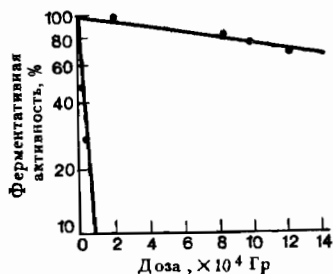


Рис. IV-1. Инактивация сухой рибонуклеазы (1) и водного раствора фермента в концентрации 5 мг/мл (2) при γ -облучении (по Юнгу и Дертингеру, 1973)

но 1,68; G в водном растворе — 0,89. Обе величины G мало отличаются друг от друга.

По-видимому, причина повышения радиочувствительности фермента в водном растворе связана не с изменением его физико-химических свойств в результате растворения (энергия активации изменилась незначительно), а с появлением в облученной воде дополнительных поражающих факторов — активных продуктов радиолиза воды. Поэтому правильнее говорить не об истинном повышении радиочувствительности макромолекулы, а об увеличении эффективности данной дозы, которое обусловлено увеличением объема чувствительной мишени. В мишень большего размера более вероятно одиночное попадание, приводящее к инактивации.

Для изучения механизма лучевой инактивации растворенных молекул необходимо осуществить ряд логически связанных друг с другом этапов биофизического анализа:

- 1) изучить характер радиационно-химического превращения воды, выяснить природу возникающих активных продуктов, их физико-химические свойства и реакционную способность;
- 2) изучить кинетические характеристики процесса инактивации растворенных молекул;
- 3) определить основные типы реакций, в которые могут вступать органические молекулы и продукты радиолиза воды;
- 4) исследовать характер структурных повреждений, возникающих в биомacroмолекулах, взаимодействующих с активными продуктами радиолиза воды;
- 5) определить причинно-следственную связь между типами структурного повреждения и характером инактивации растворенных макромолекул.

Ниже мы кратко рассмотрим ряд методических подходов к решению перечисленных задач и остановимся на некоторых важных результатах, полученных в биофизических исследованиях.

1. РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ

На рис. IV-2 представлен оптический спектр поглощения воды, дающий представление о распределении сил осцилляторов молекулы H_2O ¹. В части спектра, соответствующей обычному возбуждению с энергией, меньшей потенциала ионизации $I = 12,6$ эВ, можно различить три области. Полоса непрерывного

¹ Оптический спектр H_2O и его трактовка заимствованы из работы: Платцман Р. Л. Энергетический спектр возбуждения при действии ионизирующей радиации. — В кн.: Современные проблемы радиационных исследований (материалы III Международного конгресса по радиационным исследованиям. Италия, 1966 г.). М., 1972.

поглощения χ_1 с наименьшей энергией обусловлена только переходом, который приводит к диссоциации с образованием основного (электронного) состояния $\text{H} + \text{OH}$ и ответствен за известную непрозрачность воды во всех фазовых состояниях для длин волн короче 180 нм. В другие полосы возбуждения — χ_2 и χ_3 — входят как область непрерывного поглощения, так и ряд отчетливых полос, и соответствующие им наиболее распространенные первичные продукты диссоциируют на H и OH^* или H_2 и O . Область сверхвозбуждения простирается от I_0 до энергии около 30 эВ. Сверхвозбуждение возникает в результате примерно 63% всех первичных событий, происходящих без ионизации, а конкуренция между двумя путями — ионизацией и диссоциацией — была доказана экспериментально.

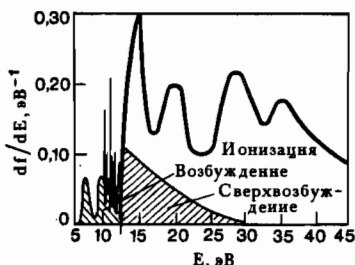


Рис. IV—2. Оптический спектр поглощения воды (по Платцману, 1966)

Сверхвозбужденные молекулы H_2O^* могут диссоциировать на два радикала:



Конкурирующий процесс — «автоионизация» сверхвозбужденной молекулы воды:



Большая часть энергий осцилляторов превосходит потенциал ионизации. Перенос к молекуле H_2O энергии, большей, чем I_0 , с высокой вероятностью приводит к ионизации:



Ионы H_2O^+ могут находиться в различных электронных состояниях, одни из которых стабильны, а другие приводят к диссоциации. Концентрация колебательной энергии на определенных связях может привести к распаду иона:



Свободные радикалы H и OH пространственно не разобщены, поэтому они могут с большой вероятностью рекомбинировать с образованием молекулярных продуктов:



Чем выше ЛПЭ излучения, тем больше свободных радикалов возникает на единицу пути частицы и тем соответственно выше вероятность их рекомбинации с образованием молекулярных продуктов согласно реакциям (IV-6) — (IV-8).

До середины 60-х гг. считалось, что при облучении водных растворов косвенное поражение макромолекул происходит за счет их взаимодействия с радикалами H , $\text{OH}^\cdot$ и перекисью водорода. Это соответствовало гипотезе, высказанной еще в 1944 г. Вейсом.

Роль свободного электрона, возникающего в реакциях (IV-3), (IV-4), оставалась невыясненной. По одной схеме (Вейс, 1944) предполагалось, что электрон переходит на соседний ион водорода H^+ и превращает его в радикал $\text{H}^\cdot$. Согласно схеме Ли (1946) электрон захватывается молекулой воды с образованием отрицательно заряженного иона H_2O^- , который распадется на OH^- и $\text{H}^\cdot$. Однако существование ионов H_2O^- даже в качестве промежуточных продуктов доказать не удалось. Дальнейшие исследования привели к открытию в облученной воде особой стабилизированной формы электрона, которая получила название «гидратированный электрон».

Гидратированный электрон, обозначаемый $e^-_{\text{гидр}}$, возникает в результате стабилизации свободного электрона в «потенциальной яме», образованной поляризованными молекулами воды (рис. IV-3, А, Б).

Растеряв на возбуждение и ионизацию среды большую часть энергии, электрон продолжает взаимодействовать с окружающими его молекулами до тех пор, пока он в конце концов не окажется в потенциальной яме, так как не сможет преодолеть электростатическое отталкивание электронного облака молекулы, через которую он проходит. Свободный электрон окажется в области относительно низкой потенциальной энергии, т. е. в промежуточном положении, соответствующем элементу свободного объема в жидкости. Здесь он стабилизирован близлежащими силами отталкивания. Перед стабилизацией электрона его кинетическая энергия в областях с низкой потенциальной энергией уменьшается до 1 эВ и менее, а скорость падает до $6 \cdot 10^7$ см/с, так что для пересечения электроном молекулярного диаметра или среднего по размеру межмолекулярного промежутка ему требуется около 10^{-15} с. Поскольку электронная поляризация молекул происходит быстрее чем за 10^{-15} с, стабилизи-

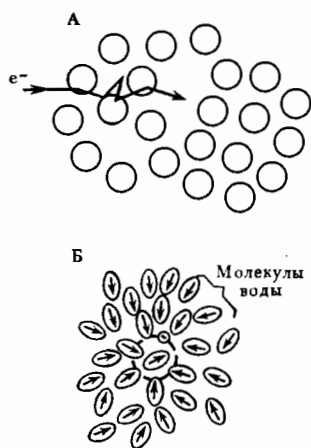


Рис. IV-3. Гидратированный электрон (по Боуэ, 1967): А — схематическое представление последнего участка пути «свободного электрона» в жидкости; Б — основная ориентация полярных молекул воды вокруг гидратированного электрона

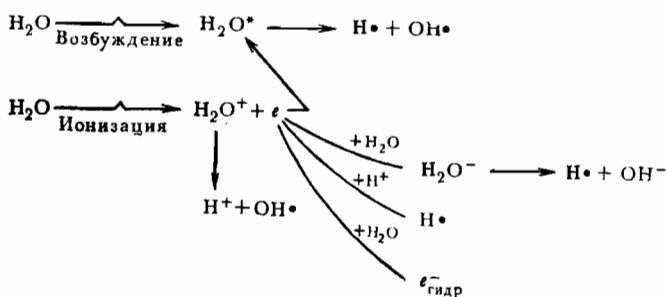
рованный электрон оказывается в электронно-поляризованной дырке.

Последовательное уменьшение потенциальной энергии стабилизированного электрона происходит за счет атомной поляризации, расширения полости и ориентационной поляризации окружающих молекул. Глубина потенциальной ямы для стабилизированного электрона увеличивается с переходом от одного типа поляризации среды к другому, однако кинетическая энергия электрона не уменьшается до нуля, а сохраняет малое, но конечное значение.

Тепловое равновесие свободного электрона со средой достигается примерно за 10^{-11} с, время релаксации молекул воды при комнатной температуре составляет такую же величину. Следовательно, за 10^{-11} — 10^{-10} с вокруг стабилизированного электрона возникнет область радиальной поляризации, т. е. поляризованные молекулы воды ориентируются в собственном электрическом поле электрона (рис. IV-3). Область радиальной поляризации, обладающая избыточным положительным зарядом около своего центра, служит ловушкой для электрона, обуславливающего поляризацию. Вместе они и формируют уникальное образование — гидратированный электрон, который в химическом отношении ведет себя, как очень активный ион, вступая в реакции со многими веществами при первом соударении. Скорость реакции ограничена временем, необходимым для того, чтобы перемещающиеся в результате диффузии реагенты «нашли друг друга». Время жизни $e^-_{\text{гидр}}$ в высокоочищенной воде приближается к 1 мс. Такое большое время жизни позволяет гидратированному электрону диффундировать на значительные расстояния от трека первичной ионизирующей частицы и взаимодействовать с растворенными молекулами.

Основные характеристики $e^-_{\text{гидр}}$ приведены в табл. IV-1.

Первичные реакции, происходящие после возбуждения и ионизации, которые мы обсуждали выше, можно суммировать в виде общей схемы:



Первичные продукты радиолиза воды — радикалы $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, $e^-_{\text{гидр}}$ — располагаются в пространстве достаточно близко друг

Таблица IV-1

Характеристика гидратированного электрона
(по Томасу, 1967)

λ макс	720 нм
$\epsilon_{720 \text{ нм}}$	15 800 моль ⁻¹ , см ⁻¹
$\epsilon_{678 \text{ нм}}$	10 600 моль ⁻¹ , см ⁻¹
$\tau_{1/2} (e_{\text{гидр}}^- + \text{H}_2\text{O})$	780 мкс
$\tau_{1/2} (\text{нейтральная } \text{H}_2\text{O})$	230 мкс
Заряд иона	-1
Радиус распределения заряда (расч)	0,25—0,3 нм
Энергия гидратации	1,82 эВ
Коэффициент диффузии	$4,7 \cdot 10^{-5}$ см ² ·с ⁻¹
$E^0 (e_{\text{гидр}}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow 1/2\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O})$	2,58 эВ
$pK (e_{\text{гидр}}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H} + \text{OH}^-)$	9,7
$k_{e_{\text{гидр}}^- + \text{H}_2\text{O}}$	16

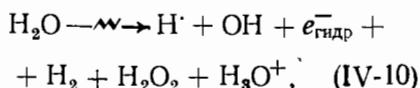
от друга, образуя своеобразные скопления — «рои» небольшого объема, средний радиус которых около 1,5 нм. Радиохимики называют эти скопления шпурами. В среднем на шпур приходится около 6 радикалов. Именно в шпуре происходит рекомбинация радикалов с образованием молекулярных продуктов — H_2 и H_2O_2 — например, по реакциям (IV-6) — (IV-8).

Таблица IV-2

Радиационно-химический выход
первичных продуктов
радиолиза воды

Продукты радиолиза воды	Значение G
$e_{\text{гидр}}^-$	2,6
$\text{H}^\cdot$	0,6
$\text{OH}^\cdot$	2,6
H_2O_2	0,75
H_2	0,45

Атаковать растворенные молекулы могут лишь те радикалы, которые не рекомбинируют, а выходят из шпура. Эти радикалы, а также молекулярные продукты радиолиза мы будем называть продуктами радиолиза воды, образование их отражает следующее суммарное уравнение:



где H_3O^+ — принятая форма записи иона H^+ , уравновешивающего отрицательный заряд гидратированного электрона.

В табл. IV-2 приведены радиационно-химические выходы продуктов радиолиза воды. Оказалось, что при нейтральном значе-

нии рН на каждые 100 эВ поглощенной энергии излучения в наибольшем количестве образуются гидратированные электроны и радикалы $\text{OH}^\cdot$.

Для исследования механизмов взаимодействия продуктов радиолиза воды и растворенных макромолекул необходимо располагать надежными методами идентификации продуктов радиолиза и уметь определять их количество.

Оценивают количество молекулярных продуктов — H_2 и H_2O_2 — стандартными методами химического анализа. Наличие гидратированного электрона можно зарегистрировать по характерному спектру оптического поглощения (таб. IV-1). Спектр поглощения радикала $\text{OH}^\cdot$ регистрируют в области ниже 300 нм.

Сочетание перечисленных методов позволяет исследовать типы реакций, происходящих при взаимодействии продуктов радиолиза воды с органическими молекулами.

2. РЕАКЦИИ РАСТВОРЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ С ПРОДУКТАМИ РАДИОЛИЗА ВОДЫ

Многие научные работы посвящены изучению характера химического превращения органических веществ, облученных в водных растворах низкой концентрации, когда преобладает прямое действие излучения.

Спектр конечных продуктов определяют традиционными методами химического анализа. Значительно сложнее установить, какой из активных продуктов радиолиза воды приводит к данному типу структурного превращения молекулы. Для ответа на этот вопрос разработаны специальные методические приемы.

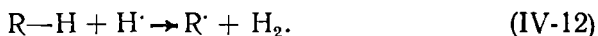
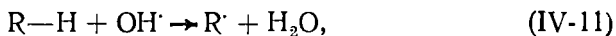
Эффекты, связанные с перекисью водорода, образующейся в облученной воде, установить несложно. Для этого в необлученный раствор вводят H_2O_2 до такой же концентрации, какая отмечена после облучения. Типы реакций, осуществляемые радикалом $\text{OH}^\cdot$, также возможно исследовать в необлученных растворах. Так как в ходе реакции между перекисью водорода и двухвалентным железом возникают радикалы $\text{OH}^\cdot$, то, подбирая соответствующие количества этих реагентов, добиваются появления в растворе требуемого количества $\text{OH}^\cdot$.

Ряд веществ служат перехватчиками свободных радикалов. С их помощью вызывают селективное поражение растворенных молекул одним из радикалов воды. Так, N_2O в нейтральной среде перехватывает $e^-_{\text{гидр}}$, кислород — перехватчик $e^-_{\text{гидр}}$ и $\text{H}^\cdot$, этиловый спирт в нейтральной среде избирательно взаимодействует с радикалами $\text{OH}^\cdot$. Облучая растворы в присутствии различных комбинаций конкурирующих агентов, отдельно изучают реакционную способность продуктов радиолиза воды.

Ниже перечислены основные типы реакций радикалов воды

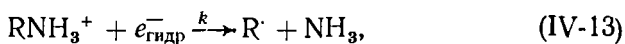
с органическими молекулами, обозначаемыми RH , где H — реакционноспособный атом водорода, а R — остальная часть молекулы (по Окада, 1974).

1) Отрыв атома водорода

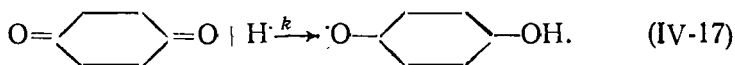
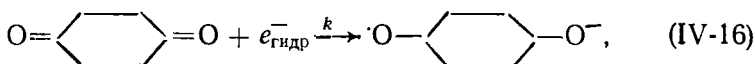
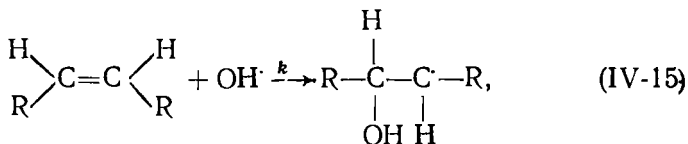


Радикал $e^-_{гидр}$ не отрывает атом водорода от органических молекул. В результате реакций (IV-11), (IV-12) в растворе появляется органический радикал $R\cdot$. С помощью дейтериевого обмена установили, какой из атомов водорода отрывается от органической молекулы в реакциях этого типа. Отрыв водорода возможен от третичных углеродных атомов, атомов серы в сульфгидрильных группах и α -углеродных атомов. Не происходит отрыва атома водорода в функциональных группах $-CONH_2$, $-CONH$, $-NH_3$, $-OH$, $-COOH$.

2) Реакции диссоциации



3) Реакции присоединения



В результате протекания этих двух типов реакций также образуется растворенный органический радикал $R\cdot$.

Для изучения кинетики перечисленных реакций необходимо знать константы абсолютных скоростей (k). Их значения можно установить с помощью импульсного радиолиза. Суть метода состоит в том, что водный раствор облучают в течение очень короткого промежутка времени, измеряют концентрацию свободных радикалов и подсчитывают константы скоростей реакции органических молекул, в том числе белков и нуклеиновых кислот, с радикалами $e^-_{гидр}$, $H\cdot$ и $OH\cdot$.

Продукты радиолиза воды высокоактивны по отношению к аминокислотам, белкам, нуклеотидам и ДНК; константы скоро-

стей соответствующих реакций лежат в пределах 10^7 — 10^{11} $M^{-1} s^{-1}$. Радиальные продукты реакций можно зарегистрировать методом ЭПР.

Свободные радикалы органических молекул претерпевают внутримолекулярные перестройки, вступают в реакции друг с другом и с молекулами растворенных веществ. В результате формируется стабильное структурное поражение, приводящее к изменению биологических свойств макромолекул.

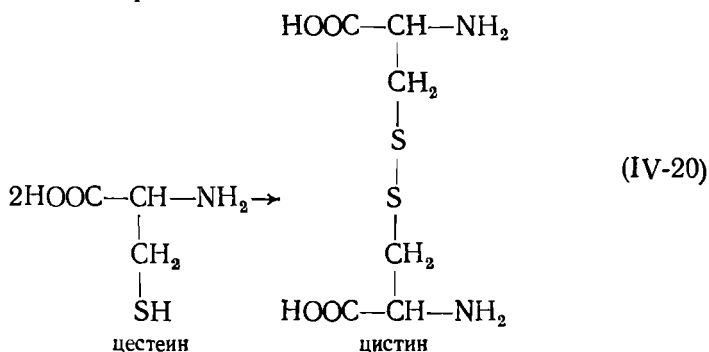
3. РЕАКЦИИ РАДИКАЛОВ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ, ВЕДУЩИЕ К ОБРАЗОВАНИЮ СТАБИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Ниже перечислены основные типы реакций, в которые вступают свободные радикалы органических молекул в водных растворах.

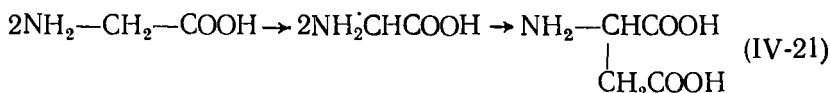
1) Димеризация и присоединение



Продукты реакции — димеры молекул и агрегаты более высоких порядков. Например, при облучении водного раствора цистеина образуется димер — цистин:



Другой пример — образование аспарагиновой кислоты из двух радикалов глицина:

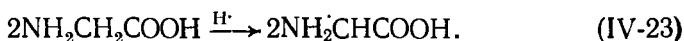


2) Реакции диспропорционирования



В результате реакции атом водорода перераспределяется между радикалами. Один из радикалов может восстановиться до

исходной структуры, а другой — превратиться в новое соединение. Например, при облучении раствора глицина в присутствии перехватчиков $\text{OH}^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$ с аминокислотой взаимодействует радикал $\text{H}^\cdot$, осуществляя отрыв атома водорода:



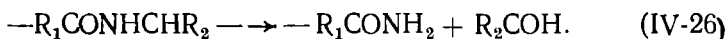
Реакция диспропорционирования, в которую вступают два радикала глицина, приводит к появлению иминоуксусной кислоты и восстановлению одного из радикалов до исходной структуры:



3) Реакции гидролиза

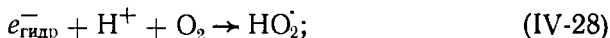


Пример такой реакции — расщепление пептидной связи при облучении раствора белка:



4) Присоединение кислорода

В присутствии молекулярного кислорода в облученном растворе образуются окислительные радикалы $\text{HO}_2^\cdot$ и O_2^- согласно реакциям



Важно учесть, что в присутствии кислорода высокоактивные окислительные радикалы образуются за счет радикалов-восстановителей $\text{H}^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$. Следовательно, в облученном водном растворе возникают условия, благоприятные для окисления. Свободные радикалы O_2^- и $\text{HO}_2^\cdot$ энергетически способны вызвать окисление органических веществ по любым связям, в том числе и тем, которые обычно устойчивы в ходе окислительно-восстановительных реакций.

К числу наиболее характерных реакций органических радикалов с радикалами $\text{HO}_2^\cdot$ относится реакция образования гидроперекисей



В облученных растворах обнаружено появление гидроперекисей аминокислот, тимина и цитозина. Если аминокислоты имеют длинные углеродные цепи, то образующиеся гидроперекиси весь-

ма стабильны, как, например, гидроперекиси лейцина и изолейцина. В конечном счете гидроперекиси распадаются с образованием стабильных продуктов.

5) Реакции переноса водорода

В облученном водном растворе репарация органических радикалов может происходить за счет второго растворенного вещества $R-H$, которое отдает атом водорода:



Особенно эффективны соединения, содержащие свободную SH-группу. Пример такой реакции — взаимодействие метанола с радикалом $OH\cdot$ в присутствии SH-соединений:



4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Прежде чем перейти к результатам экспериментов, в которых изучали зависимость инактивации макромолекул от концентрации раствора, попытаемся качественно проанализировать возникающую ситуацию. При определенной концентрации раствора в нем существуют молекулы-мишени, поражение которых приводит к определенному типу инактивации. Если в растворе преобладает прямое действие излучения на макромолекулы, то с ростом концентрации (больше мишеней) должно увеличиваться число пораженных молекул, так как увеличивается вероятность попадания. Если же инактивация происходит вследствие взаимодействия макромолекул с активными продуктами радиолиза воды, то лимитирующим будет не число объектов в растворе (концентрация), а количество образующихся радикалов воды, которое зависит лишь от дозы излучения. Это означает, что в достаточно широком диапазоне концентраций выход инактивированных молекул при облучении определенной дозой D не должен зависеть от числа этих молекул (концентрации раствора). Лишь при очень низких концентрациях, когда число объектов-мишеней меньше числа продуктов радиолиза, приращение концентрации приведет к увеличению абсолютного числа инактивированных молекул. Но вскоре, по мере роста концентрации, число мишеней сравняется с числом активных радикалов воды и дальнейший рост концентрации не приведет к увеличению числа инактивированных молекул. Только при очень высоких концентрациях возможно некоторое увеличение числа поврежденных молекул вследствие их прямого поражения ионизирующим излучением. Именно такую зависимость наблюдали в эксперименте (рис. IV-4, А).

На рис. IV-4, Б показано, как изменяется радиационно-химический выход пораженных молекул ДНК с ростом концентрации раствора. Видно, что в широком диапазоне концентраций раствора на каждые 100 эВ поглощенной энергии инактивируется одинаковое число молекул, т. е. радиационно-химический выход инактивированных молекул не зависит от концентрации. Этот эффект (его называют «эффектом разбавления» или «эффектом Дейла») используют для выявления непрямого действия радиации на молекулы.

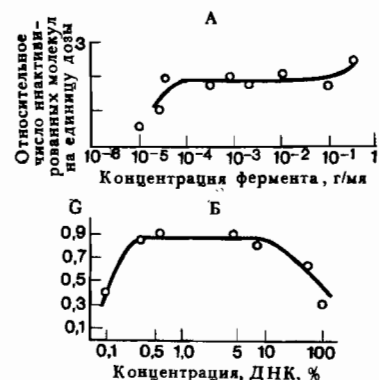


Рис. IV-4. Количественные закономерности прямого действия радиации в водных растворах: А — зависимость числа инактивированных молекул карбоксипептидазы от концентрации раствора (по Дейлу и др., 1949); Б — зависимость радиационно-химического выхода (G) однонитевых разрывов от концентрации ДНК (по Коллинсу и др., 1965)

Теперь обратимся к результатам экспериментов, в которых определяли радиочувствительность макромолекул в растворах различной концентрации. В одном из таких опытов, представленном на рис. IV-5, в разбавленных растворах облучение оказывается значительно эффективнее. При одной и той же дозе в растворе низкой концентрации инактивируется значительно большая доля молекул, чем в высококонцентрированных. Такой результат не находит объяснения с позиции прямого действия излучения на молекулы. При прямом действии величина дозы указывает на число попаданий. При данной дозе каждый из растворов испытывает одинаковое число попаданий, следовательно, в них должно было бы инактивироваться одно и то же относительное число молекул. Иначе можно анализировать результат эксперимента исходя из представлений о непрямом действии излучения, которое опосредовано активными продуктами радиолиза воды. При низких концентрациях общее число молекул-мишеней невелико, поэтому необходимое число активных продуктов радиолиза воды появится уже при малой дозе излучения. В концентрированных растворах такая же доля молекул (сравнимый процент от общего числа) окажется инактивированной только в том случае, если в воде возникнет достаточное число активных продуктов. В результате мы отмечаем кажущееся повышение устойчивости к излучению концентрированных растворов. Еще один эффект, наблюдаемый в концентрированных растворах, — экранирование непораженных молекул пораженными. В результате зависимость «доза — эффект» графически будет выражаться экспонентой: в диапазоне малых доз небольшое приращение до-

зы излучения приводит к резкому увеличению числа инактивированных молекул (быстро достигается количество активных продуктов радиолиза, сравнимое с числом мишеней), с ростом дозы все медленнее накапливаются пораженные молекулы, так как часть продуктов радиолиза воды вторично поражает уже пораженные объекты. Такая зависимость обнаружена в опыте



Рис. IV-5. Инактивация растворов дезоксирибонуклеазы I различной концентрации (по Окада, 1957)

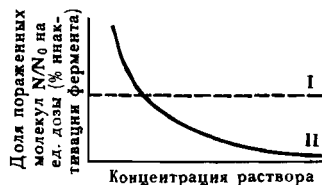


Рис. IV-6. Прямое (I) и косвенное (II) действие одной и той же дозы на раствор фермента (по Дэйлу, 1949)

(рис. IV-6). Отсюда следует важный критерий непрямого действия излучения в водных растворах — снижение относительного числа инактивированных молекул (% инактивации) с ростом концентрации.

5. МОДИФИКАЦИЯ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ РАСТВОРЕННЫХ МОЛЕКУЛ

Приведенный выше материал свидетельствует о том, что в разбавленных водных растворах не прямое действие радиации, опосредованное продуктами радиолиза воды, играет ведущую роль в инактивации молекул. Последовательность протекающих процессов выглядит так.

1. В момент прохождения ионизирующей частицы через воду (в первые 10^{-18} — 10^{-16} с) вдоль ее трека возникают возбужденные, сверхвозбужденные и ионизированные молекулы, которые испытывают цепь превращений, приводящих к образованию радикалов $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$ и e^- -гидр.

2. Часть свободных радикалов рекомбинирует с образованием молекулярных продуктов H_2O_2 , H_2O и H_2 , некоторые радикалы способны взаимодействовать с растворенными органическими молекулами.

3. Каждый из радикалов воды вступает в специфические реакции с растворенными макромолекулами, в результате возникают свободные органические радикалы (биологически активные макромолекулы имеют высокое сродство к радикалам воды).

4. Возникшие радикалы органических молекул взаимодействуют друг с другом и с окружающими молекулами, образуя ста-

бильные репарированные или поврежденные структуры. Характер инактивации макромолекул зависит от типа их структурного поражения.

5. Критерием непрямого действия излучения служит «эффект разбавления» и снижение относительного числа инактивированных молекул с ростом концентрации раствора.

Эффект защиты. Если в растворе существуют молекулы-примеси, способные конкурировать с макромолекулами за активные продукты радиолитического разложения воды, то это приводит к снижению радиационного поражения макромолекул. Справедливость такого положения доказана экспериментально (рис. IV-7).



Рис. IV-7. Поражение сыровоточного альбумина человека после облучения γ -лучами: А — 1%-ный раствор; Б — то же в присутствии β -меркаптоэтиламина $2 \cdot 10^{-3}$ М; В — то же в присутствии тиомочевинной $1 \cdot 10^{-3}$ М (по Розину и др., 1957)



Рис. IV-8. Инактивация трипсина в аэробных (O_2) и анаэробных (N_2) водных растворах (0,1 мг фермента в мл) рентгеновскими лучами (по Брустоу, 1960)

Влияние ЛПЭ излучения. Поражающее действие излучения снижается с ростом ЛПЭ-излучения, т. е. рентгеновские и γ -лучи оказываются эффективнее α -частиц или ускоренных ядер элементов. Это связано с неодинаковой линейной плотностью ионизации, которая определяет пространственное распределение активных радикалов воды. В случае плотнoионизирующего излучения продукты радиолитического разложения пространственно не разобщены, значит, увеличивается вероятность их рекомбинации с образованием молекулярных продуктов H_2 , H_2O и H_2O_2 . При действии редкоионизирующего излучения радикалы воды с большей вероятностью достигнут растворенных молекул и вызовут их поражение.

Кислородный эффект. Наличие кислородного эффекта при прямом действии излучения доказано во многих работах. Для сухих препаратов ферментов и нуклеиновых кислот фактор кислородного эффекта равен 1,5—2,2, т. е. в присутствии кислорода макромолекулы в 1,5—2,2 раза эффективнее поражаются ионизирующим излучением. В водных растворах кислородный эффект либо очень мал, либо вообще отсутствует. Для ряда систем да-

же было показано защитное действие кислорода. Так, при облучении раствора трипсина (рис. IV-8) обнаружено увеличение радиочувствительности фермента при переходе от атмосферы кислорода к атмосфере инертного газа.

В водных растворах ДНК наблюдают примерно одинаковое поражение как в присутствии кислорода, так и в анаэробических условиях (рис. IV-8), а в клетках инактивация трансформирующей ДНК происходит в 3,7 раза эффективнее, если клетки аэрировались во время облучения.

Добавляя к раствору ДНК радиозащитные вещества (глутатион), удалось воспроизвести ситуацию, аналогичную наблюдаемой при облучении клетки. При концентрации глутатиона $1,4 \cdot 10^{-3}$ М трансформирующая ДНК в 3,7 раза эффективнее поражалась облучением в аэрированных растворах, чем в атмосфере азота (N_2). Так возникло предположение, что наблюдаемый в клетках кислородный эффект связан с присутствием защитных веществ, главным образом сульфгидрильных соединений.

Г. Дертингер и Х. Юнг (1973) предлагают следующую интерпретацию кислородного эффекта для макромолекул. Благодаря парамагнитным свойствам молекулярный кислород обладает высоким сродством к возникающим под действием излучения радикалам. При взаимодействии кислорода с радикалом $R^\cdot$ образуются перекисные радикалы:



Это свойство кислорода не зависит от того, является радикал $R^\cdot$ радикалом макромолекул или одним из активных продуктов радиолиза воды. Кроме того, электроотрицательный кислород способен улавливать электроны согласно уравнению



Таким образом, в присутствии кислорода вместо радикалов $H^\cdot$, $OH^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$ могут возникать радикалы $OH^\cdot$, $HO_2^\cdot$ и $O_2^{\cdot-}$.

Если определенный специфический тип инактивации связан с радикалами $H^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$, то кислород будет оказывать защитный эффект, конкурируя с макромолекулами за эти радикалы воды. Если же данный тип повреждения преимущественно связан с радикалом $OH^\cdot$, то кислород может усиливать радиационное поражение вследствие перехвата радикалов $H^\cdot$. Это приведет к некоторому увеличению выхода радикалов $OH^\cdot$, так как в отсутствие кислорода возможна рекомбинация $H^\cdot$ и $OH^\cdot$ с образованием H_2O , а взаимодействие радикалов $H^\cdot$ с кислородом согласно уравнению (IV-28) уменьшит число рекомбинированных радикалов $H^\cdot$ и $OH^\cdot$. В опытах по облучению РНКазы в присутствии кислорода обнаружено усиление поражающего действия излучения (фактор кислородного эффекта равен 1,2).

В присутствии SH-соединений лучевое поражение макромолекул снижается в результате двух эффектов: защитное соедине-

ние конкурирует за свободные радикалы воды и способно репарировать начальное повреждение путем переноса водорода с SH-группы на радикал макромолекулы. На рис. IV-9 показано, что в анаэробных условиях глутатион в 3,7 раза снижает радиочувствительность трансформирующей ДНК (кривая 1), вероятно,

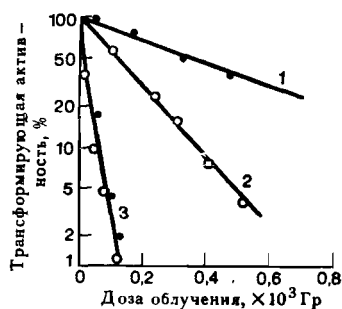


Рис. IV—9. Инактивация трансформирующей ДНК из *Diplococcus pneumoniae*: 1, 2 — облучение в атмосфере азота (•) и кислорода (°) в присутствии глутатиона $1,4 \cdot 10^{-3}$ М; 3 — облучение в водном растворе в отсутствие защитного агента

в результате обоих эффектов. В атмосфере кислорода защитный эффект глутатиона снижается, но все же радиочувствительность ДНК ниже, чем в водном растворе без радиозащитного соединения, даже если облучение проводили в анаэробических условиях. Вероятно кислород конкурирует с восстановительной способностью глутатиона, переводя радикалы ДНК в трудно репарируемую перекисную форму, хотя и в этих условиях эффект глутатиона как перехватчика радикалов сохраняется (кривая 2 лежит выше, чем кривая 3).

Таким образом, модифицирующее действие кислорода на макромолекулы, облученные в водном растворе, определяется многими факторами: присутствием защитного соединения, его сродством к кислороду, типом радикала воды, вызывающего данное повреждение макромолекулы, вкладом прямого и непрямого действия

в эффект поражения. Во всех случаях кислород, вероятно, не вызывает истинной сенсibilизации или защиты макромолекул, так как он не влияет на число первичных повреждений. По-видимому, действие кислорода связано с процессами репарации начальных повреждений макромолекул в присутствии защитных веществ. Поэтому кислородный эффект может не наблюдаться в разбавленных водных растворах, не содержащих радиопротектора.

6. СВЯЗЬ МЕЖДУ ТИПОМ СТРУКТУРНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ И ХАРАКТЕРОМ ИНАКТИВАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Этот этап включает биофизический анализ механизма инактивации макромолекул в облученных водных растворах. Его задача — указать тип (или типы) структурного повреждения, приводящего к данному изменению функциональных свойств макромолекулы. Работы в этом направлении ведутся в настоящее время

ми во многих лабораториях. Они требуют привлечения сложнейшего арсенала биохимических и физико-химических методов анализа для выявления структурных повреждений макромолекул. Существуют специальные биофизические методы, позволяющие судить о причинно-следственной связи между типом поражения и наблюдаемым характером инактивации.

Переходя к экспериментам с облученными водными растворами, необходимо по возможности точнее установить, какой из активных продуктов радиолиза воды вызывает данное повреждение молекулы. Для этого используют перехватчики радикалов определенных типов. В результате в растворе останется реакционноспособным один из радикалов воды, остальные будут перехвачены. Другой прием состоит в том, что в растворе специальными методами создают определенную концентрацию какого-либо из радикалов воды или молекулярных продуктов радиолиза, добавляют исследуемое вещество и изучают характер реакции. Во всех случаях стремятся к дифференциальной оценке эффекта каждого из активных продуктов радиолиза воды.

Фермент лизоцим облучали в присутствии различных перехватчиков или селективно воздействовали на него радикалами $\text{H}^\bullet$ и $\text{OH}^\bullet$. Было показано, что инактивация фермента происходит в результате атаки белковой молекулы тремя типами радикалов — $\text{H}^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$ и e^- -гидр. Другой фермент — трипсин — инактивируется главным образом за счет атаки радикалов $\text{OH}^\bullet$, из всех использованных перехватчиков только этанол — перехватчик $\text{OH}^\bullet$ — защищал трипсин от инактивации в водном растворе. В растворе белковая молекула многократно взаимодействует с радикалами, среди вызываемых ими повреждений необходимо выявить те, которые приводят к инактивации.

Зависимость «доза — эффект» для инактивации молекул в водном растворе сохраняет экспоненциальный характер. Как и в случае прямого действия, причина инактивации — одиночное событие попадания. В водном растворе инактивирующим событием может быть одна специфическая реакция водного радикала со структурным звеном макромолекулы. Выявить эту специфическую реакцию или ее последствия крайне трудно, так как белковая молекула испытывает множество соударений с радикалами. Рассмотрим несколько примеров.

После облучения рибонуклеазы в растворе (1 мг фермента в 1 мл H_2O) физико-химический анализ выявил следующие структурные повреждения: образование агрегатов макромолекул (увеличивается внутренняя вязкость и возникают дополнительные фракции при гельфильтрации); появление свободных SH-групп; селективное разрушение аминокислот — метионина, цистина, лизина, тирозина, фенилаланина, гистидина; изменение конформации (увеличивается перевариваемость молекул трипсином). Все эти структурные изменения обнаружены при дозе, близкой к D_{37} , когда каждая молекула испытала в среднем по одному ин-

активирующему событию попадания. Возможной причиной инактивации может служить развертывание молекулы вследствие разрушения аминокислот, формирующих гидрофобные или $S=S$ -связи, поддерживающие конформацию белка.

После облучения дезоксирибонуклеазы-1 обнаружено снижение числа триптофановых остатков на молекулу фермента. Известно, что эта аминокислота входит в состав активного центра. Если в норме на молекулу фермента приходится около 5 остатков триптофана, то после облучения



Рис. IV-10. Зависимость между числом триптофановых остатков и максимальной скоростью реакции облученной дезоксирибонуклеазы I (по Окада, 1963): 1 — активность фермента, облученного в водном растворе; 2 — активность фермента, обработанного N-бромсукцинимидом (активность фермента оценивали по максимальной вязкости ДНК, %)

в дозе D_{37} остается 3 остатка аминокислоты. При этом происходит резкое снижение каталитической активности фермента. Интересно, что специфический ингибитор — бромсукцинимид — также взаимодействует с триптофаном и отмечается известный параллелизм в действии излучения и этого ингибитора (рис. IV-10).

Специальные опыты позволили оценить величину радиационно-химического выхода пораженных остатков триптофана и сопоставить его с радиационным выходом инактивированных ферментов. Оказалось, что G-поражения двух открытых остатков триптофана (из 5 на молекулу фермента) равно 0,4, а G-инактивации равно 0,2. В этих же условиях G-поражения трех других остатков триптофана только 0,08. Поэтому кажется вполне убедительным, что именно разрушение открытого остатка триптофана водным радикалом приводит к повреждению активного центра и потере каталитической активности облученной дезоксирибонуклеазы.

В табл. IV-3 представлены выводы ряда исследователей, изучавших механизм инактивации ферментов ионизирующим излучением в воде. Большое число исследований посвящено выяснению механизма поражения ДНК в облученных водных растворах. В физико-химических экспериментах выявлены основные типы структурных повреждений, возникающих в облученной ДНК. Представление об этом дает табл. IV-4, в ней приведены повреждения, наблюдаемые в ДНК, облученной в разбавленном водном растворе. Появление разрывов полинуклеотидной цепи и поперечных межмолекулярных сшивок легко зарегистрировать седиментационным анализом и хроматографическим методом. Значительно сложнее выявить разрушение нескольких азотистых оснований из десятков тысяч, входящих в состав молекулы. Тем не менее такие повреждения могут иметь значительные биологические последствия.

Таблица IV-3

Предполагаемые причины инактивации ферментов, облученных в водном растворе
(по Окада, 1974)

Исследуемый фермент	Предполагаемая причина инактивации облученного фермента
Рибонуклеаза	разрушение остатка метионина
Дезоксирибонуклеаза I	разрушение одной молекулы триптофана
Фосфоглюкомутаза	разрушение одной молекулы гистидина
Каталаза	разрушение гематопорфириновой группы
Лактопероксидаза	частичное разрушение одной гематопорфириновой группы
Фосфоглицеральдегидгидрогеназа	деструкция SH-групп (цистеина) или окисление SH-групп
Аденозинтрифосфатаза	окисление SH-групп
Сукцинатоксидаза	окисление SH-групп
Уреаза	окисление SH-групп
Глутаматдегидрогеназа	окисление SH-групп
Лактатдегидрогеназа	окисление SH-групп
Алкогольдегидрогеназа	окисление или деструкция SH-групп

Важно установить, какой из активных продуктов радиолиза воды отвечает за данный характер инактивации. Это позволит в дальнейшем изучить кинетику реакции, выявить радикальный продукт или продукты, исследовать их дальнейшие превращения. Для этой цели часто используют перехватчики радикалов. Например, облучение инфекционной ДНК фага фХ-174 в присутствии перехватчика $\text{OH}^\cdot$ (йод) и перехватчиков $\text{H}^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$ (кислород) показало, что подавление инфекционной способности вызвано действием радикала $\text{OH}^\cdot$. В присутствии йода (меньше $\text{OH}^\cdot$) инактивация снижалась, а кислород не влиял на степень инактивации, хотя и уменьшал число радикалов $\text{H}^\cdot$ и $e^-_{\text{гидр}}$. За счет атаки радикалов $\text{OH}^\cdot$ в ДНК возникали однонитевые разрывы, повреждения азотистых оснований и другие эффекты. Удельный вклад каждого структурного повреждения в эффект инактивации оценивают путем сопоставления величин радиационно-химического выхода инактивации с выходом однонитевых разрывов, поврежденных оснований и других типов структурной деградации.

Изучение инфекционной двухнитевой ДНК фага ф29 показало, что инактивация происходит вследствие двухнитевых разрывов цепи. Зависимость числа двухнитевых разрывов от дозы облучения сигмоидальна. Это означает, что в результате атаки водными радикалами в каждой из цепей вначале появляются одиночные разрывы, а при определенном критическом числе этих разрывов становится вероятным двухнитевой разрыв как результат совпадения близкорасположенных однонитевых разрывов.

Таблица IV-4

Радиационные повреждения ДНК из тимуса теленка,
облученной в водном растворе
(по Окада, 1974)

Типы радиационного повреждения ДНК	Среда суспендирования*	Концентрация ДНК, %	Радиационно-хи- мический выход
Однонитевые разрывы	0,01 М NaCl	0,02	0,24
Двухнитевые разрывы	»	0,02	не определяли
Поперечные сшивки	»	0,02	не определяли
Денатурация (разрыв водородных связей)	»	0,14	38
Разрушение основания	0,01 М PO ₄	0,5	
тимин			0,45
цитозин			0,28
гуанин			0,17
аденин			0,12
Образование перекисей тимина и ци- тозина	вода	0,025	0,30
Дезаминирование (образование NH ₃)	вода	0,2	0,4
Освобождение оснований	0,01 М PO ₄	0,5	
тимин			0,5
аденин			0,07
цитозин			0,08
гуанин			0,04
Освобождение неорганического PO ₄	вода	1,0	0,09

* Облучение растворов проводили на воздухе.

Эксперименты с трансформирующей ДНК показали, что ее инактивация обусловлена атакой полинуклеотидной цепи радикалом OH[•]. Об этом свидетельствует независимость выхода инактивированных молекул от концентрации кислорода в среде (кислород — перехватчик радикалов e⁻_{гидр} и H[•]). Сопоставив величины радиационно-химических выходов инактивированных молекул с выходом различных типов повреждений, предположили, что инактивация возникает вследствие однонитевых разрывов цепи ДНК.

В целом проблема лучевого поражения нуклеиновых кислот в облученных водных растворах далека от разрешения. В настоящее время интенсивно анализируется возможность миграции энергии в молекуле и между молекулами, роль различных модифицирующих факторов в первичных процессах лучевого поражения нуклеиновых кислот, возможность репарации повреждений, вызванных в молекуле ДНК водными радикалами.

* * *

Материал IV главы посвящен рассмотрению непрямого действия ионизирующих излучений в водных растворах. Опосредо-

важное поражение органических молекул в разбавленных водных растворах обусловлено действием высокоактивных диффундирующих свободных радикалов, возникающих в результате радиолиза молекул воды. Свободные радикалы $H^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$, $e^-_{гидр}$ обладают высокой реакционной способностью, они могут вызвать разрушение химических связей в белках, нуклеиновых кислотах и других органических молекулах. Во многих случаях реакция органической молекулы со свободными радикалами воды приводит к возникновению свободных радикалов органических молекул, которые вступают в различные реакции друг с другом и с другими молекулами. В результате формируются стабильные растворенные продукты — молекулы с измененными структурными и функциональными характеристиками. Это могут быть ферменты с нарушенными каталитическими характеристиками, молекулы ДНК с одно- и двухнитевыми разрывами полинуклеотидных цепей или разрушенными азотистыми основаниями и т. д. Некоторые из подобных повреждений, в принципе, могут служить причиной гибели клеток и организмов.

Ряд модифицирующих агентов, таких, как кислород, низкая температура, серосодержащие соединения и другие воздействия, изменяют характер радиационно-химических реакций в водных растворах, конкурируя с органическими молекулами за активные радикалы воды или восстанавливая пораженные молекулы. Это открытие стимулировало использование радиопротекторов для защиты клеток и организмов от действия излучения.

Феномен непрямого действия излучения был впервые продемонстрирован на разбавленных водных растворах. Однако это не означает, что не прямое действие может наблюдаться только в воде. В принципе, любой растворитель, в котором возникают диффундирующие активные продукты, может служить субстратом для проявления непрямого действия радиации. В главе VI будет подробно разобрано не прямое действие излучения в липидной фазе.

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА КЛЕТКУ

Выяснение механизма действия ионизирующей радиации на клетку — одна из основных проблем радиобиологии. Ее решение имеет важное теоретическое значение, так как позволит расшифровать природу внутриклеточных процессов, приводящих к развитию поражения или его восстановлению. Практическая значимость исследований, проводимых на клеточном уровне, несомненна. В основе лучевого поражения любых сложных биологических систем, включая млекопитающих, лежит реакция различных клеток на действие ионизирующей радиации.

Клеточный радиобиологический феномен анализируется со времени открытия рентгеновских лучей и радиоактивности. За этот период накоплен обширный экспериментальный материал о характере морфологических и биохимических изменений в облученной клетке, изучены кинетические закономерности развития лучевого поражения, проведен количественный анализ гибели клеток в облученной популяции. В настоящее время ведутся интенсивные биофизические исследования, посвященные анализу первичных физико-химических процессов, происходящих в облученной клетке.

Задача радиационной биофизики состоит в исследовании центрального звена — последовательности процессов, протекающих с момента возникновения немногочисленных начальных повреждений до возникновения тестируемых биологических эффектов, включая гибель клетки. Для этого используется широкий арсенал физических и физико-химических методов анализа, оригинальные подходы, основанные на фундаментальных физических концепциях о взаимодействии фотонов с веществом, разнообразные модельные системы: изолированные молекулы, различные многокомпонентные системы, субклеточные органоиды, культивируемые клетки различных тканей.

1. РЕАКЦИЯ КЛЕТОК НА ОБЛУЧЕНИЕ

Еще в начале века были описаны различные реакции клеток на облучение — от временной задержки роста и размножения до полной деградации и лизиса. Выраженность эффекта зависела от дозы облучения и особенностей объекта. В 1906 г. Бергонье и Трибондо, обобщив накопленный к тому времени эксперимен-

тальный материал, заключили, что рентгеновские лучи тем сильнее действуют на клетки, чем интенсивнее они делятся и чем менее дифференцированы. Это эмпирическое правило указывало, что ответная реакция клеток на лучевое воздействие зависит от физиологического состояния объекта и его генетической конституции.

С появлением методов культивирования клеток вне организма удалось детально описать характер гибели быстроделющихся малодифференцированных клеток и неделящихся или медленно делящихся высокодифференцированных клеток.

Быстроделющиеся клетки или клетки, стимулированные к делению¹

С помощью цейтраферной киносъемки можно проследить судьбу потомков одной облученной клетки (на рис. V-1 показана клетка линии *L*, облученная в дозе 2 Гр, и ее потомство).

Первая видимая реакция клеток на облучение — задержка их вступления в митоз, т. е. клетка, облученная в интерфазе, не делится в ожидаемый момент. Опыты с синхронизированными культурами показали, что выраженность задержки деления зависит от стадии клеточного цикла: наибольший эффект наблюдается при облучении клеток в стадиях *S* и *G*₂. Чем больше доза облучения, тем продолжительнее задержка деления. Через определенный промежуток времени, зависящий от величины дозы, клетки вступают в митоз. Их дальнейшая судьба складывается по-разному. Часть клеток облученной популяции, вступив в митоз, не в состоянии разделиться. Образуются гигантские клетки. Их размеры могут в сотни раз превосходить размеры необлученных клеток. По-видимому, гигантские клетки возникают не за счет набухания, а в результате общего увеличения синтезированных клеточных элементов (содержание ДНК, РНК и белка увеличивается пропорционально размерам клетки). В конечном итоге гигантские клетки погибают, вероятно, из-за нарушения механической прочности мембран и изменения оптимального для питания соотношения поверхности клетки и ее объема.

Большая часть облученных клеток проходит митоз и делится. Однако сразу же после первого деления появляются погибающие клетки. Еще больше клеток гибнет после второго, третьего и т. д. митозов (рис. V-1).

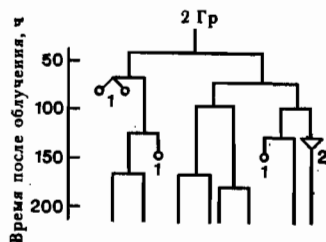


Рис. V—1. Результаты наблюдения за потомками клетки линии *L*, облученной в дозе 200 Р в поздней *S*-фазе: 1 — погибшая клетка; 2 — гигантская клетка (Тротт, 1969)

¹ Деление клеток печени стимулируют частичной гепатэктомией, клеток почки — удалением одной из почек, малых лимфоцитов — добавлением фитогемагглютининов.

Описанный тип гибели неразрывно связан с процессом митоза. Его существенная особенность состоит в том, что облученные клетки в течение определенного промежутка времени сохраняют метаболическую активность, но не продуцируют жизнеспособное потомство, которое было бы в состоянии делиться далее. До первого постлучевого митоза погибшие клетки не появляются — процессы митоза как бы выявляют летальные повреждения, вызванные облучением. Особенности гибели быстроделящихся клеток подчеркивают термины, которые в разное время были приняты для ее обозначения: «митотическая гибель», «отсроченная гибель», «гибель при делении», «репродуктивная гибель». Последний термин получил наибольшее распространение, так как в качестве критерия гибели используют методы количественной оценки репродуктивной способности клеток (способность к образованию колоний *in vitro*, селезеночных колоний и другие методы оценки клоногенной активности).

Неделящиеся или медленно делящиеся клетки

Примером неделящихся клеток служат дифференцированные нервные или мышечные клетки; к медленно делящимся относятся клетки печени; у малых лимфоцитов и юных ооцитов способность к делению ограничена. Гибель клеток этого типа не зависит от деления — облученные клетки гибнут в интерфазе. Для обозначения рассматриваемого типа гибели приняты термины: «немитотическая гибель», «немедленная гибель», «гибель в отсутствие деления», «интерфазная гибель». Каждый из терминов по-своему подчеркивает особенности рассматриваемого типа гибели клеток, но наиболее распространен последний — «интерфазная гибель».

Интерфазной гибели предшествует ряд закономерных физиологических и морфологических изменений. Нарушается ядерное фосфорилирование, изменяется проницаемость ядерной, митохондриальной и цитоплазматической мембран, угнетается дыхание, происходит деградация дезоксирибонуклеопротеидного комплекса в ядре, активируются протеолитические ферменты, клетки теряют способность выводить краситель — эритрозин Б (гибнущие клетки окрашиваются этим красителем). Среди морфологических изменений наиболее отчетливо выражены набухание и пикноз ядер, вакуолизация и распад ядрышек.

Гибель клеток происходит через несколько часов (малые лимфоциты, юные ооциты) или в первые сутки (нервные, мышечные, печеночные клетки) после облучения. При очень высоких дозах радиации интерфазная гибель наступает сразу же, «под лучом».

В принципе, можно добиться того, чтобы клетки, для которых характерна репродуктивная форма гибели, погибали в интерфазе до первого митоза. Для этого их необходимо облучить большой дозой.

2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИБЕЛИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

Первые строгие количественные эксперименты по лучевой инактивации клеток были проведены в начале 20-х гг. Тогда же обнаружили важнейшую закономерность — вероятностную природу проявления реакции клеток на облучение. При исследовании зависимости доли погибших клеток от величины дозы облучения выяснили, что различные одноклеточные объекты гибнут при самых малых дозах облучения, с ростом дозы увеличивается число погибших клеток, однако при любой как угодно большой дозе некоторое число клеток сохраняет жизнеспособность.

Существенно, что с ростом дозы облучения увеличивалась не столько степень проявления эффекта (глубина поражения клетки), сколько доля пораженных, т. е. число клеток в облученной популяции, реагирующих данным образом на облучение.

Пример кривой, отражающей зависимость доли выживших клеток от дозы облучения, приведен на рис. V-2, А, Б. Ось абсцисс начинается не от нуля оси ординат, а от выбранной для удобства точки, соответствующей 0,01% выживаемости. Поэтому кривая упирается в ось абсцисс. В действительности же для популяции изолированных клеток не существует критической дозы, при которой гибели бы все 100% особей.

Возможная «биологическая» интерпретация кривых «доза — эффект», наблюдаемых в экспериментах с клетками, могла бы основываться на представлении о широкой индивидуальной вариабельности радиочувствительности. Действительно, фармакологам хорошо известно, что S-образные кривые «доза — эффект», получаемые при действии ядов на животных, связаны с их различной индивидуальной устойчивостью к действию токсического агента. Вплоть до некоторой пороговой дозы все животные переносят действие яда; при концентрациях, превышающих пороговые, резко возрастает доля погибших особей; и при некоторой дозе яда 100% животных гибнут. Чем меньше выражены индивидуальные различия, тем круче наклон кривой «доза — эффект». Однако такое объяснение в случае радиационного воздействия малоубедительно. Во-первых, трудно представить, что внутри генетически однородной популяции клетки в десятки тысяч раз различаются по устойчивости к облучению. Во-вторых, на кривых «доза — эффект» отсутствует четкий порог: как угодно



Рис. V—2. Кривая «доза — эффект» для популяции клеток, облученных редкоионизирующим излучением: А — клетки почки человека в культуре (Скайф, 1962); Б — линия клеток ELD в культуре (Ярмоненко и др., 1976)

малая доза излучения убивает некоторое число клеток, а при самых высоких дозах все еще обнаруживаются выжившие. Вряд ли у клеток одного клона существуют такие различия в строении или обмене веществ, которые делают их тысячекратно различающимися по радиочувствительности.

Была предложена иная, биофизическая трактовка экспериментальных кривых «доза — эффект». Она основывалась на сложившихся в 20-е гг. представлениях о дискретной природе ионизирующего излучения и вероятностном характере передачи энергии внутриклеточным молекулярным структурам. Вначале Дж. Дессауэр использовал гипотезу точечного нагрева для объяснения вероятностного характера клеточной гибели, затем Блау и Альтенбургер в 1922 г. предложили общую формулу для расчета кривых «доза — эффект», основанную на статистическом принципе попадания:

$$N/N_0 = 1 - e^{-vD} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(vD)^k}{k!}, \quad (V-1)$$

где N_0 — исходное число клеток до облучения, N — число клеток, прореагировавших данным образом, v — чувствительный объем, попадание в который приводит к тест-эффекту, D — доза облучения, n — требуемое число попаданий в мишень. Блау и Альтенбургер из уравнения (V-1) рассчитали теоретические кривые «доза — эффект» для разного числа попаданий в мишень. Эти кривые соответствовали реальным дозным кривым, наблюдаемым при облучении изолированных клеток. Дальнейшее приложение статистического принципа попадания для объяснения количественных закономерностей лучевой инактивации клеток связано с работами Кроутера. В 1924 г. он сформулировал «теорию попадания». Считая попаданием возникновение акта ионизации в облучаемом объеме, Кроутер предположил, что регистрируемый эффект связан с некоторым критическим числом ионизаций (попаданий) в пределах мишени, занимающей определенный чувствительный объем внутри клетки. Параметры мишени оказались сопоставимы с размерами центриолей и ядрышек. В радиобиологии начинается поиск мишени на основании статистических принципов теории попадания. Он привел к представлению о ведущей роли ядра и внутриядерных наследственных структур в летальном поражении клетки.

Количественный анализ, основанный на принципе попаданий, не может вскрыть природу физико-химических процессов, развивающихся в клетке вслед за возникновением одиночных актов ионизации (попаданий). Однако он позволил ввести в радиобиологию представление о вероятностной природе единичной реакции клетки на облучение. Появилась возможность корректного описания кривых «доза — эффект», анализа важнейших пара-

метров кривых, планирования радиобиологического эксперимента и точного количественного учета полученных результатов.

Рассмотрим характерную кривую «доза — эффект» и дадим ей интерпретацию на основании принципа попадания.

Лишь в ограниченном числе случаев зависимость доли выживших клеток от величины дозы облучения описывается простой одноударной кривой, соответствующей уравнению

$$N/N_0 = e^{-\frac{D}{D_0}}, \quad (V-2)$$

где D_0 — доза, достаточная для гибели всех клеток, если «попадания» будут претерпевать лишь живые клетки. При $D=D_0$ выполняется соотношение

$$N/N_0 = e^{-1} = 0,37, \quad (V-3)$$

т. е. выживает 37% облученных клеток, а 63% гибнет. Это соответствует распределению Пуассона: так как при дозе D_0 часть попаданий приходится в уже погибшие клетки, то 37% клеток не испытывают ни одного попадания (см. гл. II).

Величина дозы D_0 служит показателем радиочувствительности клеток. Для чисто экспоненциальных кривых дозы D_0 и D_{37} совпадают.

При облучении клеток редко наблюдаются экспоненциальные дозные кривые. Значительно чаще в эксперименте получают кривые «доза — эффект», которые имеют плечо (рис. V-3) и описываются уравнением

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_0}})^n, \quad (V-4)$$

где n — экстраполяционное число, определяемое как значение ординаты в месте ее пересечения экстраполированным прямолинейным участком кривой выживаемости, D_0 определяет исходную радиочувствительность и вычисляется как приращение дозы, снижающей выживаемость в e раз на прямолинейном участке кривой «доза — эффект». D_q — «квазипороговая доза» — соответствует отрезку, отсекаемому от перпендикуляра, проведенного из точки 100%-ной выживаемости на оси ординат, продолжением линейного участка кривой выживаемости. В этом случае доза

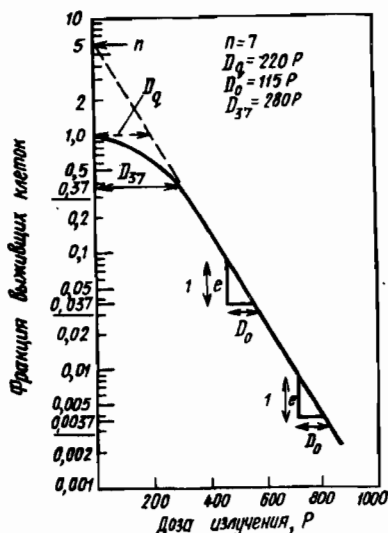


Рис. V-3. Определение основных параметров кривой выживаемости (по Ярмоненко и др., 1976). В качестве примера разобрана реальная кривая выживаемости клеток ELD, представленная на рис. V-2.

D_{37} , дающая 37% выживаемости, связана с D_0 и D_q простым уравнением

$$D_{37} = D_0 + D_q. \quad (V-5)$$

Формально такие сигмоидальные кривые выживания можно описать целым рядом моделей с позиции теории мишени. Если простые экспоненциальные кривые выживаемости хорошо описываются моделью «одно попадание — инактивация одной критической мишени», то для сигмоидальных кривых рассматриваются две модели: «много попаданий — инактивация одной критической мишени» и «одно попадание — инактивация каждой из многих критических мишеней». Первая модель предполагает наличие в клетке одной уникальной структуры — мишени, для инактивации которой необходимо осуществление в пределах чувствительного объема n актов абсорбции энергии («попадание»), а вторая модель предполагает наличие в клетке m критических мишеней, для инактивации каждой из которых достаточно одного события попадания. Такие формальные модели используют для анализа первичных событий передачи энергии излучения клетке. Построив на основании экспериментальных данных как можно более точную кривую «доза — эффект», можно определить величины D_{37} , D_0 , n и D_q , которые характеризуют радиочувствительность клетки и ее способность восстанавливать радиационное поражение. С помощью аналоговых вычислительных машин можно получать теоретические «кривые выживаемости», варьируя основные параметры n , D_0 , D_q . При определенных значениях выбранных параметров теоретические кривые выживаемости совпадают с кривыми, полученными на основании экспериментов по облучению клеток. В таком случае можно формально судить о том, какая из моделей лучше описывает характер лучевого поражения клетки, высказывать предположения о числе критических мишеней и количестве событий попадания, необходимых для инактивации.

Развитие этих методов позволило создать весьма сложные модели. Например, Циркль и Тобайс для объяснения инактивации диплоидных и полиплоидных клеток предложили модель «одно попадание — n наборов — l мишеней». В экспериментах по облучению клеток разной плоидности получают семейство сигмоидальных кривых. По мнению авторов модели, эти кривые соответствуют уравнению

$$N/N_0 = [1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_0}})^n]^l, \quad (V-6)$$

где n — плоидность клетки, т. е. число наборов хромосом, а l — число генов в каждом наборе. Гибель клетки согласно такой модели происходит в результате одного попадания в i -тый ген одной и той же хромосомы каждого набора, i -тым геном может быть любой из l генов.

3. МОДИФИКАЦИЯ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ КЛЕТОК

Чувствительность клеток к ионизирующей радиации можно повысить или понизить за счет физических и химических факторов, а также с помощью воздействий, изменяющих биологические характеристики клеток (плоидность, уровень метаболитов, интенсивность дыхания и другие процессы обмена веществ).

Модифицирующие факторы пытаются использовать в радиотерапии, например, избирательно повышая радиочувствительность опухолевых клеток, и в защите организма от радиации.

Воздействия, изменяющие радиочувствительность, способствуют выяснению механизмов лучевого поражения клеток. Если какой-либо из внутриклеточных процессов подвергается модификации и при этом меняется устойчивость клеток к облучению, логично предполагать связь этого процесса с механизмом лучевого поражения.

Модификация репродуктивной гибели

Радиочувствительность быстродействующих клеток удается модифицировать за счет воздействий, изменяющих плоидность, продолжительность отдельных стадий жизненного цикла, характер внутриклеточного метаболизма. Кроме того, репродуктивная гибель зависит от физических параметров среды — температуры, состава атмосферы, присутствия в облучаемой системе ряда химических агентов, степени замещения нуклеотидов ДНК на бромированные аналоги.

Несмотря на многолетние исследования, до сих пор не ясно, на какие внутриклеточные системы и процессы направлено действие многих модифицирующих факторов. И все же для некоторых из них можно указать предположительные механизмы модификации (Окада, 1970).

Факторы, способные изменять степень начального радиационного поражения клетки. Установлено, что в присутствии кислорода увеличивается выход одностранных разрывов ДНК и эффективность летального поражения клеток. Другой модифицирующий агент — бромдезоксигидроурidine — включается в состав ДНК вместо тимидина. При этом увеличивается число одностранных разрывов и снижается радиочувствительность.

Цистеамин и цистеин увеличивают устойчивость клеток к радиации и снижают выход одно- и двухстранных разрывов в ДНК.

Таким образом, установлено, что, модифицируя начальное радиационное повреждение ДНК, можно изменить радиочувствительность быстродействующих клеток (репродуктивную гибель).

Факторы, изменяющие процессы восстановления. При увеличении плоидности клетки повышается ее устойчивость к излуче-

нию и способность восстанавливать повреждения генетического аппарата. Напротив, с ростом ЛПЭ-излучения в 2—3 раза увеличивается эффективность лучевого поражения клеток и снижается их способность к восстановлению, вероятно, за счет появления труднорепарируемых повреждений.

Целый ряд химических агентов, влияющих на восстановление клетками радиационных повреждений, модифицирует радиочувствительность (актиномицин Д, циклогексимид, стрептовитагин А и др.).

Факторы, изменяющие распределение клеточной популяции по возрасту. Известно, что на разных стадиях клеточного цикла клетки обладают неодинаковой радиочувствительностью. Для большинства клеток наиболее радиочувствительные стадии — «поздняя G_2 », «М» и «поздняя G_1 ». На стадиях «поздняя S» и «ранняя G_1 » клетки наиболее устойчивы к облучению. Некоторые воздействия изменяют продолжительность отдельных стадий клеточного цикла и, таким образом, модифицируют радиочувствительность популяции клеток. В сыворотке уменьшенной концентрации пролонгировалась стадия G_1 клеток китайского хомячка, при этом радиочувствительность популяции была ниже, чем при культивировании в сыворотке нормальной концентрации, где значительно меньше клеток в стадии G_1 . Агенты, блокирующие синтез ДНК, вызывают накопление клеток на поздней стадии G_1 и (или) ранней S. При этом клетки оказываются наиболее радиочувствительными.

По данным Синклера (1968), защитный агент цистеамин вызывает исчезновение возрастной зависимости радиочувствительности клеток китайского хомячка — на всех стадиях цикла клетки одинаково реагируют на облучение. Это означает, что радиационное повреждение состоит из двух компонент — зависящей от возраста, защищаемой цистеамином, и не зависящей от возраста, не защищаемой цистеамином. Природа этих компонент неизвестна.

Модификация интерфазной гибели клеток

Неделящиеся или медленно делящиеся клетки погибают в интерфазе до первого деления. Гибели клеток предшествует изменение внутриклеточного метаболизма и проницаемости мембран, появление морфологических признаков деградации ядерного материала. Можно было ожидать, что воздействия, изменяющие характер метаболизма или защищающие ядерный материал от деградации, модифицируют интерфазную гибель. В целом это предположение подтвердилось.

Физические агенты — температура, газовый состав атмосферы и pH среды — изменяют радиочувствительность. Так как снижение температуры и уменьшение pH модифицируют интерфазную гибель, было высказано предположение, что эти факторы

влияют на химические реакции, зависящие от температуры и pH и, возможно, имеющие ферментативный характер.

Интерфазная гибель возрастает при облучении клеток в атмосфере чистого кислорода. Замена кислорода на азот приводит к снижению радиочувствительности. Возможно, эти агенты модифицируют начальное радиационное поражение клеток, тогда степень начального повреждения может определять характер интерфазной гибели.

Химические факторы, модифицирующие интерфазную гибель, делят на три группы. В первую входят «конденсирующие агенты» — агматин, спермидин, хлористый натрий в высоких концентрациях. Считается, что эти вещества защищают клетки от интерфазной гибели за счет влияния на степень дисперсии хроматина. Действительно, в их присутствии снижается число клеток с пикнозом ядер. Однако они не снижают доли погибших клеток, если интерфазную гибель оценивать по выходу K^+ , уменьшению скорости дыхания и окрашиванию красителями. Это означает, что пикноз может зависеть от дисперсии хроматина (эффект модифицируется конденсирующими агентами), но другие проявления интерфазной гибели связаны с иными процессами.

Вторая группа веществ включает различные дыхательные яды (цианиды, арсенат натрия, динитрофенол, йодацетат), которые уменьшают число клеток с пикнозом ядер и ослабляют вызываемое облучением снижение количества ДНК на клетку. Выход K^+ и окрашиваемость эритрозином Б у клеток, облученных в присутствии дыхательных ядов и без них, мало различается. По-видимому, поражение мембран не модифицируется ни первой, ни второй группой веществ.

Третья группа — различные метаболиты. Подробно изучено модифицирующее действие никотинамида и неорганического фосфата. Никотинамид, предшественник НАД, уменьшал вызываемое облучением число пикнозов ядер, но не влиял на выход K^+ и окрашиваемость клеток. Эффект неорганического фосфата обнаружить не удалось.

Вероятно, состояние хроматина, интенсивность дыхания и уровень метаболитов играют определенную роль в возникновении интерфазной гибели, однако мы не располагаем модифицирующими агентами, способными в равной мере изменять все эти параметры.

Информация, полученная с помощью модифицирующих агентов, имеет большое значение для выяснения механизмов соответствующих типов клеточной гибели.

4. ПЕРВИЧНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ОБЛУЧЕННОЙ КЛЕТКЕ

Анализ первичных физико-химических процессов, протекающих в облученной клетке, имеет первостепенное значение для создания общей теории биологического действия ионизирующих излу-

чений. До недавнего времени основная информация по этому вопросу могла быть получена в модельных экспериментах с изолированными макромолекулами, водными растворами или отдельными субклеточными органоидами. Это позволило построить качественную картину физико-химических процессов, возникающих в живой клетке, поглотившей энергию ионизирующей радиации, которая сводилась к следующему. Ионизирующие частицы, пронизывающие высокоорганизованную микрогетерогенную структуру живой клетки, с определенной вероятностью передают часть своей энергии отдельным молекулам, расположенным вдоль треков частиц. Молекулы, поглотившие энергию излучения, переходят в различные возбужденные состояния, часть которых заканчивается ионизацией. Вероятность переноса энергии к молекуле не зависит от ее химической структуры, она определяется суммарной электронной плотностью, имеющей примерно равные значения для различных биомолекул и воды. Это означает, что в облученной клетке не существует структур, испытывающих преимущественное поглощение энергии, — возбужденными и ионизированными в равной мере могут оказаться белки и нуклеиновые кислоты, липиды и углеводы, молекулы воды и различные низкомолекулярные органические соединения. Эта первая, или физическая, стадия действия излучения на клетку должна закончиться в первые 10^{-13} с. Ее результатом служит возникновение ионизированных и возбужденных молекул, неравномерно распределенных вдоль треков ионизирующих частиц. Процессы, происходящие на этой стадии, недоступны прямому измерению в клетке. Нельзя их и модифицировать — число первичных актов ионизации и возбуждения не зависит от состояния объекта, а определяется лишь свойствами излучения.

Ионизированные и возбужденные молекулы нестабильны. Исчезновение метастабильного состояния происходит за счет миграции энергии внутри молекул или между ними. Вероятно, энергия может мигрировать за счет переноса спина, миграции «положительно заряженной дырки», миграции малых радикалов, прежде всего атомарного водорода. Помимо прямого действия на биомолекулы ионизирующие излучения вызывают их поражение косвенным путем — диффундирующими водными радикалами $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, $\text{e}^-_{\text{гидр}}$ и др., возникающими в результате радиолиза воды. В липидной фазе могут возникать высокоактивные перекисные радикалы и другие продукты радиационного окисления, способные передавать энергию молекулам, погруженным в липидную фазу клеток.

Процессы, связанные с внутримолекулярной миграцией энергии и диффузией радикалов воды, различными межмолекулярными перестройками возбужденных и ионизированных клеточных структур, относятся к физико-химической стадии действия излучения на клетку, которая длится около 10^{-10} с. Возникающие первичные продукты, как правило, неустойчивы и быстро претер-

певают вторичные превращения, приводящие к образованию биорадикалов, взаимодействующих друг с другом и с окружающей средой. Процессы, происходящие на этой стадии, доступны экспериментальному анализу, например, методом ЭПР и с помощью импульсного облучения. Модифицировать физико-химический этап лучевого поражения могут агенты, способные изменять характер миграции энергии или вступающие в реакции со свободными радикалами.

Взаимодействие биорадикалов друг с другом и с окружающими молекулами должно привести к возникновению стойких молекулярных изменений — разнообразных повреждений в структуре молекул, составляющих живую клетку. Структурные повреждения можно выявить методами аналитической биохимии. Рассматриваемая стадия действия излучения получила название химической, ее продолжительность около 10^{-6} с.

Исходя из результатов модельных экспериментов можно ожидать, что под действием излучения произойдет нарушение первичной структуры белков (селективное разрушение отдельных аминокислот), изменится их вторичная структура, нарушится конформация и, возможно, структура активного центра ферментов. В нуклеиновых кислотах возникнут одно- и двухнитевые разрывы полинуклеотидных цепей, разрушатся некоторые азотистые основания, возникнут межмолекулярные сшивки (ДНК—ДНК, ДНК—белок). Могут оказаться пораженными молекулы иРНК, тРНК и рибосомы. В липидах мембран будут инициироваться реакции свободнорадикального перекисного окисления, накапливаться токсические для клетки продукты окисления тканевых липидов.

Различные структурные повреждения молекул клетки могут привести к разнообразным функциональным нарушениям, составляющим последнюю, биологическую, стадию действия излучения. Ферменты в этом случае утрачивают каталитические свойства, субстратную специфичность, чувствительность к соответствующим активаторам и ингибиторам или аллостерические свойства. Различные типы инактивации имеют неодинаковые последствия для клеточного гомеостаза: одни ферменты оказываются исключенными из цепи метаболических реакций, другие нарабатывают токсические продукты, третьи перестают регулироваться соответствующими эффекторами.

Структурные повреждения нуклеиновых кислот будут служить препятствием для нормального протекания процессов репликации, транскрипции и трансляции генетической информации.

Вовлечение липидов мембран в процессы перекисного окисления может привести к поражению мембраносвязанных белков и разнообразным деструктивным изменениям в мембранах: нарушится проницаемость, сместятся ионные градиенты, ферменты выйдут из мест специфической локализации, например из лизосом, нарушится окислительное фосфорилирование. Деградация ядерной

мембраны будет иметь глубокие последствия для генетического аппарата, например, вследствие проникновения в ядро гидролитических ферментов — РНКаз, кислых фосфатаз и др. Накопление продуктов окисления липидов приведет к развитию лучевого токсического эффекта. Разнообразные функциональные изменения, происходящие на биологической стадии, формируются в течение секунд, часов, дней или месяцев. Они могут закончиться гибелью клетки.

В последнее десятилетие получены убедительные доказательства в пользу того, что в облученной клетке осуществляется именно такая последовательность этапов размена энергии ионизирующей радиации, приводящая к закономерному переходу начального радиационного повреждения с одного уровня на другой.

Переход молекул в метастабильное состояние и последующие процессы переноса энергии можно зарегистрировать методом ЭПР. Первые исследования спектров ЭПР облученных тканей провел в начале 60-х гг. Циммер. В последующие годы число таких исследований непрерывно возрастало. Установлено, что в облученной клетке возникают свободные радикалы, их число зависит от дозы облучения. В диапазоне низких доз число радикалов возрастает быстро с увеличением дозы облучения, в области высоких доз — значительно медленнее. Вероятно, это связано с рекомбинацией радикалов, возникающих в высоких концентрациях при больших дозах облучения. Идентификация свободных радикалов затруднительна. Различные биологически активные молекулы имеют близкие значения радиационно-химических выходов радикалов. Следовательно, на единицу поглощенной энергии возникает примерно равное количество радикалов ДНК, белков, липидов и других органических молекул. Все они, по-видимому, вносят вклад в суммарный сигнал ЭПР. Помимо метода ЭПР для выявления свободнорадикальных состояний в клетках используют и другие биофизические методы. Б. Н. Тарусов и его сотр. на кафедре биофизики МГУ регистрировали хемилюминесценцию облученных тканей, в работах Ю. П. Козлова использовали метод привитой сополимеризации мономеров, вводимых в ткани до облучения.

Существуют данные, указывающие на связь между индуцируемыми облучением свободными радикалами и конечным биологическим поражением клеток. Воздействия, модифицирующие начальный уровень радикалов или характер их дальнейших превращений, как правило, изменяют характер лучевого поражения клеток. Так, замораживание в равной мере предотвращает снижение уровня свободных радикалов и развитие лучевого поражения. При помещении клеток после облучения в атмосферу чистого кислорода наблюдают быстрое исчезновение радикалов и более глубокое, чем в обычных условиях, лучевое поражение. Аналогичное действие оказывает высокая температура. По-видимому, в обоих случаях быстрое исчезновение числа свободных ра-

дикалов связано с образованием стабильных поврежденных молекул, приводящих к развитию биологического поражения. Интересные данные получены при обработке облученных клеток сероводородом: число свободных радикалов быстро снижалось, однако биологическое поражение было выражено значительно слабее, чем у контрольных клеток. Вероятно, в присутствии сероводорода исчезновение свободнорадикальных состояний приводит к образованию стабильных репарированных молекул за счет миграции энергии с биорадикала на молекулу SH_2 . Таким образом, с уменьшением числа свободных радикалов поражение облученной клетки либо усиливается, либо ослабляется. Однако сам факт модификации лучевого поражения воздействиями, изменяющими уровень свободных радикалов, свидетельствует о вкладе свободнорадикальных состояний в развитие биологического поражения облученных клеток.

Вклад диффундирующих продуктов радиолиза воды в эффект клеточной гибели можно продемонстрировать различными путями. Во многих исследованиях сопоставляли радиочувствительность высушенных или замороженных клеток с радиочувствительностью клеток, облученных во влажном состоянии. В первых двух случаях преобладает прямое действие радиации, а в последнем — прямое и опосредованное продуктами радиолиза воды. Как правило, сухие или замороженные клетки в 2—3 раза устойчивее к действию радиации. Этот результат указывает на роль диффундирующих радикалов воды в поражении внутриклеточных структур, определяющих чувствительность клетки к радиационному воздействию. Были проведены прямые эксперименты по сопоставлению радиочувствительности макромолекул во влажных и обезвоженных клетках. Критерием радиочувствительности служила величина дозы, вызывающей инактивацию 63% макромолекул (D_{37}). Оказалось, что доза D_{37} для инактивации ряда ферментов значительно ниже во влажных клетках, чем в высушенных или замороженных. Например, активность алкогольдегидрогеназы во влажных дрожжевых клетках снижается до 37% от исходной величины в результате облучения в дозе 1,2 Мрад; в сухих клетках аналогичная степень инактивации наблюдалась после облучения в дозе 28 Мрад. Для инвертазы во влажных клетках доза D_{37} — 6 Мрад, а в замороженных — 12 Мрад. По-видимому, более эффективное поражение макромолекул во влажных клетках связано с действием активных продуктов радиолиза воды. Не все изученные ферменты поражаются в клетке радикалами воды. Например, β -галактозидаза и ацетилхолинэстераза в равной степени инактивировались во влажных, обезвоженных и замороженных клетках. Возможно, некоторые макромолекулы локализованы в клетках таким образом, что становятся недоступными для продуктов радиолиза воды. В связи с этим приобретает значительный интерес вопрос о возможном расстоянии диффузии радикалов воды от места возникновения до поражаемой структуры. Ес-

ли бы это расстояние было достаточно велико и приближалось к размерам клетки, то облучение любого участка клетки с равной эффективностью вызывало бы биологическое поражение, связанное с непрямым действием радикалов воды. Опыты Коула, проведенные в 1965 г., показывают, что радикалы воды (или другие реакционноспособные продукты), возникающие в цитоплазме, малоэффективны — пучки электронов вызвали репродуктивную гибель клетки только в том случае, если они достигали ядра. По-видимому, радикалы, возникающие в цитоплазме, не в состоянии атаковать ядро. Теоретическая оценка расстояния диффузии радикалов показывает, что наиболее вероятное значение этой величины — 3 нм. Следовательно, в не прямое действие радиации вовлекается водная оболочка, окружающая мишени, толщиной примерно в 10 молекул воды. Радикалы, образующиеся в более отдаленных участках клетки, возможно, инактивируются в различных реакциях до того, как достигнут мишени.

Возникновение стойких молекулярных повреждений выявлено в облученных клетках еще в середине 50-х гг. работами Хатчинсона, Полларда, Раевского и др. Радиочувствительность ряда молекул в изолированных сухих препаратах и высушенных клетках совпадала. Вероятно, эти молекулы инактивируются в клетке за счет прямого действия радиации. В опытах с коферментом А было показано, что в высушенных клетках он в 2,7 раза чувствительнее к облучению, чем в изолированном состоянии. Такой результат позволяет предположить наличие в клетке факторов, модифицирующих радиочувствительность молекул (высокая степень агрегации, адсорбция на поверхности субклеточных структур, образование комплексов и др.). В большом числе экспериментов сопоставляли радиочувствительность молекул во влажных и обезвоженных клетках. Во многих случаях обезвоживание приводило к повышению радиоустойчивости молекул. Этот эффект указывает на роль непрямого действия активных продуктов радиолитиза воды в инактивации молекул в клетке.

Основной вывод, который следует из опытов по изучению инактивации молекул в клетке, состоит в том, что значение инактивирующей дозы D_{37} варьирует от нескольких тысяч до миллиардов Гр. В то же время для большинства клеток летальная доза радиации — от 1 до 100 Гр. Следовательно, в летально облученной клетке доля инактивированных молекул чрезвычайно низка — около 0,001—0,1%. Если речь идет о ферментах, то 99,9—99,999% молекул, оставшихся непораженными, способны выполнять свои функции. Маловероятно, чтобы убыль такого незначительного числа катализаторов имела столь серьезные последствия для клетки. Возможно, повреждение небольшой доли уникальных структур, таких, как ядерная ДНК, действительно может привести клетку к гибели.

В облученных клетках выявлены структурные повреждения молекул ДНК, главным образом одонитевые и двухнитевые раз-

рывы полинуклеотидных цепей и повреждения азотистых оснований. Появление новых методов выделения ядерной ДНК позволило продемонстрировать возникновение одно- и двухнитевых разрывов после облучения клеток среднетлетальными дозами радиации.

О перекисном окислении липидов биологических мембран указано в большом числе работ. Показано, что в облученных клетках накапливаются продукты окисления, главным образом гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, способные поражать мембраносвязанные белки и вызывать деструктивные изменения в мембранах. В работах Ю. Б. Кудряшова и сотр. установлено, что накопление продуктов окисления липидов приводит к развитию лучевого токсического эффекта и sensibilizes клетки к действию радиации.

5. АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ КЛЕТОК

Исследование биологической реакции клеток на облучение, количественная характеристика лучевого поражения, изучение физико-химических процессов в облученной клетке — все эти исследования служат основой для построения общей теории, раскрывающей механизм действия ионизирующих излучений на живую клетку. Такая теория должна учитывать вероятностный характер проявления радиобиологических эффектов, возможность модификации лучевого поражения, основные этапы развития немногочисленных начальных молекулярных повреждений до видимых конечных биологических эффектов. Для объяснения перечисленных радиобиологических феноменов могут быть сформулированы следующие априорные предположения о механизмах поражающего действия радиации на клетку.

1. Существует уникальная структура — мишень, поражение которой вследствие поглощения энергии излучения однозначно приводит клетку к гибели. Вероятностный характер гибели клеток определяется вероятностью переноса энергии излучения к соответствующей мишени. Неодинаковая радиочувствительность клеток может объясняться различными геометрическими размерами или физико-химическими свойствами их критических мишеней. Модификация радиочувствительности связана с изменением устойчивости мишени к структурным повреждениям. Если предположить возможность миграции энергии к мишени извне, то модифицирующие агенты окажут влияние на механизмы миграции энергии, например, конкурируя за радикалы воды и липидов.

2. Существуют уникальные структуры — мишени, поражение которых само по себе не летально. Фатальные для клетки последствия возникают позднее, когда накопится достаточное количество дефектных продуктов цепи сопряженных биологических реак-

ций, протекающих с участием пораженных мишеней, например аномальных молекул, синтезированных на пораженных матрицах, избыточных продуктов метаболизма или токсических агентов, возникших за счет извращения работы ферментов. В этом случае будет проявляться эффект биологического усиления начального радиационного поражения мишеней.

Вероятность проявления биологического эффекта будет определяться вероятностью поражения мишени и вероятностью его усиления соответствующими процессами. Генетически детерминированные различия в радиочувствительности клеток могут опять-таки быть следствием неодинаковых геометрических размеров и физико-химических свойств мишеней и особенностей метаболизма клеток данного типа. Защита или сенсибилизация осуществляется здесь либо путем изменения радиоустойчивости мишени, либо модификацией процессов обмена веществ.

3. Гибель клетки не связана с повреждением уникальных мишеней энергией ионизирующей радиации, а происходит в результате дисперсного поражения, которое может развиваться за счет физико-химических механизмов усиления. Например, во множественных участках мембран излучение инициирует цепи перекисного окисления липидов. Развитие окислительных процессов принимает автокаталитический характер, происходит массовая деградация мембран и связанных с ней ферментативных ансамблей, нарушается ионный гомеостаз клетки, накапливаются токсические продукты, высвобождаются ферменты из мест специфической локализации и т. д. Такой механизм не исключает наличия в клетке уникальных мишеней, поражение которых имеет ведущее значение для жизнедеятельности, однако в отличие от первых двух гипотез предполагается не прямое, а опосредованное поражение этих критических структур. В этом случае вероятностный характер инактивации клеток объясняется вероятностью зарождения соответствующих физико-химических процессов усиления. Сигмоидальный характер кривых «доза — эффект» может соответствовать необходимости какого-то критического числа событий абсорбции энергии клеткой для развития физико-химических процессов усиления. Неодинаковую радиочувствительность различных типов клеток можно связать с генетически детерминированными особенностями строения, облегчающими или затрудняющими развитие физико-химических процессов усиления начального поражения, например неодинаковым уровнем естественных ингибиторов и активаторов перекисного окисления липидов биологических мембран. Повысить или понизить радиочувствительность клеток могли бы такие агенты, которые способны модифицировать развитие первичных физико-химических реакций.

4. Нельзя исключить и совместное проявление перечисленных выше механизмов. Относительный вклад каждого из них определяется условиями облучения, величиной поглощенной дозы, особенностями строения и метаболизма изучаемых клеток.

Высказанные выше соображения касались механизмов развития начального радиационного поражения. Последнее десятилетие ознаменовалось крупнейшим открытием не только для радиационной биологии, но и для молекулярной биологии в целом. Доказано существование ферментативных систем, способных репарировать начальные радиационные повреждения генетического аппарата клетки. Изучение биохимических механизмов репаративных процессов показало, что облученные клетки способны выплывать поврежденные азотистые основания, воссоединять разрывы полинуклеотидных цепей ДНК. Постепенно перед исследователями начинает развирываться сложная картина «борьбы» облученной клетки за выживание и сохранение нативных свойств путем активации репарирующих систем. Эти идеи привели к существенной трансформации представлений о характере действия ионизирующей радиации на клетку. Если на заре развития радиобиологии предпочтение отдавалось статичным моделям, которые рассматривали гибель клетки как результат простого поражения гипотетических субклеточных мишеней, то для современного периода характерен динамический подход, который в целом соответствует представлениям «динамической» биохимии и биофизики. Становится общепринятым рассмотрение радиобиологического эффекта как результата интерференции двух противоположно направленных процессов — развития начального радиационного поражения и его элиминации за счет функционирования репарирующих систем. Основываясь на этом, Хуг и Келлерер предложили в качестве общей теории действия ионизирующих излучений на клетку «стохастическую гипотезу». Она базируется на представлениях о том, что случайные и диффузно расположенные акты ионизации и возбуждения только в редких и маловероятных случаях однозначно приводят клетку к гибели. На эту «стохастическую первую очередь» должна накладываться «стохастика более высоких порядков», которая определяется динамической нестабильностью жизненных процессов, способных элиминировать или усиливать начальное радиационное повреждение. Разработанный авторами математический аппарат позволяет формально оценить вероятность перехода повреждения с одного уровня на следующий (развитие повреждения) или обратного перехода, связанного с восстановлением радиационного повреждения. Предложенные математические модели позволили Хугу и Келлереру получить семейство дозных кривых, хорошо согласующихся с наблюдаемыми в реальных экспериментах на клетках. Это послужило важным критерием применимости динамических моделей для объяснения радиобиологических феноменов.

Развитие современных представлений о механизмах лучевого поражения клеток свидетельствует о том, что в большинстве случаев затруднительна и мало оправдана прямая экстраполяция данных, полученных при облучении простых модельных систем (молекул, вирусов, субклеточных органоидов), на высокоорганизо-

ванную и активно метаболизирующую систему — живую клетку. Логика современного исследования требует планомерного поэтапного анализа механизмов действия излучения. Для этого необходимо уметь использовать всю совокупность радиобиологических данных, полученных на системах различного уровня сложности, и, сопоставляя их с реальными процессами, протекающими в облученной клетке, воссоздать последовательную картину, развертывающуюся в клетке, поглотившей энергию ионизирующих излучений.

Выявление принципиальных различий в реакции на облучение активно пролиферирующих и неделящихся клеточных популяций позволило раздельно исследовать механизмы их лучевого поражения. Эта проблема еще далека от разрешения. Имеющиеся экспериментальные данные пока позволяют лишь высказывать некоторые гипотезы о природе репродуктивной и интерфазной гибели клеток.

Репродуктивная гибель клеток

Быстро делящиеся клетки, включая культивируемые клетки млекопитающих, погибают после облучения средними дозами, обычно не превышающими 1000 рад. Появление гибнущих клеток задерживается до первого постлучевого митоза. Процессы клеточного деления как бы проявляют повреждения, нанесенные ионизирующим излучением. Роль митоза в гибели быстро делящихся клеток подтверждается следующими данными.

Погибшие клетки обнаруживаются в облученной популяции сразу же или вскоре после первого пострadiационного митотического пика, а также после второго, третьего и т. д. митозов. Условия, изменяющие время наступления митотического пика, влияют на время появления гибнущих клеток. Так, Глюксман и Спир облучали сетчатку головастика при 0,3° и в дальнейшем выдерживали при этой температуре. Клетки теряли митотическую активность, и не появлялось ни одной погибшей клетки. Перенесение ткани в комнатную температуру восстанавливало митотическую активность, и одновременно с митотическим пиком появлялись гибнущие клетки.

Таким образом, облученные быстро делящиеся клетки вплоть до первого митоза сохраняют метаболическую активность, заканчивают подготовку к делению, но не в состоянии продуцировать жизнеспособное потомство, которое могло бы делиться далее.

До настоящего времени нет единства мнений по вопросу о том, какие клеточные механизмы лежат в основе репродуктивной гибели. Наиболее распространенной является гипотеза, связывающая этот тип гибели с возникновением хромосомных aberrаций. Предполагается, что начальное радиационное поражение ДНК проявляется как хромосомная aberrация только в том случае, если

клетка проходит митоз, а некоторые хромосомные aberrации оказываются летальными для клеток.

В пользу такого предположения свидетельствует корреляция между радиочувствительностью клеток, их плоидностью и содержанием ДНК. Доза, необходимая для возникновения одной визуально наблюдаемой хромосомной aberrации, — величина того же порядка, что и доза для летального поражения. Факторы, модифицирующие выход хромосомных aberrаций, сенсibiliзируют клетки как к летальному действию радиации, так и к появлению хромосомных aberrаций. И наконец, среди выживших после облучения быстросредящихся клеток редко обнаруживаются клетки с хромосомными aberrациями — большинство aberrантных клеток погибает или во время первого постлучевого митоза или после него.

Если действительно причиной репродуктивной гибели служат индуцируемые излучением хромосомные aberrации, то необходимо воссоздать физико-химическую последовательность процессов, приводящих к появлению aberrаций, и на основании этой картины объяснить экспериментально установленные временные, дозовые или иные закономерности этого типа гибели, а также объяснить эффекты модифицирующих агентов.

Молекулярные процессы, лежащие в основе гибели клеток

Выяснение молекулярных механизмов репродуктивной гибели клеток началось в 30-е гг. Последующие 40 лет интенсивных исследований с использованием всех возможных цитологических, биохимических и биофизических методов анализа позволили получить важные доказательства в пользу того, что молекула ДНК служит мишенью радиационного поражения и возникающие в ней повреждения оказываются определяющими в репродуктивной гибели клеток. Ниже будут рассмотрены наиболее убедительные данные, подтверждающие это предположение.

Мишень, ответственная за гибель клеток, локализована в клеточном ядре. Об этом свидетельствуют эксперименты с микропучками ионизирующего излучения, сечение которых менее 10 мкм, облучение клеток электронами с ограниченной проникающей способностью, облучение изотопами, инкорпорированными в ядро или цитоплазму, раздельное облучение ядра и цитоплазмы с последующей трансплантацией облученных органоидов. Приведем некоторые результаты такого рода экспериментов.

Ульрих облучал яйца беспозвоночных микропучками рентгеновского излучения — для достижения летального эффекта достаточно было облучить ядро дозой в 500—950 Р, такой же эффект достигался при облучении цитоплазмы в дозе 90 000—140 000 Р.

В работах Орда и Даниелли раздельно облучали ядра, выделенные из амёбы, и безъядерную цитоплазму. После облучения

ядро пересаживали в необлученную цитоплазму и, наоборот, необлученное ядро подсаживали в облученную цитоплазму. Затем определяли выживаемость простейших. Значение LD_{50} для клеток с облученным ядром и необлученной цитоплазмой в два раза меньше, чем для клеток, в которых облучена была лишь цитоплазма.

Существует корреляция между содержанием ДНК и радиочувствительностью клеток. По данным Каплан и Мозес, логарифм числа нуклеотидов на геном линейно связан с логарифмом дозы D_{37} .

В летально пораженных клетках выявляются различные типы повреждений молекул ДНК. Выявление радиационных повреждений ДНК сразу же после облучения стало возможным благодаря развитию современных методов биохимии, например метода ультрацентрифугирования лизированных клеток в градиенте плотности. Показано, что при облучении в дозе D_0 на клетку приходится от 500 до 900 однонитевых разрывов полинуклеотидной цепи ДНК и около 60 двойных разрывов. На некоторых клеточных линиях показано, что факторы, модифицирующие репродуктивную гибель клеток, изменяют выход одно- и двухнитевых разрывов ДНК.

Прямые доказательства летальности разрывов, возникающих в ДНК, были получены в опытах с радиоактивными предшественниками тимина и других азотистых оснований. Их включение в ДНК приводит в дальнейшем к появлению одно- и двухнитевых разрывов и, как следствие, к репродуктивной гибели клеток.

Воздействия, увеличивающие активность систем, репарирующих повреждения ДНК, повышают выживаемость летально облученных клеток. На различных типах клеток показано, что активация системы репарации ДНК повышает выживаемость. Напротив, ингибирование систем, воссоединяющих разрывы ДНК или репарирующих другие типы повреждений, сенситизирует клетку к действию радиации.

Интерфазная гибель клеток

Различные типы клеток, по-видимому, получают сходные начальные повреждения при действии сравнимых доз излучения, однако характер их гибели существенно различается. Клетки с высокой пролиферативной активностью гибнут после пострadiaционного митоза. От момента облучения до деления их метаболическая активность сохраняется.

Медленно делящиеся клетки, клетки с ограниченной способностью к делению или неделящиеся клетки гибнут вскоре после облучения (в первые несколько часов или же в первые сутки), и их гибель не связана с процессами клеточного деления — она

происходит в интерфазе. Важность изучения интерфазной гибели для радиобиологии объясняется той ролью, которую играет этот тип гибели в радиационном поражении млекопитающих. Лимфопения, инволюция органов, богатых лимфоидными элементами, гибель стволовых клеток костного мозга и эпителия крипт кишечника, поражение центральной нервной системы и другие проявления лучевой болезни возникают вследствие интерфазной гибели соответствующих типов клеток.

Погибшие клетки выявляют на основании окрашиваемости специальными красителями (погибшие клетки теряют способность выводить эритрозин В), поглощения ^{51}Cr , потребления кислорода, появления пикнозов ядер, подсчета ядродержащих элементов и др. В зависимости от используемого метода тестируются различные этапы гибели клеток. Поэтому время появления погибших клеток, оцениваемое различными методами, может существенно отличаться.

Зависимость гибели от времени, прошедшего с момента облучения, подробно изучена в опытах с лимфоцитами и тимоцитами. Большая часть клеток в популяции гибнет в первые 2—3 ч после облучения, доля погибших клеток увеличивается со временем, т. е. одни облученные клетки погибают раньше других. Причины гетерогенности клеточной популяции по радиочувствительности неизвестны. Не исключено, что неодинаковая радиочувствительность связана с различным размером и возрастом, а значит, степенью дифференцировки тимоцитов и лимфоцитов.

Зависимость от дозы облучения интерфазной гибели отличается от дозовой зависимости репродуктивной гибели. Для быстроделющихся клеток характерны сигмоидальные кривые «доза — эффект». В случае интерфазной гибели отмечают резкий излом кривых при переходе от малых к высоким дозам облучения: в области малых доз (вплоть до нескольких сотен рад) **выживаемость резко падает** с ростом дозы; в области больших доз с увеличением дозы облучения выживаемость уменьшается значительно медленнее.

Биохимические изменения в гибнущих клетках отражены в табл. V—1. Их принято разделять на три группы: изменения, связанные с механизмом образования АТФ; эффекты, обусловленные нарушением проницаемости мембран; биохимические изменения, связанные с дезорганизацией ядерных структур.

Наблюдаемые биохимические изменения представляют собой конечные звенья сложной цепи процессов, протекающих с того момента, как клетка получила начальное радиационное повреждение. До настоящего времени окончательно не установлена природа физико-химических процессов, приводящих к биохимическим и морфологическим изменениям и в конечном счете к интерфазной гибели облученных клеток. Для решения этой проблемы необходимо выявить ведущие биохимические изменения, определяющие интерфазную гибель, исследовать физико-химические механизмы, лежащие в основе этой группы эффектов.

Таблица V-1

Биохимические изменения в типочитах in vivo и in vitro после облучения в дозах 5—10 Гр.

(по Окада, 1974)

Время после облучения, час	Биохимические изменения	Тип изменений*
0—1	Выход клеточного и ядерного калия Уменьшение клеточного и ядерного НАД Увеличение вязкости белка ДНП Выход гистонов из ядра Уменьшение ядерного фосфорилирования Увеличение числа ядерных групп «SH» Увеличение ядерного синтеза белка Увеличение экстрагируемой или растворимой ДНК Уменьшение вязкости ДНК Уменьшение лабильного фосфата или АТФ в клетках и ядре Уменьшение окислительного фосфорилирования в митохондриях Увеличение образования лактата Появление пикнотических ядер	б, в б, в в а, в а, в в в б, в в а, б, в а а в
1—2	Уменьшение ядерного синтеза белка Уменьшение внутриклеточных рибонуклеозидов Уменьшение внутриклеточных дезоксирибонуклеозидов Уменьшение внутриклеточных ферментов и ядерных ферментов Потеря способности выводить из клеток эритрозин В (окрашиваемость эритрозином В)	в б, в б, в б, в б
2—4	Снижение скорости потребления кислорода	б

* Типы изменений по группам: а — биохимические изменения, связанные с образованием АТФ; б — биохимические изменения, связанные с проницаемостью мембран; в — биохимические изменения, связанные с дезорганизацией ядра.

В радиобиологической литературе до сих пор нет единства мнений относительно того, какие из биохимических изменений определяют интерфазную гибель клеток, а какие являются вторичными, опосредованными.

Нарушение синтеза АТФ относится к числу ранних регистрируемых биохимических изменений в облученных клетках. В принципе, вызванное облучением нарушение энергоснабжения клетки может служить первопричиной ее гибели. В работах Ван Беккума, Поттера и др., выполненных в начале 50-х гг., было показано нарушение окислительного фосфорилирования в митохондриях селезенки, печени и других органов облученных животных. Однако на основании того, что самые ранние регистрируемые изменения в митохондриях отмечали одновременно с появлением мертвых клеток (около 2 ч после облучения), Ван Беккум пришел к выводу о том, что нарушение окислительного фосфорилирования скорее следствие, чем причина гибели клеток. В работах Кризи и Стоке-

на, Е. Ф. Клоуэна и др. было отмечено нарушение фосфорилирования в ядрах клеток тимуса и селезенки после облучения малыми дозами. В пользу ведущей роли подавления ядерного фосфорилирования в интерфазной гибели клеток обычно приводят два доказательства: 1) ядерное фосфорилирование подавляется в радиочувствительных тканях (тимус, селезенка) и практически не изменяется в тканях, высокоустойчивых к облучению; 2) нарушение ядерного фосфорилирования в результате облучения обнаруживается ранее других биохимических изменений, характерных для интерфазной гибели. Этой гипотезе противоречат данные Мейерса и ряда других авторов, полученные в опытах с динитрофенолом и другими ингибиторами ядерного фосфорилирования, — изученные агенты не ускоряли гибель тимоцитов. По мнению Бетеля, подавление ядерного фосфорилирования — косвенная реакция, происходящая вследствие вызванного облучением снижения содержания нуклеотидов — субстратов синтеза АТФ.

Изменение проницаемости клеточных мембран. Облучение вызывает нарушение проницаемости ядерной мембраны (наблюдается выход из ядра K^+ , гистонов и ряда ферментов), митохондриальной мембраны (подавляется окислительное фосфорилирование), цитоплазматической мембраны (падает концентрация внутриклеточного K^+ , нуклеозидов, поглощается краситель — эритрозин В).

В настоящее время все большее число исследователей склоняются к мысли о том, что нарушение проницаемости мембран может служить ведущей причиной интерфазной гибели клеток. Одна из наиболее ранних гипотез такого рода принадлежит Баку и Александеру (1955). По мнению этих авторов, вследствие радиационного поражения клеточных мембран происходит высвобождение ферментов из мест специфической локализации, что и приводит к гибели клетки. В пользу гипотезы «высвобождения ферментов» свидетельствует индуцированный радиацией переход ДНКазы II из лизосом в цитоплазму, переход лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из ядра в цитоплазму, выход из митохондрий каталазы и АТФазы. Все эти изменения локализации ферментов отмечены в ранние сроки после облучения, однако их роль в интерфазной гибели все еще не установлена. В работах А. Г. Пасынского указывается на ведущую роль радиационного нарушения проницаемости внутриклеточных мембран в изменении стационарного состояния клетки, в пространственной и временной организации обменных процессов.

В последние годы предложены гипотезы, согласно которым вызванная облучением интерфазная гибель клеток — это одно из проявлений неспецифической реакции клеточных систем на повреждающие воздействия. Л. Х. Эйбус рассматривает интерфазную гибель как необратимую стадию такой неспецифической реакции, в основе которой лежит нарушение компартментализации внутриклеточных низкомолекулярных субстратов, обусловленное

повреждением мембранных структур и связанных с ними механизмов активного транспорта и диффузии. Это соответствует представлениям о ведущей роли внутриклеточных мембран в лучевом поражении клеток, развитым А. М. Кузиным в «структурно-метаболической гипотезе».



Рис. V—4. Радиационно-биохимические механизмы интерфазной и репродуктивной гибели (по Мазурику, 1979)

К. П. Хансон и В. Е. Комар предложили генетическую гипотезу интерфазной гибели лимфоцитов, предполагающую наличие в этих клетках «программы гибели», сигналом к реализации которой могут быть повреждения, нанесенные различными агентами — стероидными гормонами, алкилирующими соединениями, ионизирующей радиацией. В пользу такого предположения свидетельствует сходство ранних метаболических ответов при действии различных повреждающих агентов и общей картины интерфазной гибели. Авторы предполагают, что в лимфоцитах имеется эволюционно запрограммированная система биохимических реакций, специально направленная на реализацию последовательности событий, фенотипическим проявлением которых является интерфаз-

ная гибель. Однако распространение этих представлений на другие типы клеток пока преждевременно.

Завершая рассмотрение механизмов лучевого поражения клеток, приведем общую схему этого процесса (рис. V—4), предложенную В. К. Мазуриком.

6. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОТ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ

Среди радиобиологов довольно давно сложилось представление о том, что организмы способны избавляться по крайней мере от части нанесенных им радиационных повреждений. На это указывали следующие эксперименты. Гибель организмов, задержка деления, различные морфологические и биохимические эффекты облучения некоторой дозой радиации уменьшаются, если эта доза сообщается в виде отдельных фракций с достаточным промежутком времени между ними. Возможно, перерыв между отдельными фракциями облучения используется для ликвидации ряда повреждений. Аналогичное уменьшение лучевого поражения наблюдают и в том случае, когда данную дозу радиации сообщают объекту в течение длительного времени, т. е. при малой мощности дозы. Этот эффект можно объяснить тем, что решающей оказывается скорость нанесения повреждений. Если она соизмерима со скоростью и эффективностью работы восстановительных систем, то организм окажется в состоянии исправлять возникающие повреждения, не допуская их реализации. Группа фактов связана с различными воздействиями на уже облученные биологические объекты. Варьируя состав питательной среды, освещенность, температуру во время инкубации, газовый состав атмосферы и другие факторы, удается значительно снизить поражающее действие радиации. Ни один из этих факторов не в состоянии повлиять на степень начального радиационного повреждения, поэтому естественным выглядит предположение о том, что в данном случае создаются оптимальные условия для протекания восстановительных процессов.

Согласно принятому определению, восстановление — это процесс ликвидации явного или скрытого повреждения. При явном повреждении восстановление заключается в возврате исходных свойств объекта после периода, в течение которого они вследствие облучения были изменены. При скрытом повреждении восстановление состоит в утрате способности к реализации повреждения.

Пострадиационное восстановление можно рассматривать на различных уровнях анализа — молекулярном, клеточном и популяционном. При этом причинная связь между тремя уровнями восстановления далеко не всегда очевидна.

Основные характеристики процесса восстановления клеток от летального радиационного повреждения были изучены в начале

60-х гг. благодаря использованию метода культивирования одноклеточных клеток млекопитающих. Этот метод позволил проводить количественные радиобиологические эксперименты на клетках млекопитающих с такими же точными результатами, какие ранее получали только на бактериях, вирусах и фагах. Одно из наиболее подробных исследований в этом направлении было проведено Элкингом и Саттон на клетках китайского хомячка. Когда популяцию клеток облучали однократно, например в дозах 9,92, 5,05 или 4,87 Гр, выживало соответственно 0,186, 8,2 и 9,5% клеток. Рассмотрим результат облучения в дозе 5,05 Гр. Летально поврежденными оказались 91,8% клеток и только 8,2% либо не повреждены, либо несут сублетальные повреждения, которые могут проявиться при последующем облучении. Если эту же популяцию клеток после облучения в дозе 5,05 Гр повторно облучить в дозе 4,87 Гр, то возможна одна из трех ситуаций: 1) репарация летального и сублетального повреждений завершится к моменту повторного облучения; предполагаемая выживаемость будет равняться 9,5%; 2) сублетальные повреждения будут полностью восстановлены, а летальные сохранятся; предполагаемая выживаемость составит $0,082 \times 0,095 = 0,0078$ (0,78%); 3) ни одно из повреждений не будет репарироваться и выживаемость двукратно облученной популяции не будет отличаться, от выживаемости в случае однократного облучения в дозе 9,92 Гр, т. е. составит 0,186%. В конкретных условиях эксперимента наблюдаемая в действительности выживаемость изменялась от 0,186 до 0,78%, находясь при этом в зависимости от интервала времени между двумя облучениями. Наибольшая выживаемость наблюдалась в том случае, когда интервал между облучениями превышал 10 ч. Это означает, что клетки, имеющие сублетальные повреждения (о них свидетельствует «плечо» на кривой «доза-эффект»), успевают к моменту повторного радиационного воздействия полностью завершить восстановление и, следовательно, не погибают от добавочного сублетального повреждения, нанесенного второй дозой радиации. Таким образом, полученные данные позволили их авторам заключить, что клетки млекопитающих способны ликвидировать сублетальные подпороговые повреждения, нанесенные ионизирующим излучением.

Для выяснения природы восстановления сублетальных повреждений изучали влияние различных модифицирующих факторов на этот процесс. Увеличение ЛПЭ-излучения, облучение в условиях аноксии или использование клеток малой ploидности приводило к снижению до минимума начального восстановления. По-видимому, в этих случаях образуется крайне мало сублетальных повреждений (сужается «плечо» на кривой «доза — эффект») и большее число летальных. Использование различных ингибиторов и активаторов не позволило выявить роль синтеза ДНК или белков, окислительного фосфорилирования или дыхания в этом процессе. Анализ температурной зависимости указывает на участие фермен-

тов в восстановлении сублетальных повреждений. Способность актиномицина *D* в низких концентрациях подавлять восстановление позволило Элкинду и соавторам высказать гипотезу, согласно которой связывание антибиотика молекулой ДНК препятствует процессу восстановления либо за счет перевода репарированной ДНК в функционально неактивное состояние, либо ингибируя образование комплекса ДНК-РНК-белок. В настоящее время все еще не выяснена ни природа сублетального повреждения, ни молекулярный механизм его восстановления.

Одна из разновидностей процесса восстановления была обнаружена в экспериментах с клетками млекопитающих, которые после облучения подвергали воздействию различных химических и физических агентов. Филипс и Толмач в 1966 г. провели наблюдения над облученными клетками HeLa, к которым через различные сроки после однократного облучения добавляли оксимочевину. Оказалось, что этот препарат увеличивает летальное поражение клеток, если его добавлять сразу же после облучения. Удлинение интервала времени между радиационным воздействием и добавлением оксимочевины до 6 ч полностью предотвращало гибель облученных клеток, вызванную оксимочевинной. Следовательно, за этот период потенциально летальные повреждения, чувствительные к оксимочевине, перешли в состояние, нечувствительное к этому химическому агенту. Так как используемые концентрации оксимочевины вообще не влияли на необлученные клетки, то наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что в результате облучения в клетках индуцировались сублетальные повреждения, для перехода которых в летальные требуется дополнительное воздействие оксимочевинной. За счет функционирования репаративных систем эти повреждения могут быть восстановлены, однако для этого требуется определенный интервал времени, как показали дальнейшие опыты, активный синтез ДНК и белков. Напомним, что описанный Элкиндом и Саттон тип восстановления не зависел от синтеза ДНК и белков.

Аналогичные результаты на клетках китайского хомячка были получены с использованием актиномицина *D*, который увеличивает гибель облученных клеток, переводя сублетальные повреждения в летальные (уменьшает «плечо» на кривой выживаемости). Если между облучением и добавлением актиномицина *D* проходит 2—8 ч, то способность антибиотика увеличивать летальное поражение резко падает. Это означает, что восстановительные системы клетки переводят сублетальные повреждения, чувствительные к актиномицину *D*, в нечувствительное состояние. По ряду признаков последний эффект имеет много общего с восстановлением, описанным Элкиндом и Саттон, но отличается от репарации потенциально летальных повреждений, реализуемых оксимочевинной.

Одним из наиболее вероятных механизмов, определяющих способность клетки избавляться от сублетальных повреждений, может быть процесс репарации радиационных нарушений струк-

туры ДНК. Во-первых, уникальность текста, записанного в ДНК, и его значение для клетки совершенно исключают замещение пораженных облучением молекул вновь синтезированными. Во-вторых, сама структура ДНК позволяет проводить работы по исправлению генетического текста, так как он присутствует в двух комплементарных копиях.

Репарация повреждений в облученной ДНК

На существование репарации ДНК впервые обратили внимание при анализе летального действия ультрафиолетового излучения на бактерии. Еще в 1928 г. было показано, что наибольшей эффективностью обладают кванты с длиной волны 260 нм, которые избирательно поглощаются азотистыми основаниями ДНК. Возникло предположение о том, что мишенью для летального действия ультрафиолета служит бактериальная ДНК. Обосновать это предположение удалось лишь после открытия роли ДНК в наследственности, так как стало очевидным, что для клеток окажется губительным фотохимическое повреждение генетических структур. В 1960 г. были выявлены фотохимические повреждения ДНК, ответственные за летальное действие ультрафиолета. Ими оказались димеры тимина, возникающие в результате связывания двух соседних оснований одной полинуклеотидной цепи. Появление димеров приводит к локальному нарушению вторичной структуры ДНК и подавлению активности того гена, в котором произошла димеризация.

Было показано, что вероятность летального действия данной дозы ультрафиолета зависит от условий, в которых выдерживают облученные клетки (освещение, состав питательной среды и т. д.). Так как эти факторы не влияли на первичные фотохимические повреждения, заключили, что бактерии способны репарировать некоторые из фотохимических повреждений ДНК, а летальны те повреждения, которые не репарируются.

Значительный прогресс в этой области исследований был достигнут благодаря открытию мутантов, дефектных по репарации ДНК. Было обнаружено, что мутации в любом из трех генов *uvr A*, *uvr B* и *uvr C* у *E. coli* значительно повышают чувствительность бактерий к действию ультрафиолетового излучения. Эти гены расположены в трех далеко отстоящих друг от друга участках генетической карты; вероятно, нормальный продукт, кодируемый ими, участвует в процессе репарации.

Природу одного из молекулярных процессов репарации ДНК открыл в 1964 г. Сетлоу с соавторами. Опыты проводились с нормальными и мутантными бактериями, ДНК которых предварительно метилась ^3H -тимидином. Оба типа клеток получали равную дозу ультрафиолета, после чего изучалось количество ^3H -тиминовых димеров в клеточных экстрактах. Полученные результаты показали, что в обоих экстрактах содержится одинаковое коли-

чество тиминовых димеров в расчете на клетку. Однако в чувствительном к ультрафиолету штамме все тиминовые димеры оказались в составе высокомолекулярной фракции, т. е. структурно целостной ДНК; в нормальном штамме тиминовые димеры обнаруживались в составе коротких фрагментов, состоящих не более чем из шести нуклеотидов. Отсюда авторы заключили, что как нормальные, так и мутантные штаммы получили одинаковое число начальных фотохимических повреждений, однако нормальные клетки *E. coli* обладают ферментативной системой, которая вырезает тиминовые димеры из облученных полинуклеотидных тяжей, заменяя их нормальными тиминовыми нуклеотидами. Пониженная выживаемость мутантных клеток, по-видимому, связана с отсутствием активного фермента, необходимого для вырезания (эксцизии) димеров тимина. В дальнейшем было показано, что в рассматриваемом процессе участвует эндонуклеаза, вызывающая одноцепочечные разрывы в ДНК с УФ-повреждениями. Эта эндонуклеаза имеется в нормальных штаммах *E. coli* и в мутантах по гену *uvr C*, но отсутствует в мутантах по генам *uvr A* и *uvr B*. Из этого можно заключить, что гены *uvr A* и *uvr B* кодируют разные субъединицы УФ-репарирующей эндонуклеазы.

Вслед за вырезанием тиминовых димеров и окружающих их нуклеотидов начинается репарационная репликация. Ее существование было доказано в экспериментах с бактериями, которых после облучения ультрафиолетом инкубировали в присутствии радиоактивного бромурацила. Накопление радиоактивной метки свидетельствовало о включении в облученные клетки бромурацила, который используется при репликации ДНК вместо тимина. Однако в облученных бактериях происходила не обычная репликация, протекающая только в двух репликационных Y-вилках, а репарационная, сопровождающаяся включением бромурацила во многих различных точках генома. Об этом говорит измерение плотности ДНК при равновесном центрифугировании в CsCl. Бромурацил плотнее тимина, поэтому при обычной репликации возникала бы «тяжелая» нить ДНК. Однако ее присутствия опыты не показали. Весь бромурацил содержался в «легких» цепях ДНК. Следовательно, его включение происходит в коротких полинуклеотидных участках, окруженных длинными нереплицировавшимися полинуклеотидными последовательностями, так что плотность ДНК заметно не изменилась.

В дальнейшем были изучены ферментативные механизмы рассматриваемого типа репарации ДНК. Согласно схеме, предложенной Говард-Фландерсом, одна или несколько молекул фермента, кодируемого генами *uvr A* и *uvr B*, постоянно «обегает» кольцевой бактериальный геном, «выискивая» в двойной спирали ДНК структурные нарушения. Когда такой фермент сталкивается с повреждением ДНК, обусловленным появлением тиминовых димеров, он вызывает два разрыва в полинуклеотидной цепи. В результате происходит эксцизия тиминового димера вместе с несколькими со-

седними нуклеотидами. Другой вариант состоит в том, что фермент вызывает лишь один разрыв с 5'-стороны повреждения, что позволяет ДНК-полимеразе I вырезать поврежденный участок под действием своей 5'-3'-эксонуклеазной активности. Образующаяся брешь заполняется под действием репарирующей ДНК-полимеразы I, добавляющей нуклеотиды к 3'-ОН-концу старой полинуклеотидной цепи, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь ДНК, в которой нет УФ-повреждений. Завершается процесс восстановления двойной спирали образованием с помощью ДНК-лигазы фосфодиэфирной связи между 3'-ОН-концом последнего нуклеотида, включенного при репарационной репликации, и 5'-концом старой полинуклеотидной цепи.

Помимо рассмотренного механизма, названного «выщепление — замещение», у бактерий обнаружен и принципиально иной путь репарации УФ-повреждений. В 1950 г. Дулбеко наблюдал резкое возрастание способности *E. coli* репарировать повреждения Т-четных фагов, если зараженные этим фагом бактерии после УФ-облучения осветить сильной вспышкой видимого света. Оказалось, что у *E. coli* имеется фотореактивирующий фермент, детерминированный геном *phg*. Этот фермент при воздействии светом с длиной волны 300—500 нм осуществляет прямое превращение тиминовых димеров в нормальные основания без эксцизии.

Еще один механизм репарации УФ-повреждений был расшифрован с помощью *Res⁻*-мутантов *E. coli*, открытых Кларком в 1965 г. Эти мутанты обладали способностью к эксцизионной репарации тиминовых димеров и тем не менее оказались необыкновенно чувствительными к УФ-облучению. Помимо высокой чувствительности к ультрафиолету *Res⁻*-мутанты неспособны к генетической рекомбинации ни при конъюгации, ни при трансдукции. Связь между репарацией повреждений ДНК и генетической рекомбинацией была установлена в работах Говард-Фландерса, доказавшего, что кроме механизма «выщепления — замещения» в бактериальной клетке существуют возможности исправления дефектной дочерней ДНК, образующейся при репликации нерепарированной облученной родительской ДНК. Первая после облучения ДНК-копия образуется в форме полинуклеотидной цепи с разрывами. Брешь возникает в дочерней цепи напротив тиминового димера матричной родительской цепи в результате препятствия для продвижения ДНК-полимеразы. Однако всего через 1 ч после синтеза таких разорванных цепей в клетке обнаруживаются непрерывные цепи ДНК нормальной длины. Бреши заполняются в результате пострепликативной репарации, осуществляемой за счет генетической рекомбинации между комплементарными сестринскими нитями, несущими разрывы. Из этого следует, что как отсутствие способности к генетической рекомбинации, так и высокая чувствительность к ультрафиолету у мутантов *Res⁻* обусловлены дефектом системы, отвечающей за рекомбинационные события.

По-видимому, все возможные пути репарации УФ-повреждений бактериальной ДНК исчерпываются процессами, контролируемые генами *uvr*, *hcs* и фотореактивацией. В отсутствие видимого света двойные мутанты по генам *uvr* и *hcs* погибают в результате возникновения в их геноме всего одного тиминового димера.

Расшифровка молекулярных механизмов репарации УФ-повреждений бактериальной ДНК существенно расширила представления о функционировании генома и показала, что в клетке существуют генетически детерминированные системы ферментов, поддерживающие целостность генетической информации и, если надо, исправляющие ее. В дальнейшем было доказано, что в общих чертах сходная система существует в клетках млекопитающих. Благодаря активности репаративной системы клетки способны поддерживать целостность генома в случае повреждений, наносимых не только УФ-излучением, но и ионизирующей радиацией, канцерогенами и мутагенами.

Облучение клеток млекопитающих ионизирующей радиацией приводит к появлению в ДНК сложного спектра первичных повреждений, который обычно делят на три группы: 1) модификации и потери азотистых оснований, на долю которых приходится основное количество повреждений ДНК; 2) одонитевые разрывы полинуклеотидных цепей, которых образуется в 2,0—2,5 раза меньше, и двунитевые разрывы, возникающие еще примерно в 10 раз реже; 3) нарушение вторичной структуры и надмолекулярной организации ДНК, вклад которых в общую картину повреждений пока еще мало изучен.

В последние десять лет были проведены интенсивные исследования механизмов репарации повреждений ДНК, вызванных ионизирующей радиацией. Эти работы вызвали большой интерес не только среди радиобиологов, но и среди генетиков, молекулярных биологов, биохимиков. Накоплен обширный экспериментальный материал, зачастую противоречивый и нуждающийся в дальнейшем уточнении.

В настоящее время не вызывает сомнения наличие в клетках млекопитающих эффективных систем дорепликативной репарации, участвующих в воссоединении одонитевых и двунитевых разрывов. В зависимости от природы концевых участков в месте разрыва в процесс вовлекаются различные ферментативные системы: ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, эндо- и экзонуклеазы. Пробелы, возникающие в полинуклеотидной цепи вследствие освобождения нуклеозидов из ДНК, восстанавливаются за счет системы эксцизионной репарации, подобной (хотя и менее эффективной) темновой репарации УФ-повреждений у бактерий.

Сравнительно недавно, в 1975 г., была описана пострепликативная репарация в клетках китайского хомячка, облученных ионизирующей радиацией. Как и в случае УФ-поврежденных клеток, новообразованная ДНК синтезируется в виде коротких фрагментов, а затем происходит заделывание брешей в пострепликатив-

ный период либо за счет синтеза *de novo*, либо путем рекомбинационных обменов между сестринскими дуплексами. Как отмечают В. Е. Комар и К. П. Хансон (1980), пострепликативную репарацию следует скорее рассматривать не как истинное восстановление, а как преодоление повреждений, обеспечивающее клетке сохранение жизнеспособности, несмотря на наличие дефектов в ДНК; сохранение измененной структуры ДНК в поколениях клеток может лежать в основе отдаленных последствий облучения — канцерогенеза и мутагенеза.

Механизмам репарации принадлежит важнейшая роль в поддержании нативной структуры ДНК как в ходе нормальной жизнедеятельности, так и при действии различных повреждающих агентов, в том числе ионизирующего излучения. От эффективности репаративных систем во многом зависит восстановление, наблюдаемое на клеточном уровне, однако точный вклад исправления дефектов структуры ДНК в общую картину радиационного поражения и в судьбу облученной клетки пока еще не установлен. Расшифровка молекулярных механизмов репарации ДНК в клетках млекопитающих позволила бы активно вмешиваться в этот процесс, селективно изменять радиочувствительность клеток и, возможно, многоклеточных организмов. Не исключено также, что различная природная радиочувствительность клеток и организмов связана не только с эффективностью репаративных систем, но и с их уязвимостью для радиационного воздействия.

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ЦЕЛОСТНЫЙ ОРГАНИЗМ

Материал этой главы в основном посвящен действию радиации на животные организмы, прежде всего на млекопитающих. Связано это с тем, что млекопитающие наиболее подробно изучены в радиобиологических экспериментах и, кроме того, полученные на них результаты можно экстраполировать на организм человека, что способствует решению одной из важнейших практических задач радиобиологии — разработке эффективных средств защиты от лучевого поражения.

Для выявления механизмов действия радиации на многоклеточные организмы большое значение имеют исследования на клеточном и субклеточном уровне. Репродуктивная и интерфазная гибель клеток лежит в основе дегенерации и атрофии различных органов и тканей. Поражение субклеточных структур и нарушение обмена веществ в отдельных клетках оказывает выраженное влияние на функционирование целостного организма и поддержание его гомеостаза. В то же время очевидно, что реакция сложного организма на радиационное воздействие не сводится к простой сумме клеточных и субклеточных эффектов. Возникающие изменения взаимосвязаны, затрагивают весь организм как целое, могут опосредоваться за счет особых механизмов, присущих только таким сложным и высокоинтегрированным системам, какими являются многоклеточные организмы. В настоящее время, несмотря на обилие фактического материала, радиобиологией все еще не получен однозначный ответ на вопрос о ведущих механизмах поражающего действия радиации на отдельные клетки и тем более на многоклеточные организмы. Большинство современных исследований направлено на выявление причин генетически детерминированных различий в радиочувствительности организмов, на изучение механизмов модифицированной устойчивости биологических объектов к действию радиации, на расшифровку первичных и начальных физико-химических процессов, протекающих после облучения.

1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОРГАНИЗМОВ

Биологическая эффективность ионизирующих излучений необычайно высока. По глубине и силе воздействия на организмы ионизирующая радиация значительно превосходит все известные виды излучений. К такому выводу пришли еще в начале века, когда

впервые подвергали облучению различные виды животных, отдельные органы и ткани. В настоящее время можно с уверенностью заключить, что нет ни одного организма, который не мог бы быть убит ионизирующим излучением, нет такой жизненной функции, которая не подавлялась бы в результате радиационного воздействия.

Количественные эксперименты, начатые в 20-е гг. благодаря развитию методов дозиметрии, показали, что существуют глубокие различия в чувствительности различных организмов к действию радиации. Так, млекопитающие гибнут после облучения в дозе 1—10 Гр, а другие позвоночные — только после облучения в дозах, составляющих десятки и сотни грэй. Значительные вариации радиочувствительности были обнаружены как при переходе от одного таксона к другому, так и внутри каждой филогенетической группы (см. диаграмму на рис. VI—1). Наблюдаемые различия в устойчивости организмов к действию радиации невозможно объяснить какими-либо физическими особенностями поглощения энергии излучения их тканями. Как известно, эффективность поглощения определяется электронной плотностью поглотителя, а она примерно одинакова для всех тканей и организмов. Следовательно, объяснение следует искать не в физических, а в биологических особенностях объектов, в характере их структурной и функциональной организации, в адаптивных и регенераторных возможностях, в специфичности протекания начальных реакций усиления и репарации первичных радиационных повреждений, в интенсивности метаболических и пролиферативных процессов и в ряде других уникальных факторов, присущих только живому организму.

Рис. VI—1. Размах радиочувствительности (LD_{100}) у организмов, принадлежащих к различным филогенетическим группам: 1 — одноклеточные организмы; 2 — беспозвоночные; 3 — позвоночные; 4 — млекопитающие; 5 — человек

Оценить биологическую эффективность радиации на одной выбранной системе сравнительно легко. Для этого достаточно облучить орган, ткань или целостный организм в достаточно широком диапазоне доз и оценить величину дозы, при которой наблюдается исследуемый эффект. Гораздо сложнее сопоставлять радиочувствительность различных объектов. Такое сопоставление требует выбора надежных и адекватных биологических критериев, поддающихся строгой количественной интерпретации. Например, выбрав в качестве критерия поражающего действия радиации задержку клеточного деления, мы выявим значительную чувствительность активно пролиферирующих тканей и не обнаружим постлучевой реакции у неделящихся или медленно делящихся клеточных популяций. Выбор другого критерия — метаболической

Оценить биологическую эффективность радиации на одной выбранной системе сравнительно легко. Для этого достаточно облучить орган, ткань или целостный организм в достаточно широком диапазоне доз и оценить величину дозы, при которой наблюдается исследуемый эффект. Гораздо сложнее сопоставлять радиочувствительность различных объектов. Такое сопоставление требует выбора надежных и адекватных биологических критериев, поддающихся строгой количественной интерпретации. Например, выбрав в качестве критерия поражающего действия радиации задержку клеточного деления, мы выявим значительную чувствительность активно пролиферирующих тканей и не обнаружим постлучевой реакции у неделящихся или медленно делящихся клеточных популяций. Выбор другого критерия — метаболической

активности облученных тканей — мог бы привести к противоположному результату: ранние биохимические изменения часто обнаруживаются в тех клетках, которые казались высокоустойчивыми к облучению по критерию «задержки клеточного деления». Аналогичные трудности возникают при использовании морфологических и физиологических показателей для оценки степени радиочувствительности тканей и организмов.

В настоящее время термином «радиочувствительность» обозначают величину, обратную отношению доз ионизирующего излучения, вызывающих количественно равные эффекты одного типа в сравнимых биологических системах. Наряду с радиочувствительностью используют альтернативные понятия — «радиорезистентность» или «радиоустойчивость».

Наиболее распространенным интегральным показателем радиочувствительности, применимым к организмам различного уровня сложности, служит степень выживаемости (или другой показатель, однозначно связанный с выживаемостью). Чаще всего для этой цели используют летальную дозу, вызывающую гибель 50 или 100% особей в облученной популяции, так называемую дозу LD_{50} или LD_{100} соответственно. При определении радиочувствительности большинства млекопитающих ограничиваются определением выживаемости животных к 30-му дню после облучения. Этот срок выбран в связи с тем, что острый период лучевой болезни у млекопитающих обычно заканчивается в первый месяц после радиационного воздействия. Для других объектов временной интервал выбирают в соответствии со средней продолжительностью жизни облученных организмов.

В табл. VI—1 и VI—2 приведены данные различных авторов по определению величины LD_{50} у представителей различных филогенетических групп. Видно, что диапазон устойчивости к радиации в живой природе необычайно широк. Наиболее устойчивы к действию ионизирующих излучений микроорганизмы — дозы, способные вызвать их гибель, составляют сотни и тысячи грэй. Для беспозвоночных животных диапазон летальных доз обычно на порядок ниже; для позвоночных они составляют десятки грэй, а наиболее радиочувствительными являются млекопитающие. Таким образом, можно заключить, что по мере усложнения организации объектов их устойчивость к радиации резко снижается.

С генетически детерминированными различиями в радиочувствительности мы сталкиваемся не только при сопоставлении различных таксонов, но и при изучении родственных видов. Так, *Micrococcus radiodurans* может быть отнесен к «рекордсменам» радиоустойчивости — его обнаружили в воде, окружающей атомный реактор, где облучение достигает величин 10^4 — 10^5 Гр. В этих условиях бактерии сохраняли способность к размножению. В то же время родственная форма — *Micrococcus sodensis* — примерно в 25 раз менее устойчива к радиационному воздействию, а для многих штаммов *E. coli* величина дозы LD_{50} составляет около

Таблица VI-1

Ориентировочные значения LD_{50} при облучении некоторых биологических объектов (общее однократное облучение рентгеновскими или γ -лучами)

Объект	LD_{50} , Гр.
Вирусы	
полиомы	7000
табачной мозаики	4500
Бактерии	
<i>Micrococcus radiodurans</i>	7500
<i>B. mesentericus</i>	1500
<i>Micrococcus sodensis</i>	300
<i>E. coli</i>	50—100
Водоросли	
<i>Chroococcus</i>	1000
<i>Chlorella</i>	180
Высшие растения	10—1500
Беспозвоночные	
Простейшие амёбы	
<i>Diffugia</i>	2000
<i>Amoeba proteus</i>	1000
инфузории	
<i>Ophryoglena mucifera</i>	7000
<i>Ophryoglena atra</i>	5500
<i>Ophryoglena pectans</i>	4000
<i>Paramecium caudatum</i>	3000
Кишечнополостные	
<i>Anemontia sulcata</i>	2500
<i>Hydra fusca</i>	50
Моллюски	
<i>Thais</i>	200
<i>Radix japonica</i>	120
Членистоногие	
<i>Artemia salina</i>	200—900
<i>Daphnia magna</i>	50
Асцидии	
<i>Heterodera</i>	30
НEMATоды	
<i>Molgula</i>	50
Насекомые	
<i>Drosophila</i> (imago)	950
<i>Drosophila</i> (куколка)	20—65
<i>Drosophila</i> (яйца 7-часовые)	8
<i>Drosophila</i> (яйца 4-часовые)	5
<i>Drosophila</i> (яйца 3-часовые)	2
<i>Chaoborus</i> (личинка)	100—250
<i>Tribolium confusum</i> (imago)	200
<i>Calandria granria</i> (imago)	50
Позвоночные	
Змеи	80—200
Черепашки	15—20
Тритоны	25—30
Лягушки	5—10
Голуби	25—30
Куры	10—15
Рыбы (карповые)	5—20

50 Гр. Значительные различия в радиочувствительности обнаружены среди различных видов беспозвоночных и позвоночных животных, а также среди млекопитающих (табл. VI—1 и VI—2). В радиобиологической литературе существует большое число

Таблица VI—2

Ориентировочные значения $LD_{50/30}$ при облучении млекопитающих (общее однократное облучение рентгеновскими или γ -лучами)

Объект	$LD_{50/30}$, Гр
Монгольская песчанка . . .	10,0—13,0
Сурок	6,5—9,0
Суслик	5,5—8,5
Полевка	5,5—8,0
Хомяк	5,0—8,0
Летучая мышь	5,0—7,5
Крыса	4,5—7,0
Мышь	4,0—6,5
Коза	3,0—5,5
Обезьяна	3,0—5,5
Человек	2,5—4,0
Собака	2,5—4,0
Свинья	2,5—3,5
Морская свинка	1,5—3,5

работ, в которых делаются попытки объяснить генетически детерминированные различия в радиочувствительности организмов различными особенностями обмена веществ, содержанием ряда эндогенных продуктов в органах и тканях, организацией генома, активностью репарирующих систем и т. д. Однако вопрос этот все еще далек от разрешения.

Растительные объекты также характеризуются значительными различиями в устойчивости к радиационному воздействию. Необыкновенно высокая чувствительность к ионизирующему излучению отмечена у гриба *Phycomyces blakeslecanus*, рост которого угнетается в результате γ -облучения в дозе, составляющей всего 0,008 Гр. В последние годы в качестве чувствительного биологического дозиметра радиобиологами используется один из штаммов актиномицета с особой четкостью синхронизации смены форм клеточной деятельности. Этот радиочувствительный штамм был успешно использован в совместном советско-американском эксперименте по программе «Союз — Аполлон». Высшие растения обла-

Таблица VI—3

Ориентировочные значения устойчивости различных растений к γ -радиации

Объект	Суточная доза при хроническом облучении, вызывающая резкую задержку развития, Гр
Сосна	0,1
Лилия	0,2
Традесканция	0,4
Бобы конские	3
Люпин	4
Кукуруза	5
Брюква	10
Арабидопсис	40
Гладиолус	60

Объект	LD_{100} , Гр
Бобы конские	100
Кукуруза	150
Пшеница	150
Конопля	250
Гречиха	250
Люпин	500
Овес	500
Клевер	1000
Клещевина	1000
Редис	3000
Горчица	4000
Капуста	4000

дают высокой устойчивостью к облучению: значение дозы LD_{100} достигает величины порядка сотен и тысяч грэй. Один из способов изучения радиочувствительности растений состоит в их хроническом облучении на так называемых гамма-полях. В табл. VI—3 представлены результаты различных авторов по определению LD_{100} для высших растений и суточных доз γ -излучения, вызывающих задержку роста и развития в условиях хронического облучения. Интересные результаты были получены многими исследователями при облучении семян растений: семена сосны и лилии обычно теряют всхожесть после облучения в дозах, составляющих десятые доли грэя, тогда как на семена других растений (редис, горчица, капуста) дозы в десятки грэй оказывают стимулирующее действие. Убедительных объяснений всем этим резким различиям в устойчивости к радиации различных видов растений все еще не найдено.

Наряду с генетически детерминированными различиями в устойчивости к радиации радиобиологам хорошо известны и активно исследуются явления искусственно модифицированной радиочувствительности. Изменяя газовый состав атмосферы и температуру во время облучения, замораживая объекты или изменяя содержание воды в них, удается значительно изменить их устойчивость к радиации. Кроме того, обнаружен широкий спектр химических воздействий, способных усилить или ослабить действие радиации на организмы. Подробнее об этих эффектах говорится в последующих разделах.

Устойчивость к радиации может модифицироваться не только за счет внешних химических и физических воздействий, но и при изменении диеты, интенсивности обменных процессов, в ходе онтогенетического развития. Так, ряд грызунов — обитателей пустынь — обладает неожиданно высокой для млекопитающих устойчивостью к радиации. Их перевод на пищевой рацион обычных лабораторных крыс и мышей приводит к снижению радиоустойчивости, и наоборот, питание белых крыс и мышей травами, которые употребляют пустынные грызуны, ведет к увеличению устойчивости к действию радиации. В настоящее время анализ экологических факторов радиочувствительности проводится во многих лабораториях мира. О роли диеты в радиочувствительности свидетельствуют также наблюдения за летучими мышами. В естественных условиях их устойчивость к радиации примерно такая же, как у большинства млекопитающих, однако в неволе они отказываются от пищи и при этом становятся в 20—50 раз более устойчивы к радиационному воздействию.

Физическая нагрузка, изменение температуры тела и другие воздействия, направленно изменяющие метаболизм, оказывают заметное влияние на радиоустойчивость. Еще в 50-е гг. работами Сторера, Гомпельмана, Анджус, Смит и др. было показано, что снижение температуры тела крыс, мышей и хомяков до $+5^{\circ}$ — 0°C оказывает выраженный радиозащитный эффект. Вероятно, это свя-

зано с угнетением метаболизма. О том же говорят и наблюдения за сурками, сусликами и рядом других животных в состоянии зимней спячки. Чтобы убить животное в это время, необходимы очень высокие дозы, порядка десятков и сотен грэй. Если животных тотчас после облучения вывести из состояния спячки, то лучевое поражение развивается быстро и наблюдается при тех же дозах, что и у бодрствующих животных, т. е. при дозах 1—10 грэй. Интересно, что в некоторых случаях понижение температуры тела приводит к увеличению радиочувствительности у гомойотермных животных. Вероятно, это связано с компенсаторным усилением метаболизма и, как следствие, приводит к возрастанию лучевого поражения.

О связи между радиочувствительностью и этапом онтогенеза говорят наблюдения за насекомыми. Их радиочувствительность подробно исследовалась с целью практического использования радиации для уничтожения яиц, личинок, куколок или стерилизации взрослых особей. В целом радиочувствительность насекомых снижается в ходе онтогенеза. Из табл. VI—I видно, что у *Drosophila* по мере развития яиц их устойчивость к облучению возрастает в несколько раз, на стадии куколки — уже в десятки раз, а взрослая особь в сотни раз устойчивее зародыша. Предполагают, что высокая радиоустойчивость взрослых особей связана с повышенным содержанием в гемолимфе эндогенных защитных веществ — аминокислот, полипептидов, аминов, а также с особенностями трахейного дыхания, приводящего к пониженному содержанию кислорода в тканях. Изменение радиоустойчивости с возрастом хорошо изучено в опытах на мышах и крысах. На рис. VI—2 показано, как изменяется устойчивость мышей к действию радиации в зависимости от возраста. Интересно, что сходная кривая получена и в том случае, когда критерием радиочувствительности служил не летальный эффект, а вызванное облучением сокращение средней продолжительности жизни животных.

Выказанные в разное время гипотезы связывают различия в радиочувствительности животных с содержанием ДНК в их клетках, с уязвимостью для ионизирующих частиц отдельных хромосом и генома в целом, с эффективностью репарирующих систем, с содержанием эндогенных защитных и сенсibiliзирующих веществ и напряжением кислорода в тканях, со степенью накопления токсических веществ, интенсивностью метаболических процессов и

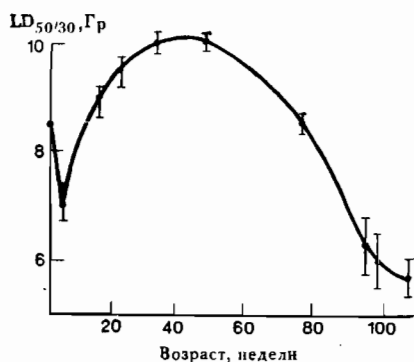


Рис. VI—2. Значение летальной дозы $LD_{50/30}$ для мышей линии SAS/4 как функция возраста.

адаптивными возможностями отдельных клеток и физиологических систем. В качестве примера предлагаем рассмотреть предложенную А. М. Кузиным феноменологическую зависимость между радиочувствительностью тканей и рядом физико-химических и физиологических параметров, которые могут быть существенными для определения развития лучевого поражения и его восстановления:

$$P = \frac{K_1 [O_2] + K_2 [ПТР] + K_3 \Phi A + K_4 PCB + K_5 \Phi \text{Стот}}{K_6 \Phi \Phi СГ + K_7 \Phi В + K_8 [ЗВ] + K_9 \Phi \text{Слок}},$$

где P — радиочувствительность клеточной популяции или ткани; K — коэффициенты $[O_2]$ — напряжение кислорода; $[ПТР]$ — концентрация предшественников радиотоксинов; ΦA — фактор активации ферментов, способствующих гибели клетки (учитываются не только ферменты, переводящие предшественников в активные радиотоксины, но и литические ферменты, играющие важную роль в интерфазной гибели клетки); PCB — радиочувствительность системы восстановления (считается, что сама система восстановления обладает определенной степенью радиочувствительности); $\Phi \text{Стот}$ и $\Phi \text{Слок}$ — факторы связи с окружающей средой при тотальном или локальном облучении (учитывается значение интенсивности обмена между тканями в организме). При локальном облучении ткани с высоким $\Phi \text{Слок}$ будет происходить быстрое удаление из ткани предшественников радиотоксинов и в связи с этим радиочувствительность снизится. При тотальном облучении высокий $\Phi \text{Стот}$ будет способствовать притоку радиотоксинов из окружающих тканей и повышать радиочувствительность; $\Phi \Phi СГ$ — фактор физиологической стабильности генома ($\Phi \Phi СГ$ будет тем выше, чем меньше объем хромосом, чем менее интенсивно идут процессы синтеза ДНК и иРНК, чем более репрессирована ДНК белками, защищающими ее от действия диффундирующих радикалов и первичных радиотоксинов); $\Phi В$ — фактор восстановления (интенсивность восстановления зависит от наличия в клетках специализированных ферментативных систем восстановления, макроэргов, метаболитов для ресинтеза, условий связывания и удаления первичных радиотоксинов из облученной ткани); $[ЗВ]$ — концентрация защитных веществ (естественных антиоксидантов и искусственно вводимых).

Объяснение параметров приведено по А. М. Кузину, который подчеркивает, что параметры имеют лишь качественный смысл. Незнание коэффициентов, т. е. доли участия каждого из показателей, сложность регистрации многих из указанных параметров, их специфичность у различных объектов — все это не позволяет еще предсказывать степень устойчивости объектов к действию ионизирующей радиации.

2. ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ОСТРАЯ И ХРОНИЧЕСКАЯ ЛУЧЕВАЯ БОЛЕЗНЬ

Поглощение организмом млекопитающего энергии ионизирующей радиации вызывает разнообразные морфологические и функциональные изменения, приводит к развитию острой или хронической формы лучевой болезни, которая заканчивается гибелью организма или выздоровлением, хотя в последнем случае нельзя исключить возникновения отдаленных последствий, таких, как рак, катаракта, уменьшение продолжительности жизни и др. Характер постлучевых нарушений зависит от условий облучения — общее или локальное, однократное или хроническое, а также от вида используемого излучения, мощности дозы и ее распределения во времени. В последние годы всё более интенсивно исследуется стимулирующее действие на организм малых доз радиации. Это самостоятельная проблема, еще недостаточно изученная, однако представляющая значительный интерес. Не останавливаясь на ней подробно, отметим лишь что вполне возможно существование таких малых доз радиации, при которых вероятность повреждения организма весьма мала, однако регулирующие механизмы, в силу их высокой радиочувствительности, уже отвечают на облучение стимуляцией ряда процессов, благоприятных для роста и развития организма. Наличие такого критического предела дозы облучения для различных биологических объектов, включая млекопитающих, предполагается в работах А. М. Кузина и соавт. (1981). Возможно, это направление исследований найдет широкое практическое использование.

Исследованиям этиологии лучевой болезни посвящено большое количество монографий в области радиобиологии и медицинской радиологии. Мы же рассмотрим лишь некоторые вопросы, важные для понимания биофизических особенностей действия излучений на организм млекопитающего.

Степень устойчивости к ионизирующей радиации может сильно колебаться в пределах одного вида, т. е. для каждого индивидуума радиочувствительность зависит от многих физиологических показателей. Уже сам критерий $LD_{50/30}$ свидетельствует о том, что при определенной дозе облучения половина исследуемых биологических объектов гибнет, а другая остается в живых, т. е. можно говорить об индивидуальных различиях радиорезистентности внутри однородной популяции. Можно отобрать животных одного вида, линии, пола, возраста, массы тела и убедиться, что после облучения в одной дозе их устойчивость к радиации будет различной. Так, из рис. VI—3 видно, что при одной и той же дозе гибель животных происходит в различное время после облучения; кривые зависимости смертности животных от времени, прошедшего после радиационного воздействия, имеют S-образную форму. Еще при дозе в 1 Гр ни одна из облученных мышей, как правило, не погибает.

бают в течение всего периода исследования; облучение в дозе 5 Гр вызывает гибель 50% животных — наблюдается острая форма лучевого поражения, которая у млекопитающих развивается в течение 30 сут и менее; минимальная доза, при которой гибнут уже все облученные мыши («минимальная абсолютно летальная доза»), — около 7 Гр.

Понятно, что для животных чистых линий варибельность устойчивости к облучению менее значительна, чем для животных из генетически неоднородных популяций (рис. VI—4).

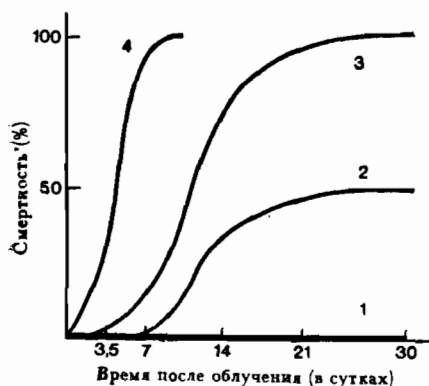


Рис. VI—3. Зависимость смертности мышей от величины дозы общего однократного внешнего облучения (1—1 Гр; 2—5 Гр; 3—7 Гр; 4—10 Гр) и времени, прошедшего после облучения.

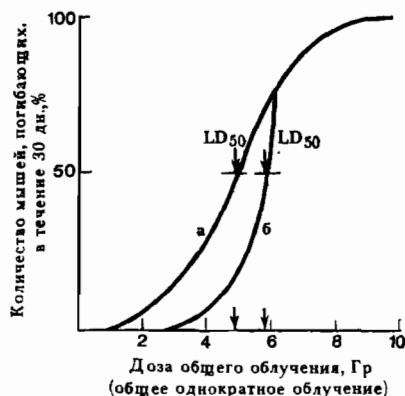


Рис. VI—4. Зависимость от дозы рентгеновского облучения числа погибших беспородных (а) и тесно инбридированных (б) мышей (по Александру, 1959)

Поглощение организмом млекопитающего до 10 Гр ионизирующего излучения вызывает появление многообразных симптомов острой лучевой болезни. Широкую известность лучевая болезнь получила после трагических событий в Хиросиме и Нагасаки в августе 1945 г. Среди жителей, уцелевших после атомной бомбардировки, наблюдали тяжелое заболевание, сопровождающееся лихорадочным состоянием, выпадением волос, глубоким нарушением картины крови, поражением эпителия кишечного тракта и др. Потребовалось несколько лет, чтобы доказать связь этого заболевания с поражающим действием ионизирующих излучений. Характер лучевой болезни у человека был описан во многих странах врачами и биологами, спасавшими жизнь людей, пострадавших при авариях ядерных реакторов, когда происходило облучение обслуживающего персонала, а также в результате наблюдений за людьми, получавшими общее облучение в лечебных целях, в частности при терапии лейкозов и др..

Острая лучевая болезнь

Рассмотрим основные проявления острой лучевой болезни, возникающей в результате общего однократного, относительно равномерного облучения в диапазоне поглощенных доз 1 Дж/кг и более¹. Различают следующие степени тяжести острой лучевой болезни: легкая (первая) степень — от 1 до 2,5 Дж/кг; средняя (вторая) степень — от 2,5 до 4 Дж/кг; тяжелая (третья) степень — от 4 до 10 Дж/кг; крайне тяжелая (четвертая) степень — от 10 Дж/кг и выше. В развитии острой лучевой болезни отмечается три периода: период формирования, период восстановления и период исходов и последствий.

Период формирования острой лучевой болезни состоит из четырех фаз: фаза первичной реакции; фаза кажущегося клинического благополучия (латентная, или скрытая, фаза); фаза выраженных клинических проявлений (фаза разгара болезни); фаза непосредственного восстановления.

Фаза первичной реакции проявляется при общем облучении организма в дозах, превышающих 2 Дж/кг, и возникает в зависимости от дозы в первые часы или даже минуты после облучения. Она сопровождается потерей аппетита, тошнотой, рвотой, головной болью, общей слабостью. При высоких дозах, приближающихся к 10 Дж/кг, наблюдается развитие шокоподобного состояния с падением артериального давления, кратковременная потеря сознания, субфебрильная температура, расстройство желудочно-кишечного тракта; появляются признаки нервно-рефлекторных нарушений; изменяется картина крови; в первые сутки в периферической крови обнаруживается нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево, а также абсолютная и относительная лимфопения; в костном мозге может происходить уменьшение общего числа миелокариоцитов, снижение митотического индекса и исчезновение молодых форм клеток. При дозах облучения, превышающих 3 Дж/кг, уже с достоверностью отмечается усиление обменных процессов, активация гидролитических ферментов, повышение уровня сахара и билирубина в крови, снижение содержания хлоридов; с мочой выводится повышенное количество некоторых метаболитов, например креатина. Фаза первичной реакции может протекать в течение нескольких дней.

Фаза кажущегося клинического благополучия характеризуется отсутствием выраженных клинических симптомов. Длительность этой фазы находится в обратной зависимости от величины поглощенной дозы, а при дозе свыше 10 Дж/кг, т. е. при крайне тяжелой степени лучевого поражения, фаза кажущегося клинического благополучия вообще отсутствует. Смена первичной реакции латентным

¹ Терминология, а также классификация лучевой болезни взяты нами из работ А. К. Гуськовой, Г. Д. Байсоголова и С. П. Ярмоненко (1977).

периодом объясняется включением в патологический процесс защитных механизмов организма. Однако в этот период развивается поражение кроветворных органов — костного мозга, селезенки, лимфоидных тканей; обнаруживается лимфопения, начальное снижение содержания в крови нейтрофилов, в дальнейшем — уменьшение уровня тромбоцитов и ретикулоцитов. Может наблюдаться также атрофия гонад, подавление ранних стадий сперматогенеза. В течение фазы кажущегося клинического благополучия неврологическая симптоматика постепенно сглаживается.

Фаза выраженных клинических изменений сменяет латентный период. Самочувствие больных резко ухудшается, повышается температура тела, нарастает слабость. Фазу выраженных клинических изменений часто называют разгаром болезни. В этот период появляется либо весь симптомокомплекс лучевой болезни, либо различные комбинации отдельных ее симптомов; могут нарушаться все основные физиологические и биохимические процессы. Значительное место принадлежит проявлениям геморрагического синдрома (кровоточивость), в значительной степени определяющего тяжесть лучевой болезни, характер течения и нередко исход. Течение геморрагического синдрома выражается в сочетании кожной пурпуры с многочисленными, часто массивными, спонтанно возникающими кровоизлияниями в органы желудочно-кишечного тракта, сердце, головной мозг, легкие, в некоторые эндокринные железы. Характерна для этого синдрома и цикличность течения. Кровоточивость, по мнению большинства авторов, обусловлена тромбоцитопенией, являющейся следствием аплазии костного мозга, и серьезными функциональными и морфологическими изменениями кровеносных сосудов. Геморрагический синдром возникает только при значительной степени тромбоцитопении, когда количество тромбоцитов падает до уровня 50 000 в 1 мм³ крови и ниже. Однако нарушение свертываемости крови (возрастает продолжительность свертываемости) и повышение ломкости сосудов могут наблюдаться и при высоком содержании тромбоцитов в крови.

Тромбоцитопения не единственная причина геморрагического синдрома острой лучевой болезни. Существенно также совместное участие органов циркуляции, кроветворения и системы соединительной ткани в генезе синдрома. Нарушение тонкой регуляции кроветворения — одной из наиболее радиочувствительных систем организма — происходит в результате действия излучения на костный мозг и лимфоидные ткани. Изменяется клеточный состав крови: элементы белой крови представлены почти только лимфоцитами, а все остальные клетки белой крови или совсем исчезают, или содержание их в крови резко падает, прогрессирует анемия. В период разгара болезни наблюдается также нарушение функционального состояния желудочно-кишечного тракта, печени, почек, половой системы, кожных покровов, сердечной деятельности, нервной, эндокринной систем и другие изменения.

Все многочисленные повреждения, наблюдающиеся в период выраженных клинических изменений, тесно связаны с нарушением сложных биохимических процессов, лежащих в основе белкового, липидного, углеводного, водного, минерального обмена, обмена витаминов, гормонов и отражают изменения активности ферментных систем.

В зависимости от величины поглощенной дозы радиации и индивидуальной реакции организма на облучение наступает либо терминальная фаза, либо фаза непосредственного восстановления (она может наблюдаться при облучении в дозах ниже 7 Дж/кг). При дозах от 10 Дж/кг и выше формируется крайне тяжелая степень поражения, картина клинического проявления которой разворачивается настолько стремительно, что периодичности в развитии уже фактически не обнаруживается.

Фаза непосредственного восстановления может продолжаться 1—2 мес после начала заболевания и характеризуется постепенной нормализацией процессов, нарушенных в результате облучения. К концу третьего месяца состояние организма может быть вполне удовлетворительным, хотя отдельные проявления лучевой патологии еще могут обнаруживаться (например, не всегда нормализуется к этому времени репродуктивная функция, иногда прогрессирует выпадение волос). Выше кратко описаны различные фазы формирования острой лучевой болезни, возникающей в результате общего однократного внешнего равномерного облучения рентгеновскими или γ -лучами. При таком облучении проникающая ионизирующая радиация воздействует в той или иной степени на все клетки, органы, ткани и системы организма, суммарная реакция которых на облучение проявляется в наблюдаемой лучевой болезни.

Если производить облучение не всего тела, а лишь части его, то величина смертельной дозы существенно возрастает. Эксперименты на лабораторных животных показали, что радиорезистентность может резко меняться в зависимости от того, какая область тела защищается от облучения. Так, в табл. VI—4 представлены данные из работ П. Александера по защите мышей с помощью

Таблица VI-4

Выживание мышей после однократного облучения в дозе 10 и 25 Гр в условиях экранирования различных тканей

Экранированная область тела	Выжило к 30 сут, %	Экранированная область тела	Выжило к 30 сут, %
Без защиты . .	0	Кишечник . . .	27
Почки	0	Голова	28
Задняя лапа . .	13	Печень	33
		Селезенка . . .	78

свинцового экрана, накладываемого на различные ткани при облучении животных.

Локальное облучение какого-либо участка тела вызывает гибель животного только при значительных дозах ионизирующей радиации, при этом далеко не безразлично, какие органы подвергаются лучевому воздействию. Б. Раевский, производя «щелевое облучение» мышей (тело животного защищалось свинцовым листом с узкой щелью шириной 5 мм; положение щели, через которую проникало излучение, менялось по отношению к различным участкам тела), показал, что наиболее чувствительными к радиации

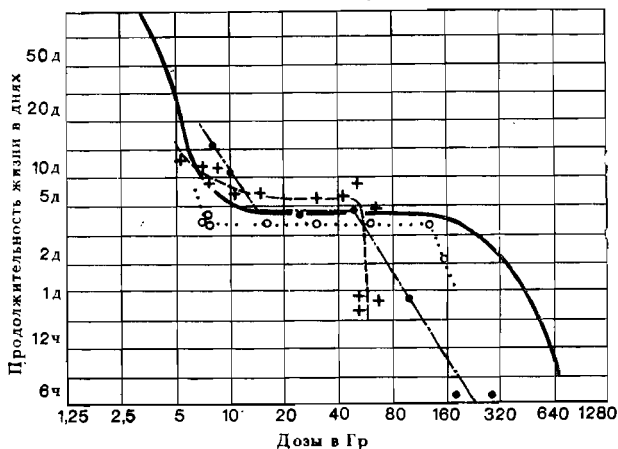


Рис. VI—5. Средняя продолжительность жизни животных, однократно облученных рентгеновскими лучами: сплошная линия — мыши, пунктирная — морские свинки, точечная — крысы (по Раевскому, 1959), пунктир с точкой — обезьяны (по Лендхему, 1961)

оказываются органы брюшной полости: часть кишечника, костный мозг, селезенка и другие ткани, но установить точно степень радиорезистентности каждого органа не представлялось возможным.

Анализ клинической картины лучевой болезни показывает, что, несмотря на необычайно пеструю симптоматику поражения, существует прямая связь между степенью поражения организма и радиочувствительностью так называемых «критических органов», поражение которых данной дозой облучения влечет за собой гибель организма.

Б. Раевский установил связь между средней продолжительностью жизни облученных млекопитающих и поражением их критических органов. При общем однократном, относительно равномерном облучении мышей в диапазоне доз от 2,5 до 1200 Гр им были отмечены следующие закономерности (рис. VI—5).

У животных, облученных в дозе 1—10 Гр, средняя продолжительность жизни составляет период от нескольких дней до не-

скольких недель. Лучевой синдром в этом диапазоне доз облучения получил название «костномозговой» или «кроветворный», так как решающее значение в его исходе имеет поражение кроветворной системы организма, в первую очередь костного мозга. Наблюдаемое уже в самые ранние сроки лучевой болезни резкое опустошение костного мозга является следствием глубокого торможения процессов клеточного деления, тогда как в периферическую кровь продолжают с постоянной скоростью поступать зрелые элементы. Даже невысокие дозы ионизирующей радиации вызывают быстрое и резкое опустошение костного мозга, поэтому дальнейшее повышение дозы облучения мало изменяет и без того глубокий патологический процесс. На исход лучевой болезни существенно влияет способность кроветворных органов к восстановлению, которое зависит от количества сохранившихся стволовых клеток.

В интервале доз от 10 до 100 Гр средняя продолжительность жизни млекопитающих практически не зависит от величины поглощенной дозы и составляет в среднем 3,5 сут. Эффект независимости средней продолжительности жизни от величины дозы облучения получил название «3,5-дневный эффект» или «эффект Раевского», а возникающий лучевой синдром — «желудочно-кишечный». Летальный исход желудочно-кишечного синдрома связан с поражением слизистой кишечника и желудка, высокой чувствительностью к радиации быстроделяющихся эпителиальных клеток, оголением ворсинок.

Облучение в дозах, превышающих 100 Гр, приводит к гибели млекопитающих, наступающей в первые несколько дней или даже несколько часов. У гибнущих животных наблюдают явные признаки поражения центральной нервной системы, поэтому описываемый лучевой синдром называют церебральным. У мышей, например, церебральный синдром протекает в следующем порядке: а — атаксическая фаза, 5—10 мин после облучения; б — летаргическая, или неактивная, фаза; в — повышенная возбудимость, или конвульсивная фаза; г — гибель через несколько часов после облучения при выраженных судорогах. Основной причиной такого поражения при этом типе гибели считают резкое подавление жизнедеятельности нервных клеток, реакция которых на облучение принципиально отличается от реакции костного мозга и кишечника отсутствием клеточных потерь.

Если поглощенная доза достигает 1000 Гр и более, животные гибнут сразу же «под лучом». Механизм такого поражения может быть связан с тем, что возникают массовые структурные поражения макромолекул. Иногда лучевой синдром, вызванный облучением в таких высоких дозах ионизирующей радиации, называют «молекулярной смертью». Таким образом, для млекопитающих определены три основные критические системы, поражение которых является ведущим и решающим в исходе того или иного лучевого синдрома. Лучевая болезнь в целом представляет собой результат сложных и взаимосвязанных процессов взаимодействия

клеточных повреждений и нарушенных восстановительных процессов в тканях. Это создает кажущееся впечатление отсутствия специфических для лучевого поражения процессов. Действительно, при костномозговом и желудочно-кишечном синдромах уже через сутки приостанавливается клеточное деление и в критических органах могут отсутствовать новые клетки. Но и при нелетальных дозах облучения можно наблюдать подобную картину. Подавление клеточного деления для летально и нелетально облученных животных носит временный характер, и поэтому даже в терминальный

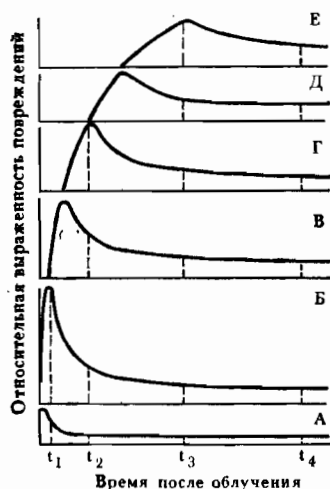


Рис. VI—6. Схема последовательности формирования радиационного поражения на различных уровнях биологической интеграции. Уровни биологической интеграции: А — молекулы, Б — субклеточные структуры, В — клетки, Г — тканевые системы, Д — физиологические системы, Е — организм. t_1 — период времени, необходимый для развития максимального количества повреждений за счет первичной биохимической трансформации и усиления поражения, составляющих основу эффективной дозы лучевого воздействия. В низкометаболизирующих объектах максимум повреждений t_1 может быть значительно отдален по времени от конца облучения (эффект хранения сухих семян на воздухе). В организме млекопитающих t_1 совпадает с окончанием облучения или близок к нему. t_2 — период наибольшего развития в тканях клеточной депопуляции. t_3 — время наибольшего развития наблюдаемых изменений на уровне организма, период клинического разгара болезни. t_4 — период начинающегося разрешения лучевого поражения организма (по Аковцу, Максимова, Малышеву, 1972)

период острой лучевой болезни в результате восстановительных процессов критические органы часто не выглядят тяжелопораженными. По мнению П. Александера и других радиобиологов, именно временное выведение критических органов из строя способствует летальному исходу. Предполагают, что, когда критические органы снова начинают образовывать жизнеспособные клетки, возможности для восстановления других поврежденных систем уже утрачиваются и оказывается невозможным восстановление autoregulatory процессов.

Интересно, что ступенчатый характер зависимости средней продолжительности жизни от дозы облучения (характеризующий разные механизмы, ведущие к гибели организмов в результате поражения критических органов и систем) наблюдается не только у млекопитающих. Ступенчатая форма кривой обнаружена в настоящее время у различных представителей позвоночных, беспозвоночных, у одиночных клеток и растительных организмов. Конечно, для различных представителей живого мира значения средней продолжительности жизни и абсолютные величины пора-

жающих доз облучения меняются в зависимости от радиорезистентности организмов. Однако ступенчатая форма кривой (рис. VI—5) свидетельствует об общебиологическом принципе существования критических органов, тканей, физиологических систем и, возможно, молекулярных структур, имеющих решающее значение для гибели облученного биологического объекта. Как отмечают И. Г. Акоев и др., для каждого уровня биологической интеграции существуют характерные структурные и функциональные особенности, определяемые их состоянием, временными и количественными параметрами, значение каждого из которых подчинено стохастическим закономерностям (рис. VI—6).

Пострадиационное восстановление у млекопитающих

Пострадиационное восстановление («период восстановления» или «биологическое восстановление» в отличие от «фазы восстановления» в период формирования лучевой болезни) так же, как и лучевое повреждение, может разворачиваться в организме уже вскоре после начала лучевого воздействия и протекать с неодинаковой интенсивностью на различных уровнях биологической организации.

Пострадиационное восстановление обнаруживается, например, при сопоставлении величин летальных доз, полученных при разных вариациях мощности доз облучения организма. Так, из рис. VI—7 видно, что малым мощностям доз, т. е. более продолжительному облучению, соответствуют более высокие дозы облучения для получения одного и того же радиобиологического эффекта по критериям $LD_{50/30}$ или $LD_{50/3,5}$; особенно отчетливо это наблюдается для кишечного синдрома. Таким образом, по мере увеличения протяженности облучения в организме все в большей степени успевают проявляться восстановительные процессы, их не удается наблюдать лишь при сравнительно кратковременных облучениях.

Удобный метод количественной оценки пострадиационного восстановления — это определение устойчивости организма к повторному облучению, производимому через разные интервалы времени после первого воздействия ионизирующей радиации. По разности

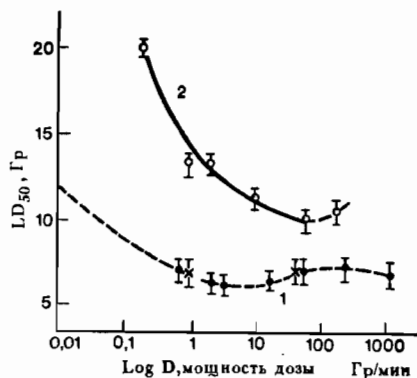


Рис. VI—7. Смертность мышей (значение дозы LD_{50}) после общего однократного облучения при разных мощностях дозы. 1 — костномозговой синдром — $LD_{50/30}$; 2 — кишечный синдром — $LD_{50/3,5}$.

между величинами летальных доз дробного и однократного облучения оценивают эффекты восстановления. Например, животных облучают в дозе, не вызывающей еще летального исхода (первое облучение); затем разные группы животных через различные интервалы времени облучают повторно и определяют, при какой суммарной дозе обоих облучений погибнет половина животных. Приведем результаты одного из таких экспериментов (табл. VI—5). Уже из этих данных можно видеть, что суммарная доза при двукратном облучении превышает дозу, полученную в результате однократного лучевого воздействия и с увеличением интервала времени между двумя облучениями величина $LD_{50/30}$ возрастает. Если бы за период между двумя облучениями в организме не шли процессы восстановления, при втором облучении достаточной была бы доза 3,0 Гр, а на самом деле вторая доза превышает эту величину.

Эксперименты с фракционированным облучением позволили заключить, что полного восстановления в облученном организме не происходит и всегда остается какое-то «остаточное поражение», которое сказывается при повторном облучении.

Еще в середине нашего столетия Блэр впервые предположил, что пострadiационное восстановление протекает по экспоненциальному закону с постоянной скоростью и пропорционально обратимой доле поражения; необратимая доля пропорциональна величине общей накопленной дозы облучения.

Эффективная доза «чистого поражения» рассчитывается по формуле

$$D_t = D [f + (1 - f)e^{-\beta t}],$$

где f — необратимая часть поражения; $(1-f)$ — доля обратимого лучевого поражения; β — скорость восстановления за одни сутки в %; t — время в сутках; e — основание натуральных логарифмов. Используя методы статистического анализа, можно рассчитать также «период полувосстановления», т. е. время, за которое происходит восстановление организма от лучевого поражения на 50%. Предполагалось, что эта величина постоянная для каждого вида животного: для мышей она составляет 2—8 сут, для крыс — 6—9, для собак — 14—18, а для человека — 25—45 сут. В дальнейшем было показано, что период полувосстановления зависит от величины дозы облучения. Так, по данным Мелвилла и сотр., наибольших величин суммарной дозы при двукратном облучении можно добиться в тех случаях, когда первая доза облучения соответствует $LD_{10/30}$. И. Г. Акоев обнаружил, что наибольший темп восстановления у мышей наблюдается для первой дозы облучения в 4 Гр, повышение или снижение ее приводит к снижению эффекта пострadiационного восстановления. Другим фактом, позволяющим рас-

ширить представление о пострадационном восстановлении, служат данные о его фазовой периодичности во времени. Имеющийся фактический материал свидетельствует о существовании периода повышенной радиорезистентности организма. Как видно из работ А. Г. Коноплянникова и С. П. Ярмоненко (рис. VI—8), в течение первой недели после облучения мышей происходит снижение величины остаточного повреждения, а затем (10—18-е сут) наблюдается период повышенной радиорезистентности. Однако это не может свидетельствовать об изменении характера восстановительных процессов, так как они протекают наряду с развивающимся лучевым повреждением. Конечно, такой суммарный показа-

Таблица VI-5

Зависимость общей дозы $LD_{50/30}$ от условий облучения мышей (первое облучение в дозе 3,0 Гр)

Условия облучения	$LD_{50/30}$
Однократное, мгновенное	6,0
Двукратное с интервалом 2 сут	6,6
Двукратное с интервалом 5 сут	7,2

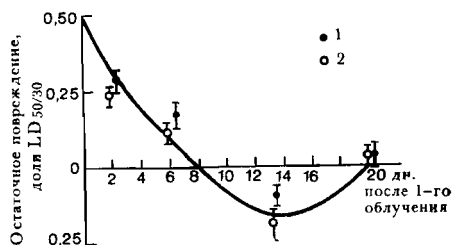


Рис. VI—8. Зависимость динамики остаточного повреждения от длительности интервала времени между первым и вторым рентгеновским (1) или протонным (2) облучением (по Ярмоненко, 1977)

тель, как величина летальной дозы при фракционированном облучении, дает лишь обобщающее, формальное представление о соотношениях повреждения и восстановления в облученном организме, при этом не учитывается, какие поражения восстанавливаются и в какие сроки это происходит.

В облученном организме одновременно развивается множество противоположно направленных процессов поражения и восстановления, осуществляемых на разных уровнях. Пострадиационное восстановление протекает в разных тканях с неодинаковой скоростью; наиболее интенсивно репарация происходит в активно пролиферирующих тканях, некоторая доля повреждений остается необратимой. В организме репарация осуществляется также и на клеточном уровне. Поэтому для выяснения вопросов, связанных с механизмами пострадационного восстановления организмов, проводят цитокINETические и функциональные исследования органов, играющих ведущую роль в развитии и исходе лучевых синдромов, а также определяют соотношения процессов деструкции и восстановления на различных уровнях организации биологических систем.

Хроническая лучевая болезнь

Хроническая лучевая болезнь возникает при продолжительном облучении организма в малых дозах. Обобщая различные формы проявления хронической лучевой болезни, А. К. Гуськова выделяет два основных варианта синдромов: 1 — обусловленный общим облучением и 2 — обусловленный местным облучением.

Первый вариант хронической лучевой болезни может быть следствием длительного общего, относительно равномерного или неравномерного облучения. В радиобиологической литературе описаны многочисленные случаи хронической лучевой болезни при внешнем и инкорпорированном облучении, которые могут представлять собой и промежуточные синдромы, возникающие при сочетании различных способов и видов облучения. Второй вариант хронической лучевой болезни может быть вызван облучением отдельных участков тела при воздействии радиоактивных изотопов с избирательным распределением по органам и тканям, а также при местном внешнем облучении.

Клинические проявления хронической лучевой болезни, в отличие от острого лучевого поражения, более растянуты во времени и также характеризуются фазностью течения, связанной с динамикой поглощения органами и тканями организма энергии ионизирующей радиации. Хроническая лучевая болезнь развивается при суммарных дозах 0,7—1,0 Дж/кг и мощности излучения 0,001—0,005 Дж/кг за одни сутки. Она характеризуется медленным нарастанием дистрофических изменений и возможностью сохранения в течение длительного времени репаративных процессов. Условно отмечают три степени заболевания: легкая, средняя и тяжелая хроническая лучевая болезнь. Клиническая очерченность второго варианта хронической лучевой болезни выражена слабо для разграничения отдельных периодов; при данном варианте синдрома местные тканевые изменения преобладают над общими реакциями организма.

3. ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В ответных реакциях организма на действие ионизирующей радиации условно можно выделить три последовательно развивающихся во времени стадии: физические реакции, биофизические процессы и общебиологические изменения (табл. VI—6).

Согласно структурно-метаболической теории, развиваемой А. М. Кузиным, лучевое поражение инициируется множественными начальными актами поглощения энергии ионизирующей радиации в организме; наиболее важная роль в развитии начальных процессов лучевого поражения отводится первичным поврежде-

Последовательность формирования реакции организма на действие ионизирующей радиации

Физические реакции микросекунды — миллисекунды	Биофизические процессы		Общесбиологические изменения в клетке и организме	
	миллисекунды — секунды	минуты — часы	сутки	годы

Поглощение энергии, ионизация и возбуждение атомов и молекул, образование радикалов

Внутри- и межмолекулярный перенос энергии, взаимодействие радикалов друг с другом и с неповрежденными молекулами, внутримолекулярные изменения

Образование стабильных измененных молекул

Метаболизм измененных молекул, нарушение генетического кода, трансскрипции и трансляции

Биохимические и физиологические изменения в клетках и тканях

Морфологические нарушения

Гибель клетки

Гибель организма или восстановление и последующее выживание

Отдаленные последствия

ниям микрогетерогенных структур и гетерогенной метаболической организации биологических систем. Дальнейшее развитие лучевого поражения приводит к сложным структурным и функциональным нарушениям в организме. В период разгара болезни все ярче проявляются так называемые общебиологические изменения, включающие в себя биохимические, физиологические и морфологические нарушения в органах и тканях. Однако не все общебиологические изменения в организме представляют собой непосредственную реакцию на облучение. В зависимости от дозы радиации и от времени, прошедшего после облучения, проявляется все большее количество патологических процессов, которые в конечном итоге могут привести к гибели организма, или происходит постепенное восстановление нарушенных процессов и структурных изменений.

Установлено, что разные органы и ткани сильно различаются по своей чувствительности к ионизирующей радиации, а также по роли в лучевой патологии и конечном исходе болезни. По морфологическим изменениям их радиочувствительность располагается (по степени убывания чувствительности) в такой последовательности: 1 — органы кроветворения; 2 — половые железы; 3 — слизистые оболочки, слюнные, потовые и сальные железы, волосные сосочки, эпидермис; 4 — желудочно-кишечный тракт; 5 — печень; 6 — органы дыхания; 7 — железы внутренней секреции (надпочечники, гипофиз, щитовидная железа, островки поджелудочной железы, паращитовидная железа); 8 — органы выделения; 9 — мышечная и соединительная ткани; 10 — соматические костная и хрящевая ткани; 11 — нервная ткань.

В оценке чувствительности тканей обычно исходили из закона Бергонье и Трибондо о наибольшей радиочувствительности высокодифференцированных тканей с активной способностью к клеточному делению. Однако для правильной оценки степени чувствительности тканей к радиации одних только этих признаков недостаточно. Так, нервная ткань, являющаяся по морфологическим признакам радиорезистентной, в функциональном отношении чувствительна к облучению. Известно, например, что у облученных животных заметно нарушается условно-рефлекторная деятельность, которая может сохраняться в течение длительного периода после облучения. При лучевой болезни обнаруживается также нарушение ответной реакции центральной нервной системы на некоторые дополнительные раздражители, например химические. Сердце по морфологическим признакам является радиорезистентным органом. Кроме того, ритм и сила сердечных сокращений нарушаются лишь в поздний период лучевой болезни. Однако, изучая биоэлектрические потенциалы миокарда, удается обнаружить характерные сдвиги уже вскоре после облучения организма в невысоких дозах. В связи с изложенным при описании изменений в органах и тканях облученных организмов помимо структурных изменений необходимо оценивать различные функциональные и биохимические нарушения.

Кроветворение при лучевом поражении

Органы кроветворения наиболее радиочувствительны, поражение костного мозга, тимуса, селезенки, лимфатических узлов является одним из важнейших проявлений острой лучевой болезни. Значительные морфологические и функциональные нарушения наблюдаются во всех кроветворных органах, причем изменения в системе крови представляется возможным обнаружить вскоре после действия радиации и даже при относительно небольших дозах облучения.

Клеточное опустошение — это наиболее важное проявление лучевого повреждения кроветворных органов. Этот процесс обычно подразделяют на три стадии.

Первая, длящаяся около трех часов, характеризуется относительным постоянством содержания клеток в кроветворных тканях.

Вторая стадия охватывает интервал времени от трех до семи часов после облучения, для нее характерно резкое и глубокое опустошение костного мозга и лимфоидных тканей (количество клеток в костномозговой ткани может снижаться более чем наполовину), важнейшим механизмом которого является интерфазная гибель клеток, определяющая высокую радиопоражаемость кроветворных органов.

В третьей стадии скорость клеточного опустошения замедляется и дальнейшее уменьшение количества клеток происходит в костном мозге в результате репродуктивной гибели, а также продолжающейся дифференцировки части клеток и миграции их в кровь. Отмечают, что длительность течения третьей стадии пропорциональна дозе облучения.

При сравнении радиочувствительности клеток различных кроветворных органов обнаруживается, что наиболее чувствительны к действию ионизирующей радиации эритроидные клетки костного мозга; поражаемость лимфоидных клеток тимуса, селезенки и костного мозга в основном сходна и выражена, по-видимому, слабее по сравнению с эритроидными клетками костного мозга; наиболее радиорезистентными оказываются клетки гранулоцитарного ростка млекопитающих. Установлено, что интерфазная гибель клеток — основная причина убыли лимфоидных клеток млекопитающих; снижение количества эритроидных и гранулоцитарных клеток в значительной степени зависит и от других причин. В работах П. Д. Горизонтова и его сотр. показано, что гибель клеток, даже в ранние стадии лучевой болезни, нельзя рассматривать только как результат непосредственного воздействия радиации на кроветворные органы, существенную роль в поражении клеток отводят и системному ответу организма на действие ионизирующей радиации: токсемии, нарушению иммунных реакций, нервной и гормональной регуляции.

Таблица VI-7

Количество отдельных видов клеток (млн) в кроветворных органах крыс, подвергну облучению в дозах: 1,5; 4,0 и 7,0 Гр

(по О. И. Белоусовой, П. Д. Горизонтову и М. И. Федотовой, 1979)

Клетки	Доза, Гр	Норма	Время, прошедшее после			
			1	2	3	5
Костный						
Общее количество	1,5	122,4±6,7	90,4±5,6	98,2±5,3	120±6,4	117,5±8,6
	4,0	124,3±7,6	—	20,8±2,3	35,2±8	63,6±7,7
	7,0	124,3±7,6	—	16,1±0,7	—	18,3±1,9
Все эритроидные	1,5	27,95±1,8	9,94±1,7	18,3±1,5	33,6±2,3	28,1±2,8
	4,0	20,7±1,6	—	2,63±0,82	13,8±4,1	9,2±2,9
	7,0	20,7±1,6	—	0,27±0,07	—	1±0,3
Все лимфоидные	1,5	23,8±1,8	15,3±1,8	14,9±3,3	10,6±1,4	18,6±2,8
	4,0	28,6±4	—	1,2±0,3	1±0,4	4,2±1
	7,0	28,6±4	—	0,5±0,1	—	0,5±0,1
Все гранулоцитарные	1,5	47,17±3,2	49±3,6	44,6±4,8	53,5±3,8	47,6±4,8
	4,0	54,4±3	—	11,4±1,3	14,6±2,3	28,4±4,6
	7,0	54,4±3	—	10,5±0,6	—	8,7±1,2
Селе						
Лимфоидные	1,5	1116±83	470±57	665±100	544±51	698±60
	4,0	1116±83	—	52,0±8	89±17	142±14
	7,0	1116±83	—	118,6±13,7	—	83±6,6
Тн						
Лимфоидные	1,5	1100±67	572±42	297±25	321±39	704±82
	4,0	1100±67	—	59,5±4,5	52,7±7,5	158±15
	7,0	1100±67	—	42,5±4,4	—	31,7±4,2

Изменение содержания клеток в кроветворных органах при развитии разных по тяжести форм лучевой болезни представлено в табл. VI—7.

С резкого снижения количества клеток в кроветворных органах (обусловленного интерфазной и репродуктивной гибелью и выходом в кровоток продолжающих дифференцировку клеток) начинается процесс восстановления кроветворения. Он состоит из двух этапов: «абортивного подъема» и «последующего подъема». Абортивный подъем кратковременен: вскоре после увеличения содержания клеток в кроветворных тканях происходит их повторное снижение. Предполагают, что абортивный подъем содержания клеток в костном мозге происходит в результате размножения

облучения, сутки

7	10	15	20	25	30
---	----	----	----	----	----

м о з г

120±8	122,0±7,4	162,5±10,1	157,5±11,9	158,9±5,2	164,6±19,6
98,2±2,3	115,8±4	120,3±5,5	126,2±12,5	160,3±9,1	159,4±14,2
31,7±2,7	37±3,4	63,8±6,6	94±13	117±13,8	109±7,4
27,3±3	22,7±1,9	35,9±3	37,3±4,2	36,7±2,7	34,1±4,5
30,4±1,8	15,5±5,2	17,2±2,7	28±4,8	28,8±2	41,4±4,9
7,5±1,7	13,7±2,7	14±2,3	23,5±3,3	27,7±3,7	23,5±2,3
20±2,6	27,8±3,8	41,5±9	50,8±9	33,7±4,6	37,9±7,6
13,7±2	66,8±3,3	50,8±7,2	28±4	40,2±5,1	32,4±9,2
2,6±0,7	5,9±1,2	11,5±3	15,4±2,4	20,2±3,7	15,3±2,3
48,7±8	45,9±3,3	54,3±6,9	44,4±4	60,6±2,6	71,2±6,3
38,4±3,4	15,4±2,3	36,6±6,3	47,4±5,3	56,6±4,6	56,4±7,3
10,7±1,4	8±1,7	25,6±4	32,8±4,5	47,2±7,8	45,2±3,2

з е н к а

—	750±113	1244±274	1345±102	1050±101	1240±135
304±26	380±60	1235±189	684±151	877±83	1309±116
127±22	175,9±20	518±56	1005±86	1001±65	895±99

м у с

960±161	950±98	1182±192	1168±137	1080±137	1185±123
475±39	545±43	1385±134	700±109	910±144	1145±125
118±19	380±60	200±33	166±22	298±55	480±65

части сохранившихся неповрежденными клеток-предшественников, а также стволовых клеток, находящихся на разных стадиях повреждения. Абортивный подъем лимфоидных клеток — «лимфоидный пик» — наблюдается не только за счет собственных клеток кроветворных органов, но и за счет миграции клеток из других тканей. Существенно, что возрастание количества лимфоидных клеток оказывает влияние на восстановление и других клеточных элементов.

По данным С. П. Ярмоненко, существующая связь между дозой облучения животного, числом погибших клеток и началом регенерации в костном мозге, тимусе, селезенке, лимфатических узлах позволяет использовать величину общего количества клеток в

кровотворной ткани в единице ее объема в качестве надежного количественного критерия оценки тяжести лучевого поражения организма в определенные сроки после облучения.

Показатели гематологических изменений, используемые для клинической оценки тяжести лучевой болезни, отражают нарушения, происходящие в кроветворных органах, поскольку сами клетки крови обладают высокой устойчивостью к непосредственному действию ионизирующей радиации. Оценка количественного состава и последовательности морфологических изменений разных клеток периферической крови широко применяется в медицине и радиобиологии.

Уже после облучения млекопитающих в невысоких, нелетальных дозах (например, 0,5—2,0 Гр, общее однократное облучение γ -лучами) в течение короткого периода времени (секунды — часы) происходит заметное уменьшение количества лейкоцитов, вслед за которым наступает кратковременное увеличение их количества, сменяющееся в дальнейшем прогрессирующим падением. При увеличении дозы облучения фаза падения количества лейкоцитов может быть продолжительной и значительно более глубокой. По данным работ японских врачей снижение числа лейкоцитов у человека до 1500 кл. в 1 мм^3 означает, что у пораженного имеется мало шансов на выздоровление; падение уровня лейкоцитов до 400 кл. в 1 мм^3 свидетельствует о наиболее вероятном летальном исходе в течение двух недель после облучения. Количество лейкоцитов в крови определяется в основном двумя наиболее многочисленными группами клеток: лимфоцитами и нейтрофилами. Изменение количества лимфоцитов и нейтрофилов после облучения происходит неодновременно и может иметь неодинаковую направленность. Различия, наблюдаемые в динамике содержания нейтрофилов и лимфоцитов, объясняются тем, что они имеют различное происхождение: нейтрофилы образуются в костном мозге, а лимфоциты — также и в лимфоидной ткани. После облучения животных в их кроветворных органах происходят два противоположно направленных процесса: с одной стороны, наблюдается ускоренное формирование клеток за счет быстрого созревания всех клеточных элементов, а с другой — торможение образования новых клеток из недифференцированных предшественников и распад клеток. Этим и объясняют смену в периферической крови повышенного содержания клеточных элементов цитопенией, такая смена происходит не одновременно для разных клеток крови.

Лимфоидная ткань обедняется клеточными элементами раньше, чем ткань костного мозга. В связи с этим в начальный период лучевой болезни в периферической крови возникают сдвиги числа лимфоцитов и нейтрофилов противоположной направленности. С первых минут острого лучевого поражения наблюдается лимфопения, которая прогрессирует на протяжении всего лучевого поражения, количество лимфоцитов может снизиться до 10% от содержания их в норме. При нелетальных дозах радиации восста-

новление числа лимфоцитов начинается через несколько дней после облучения. При более высоких дозах количество лимфоцитов может увеличиться лишь через несколько недель. Изменение уровня нейтрофилов не зависит от колебания численности лимфоцитов. Наблюдаемый в начальный период лучевого поражения лейкоцитоз обусловлен в основном увеличением числа нейтрофилов, которое часто бывает неравномерным, волнообразным и непродолжительным; со временем возникает нейтрофилопения. Число нейтрофилов при одной и той же дозе облучения снижается медленнее, чем число лимфоцитов. Количество нейтрофилов обычно снижается до минимума в терминальный период лучевого поражения; восстановление же их количества в крови служит одним из показателей выздоровления облученных организмов.

При лучевой патологии наблюдаются морфологические изменения белой крови: появляются гиперсегментированные нейтрофилы, увеличивается фрагментоз ядер нейтрофилов. Вскоре эта картина сменяется сдвигом лейкоцитарной формулы влево при отсутствии гиперсегментированных нейтрофилов и уменьшении фрагментоза их ядер. Поражение лимфоцитов заключается в пикнотизации ядер, кариорексисе, кариолизе и затем в лимфолизе. Помимо этих изменений часто наблюдается уплотнение лейкоцитов, их набухание, увеличение в размерах, накопление пигментов, обилие зерен, разрыхление структуры ядра и др.

Уменьшение числа тромбоцитов часто следует за снижением числа нейтрофилов и уже отчетливо заметно в первые часы после лучевого воздействия. Тромбоцитопения приводит к увеличению времени свертывания крови. Считают, что содержание в 1 мм^3 крови тромбоцитов ниже 80 тыс. представляется уже опасным для человека.

Изменение содержания эритроцитов значительно менее выражено по сравнению с другими клетками крови, однако процесс восстановления красных кровяных клеток затягивается на месяц и более. В начальный период лучевой болезни ни число эритроцитов, ни содержание гемоглобина в крови практически не изменяются, однако устойчивость эритроцитов к гемолитическим агентам нарушается уже вскоре после облучения животных.

Клетки крови и ее плазма обладают сравнительно высокой устойчивостью к действию ионизирующей радиации (*in vitro*).

Биохимические сдвиги в крови облученных животных отчетливо выражены лишь в разгар лучевого поражения, оставаясь на начальных этапах поражения малозаметными. В терминальной стадии лучевой болезни нередко развивается анемия апластического типа, в этих случаях наблюдаются резко выраженные изменения дыхательной функции крови. Кровь теряет способность снабжать ткани достаточным количеством кислорода, и в результате гипоксии организм погибает. Однако при острых лучевых поражениях смерть может наступить от тяжелой лейкопении, кровоизлияний, сопутствующих инфекционных заболеваний.

Нарушения процессов свертывания крови в период разгара лучевой болезни вызваны неполноценностью реакции уже в первой фазе свертывания — образования тромбокиназы. Так, существует отчетливая зависимость инактивации тромбокиназы от величины дозы облучения животных. Биохимические нарушения, наблюдаемые в костном мозге и лимфоидных тканях облученных животных, связаны с изменениями соотношения клеточных популяций в этих тканях. Поэтому в биохимических опытах так важен морфологический контроль за состоянием клеток изучаемых органов и тканей. Отсутствие такого контроля может привести к противоречивым результатам, искажению истинной биохимической картины и ошибочным выводам. Особенно важен морфологический контроль при исследовании высокодифференцированных кроветворных тканей, обладающих большой неоднородностью клеточной популяции с неодинаковой устойчивостью клеток к ионизирующей радиации и с различной локализацией ферментов в компартментах клеток. Например, костный мозг содержит гетерогенную клеточную популяцию, включающую несколько категорий быстроделящихся клеток: эритро-, миело- и тромбопоэтических. В тимусе можно выделить следующие морфологические компоненты: ретикулярные клетки, тельца Лассалы; малые, средние и большие лимфоциты (тимоциты); кровеносные сосуды, лимфатические пути, соединительнотканые структуры. Каждый из этих компонентов тканей обладает неодинаковой устойчивостью к облучению.

Мы уже отмечали, что под действием ионизирующей радиации может происходить либо интерфазная, либо репродуктивная (митотическая) гибель клеток. Интерфазной гибели клетки предшествует появление пикнозов, затем, еще до вступления в митоз, клетка теряет способность к нормальной жизнедеятельности, а гибель ее происходит в момент митоза (или вскоре после него, по прошествии лаг-периода). Конкретные биохимические механизмы, приводящие клетку к гибели, еще в достаточной степени не установлены. Известно, что интерфазная гибель облученных лимфоидных клеток обычно не сопровождается ингибированием синтеза нуклеиновых кислот. По-видимому, ведущую роль в развитии процессов интерфазной гибели играет изменение проницаемости и структуры ядерных мембран, нарушение ядерного окислительного фосфорилирования (рис. V—4). Например, ядерное фосфорилирование в тимоцитах нарушается уже через один час после облучения крыс в дозах 0,25—1,0 Гр и восстанавливается через четверо суток. Через два часа после облучения в дозе 10 Гр способность ядер тимуса синтезировать АТФ полностью подавляется, а через четыре часа происходит снижение количества цитохромов *b* и *c*. Однако механизмы этих нарушений еще окончательно не установлены. Предполагают, что они связаны с первичным изменением ядерной мембраны, нарушением проницаемости мембран и выходом из них ряда веществ, активно влияющих на процессы, осуществляющие синтез макроэргов и ядерное фосфорилирование. В дальнейшем

происходит нарушение синтеза короткоживущих информационных РНК и кодируемых ими белков. Обнаруживаемое в экспериментах снижение включения меченых предшественников в РНК является частью сложного процесса деградации, происходящего в кроветворных тканях облученных животных. Падение удельной радиоактивности клеточной РНК в процессе лучевого поражения может являться следствием подавления синтеза РНК и предшествующих ему процессов: новообразования РНК-полимеразы, белков ДНП, предшественников РНК и ферментов, участвующих в их синтезе. На более поздних стадиях лучевого поражения происходят многосторонние изменения структурной и функциональной организации клеточных органелл, нарушения обменных процессов вне митотического цикла, радиационное изменение клеточных популяций вследствие интерфазной гибели. Репродуктивная гибель клеток также связана с глубокими изменениями нуклеинового обмена (рис. V—4).

Изменения в желудочно-кишечном тракте при лучевом поражении

Еще задолго до выраженной картины желудочно-кишечного синдрома в слизистой оболочке желудка и особенно кишечника обнаруживаются признаки, свидетельствующие об изменениях тонко отрегулированных процессов смены клеточных форм. Именно в связи с этими изменениями слизистые оболочки отнесены к высокочувствительным тканям. Наиболее существенным в лучевых изменениях желудочно-кишечного тракта является быстрое и глубокое опустошение тканей. Так, клеточное опустошение в кишечнике крипт уже завершается на первые-вторые сутки, а ворсинок — на третьи-четвертые сутки после облучения мышей (рис. VI—9). У животных, выращенных в стерильных условиях, скорость клеточного опустошения крипт и ворсинок замедляется вдвое, что говорит об участии кишечной флоры в развитии желудочно-кишечного синдрома.

По сравнению с костным мозгом обычное, нормальное обновление клеток в криптах и ворсинках кишечника протекает с большей скоростью и нарушается при больших дозах облучения, а радиорезистентность стволовых клеток кишечника в несколько

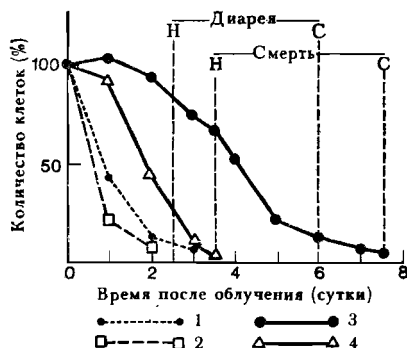


Рис. VI—9. Скорость снижения количества эпителиальных клеток из крипт, 2, 4, и ворсинок, 1, 3, нормальных и стерильных мышей после облучения их в дозе 30 Гр (в процентах к числу клеток необлученного кишечника) (по Герберу и Альтману, 1970)

раз превышает устойчивость к радиации стволовых клеток костного мозга. Этим объясняется более резкий процесс клеточного опустошения в кишечнике при кишечном синдроме по сравнению с опустошением клеток в костном мозге при костномозговом синдроме. Облучение в дозах от 10 до 100—150 Гр, вызывающее 3,5-дневный эффект лучевого синдрома (а для мышей, выращенных в стерильных условиях, — 7,3-дневный эффект), создает условия, при которых эпителиального покрытия желудка и кишечника уже недостаточно для поддержания жизни организма. Меньшие дозы облучения, как известно, вызывают более продолжительный, зависящий от поглощенной организмом энергии излучения костномозговой синдром, в развитии которого решающее значение имеет динамика клеточности кроветворных органов. Все это еще раз свидетельствует о ключевой роли клеточной кинетики в развитии и исходе различных по степени тяжести лучевых поражений.

Развитие во времени морфологических изменений, сопоставленных с биохимическими и физиологическими, представлено в табл. VI—8. В ней приведены данные для тонкой кишки животных, облученных в «высоких» (соответствуют желудочно-кишечному синдрому) и «низких» (соответствуют костномозговому синдрому) дозах ионизирующей радиации.

Желудочно-кишечный синдром характеризуется комплексом нарушений, определяющих гибель облученного организма — это поражение эпителия желудочно-кишечного тракта, деструкция крипт и ворсинок и их опустошение в основном вследствие интерфазной гибели клеток; инфекционные процессы за счет кишечной флоры; закупорка и поражение кровеносных сосудов; нарушение баланса жидкостей и электролитов; изменение активного транспорта; возрастание активности ферментов автолиза, изменение других ферментативных процессов; снижение проницаемости кишечника для питательных веществ.

Если облучение производится в меньших дозах, т. е. в дозах, вызывающих костномозговой синдром, то уже на пятые сутки после радиационного воздействия можно наблюдать восстановление клеточного эпителия, а к концу первой недели — и других морфологических, биохимических и физиологических нарушений. Наряду с этим развиваются лучевые нарушения желудочно-кишечного тракта, характерные для периода выраженной симптоматики костномозгового синдрома: развиваются всевозможные кровоизлияния, иногда представленные в виде отдельных геморрагий, но чаще — в виде больших очагов, распространяющихся по всему кишечнику; на поздних стадиях поражения наблюдаются изъязвления и некробоз эпителиального покрова, усиление автолитических процессов; в желудке появляется тканевый микробизм — ограниченное и редкое явление, однако в кишечнике довольно часто в зонах некроза происходит скопление огромного количества кишечной флоры, распространяющейся с током лимфы и крови и вызы-

Схема временной последовательности морфологических, биохимических и физиологических изменений в тонкой кишке облученных животных
(по Г. Герберу и К. Альтману, 1970)

Время после облучения	Морфологические изменения	Биохимические изменения	Физиологические изменения
0—3 ч	1) Задержка митотической активности + повреждение хромосом 2) Повреждения митохондрий и ядерных мембран 3) Набухание митохондрий 4) Образование цитолизом + возрастание количества лизосом	1) Пониженное присоединение предшественников к ДНК 2) Повышение активности лизосомальных ферментов	1) Замедление процессов опустошения желудка от пищи 2) Нарушение кишечной перистальтики
3—24 ч	1+4 (см. выше) 5) Редкая гибель в интерфазе 6) Увеличение размеров ядер 7) Относительное возрастание содержания бокаловидных клеток 8) Поражение сосудов (закупорка)	<i>Низкие дозы: 1+2 (см. выше)</i> 3) Разжижение слизистой оболочки, пониженное содержание белков, ДНК и т. д. 4) Постепенное снижение синтеза РНК и белков 5) Активация фосфатазы и протеолитических ферментов 6) Снижение содержания серотонина, увеличение ацетилхолина и изменения активности ферментов, разрушающих биогенные амины <i>Высокие дозы:</i> 7) Снижение потребления глюкозы и образования цитрата	1+2 (см. выше) 3) Пониженный активный транспорт электролитов, жидкостей и углеводов

Время после облучения	Морфологические изменения	Биохимические изменения	Физиологические изменения
1—3 сут	<i>Низкие дозы:</i> постепенное восстановление, возобновление митотической активности в криптах <i>Высокие дозы:</i> 1+8 (см. выше) 9) Постепенное обнажение крипт, потом ворсинок 10) Ворсинки иногда покрыты аномальными клетками	<i>Низкие дозы:</i> постепенное восстановление, повышенное потребление глюкозы <i>Высокие дозы:</i> 1+7 (см. выше) 8) Снижение содержания в слизи Na^+ оболочке K^+ и повышение Na^+	<i>Низкие дозы:</i> восстановление <i>Высокие дозы:</i> 1+3 (см. выше) 4) Изменения в кишечной флоре
После 3 суток	<i>Низкие дозы:</i> восстановление <i>Высокие дозы:</i> опустошение крипт и ворсинок	<i>Низкие дозы:</i> восстановление с «отклонениями» синтеза ДНК, белков, потребление глюкозы <i>Высокие дозы:</i> 1+8 (см. выше)	<i>Низкие дозы:</i> восстановление <i>Высокие дозы:</i> 1+4 (см. выше) 5) Пониженная всасываемость жиров и других питательных веществ 6) Утечка белков из кишечной полости 7) Потеря электролитов и воды 8) Диарея 9) Гибель

вающей инфекционные осложнения в облученном организме. Нарушения в желудочно-кишечном тракте развиваются в соответствии с тяжестью лучевого поражения, являясь в отдельных случаях даже причиной гибели организма при костномозговом синдроме.

Изменения центральной нервной системы при лучевом поражении

Центральная нервная система — наиболее радиорезистентная «критическая система». Ее решающая роль в летальном исходе лучевого поражения проявляется при действии массированных доз ионизирующей радиации (сотни грэй). В отличие от других критических систем — кроветворных органов и желудочно-кишечного тракта — зрелая нервная ткань представляет собой непролиферирующую клеточную систему, состоящую из высокодифференцированных клеток, замещения которых в организме не происходит. Гибель нервных клеток, приводящая к церебральному синдрому, наступает вскоре после массированного облучения и спустя несколько часов после радиационного воздействия вызывает летальный исход. В ответ на облучение ткань мозга реагирует как единая система: прямые поражения нейронных структур и расстройства циркуляции, связанные с поражением стенок кровеносных сосудов, обычно сопутствуют друг другу.

В начальном периоде лучевого поражения, возникшего в результате тотального однократного равномерного облучения, возникают общемозговые и дисэнцефальные симптомы, проявляющиеся в сердечно-сосудистых нарушениях (изменение кровяного давления, тахи- и брадикардия), нарушениях терморегуляции, обмена веществ. Они связаны с изменениями тех отделов мозга, в которых наблюдаются и наибольшие структурные изменения: гипоталамической области, среднего и продолговатого мозга. Морфологические, биохимические и физиологические нарушения коры больших полушарий в большинстве случаев восстанавливаются.

Как и в других органах, на высоте развития острой лучевой болезни в головном мозге обнаруживаются расстройства кровообращения, наблюдаемые в форме плазморрагий, периваскулярных отеков и кровоизлияний в вещество и оболочки мозга. Однако эти изменения не носят такого катастрофического характера, как в других органах. Повреждения капиллярных сосудов проявляются в виде набухания эндотелиальных клеток, а в более крупных кровеносных сосудах изменениям подвергаются и другие структуры: набухают мышечные клетки и соединительнотканые волокна. При отдаленных сроках острого лучевого поражения животных возникающие некробиотические процессы в паренхиме мозга выявляются часто при наличии расстройств кровообращения, а также на фоне ухудшенного снабжения ткани мозга кислородом.

Морфологические изменения в спинном мозге выражены слабее, чем в головном. В отличие от зрелой нервной ткани мозг мо-

лодых животных, в особенности плодов, обладает высокой радиочувствительностью, даже более высокой, чем другие ткани организма. Отмечают, что облучение плода в утробе матери в сравнительно невысоких дозах радиации приводит не только к значительному морфологическому нарушению определенных образований мозга, но и к полному разрушению целых его отделов. Так, облучение эмбриона в дозах 0,5—2,0 Гр приводит к микроцефалии и к полному разрушению центральной нервной системы, хотя во взрослом организме такие нарушения невозможно вызвать большими дозами ионизирующей радиации. Высокая радиочувствительность нервной ткани эмбриона объясняется общей закономерностью, заключающейся в том, что в зависимости от времени формирования и дифференцировки органов и тканей в онтогенезе любые из них становятся крайне чувствительными к радиации независимо от их радиочувствительности во взрослом состоянии. Биохимические изменения центральной нервной системы могут наблюдаться в ранний период острого лучевого поражения. Одной из важных причин лучевых нарушений в нервных клетках мозга облученных животных считают ранние (спустя несколько минут после облучения) изменения в фосфолипидах биомембран, нарушение проницаемости мембран для ионов, приводящее к потере ионов калия и повышенному накоплению ионов натрия. К другим ранним проявлениям биохимических изменений относят: угнетение окислительных процессов в нервных тканях головного мозга, разобщение окислительного фосфорилирования, дискоординацию углеводно-фосфорного обмена; нарушение азотистого и нуклеинового обмена в коре больших полушарий мозга; фазовые колебания во времени после облучения активности цитохромоксидазы и сукциндегидразы коры, подкорки и продолговатого мозга. Наиболее чувствительная реакция на облучение — это нарушение селективной проницаемости гемато-энцефалического и гисто-гематических барьеров: в начальный период лучевого поражения происходит резкое увеличение проницаемости, а на «высоте клинических изменений» — торможение с последующим его восстановлением в процессе выживания облученных животных.

Упомянутые ранние биохимические изменения обнаруживают тесную связь с нарушениями деятельности центральной нервной системы: биохимические изменения создают неблагоприятный фон для проявления функциональной активности нервной ткани, а измененное состояние клеток головного и спинного мозга еще более усугубляет сосудистые и обменные лучевые нарушения.

Оценивая биохимические и морфологические изменения центральной нервной системы, следует отметить необычайно большую разницу в радиочувствительности для различных участков, в том числе и для соседних структур однотипных тканей мозга. Например, среди основной массы неизменной ткани отдельными группами или поодиночке «вкраплены» поврежденные нервные клетки, клетки глии или нервные проводники даже в период выраженных

клинических изменений острого лучевого поражения организма. Это объясняется тем, что высокой радиочувствительностью обладают именно те микроструктуры, которые в момент облучения находятся в активном функциональном состоянии.

Согласно представлениям Л. А. Орбели, в тканях мозга (так же, как и в любой другой ткани) в активном функциональном состоянии находится лишь незначительное количество клеток, остальные — в латентном, покоящемся, «потенциально активном» состоянии. Поэтому непосредственное повреждение претерпевает относительно небольшая часть клеток и на фоне незначительных, малозаметных морфологических изменений в нервной ткани у облученных животных часто обнаруживаются отчетливые функциональные сдвиги центральной нервной системы. Так, по данным А. Б. Цыпина и Ю. Г. Григорьева, изменение корковой электрической активности происходит уже через несколько секунд после общего однократного облучения животных в дозах, меньших 0,03 Гр! Современными методами еще пока не удается обнаружить морфологические лучевые изменения в функционирующих нервных клетках при столь слабых воздействиях ионизирующей радиации.

Используя тонкие методы электроэнцефалографии, М. Н. Ливанов показал связь между нарушениями биоэлектрической активности коры мозга и изменениями условнорефлекторной деятельности облученных крыс и собак. В первые часы после облучения автор наблюдал возрастание биоэлектрической активности параллельно с усилением условнорефлекторной деятельности у животных, что соответствовало ослаблению процессов коркового, внутреннего торможения и относительно преобладанию процессов возбуждения. В последующие периоды лучевого поражения биоэлектрическая активность снижается, процессы возбуждения ослабевают и развиваются процессы запредельного торможения; условнорефлекторная деятельность при этом заметно ослабевает или в отдельных случаях полностью выпадает. Наиболее значительные изменения претерпевают сосудистые и секреторные условнорефлекторные реакции, в меньшей степени — двигательные.

В основе нарушений функций коры у облученных животных лежат изменения центрально-периферических взаимоотношений в нервной системе, меняется возбудимость анализаторов и рецепторов; нарушенная импульсация с периферии влияет на высшие отделы центральной нервной системы, изменения которой, в свою очередь, сказываются на периферии.

Последовательность морфологических, биохимических и физиологических изменений центральной нервной системы при различных синдромах лучевого поражения животных схематично представлена в табл. VI—9. Нарушения функционального состояния центральной нервной системы наблюдаются не только после общего однократного облучения, но и в результате локального действия радиации на головной мозг, а также в результате облучения

Схема временной последовательности морфологических, биохимических и физиологических изменений центральной нервной системы у облученных животных

Время после облучения	Морфологические изменения	Биохимические изменения	Физиологические изменения
Минуты	1) изменение структур биомембран нервных клеток коры головного мозга	1) нарушение ионной проницаемости биомембран; снижение содержания в клетках K^+ и повышение Na^+	1) усиление биоэлектрической активности коры головного мозга
Часы	2) петехиальные и очаговые кровоизлияния в нервных тканях; набухание эндотелиальных, мышечных клеток, соединительнотканых волокон кровеносных сосудов 3) деструкция активно функционирующих нервных клеток в результате прямого действия радиации 4) гибель части клеток	2) угнетение окислительных процессов; разобщение процессов окислительного фосфорилирования; дискоординация углеводно-фосфорного обмена 3) усиление аутолитических процессов	2) нарушение селективной проницаемости гемато-энцефалического барьера 3) непосредственное повреждение ткани мозга в сочетании с влиянием на него других пораженных систем, прежде всего — кровеносных сосудов 4) гибель организма
Облучение в «сверхлетальных» дозах, вызывающее церебральный синдром			
Часы — первые сутки	2) слабо выраженные единичные кровоизлияния в ткани мозга; незначительные повреждения кровеносных сосудов	3) усиление активности цитохром-оксидазы и угнетение сукцинатдегидрогеназы 4) нарушение азотистого и нуклеинового обмена в коре больших полушарий головного мозга 5) возрастание в крови и мочевых продуктах	3) общемозговые и дисциркуляторные симптомы; нарушение функций гипоталамической области, среднего и промежуточного мозга; сердечно-сосудистые изменения 4) ослабление процессов торможения в коре головного мозга; усиление условно-рефлекторной деятельности, наблюдаемое на фоне повышенной биоэлектрической активности коры мозга
Облучение в меньших дозах, вызывающее острое лучевое поражение			

Продолжение табл. V/1-9

Время после облучения	Морфологические изменения	Биохимические изменения	Физиологические изменения
Период разгара болезни	2) внешние мозг выглядят малоизмененными; отеки и кровоизлияния, расстройства кровообращения; повреждаются стенки кровеносных сосудов мозга	2) фазовые изменения активности ферментов: окисления и фосфорилирования, нуклеинового, азотистого, белкового, углеводного обмена	4) угнетение процессов возбуждения в коре головного мозга; ослабление условнорефлекторной деятельности, наблюдаемое на фоне пониженной биоэлектрической активности коры мозга
Исход болезни	3) на поздних стадиях болезни в отдельных участках паренхимы мозга возникают некротические процессы 4) гибнут в первую очередь высокофункционалирующие нервные клетки в результате прямого действия радиации, а также при опосредованном влиянии других пораженных систем		5) ухудшение снабжения мозга кислородом 6) нарушение центрально-периферических взаимоотношений в нервной системе организма; взаимное влияние центральной нервной системы и других систем в облученном организме: усугубление патологических процессов 7) в зависимости от дозы облучения — восстановление организма от легкого поражения или его гибель (костно-мозговой или желудочно-кишечный синдромы)

других участков тела животного, что свидетельствует о важной роли опосредуемого влияния ионизирующей радиации на мозговую ткань. В сложной картине лучевой патологии значительное место занимают нарушения деятельности единой регулирующей системы организма — нейроэндокринной.

Изменения эндокринной системы при лучевом поражении

При остром лучевом поражении в начальный период наблюдается усиление активности желез внутренней секреции, особенно надпочечников, передней доли гипофиза и в меньшей степени щитовидной железы; происходит набухание секреторных элементов, изменение клеточного состава и содержания секретируемых гормонов. В процессе развития лучевого поражения происходит нарастание дистрофических изменений эндокринных органов, а в некоторых из них (передняя доля гипофиза, корковое и мозговое вещество надпочечников, щитовидная железа) обнаруживаются также и явления гипертрофии и гиперплазии секреторных элементов. Проявляются признаки подавления и дискоординации функций эндокринной системы, а также извращения реакций органов на действие гормонов в облученном организме. В период выраженных клинических изменений обычно наблюдается глубокое угнетение деятельности органов внутренней секреции, развиваются дегенеративно-некробиотические и атрофические процессы.

Нарушенная деятельность эндокринной системы приводит к глубоким изменениям регуляторных биохимических процессов, иммунобиологических и ряда нейровегетативных реакций, к расстройству гемодинамики, терморегуляции, извращению регуляции и деятельности многих органов и систем.

К наиболее радиочувствительным органам эндокринной системы относят половые железы, которые уступают в этом отношении лишь органам кровотока. Другие железы внутренней секреции менее чувствительны к действию ионизирующей радиации, располагаясь по мере возрастания радиорезистентности (по морфологическим признакам) в такой последовательности: надпочечники, гипофиз, щитовидная железа, островки поджелудочной железы и, наконец, наиболее радиорезистентная — парашитовидная железа. Радиорезистентность этих желез связана с тем, что их ткани состоят из высокодифференцированных функциональных клеток, практически не способных к физиологической регенерации.

Поражение желез внутренней секреции (так же, как и поражение нервной ткани) складывается из прямого повреждения тканей радиацией, последующего клеточного опустошения и опосредованного влияния на них других пораженных органов и систем в облученном организме; прямое и опосредованное действия радиации настолько взаимосвязаны, что иногда невозможно количественно установить вклад каждого из них. Высокая функциональная чув-

ствительность эндокринной системы не противоречит представлениям о ее радиорезистентности. Считается, что именно высокая радиорезистентность органов внутренней секреции создает условия для временного сохранения способности эндокринной системы тонко реагировать на первичные процессы лучевого поражения организма.

Реакция гипофиз-адреналовой системы — одна из важнейших в патогенезе лучевого поражения, так как известно, что глюкокортикоиды активно влияют на радиочувствительные пролиферирующие ткани и развитие лучевой патологии протекает на фоне значительных изменений содержания гормонов в крови.

Реакция коры надпочечников и гипофиза в первые часы острого лучевого поражения напоминает неспецифическую реакцию на обычные раздражители, названную Селье адаптационным синдромом.

Уже спустя несколько минут после облучения организма гипофиз-адреналовая система активизируется: наблюдается резкое накопление адренокортикотропного гормона, длящееся в течение нескольких часов. При всем своеобразии ионизирующей радиации ей присущи и черты обычного раздражителя, на который организм реагирует стереотипно, включая симпато-адреналовую и гипофиз-адренокортикальную системы, реакции которых совпадают во времени с процессами поражения критических систем, вызванных прямым действием радиации.

Обнаружив большое сходство в характере и последовательности проявления различных нарушений при повреждении клеток раздражителями и ионизирующей радиацией, Л. Х. Эйдус (1977) предположил, что запуск неспецифической реакции осуществляется во всех случаях в результате первичного поражения биомембран, нарушения ионного баланса в клетках и изменения ионного транспорта и последующего снижения конформационной подвижности макромолекул. На уровне целостного организма отмечается (Бак, Александр, 1963), что ионизирующая радиация, как и обычный стрессор, способна возбуждать переднюю долю гипофиза, а это приводит к резкому повышению синтеза адренокортикотропного гормона при снижении содержания холестерина и аскорбиновой кислоты в коре надпочечников; активизации секреторной функции коры надпочечников; появлению в крови необычно высоких количеств стероидных гормонов, оказывающих влияние на весь организм.

Так же как и при действии любого раздражителя, при лучевом воздействии возрастание общей концентрации адренокортикотропного гормона происходит преимущественно за счет свободных, биологически активных кортикоидов при отсутствии нарушений пексической способности кортикосвязывающего глобулина. Таким образом, реакция гипофиз-адреналовой системы в первые часы острого лучевого поражения может быть рассмотрена как стресс-реакция.

Однако ионизирующая радиация, как известно, не обычный раздражитель и по характеру воздействия на организм значительно отличается от стрессорных агентов. Хорошо известно, например, что ионизирующая радиация в отличие от любого «обычного» раздражителя обладает способностью проникать непосредственно в любые структурные элементы живой системы и влиять на все процессы жизнедеятельности организма сразу, одномоментно; незначительная по величине энергия излучения способна вызывать несоизмеримо сильный (по сравнению с действием обычного раздражителя) биологический эффект поражения; организм не имеет каких-либо рецепторов для непосредственного восприятия ионизирующей радиации и передачи от периферии к центру раздражений, как это происходит при действии любого стрессорного агента, поэтому радиация проявляет свойства «тотального раздражителя».

В связи с этими свойствами ионизирующей радиации сами «участники» формирования неспецифической реакции оказываются в той или иной степени измененными, а наблюдаемый процесс первичного гиперкортицизма, по-видимому, во многом обусловлен развитием ранних лучевых нарушений в других органах и системах облученного организма, в результате которых накапливаются биологически активные агенты, влияющие на интерорецепторы.

Таким образом, реакция гипофиз-адреналовой системы на лучевое воздействие не имеет полной аналогии с неспецифической реакцией адаптационного синдрома и может быть рассмотрена как неадекватная реакция эндокринной системы на своеобразный раздражитель.

В период разгара острой лучевой болезни наблюдается вторая фаза активации функции коры надпочечников — возрастание уровня свободной, биологически активной фракции адренокортикостероидного гормона; фазовых изменений общего содержания гормона и прогрессивного снижения способности глобулина и транскортина связывать кортикостероиды. Период выраженных клинических изменений острой лучевой болезни протекает при постоянно повышенном уровне свободных, не связанных с белками плазмы крови кортикостероидных гормонов.

В этот период наблюдается также постепенная потеря способности печени инактивировать свободные кортикостероиды. Время возникновения вторичной реакции коры надпочечников зависит от величины дозы общего однократного облучения животных: с уменьшением дозы соответственно возрастает время начала реакции и ее выраженность. При абсолютно летальных дозах облучения вторичная реакция наступает обычно на третьи сутки после радиационного воздействия.

Так же как и первичная реакция, вторичное возрастание кортикостероидов развивается по типичному механизму: активация системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников. Однако вторичная реакция имеет свои особенности: при быстром протекании лучевого поражения и наступлении второй волны возрастания

кортикостероидов (на третьи сутки) реакция определяется нарушениями желудочно-кишечного тракта; клеточное опустошение костного мозга и лимфоидных тканей при более продолжительном течении лучевой болезни обуславливает вторичную реакцию коры надпочечников в более отдаленные сроки. Независимо от времени появления вторичной реакции надпочечников происходит усугубление лучевого поражения; являясь следствием повреждения критических органов и систем, вторичная реакция способна тормозить процессы восстановления радиочувствительных тканей (Мороз, Кендыш, 1975).

Влияния функции гипофиз-адrenalовой системы на процессы репарации подчиняются общему правилу: чем выше доза облучения, тем в меньшей степени проявляется опосредованное влияние ионизирующей радиации на одни и те же биологические процессы или системы.

Изменения функциональной активности гипофиза оцениваются также и по содержанию других тропных гормонов в облученном организме. Изменение содержания гонадотропинов в гипофизе претерпевает фазовые колебания: в течение первых нескольких суток после облучения происходит увеличение, а затем снижение гонадотропинов пропорционально дозе радиационного воздействия. На высоте лучевой болезни наблюдается повторное возрастание секреции гормона. Предполагают, что изменение гонадотропной активности гипофиза происходит, в основном, в результате опосредованного действия ионизирующей радиации на секретирующую ткань.

Изменения содержания тиреотропного и соматотропного гормонов и соответствующей секреторной активности гипофиза еще недостаточно хорошо изучены. По-видимому, эти изменения претерпевают после облучения животных также фазовые колебания, которые практически не оказывают существенного влияния на развитие и исход лучевой болезни.

Таким образом, в облученном организме происходят серьезные нарушения функциональной активности гипофиза, приводящие к аномальной регуляции биохимических и физиологических процессов, к потере способности постоянно поддерживать гомеостаз.

Щитовидная железа считается малочувствительной к действию ионизирующей радиации, однако в состоянии гиперплазии радиорезистентность ее снижается. Морфологические (деструктивные) изменения наблюдаются лишь начиная с дозы выше 50 Гр локального облучения железы. Процесс клеточного обновления очень незначителен. В начальный период острой лучевой болезни животных отмечается гиперплазия тиреоцитов и гипертрофия секреторных элементов железы. По мере развития заболевания в щитовидной железе, так же как и в гипофизе, прогрессируют явления дистрофического характера, сочетающиеся с рядом признаков, указывающих на усиление активности органа. Уменьшаются размеры фолликулов, фолликулярный эпителий гипертрофируется, расширяются интрафолликулярные пространства, увеличиваются

количества островковой ткани, вакуолизируется и рассасывается интрафолликулярный коллоид. Наиболее выраженные изменения происходят в разгар лучевой болезни, но иногда и в этот период изменения железы незначительны. На протяжении всего периода развития лучевого поражения наблюдаются фазы гипертиреоза, сменяющиеся гипотиреозом. Некоторые авторы отмечают несоответствия между функциональными и морфологическими изменениями щитовидной железы у облученных животных. По-видимому, это связано с тем, что устойчивая к ионизирующей радиации железа более чутко реагирует нарушением секреции в облученном организме, оставаясь некоторое время внешне еще не поврежденной. Сопоставляя изменения щитовидной железы при локальном ее облучении с нарушениями в облученном организме, отмечают, что поражение железы — результат опосредованного действия ионизирующих излучений. В экспериментах с модификацией функционального состояния щитовидной железы показано, что гипотиреозидизм незначительно облегчает течение лучевого поражения, а гипертиреозидизм отягощает его, однако эти нарушения секреции железы практически не сказываются на выживаемости облученных животных (Мороз, Кендыш, 1975).

Поджелудочная железа у облученных животных менее чувствительна к облучению, чем щитовидная, и ее изменения также малозначимы в патогенезе лучевого поражения. Содержание инсулина в крови при острой лучевой болезни претерпевает фазовые изменения: в первую неделю после облучения свободный и общий инсулин может возрастать в полтора — два раза, а в терминальный период иногда наблюдается гипоинсулинизм.

Паращитовидные железы из всех органов внутренней секреции самые устойчивые к действию радиации. Морфологические и функциональные изменения при острой лучевой болезни или отсутствуют, или выражены крайне слабо: в разгар лучевой болезни иногда наблюдается увеличение количества секреторных клеток, а в терминальный период — отдельные проявления дистрофических изменений секреторных элементов. В некоторых случаях отмечается изменение активности желез и незначительное уменьшение кальция в крови.

Половые железы — самые радиочувствительные из органов эндокринной системы: в них после облучения даже в небольших, нелетальных дозах наступает угнетение сперматогенеза и овогенеза.

Изменения функциональной радиочувствительности половых желез еще выше, чем морфологической. Так, потеря реактивности к гонадотропному гормону в облученных половых органах наблюдается уже тогда, когда еще не отмечается заметных морфологических изменений в структуре этих органов.

Ионизирующая радиация вызывает у самцов стерилизацию, азооспермию, олигонекроспермию и потерю способности к оплодотворению.

Эти нарушения в мужских половых железах связаны с прекращением деления клеток и деструкцией сперматогенного эпителия, в котором по мере развития поражения наблюдаются патологические митозы, вакуолизация, пикноз и распад ядра, вакуолизация и лизис цитоплазмы, сморщивание и распад клеток. По этим показателям наиболее радиочувствительными клетками в семенниках являются сперматогонии, затем сперматиды и сперматциты и, наконец, зрелые сперматозоиды, так же как и элементы незародышевого ряда. Клетки Сертоли и интерстициальные клетки — наиболее радиорезистентные. Клеточное опустошение в семенниках уже отчетливо наблюдается на ранних стадиях общего облучения животных в невысоких дозах (например, 1 Гр для мышей). В процессе развития острого лучевого поражения клеточное опустошение прогрессирует вплоть до полного исчезновения клеток зародышевого эпителия и появления половой стерильности; наряду с деструкцией в семенниках происходит явление своеобразного ускорения сперматогенеза — убыстренное созревание сперматозоидов.

В результате хронического действия ионизирующей радиации происходит снижение подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Это может служить наиболее чувствительным показателем хронического лучевого поражения. При локальном облучении половых желез или при общем однократном облучении животных снижение реактивности желез к действию гонадотропного гормона передней доли гипофиза также может служить чувствительным методом определения степени тяжести лучевого поражения; неодинаковая радиочувствительность семенников у млекопитающих отражает видовые различия животных к действию радиации.

Регенерация сперматогенеза у облученных животных может наступать даже после высоких доз облучения, причем период временной стерильности находится также в прямой зависимости от дозы облучения. Вначале, в процессе регенерации, появляются сперматогонии в результате деления сохранившихся стволовых клеток, затем — другие клетки, за исключением радиорезистентных клеток Сертоли и интрастициальных клеток Лейдига, которые, по-видимому, вообще не способны к физиологической регенерации.

Таким образом, поражение семенников и восстановление их функции непосредственно зависят от величины дозы ионизирующей радиации; лучевое повреждение клеточных компонентов происходит, в основном, в результате прямого действия излучений.

Лучевое поражение семенников сопровождается биохимическими изменениями, к которым относят в первую очередь снижение содержания нуклеиновых кислот, АТФ, креатина, холестерина, аскорбиновой кислоты, полисахаридов.

Женские половые железы обладают также высокой чувствительностью к ионизирующей радиации. Патологические изменения проявляются в нарушениях менструального цикла, изменениях течения беременности, преждевременных родах, мертворождении,

патологическом развитии эмбрионов, в различных генетических аномалиях потомства. Морфологические изменения яичников после облучения связаны, в основном, с процессами дегенерации и деструкции яйцеклеток и фолликулов при сохранении структуры стромы и клеток желтого тела. Устойчивость к радиации отдельных функциональных структур яичника снижается в такой последовательности: желтое тело, строма, примордиальные фолликулы, яйцеклетка, фолликулы в процессе развития до зрелого состояния, гранулезные клетки. Если семенники обладают значительной восстановительной способностью, то яичники у взрослой самки полностью лишены этой способности, поэтому у самок, в отличие от самцов, стерильность обычно необратима.

Секреция эстрогенов относится к радиорезистентным процессам: даже при стерилизующих дозах радиации секреция эстрогенов может существенно не отличаться от нормальной; снижение секреторной активности или ее полное подавление наступает лишь при высоких дозах ионизирующей радиации. На высоте острого лучевого поражения, даже при сохраняющейся нормальной скорости секреции эстрогенов, могут происходить нарушения соотношения отдельных компонентов гормонов, изменение их химической структуры, т. е. наблюдается секреция неполноценных по составу и биологическому действию гормонов. Изменения функций яичников в облученном организме влияют на обменные процессы, а это приводит, как и при кастрации, к значительному отложению жира в подкожножировой клетчатке.

Лучевые нарушения функций половых желез мало сказываются на развитии и исходе острых лучевых синдромов. Невысокие дозы ионизирующих излучений представляют опасность не столько для облучаемых организмов, сколько для их потомства. Более высокие дозы радиации вызывают подавление половой деятельности.

Поражение эндокринной системы при действии ионизирующей радиации обычно наиболее резко проявляется в изменении секреторной функции желез внутренней секреции; основную роль в нарушениях баланса гормонов, влияющих на развитие лучевой патологии, играет реакция гипоталамо-гипофиз-адреналовой системы.

Печень при лучевом поражении

Учитывая значение печени как «центральной биохимической лаборатории», ее барьерные функции, местонахождение на пути оттока крови из кишечника и т. д., можно понять причину того большого внимания, которое уделяют радиобиологи этому органу. Как показали морфологические исследования, печень обладает высокой радиорезистентностью, связанной с большой регенераторной активностью этого органа. Морфологические изменения печени наиболее выражены на поздних стадиях острого лучевого поражения и проявляются в расстройствах крово- и лимфообращения, в

дегенеративно-некробиотических изменениях паренхимы и стромы органа, отеке и анемии; по-видимому, в связи с близким расположением к кишечнику, в печени происходит скопление микрофлоры кишечной группы. Визуально различимых кровоизлияний, характерных для кишечника, желудка и других органов, в печени у облученных животных обычно не обнаруживают. Функциональные нарушения печени происходят даже при небольших, нелетальных дозах радиации. При этом отмечается угнетение желчеобразования и моторной функции внепеченочных желчных путей с последующим ухудшением расщепления и всасывания липидов в тонкой кишке.

Используя методы полярографии, удается обнаружить ранние биохимические изменения в клетках печени. Так, спустя несколько минут после облучения животного в клетках заметно возрастает содержание продуктов перекисного окисления липидов. Накапливающиеся гидроперекиси и перекиси свободных высших ненасыщенных жирных кислот обладают высокой биологической активностью — проявляют свойства эндогенных радиосенсибилизаторов, повреждают структуры внутриклеточных мембран, нарушая их проницаемость. С помощью электронной микроскопии показано, что в клетках печени вскоре после облучения существенно увеличивается количество пероксисом, нарушается структура мембран лизосом и митохондрий, а также эндоплазматического ретикула.

Повреждения структуры биомембран и изменения их проницаемости — типичная картина ранних патологических проявлений лучевого поражения не только печени, но и других органов и тканей. Структурная, функциональная и биохимическая гетерогенность клеток и различная радиорезистентность отдельных структур и функций обуславливают сложность и своеобразие реакций тканей и органов на облучение. Эти реакции являются причиной для развития начальных биофизических и биохимических нарушений, которые в печени проявляются наиболее многопланово, нарушается активный транспорт ионов и молекул, повреждается энергетический аппарат клеток, происходит структурная дезорганизация митохондриальных, лизосомальных и микросомальных ферментов и изменение их активности.

В зависимости от дозы радиации и времени, прошедшего после облучения, можно наблюдать изменение буквально любого биохимического процесса в печени; большинство биохимических нарушений имеют, как правило, фазовые сдвиги, соответствующие фазам острого лучевого поражения. Поэтому нет необходимости подробно перечислять все биохимические нарушения, происходящие после облучения, отметим лишь некоторые из них. Так, в начальной фазе и на высоте лучевой болезни происходит разобщение процессов окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях печеночных клеток; подавляются процессы фосфорилирования, снижаются уровни неорганического и лабильного

фосфора, возрастает потребление кислорода, уменьшается коэффициент R/O .

Характерным признаком острой лучевой болезни служит отрицательный азотистый баланс. Мы уже отмечали, что вскоре после облучения животных развиваются такие явления, как потеря аппетита, тошнота, рвота и серьезные нарушения желудочно-кишечного тракта. Это вызывает значительные изменения процессов

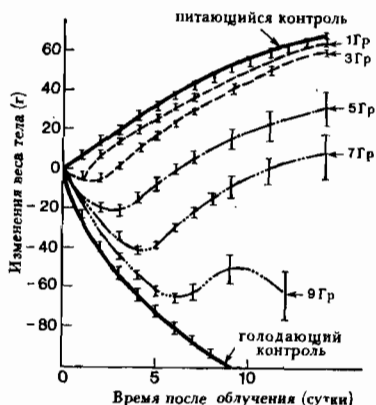


Рис. VI—10. Изменения веса тела у крыс после общего однократного облучения (величины выражены в процентах к контрольным животным) (по Герберу и Альтману, 1970)

переваривания, всасывания и усвоения пищи, что, в свою очередь, приводит к частичному или полному голоданию и к отрицательному азотистому балансу. Потеря аппетита и ряд связанных с нарушением питания процессов приводят к снижению веса органов и всего тела облученных животных (рис. VI—10, табл. VI—10).

Совершенно очевидно, что при описании биохимических изменений должен всегда учитываться фактор питания, состояние частичного голодания наряду с общим физиологическим состоянием облученного животного (а не только формальный отсчет времени, прошедшего после радиационного воздействия). В некоторых радиационно-биохимических исследованиях фактор питания не учиты-

вается, а это приводит к неправильной оценке прямого и опосредованного эффекта ионизирующей радиации. Исследование роли голодания при лучевой болезни в изменении азотистого баланса показало, что отрицательный азотистый баланс возникает у облученных животных с первых суток после радиационного воздействия и выражается большей величиной, чем у контрольных голодающих животных. Эти данные свидетельствуют о более сильном распаде тканевых белков под влиянием ионизирующей радиации.

Нарушение белкового обмена в печени в общих чертах отражает развивающуюся картину лучевого поражения. В частности, это видно по изменению активности ферментов аутолиза: активация ферментов в фазах первичной реакции и выраженных клинических изменений и снижение активности, временная нормализация — в латентную фазу.

Под влиянием опосредованного, а также и прямого действия радиации происходит денатурация и распад нуклеопротеидов, а также более радиорезистентных липопротеидов, гликопротеидов, хромопротеидов и простых белковых молекул. Следует подчеркнуть, что разрушения белков при непосредственном действии ра-

Изменение веса тела и тканей у необлученных и облученных животных
(7 Гр общего однократного облучения лучами Рентгена)*
(по Г. Герберу и К. Альману, 1970)

Ткань	Необлученные контроли	Время после облучения								
		3 ч	12 ч	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	6 дней	8 дней	10 дней
Все тело (вес в %)	100	98,8	98,2	98,6	92,2	88,2	87,0	87,8	90,5	94,5
Мышца (% от общего веса тела)	52,3±1,5	96,7 ^а	94,4 ^с	96,2 ^с	91,3 ^с	83,3 ^с	80,2 ^с	85,3 ^с	85,4 ^с	87,6 ^с
Кожа	20,7±1,6	97,0	97,4	101,4	93,8	86,4	91,1	87,7	94,3	98,2
Печень	4,77±0,53	101,3	95,8	96,4	90,8	97,2	94,7	94,6	96,1	106,5
Легкие	0,64±0,10	110,8	90,2	101,9	99,4	99,4	112,6	97,0	94,7	97,3
Сердце	0,332±0,03	101,5	105,4	104,8	103,0	97,3	98,8	98,8	97,3	106,6
Почки	0,87±0,15	106,2	104,6	99,0	100,9	86,4	92,1	98,5	94,2	103,3
Семенники	1,08±0,13	99,7	115,0	105,6	108,3	103,1	107,3	88,4	90,2	101,5
Селезенка	0,245±0,034	79,6 ^с	64,2 ^с	57,3 ^с	47,5 ^с	34,7 ^с	36,7 ^с	40,9 ^с	43,1 ^с	60,7 ^с
Головной мозг	0,632±0,046	103,8	101,6	105,7	107,4 ^а	99,1	106,8 ^а	104,0	97,2	102,1
Желудок	0,577±0,038	97,1	110,7 ^а	107,5	103,0	106,4	101,1	104,4	86,4	105,3
Тонкая кишка	2,22±0,27	98,0	88,7 ^а	83,9 ^с	72,6	90,1	121,0 ^с	111,2 ^а	86,4 ^а	105,5
Толстая кишка	1,02±0,11	87,7 ^а	82,7 ^а	90,0	86,5 ^а	105,1	120,6 ^а	116,0 ^а	97,5	97,8
Тимус	0,143±0,025	101,8	86,4	42,2 ^с	11,5 ^с	22,2 ^с	22,9 ^с	23,5 ^а	26,7 ^с	43,4 ^с

* Крысы, вес тела которых был непосредственно до облучения 300—350 г, имели в течение всего периода исследования свободный доступ к пище и воде.

Вес тела и тканей после облучения даны в процентах от соответствующих необлученных контролей. Крысы линии Холцман,

в значимости $L < 0,005$ с значимостью $L < 0,01$

диации можно обнаружить лишь при очень высоких дозах облучения. В облученном организме подобные изменения более значительны. В период разгара лучевой болезни наблюдается появление в моче повышенного количества аминокислот (например, глицина) и таких соединений, как таурин, что говорит о серьезных нарушениях аминокислотного обмена.

В начальный период лучевого поражения наблюдается повышенное выделение продуктов метаболизма нуклеиновых кислот: дезоксицитидина, псевдоуридина, пуринов (мочевой кислоты и ксантина), β -аминоизомасляной кислоты, дезоксиуридина и тимидина. Это проявление — следствие изменений метаболизма нуклеиновых кислот в печени, и в большей степени в радиочувствительных органах. Один из ранних признаков нарушения пигментного обмена в печени — повышенное содержание уробилина в моче облученных животных. Значительные изменения также происходят и в содержании в печени витаминов, гормонов, отдельных микроэлементов.

Биохимические исследования липидного и углеводного обмена подтверждают и дополняют данные о морфологических нарушениях в печени при острой лучевой болезни (например, один из признаков лучевой патологии — жировое перерождение печени). В клетках печени вскоре после облучения обнаруживается накопление нейтрального жира, происходит процесс липофанероза; одновременно холестерин, фосфолипиды, жирные кислоты и продукты их окисления, а также липопroteиды и продукты их распада поступают в кровяное русло. В печени и других органах и тканях уже с первых минут после облучения животных происходит снижение антиокислительной активности липидов. Наряду с жировым перерождением нарушается и гликогенообразовательная функция печени: продолжительный период прогрессирующей потери гликогена печеночными клетками часто завершается полным исчезновением гликогена в печени; наблюдается и гипергликемия.

Несмотря на многочисленные и глубокие биохимические изменения в печени облученных животных, все же не они причина непосредственной гибели организма. Биохимические механизмы, приводящие к гибели отдельных клеток, отмечались в предыдущих разделах данной книги. Как известно, печень не «критический орган» в исходе лучевых синдромов, и несмотря на наличие в ней выраженных процессов клеточного обновления, печеночные клетки весьма устойчивы к непосредственному действию ионизирующей радиации. Хорошо известно, например, что биохимические процессы в печени при прямом ее облучении в десятки и сотни раз более устойчивы по сравнению с теми же процессами в печени тотально облученных животных. Поэтому в основе функциональных изменений печени лежит нарушение деятельности лабильных центров регуляции стационарных состояний биохимических систем: нейрогормональных, гуморальных, систем клеточной регуляции. Важнейшую роль играет также поражение критических систем и

органов, так как нарушение их функций и гибель неизбежно отражаются и на деятельности печени.

Существенная особенность многоплановых взаимосвязанных функциональных нарушений печени состоит в том, что на фоне развития деструктивных процессов в ткани происходят периодические многофазные изменения ферментативного синтеза углеводного, липидного, белкового и нуклеинового обмена.

Органы дыхания при лучевом поражении

Легкие и воздухоносные пути долгое время считались радиорезистентными тканями, так как лучевые нарушения в них обнаруживали при облучении в больших дозах ионизирующей радиации. Однако это представление основывалось, как правило, на изучении результатов местного облучения. Сложность общей оценки радиочувствительности органов дыхания состоит в том, что они содержат клеточные структуры, значительно различающиеся по устойчивости к радиации. Так, хрящевая ткань воздухоносных путей и плевра радиорезистентны; лимфатическая ткань и сосудистая система легких, а также бронхиоларный эпителий и клетки, выстилающие альвеолы, радиочувствительны. В результате общего облучения организма в органах дыхания возникают изменения, находящиеся в полном соответствии с развитием клинических и анатомических признаков лучевой патологии. Например, в первую фазу изменений, в первые трое-четыре суток острой лучевой болезни, наблюдается набухание и частичный распад аргирофильных волокон; гиперемия, диapedез эритроцитов и отек в альвеолах; субплевральная эмфизема. После латентного периода (со второй недели) начинается новая фаза, характеризующаяся возрастанием проницаемости сосудов, периваскулярным выходом крови, кровоизлияниями, часто наблюдаемыми некрозами, бактериальной инфекцией, нейтропенической бронхопневмонией. У выживших животных происходит резорбция и регенерация с пролиферацией соединительной ткани, склеротические явления, а иногда образование костной ткани и слабая пролиферация бронхиального эпителия. Изменения органов дыхания при острой лучевой болезни развиваются на фоне резко подавленных клеточных реакций, поэтому на высоте заболевания не происходит фагоцитоза ни бактерий, ни продуктов тканевого распада. Предполагают, что при больших дозах облучения ведущим механизмом в лучевой патологии органов дыхания является разрушение капилляров, сопровождающееся эритропедезом и коллагенозом с последующим склерозированием и образованием костной ткани.

Меньшие дозы, не оказывающие значительного действия на эпителий, вызывают только слабый фиброз.

Таким образом, среди частных проявлений лучевой болезни изменения органов дыхания занимают значительное место в об-

щей картине лучевой патологии. В случаях возникновения пневмоний, представляющих собой вторичные, инфекционные осложнения, они могут оказаться решающим звеном в летальном исходе лучевого поражения организма.

Изменения некоторых «стабильных» органов и тканей при лучевом поражении

Ряд органов и тканей условно называют «стабильными» в связи с их высокой радиорезистентностью: морфологические, функциональные и биохимические изменения в них после облучения даже в высоких дозах незначительны; их способность к физиологической регенерации выражена слабо или практически отсутствует. Однако постлучевые изменения стабильных органов и тканей все же вносят известный вклад в общую картину лучевой патологии и поэтому будут кратко рассмотрены в настоящем разделе.

Почки — типично стабильный орган. Обычно поражение почек наблюдается при общем облучении животных в дозах в несколько десятков грэй. Почечные изменения проявляются в виде токсической нефропатии с геморрагическими признаками. На высоте заболевания наблюдается сочетание поражения сосудов с различной степенью нарушения кровообращения и изменений канальцевой системы почек. Некоторые авторы отмечают возможное влияние нарушенных функций почек на развитие лучевой болезни. Так, Л. Гемпельман, Г. Лиско и Д. Гофман, описывая острый лучевой синдром у людей в результате аварии в Лос-Аламосской лаборатории, отмечают, что у одного больного, погибшего на 9-е сутки, наблюдался инфаркт почки, а у другого больного, погибшего на 24-е сутки, были обнаружены дегенеративные изменения почечных канальцев, явившиеся одной из причин терминальной анурии и задержки азота. В ряде других работ отмечается, что при остром лучевом поражении происходит нарушение проницаемости почечных клеток, появляется белок и отдельные клетки в просвете капсул клубочков, наблюдаются кровоизлияния, жировая инфильтрация и некроз эпителия канальцев. Незначительное увеличение веса почек в первые сутки острой лучевой болезни связано с повышенным притоком воды в ткань. Биохимические изменения в почках также проявляются при высоких дозах радиации: наблюдается возрастание активности щелочной и кислой фосфатаз, аминотрансферазы; снижение активности каталазы, эстеразы, происходят фазовые изменения (подавление с последующей активацией) синтеза белков, активности пептидаз, содержания аминокислот, которые выделяются с мочой. О нарушении функции почек свидетельствует также резкое снижение содержания гиппуровой кислоты в моче, наступающее вслед за кратковременным увеличением ее концентрации в ранние сроки после облучения в дозах, превышающих 10 Гр. Наблюдаемое повышен-

ное образование в почках эритропоэтина может влиять на восстановление костного мозга у облученных животных.

Высокая устойчивость почек к поражающему действию ионизирующей радиации, вероятно, связана с тем, что обновление почечных клеток либо отсутствует, либо выражено очень слабо. Существует мнение, что лучевая патология почек обычно выражена в такой степени, что ей не следует придавать решающего значения в исходе лучевых синдромов (Краевский, 1957; Ярмоненко, 1977; и др.).

Мышечная и соединительная ткани еще более устойчивы к действию ионизирующей радиации, чем почки. Слабая мышечная атрофия наблюдается при облучении в дозах, превышающих 50 Гр, а выраженные морфологические изменения (геморрагия, некрозы) еще при более значительных дозах радиации. Функциональные и биохимические изменения могут быть обнаружены и при развитии желудочно-кишечного синдрома, однако они выражены слабо. Так, в дозе облучения 10 Гр происходит незначительное снижение тонуса, работоспособности мышц и увеличение времени релаксации; наблюдается тенденция к периодическим изменениям (или слабое снижение) таких биохимических показателей, как обмен фосфорных соединений, фосфорилазная, сукциндегидразная, цитохромоксидазная активность, содержание гликогена в скелетной мышце и др. Известно, что мышцы служат донаторами белков, фосфорных и пр. веществ для других органов в межтканевом обмене организма, поэтому изменения, происходящие в мышцах облученных животных, не могут совсем не сказываться на общей картине лучевой патологии. То же следует сказать и о соединительной ткани, проницаемость которой повышается спустя несколько дней после облучения животных в летальных дозах и может продолжаться в течение двух-трех недель. Повышение проницаемости связывают с радиационным повреждением основного соединительнотканного вещества, фибробластов, с повышением скорости распада мукополисахаридов, с уменьшением тучных клеток в коже. Ионизирующая радиация может оказывать прямое действие на основное вещество, вызывать деполимеризацию гиалуроновой кислоты, снижать вязкость мукополисахаридов волокон соединительной ткани кожи.

Структурные элементы кожи характеризуются относительно большими различиями в радиочувствительности. Кожа в целом представляет собой относительно радиочувствительную ткань, содержащую активно обновляющиеся клеточные системы. Микроскопические изменения в коже вслед за изменениями в костном мозге и в половых железах первыми свидетельствуют о лучевом поражении организма. В радиобиологической литературе достаточно подробно описаны изменения в коже, начиная от эритемы до некротических очагов. Временная эпиляция у человека происходит при общем облучении в дозах 4—5 Гр, при этом наблюдают разрушение сальных и потовых желез и подавление их секреции;

стойкое облысение — в дозах свыше 7 Гр. Известно, что поздние изменения в облученной коже являются результатом прямого действия радиации на эпителиальные клетки и косвенного влияния так называемого голодания и аноксии этих клеток. Некоторые изменения могут быть вторичными в результате возникшего инфицирования имевшихся лучевых изъязвлений кожи.

Костная и хрящевая ткани. Сформировавшиеся костная и хрящевая ткани у взрослых и старых организмов обладают сравнительно высокой радиорезистентностью, не способны к дальнейшим превращениям и могут быть отнесены к стабильным тканям. Однако в период роста кости и хрящи весьма чувствительны к действию ионизирующей радиации. Чувствительность тканей неодинакова в различных их частях и зависит от стадии развития. При острой лучевой болезни обнаруживается понижение количества остеобластов, аномальное набухание хрящевых клеток, являющееся первым признаком дегенерации в зоне первичного обызвествления. Уже спустя несколько дней после облучения животных в зоне окостенения появляется начальная избыточная гипертрофия хрящевых клеток, они содержат вакуоли, в них видны пикнотические ядра. Спустя неделю происходит полное разделение между хрящом и губчатой костью, в пластинках губчатой кости образуются мертвые остециты, исчезают остеобласты. Обычно через две недели после облучения столбики клеток и межклеточные мостики нарушаются, эпифиз утончается и механизм роста нарушается; рост в длину кости временно приостанавливается. В случае выживания животных при острой лучевой болезни восстановление костно-хрящевых структурных нарушений может завершиться спустя два месяца после облучения. Характерная особенность лучевых нарушений костной ткани — это отсутствие заметной зоны демаркации между нормальной и облученной частями. Однако в костях облученных животных могут появляться и некротические участки. В результате плохого кровоснабжения и незначительного количества клеток в ткани облученная кость быстрее подвергается инфицированию, чем нормальная, поддается переломам, заживления которых могут значительно задерживаться по сравнению с необлученной. Подавление посттравматической регенерации костной ткани сохраняется обычно в течение многих месяцев после облучения животных.

Известно, что костную систему, содержащую 99% кальция в организме, называют кальциевым депо. Поэтому биохимические изменения в растущей костной ткани могут оказывать значительное влияние на кальциевый баланс в облученном организме.

Влияние ионизирующей радиации на иммунитет

В процессе развития лучевого поражения, особенно в фазе выраженных клинических изменений, резко снижается устойчивость организма к инфекции: подавляется природная («естествен-

ная») резистентность организма к возбудителям инфекционных заболеваний, угнетается приобретенный иммунитет, нарушаются все его формы. Подавление резистентности организма к инфекции зависит от множества лучевых нарушений в организме, к ним относят, например, следующие: денатурацию и распад тканевых белков, повреждения гисто-гематических барьеров, поражение костного мозга, подавление продукции антител, повреждение стенки кишечника и ткани лимфатических узлов, нарушение барьерных функций селезенки, печени, изменение бактерицидных свойств сыворотки, лейкопению, угнетение фагоцитоза, бактериемию и развитие аутоинфекционного процесса. Бактериemia у облученных животных обусловлена проникновением бактерий из резервуаров нормальной микрофлоры организма (кишечника, носоглотки и др.) в кровь и дальнейшей инвазией органов и тканей. Бактериemia может возникнуть еще при нелетальных дозах общего однократного облучения в 1—2 Гр и с возрастанием дозы радиации проявляется все в большей степени. Она отмечается со вторых—четвертых суток острой лучевой болезни и прогрессирует, достигая максимального развития к концу второй недели. Проникновению микроорганизмов кишечной флоры в кровь и ткани облученных животных способствуют повреждения и изъязвления слизистой оболочки кишечника и капилляров, разрушение ретикуло-эндотелиальных барьеров и мезентериальных лимфатических узлов, а также лейкопения. Микрофлора кишечника легко проникает в кровь, где она размножается, тем более что бактерицидные свойства крови подавлены.

К числу основных причин, вызывающих бактериемию, относится количественное и качественное изменение кишечной микрофлоры после облучения. Так, у облученных крыс заметно увеличивается содержание кишечной палочки и стафилококков и резко снижается содержание молочнокислых бактерий. Уменьшение количества молочнокислых бактерий приводит к размножению их антагонистов, например синегнойных бактерий. Предполагают, что проникновение бактерий из кишечника в кровь и другие ткани зависит от увеличения концентрации микроорганизмов в кишечнике и накопления там веществ (возможно, бактериальных токсинов), повреждающих стенки кишечника. Лучевая бактериemia может быть вызвана не только нормальной микрофлорой кишечника, но и бактериями из носоглотки, зева и других полостей, органов и тканей облученных животных, в которых сосредоточиваются сапрофиты и патогенные микроорганизмы. Лучевую бактериемию рассматривают как проявление аутоинфекции, развивающейся на фоне падения сопротивляемости облученного организма к возбудителям инфекционных заболеваний. Снижение сопротивляемости организма к инфекции зависит от пострadiационного состояния белой крови. Лимфоцитопения приводит к подавлению искусственного иммунитета, а падение уровня лейкоцитов, выполняющих фагоцитарную функцию, снижает естест-

венную устойчивость организма к инфекции; после облучения подавляется не только фагоцитарная активность, но и миграционная способность лейкоцитов. По мнению многих авторов, такие изменения происходят в связи с тем, что у облученных животных костный мозг хотя и продуцирует лейкоциты, но они оказываются неполноценными вследствие повреждения их аутоантителами. Снижение способности к внутриклеточному перевариванию и миграции наблюдается и у макрофагов. Функциональные изменения макрофагов в облученном организме связаны с уменьшением их количества, размеров клеток, с повреждениями макрофагальной ткани, лимфатических узлов, селезенки, ретикуло-эндотелиальной системы.

Таким образом, опосредованное влияние ионизирующей радиации приводит к значительному повреждению микро- и макрофагальных систем, что оказывает влияние на проникновение бактериальной флоры через различные ткани и естественные барьеры. Эти повреждения зависят от степени лучевого поражения организма и находятся во взаимной связи с нарушениями всех систем органов и тканей. Важнейшим звеном в нарушении антимикробного иммунитета является повышение проницаемости гистогематических барьеров и угнетение бактерицидной способности тканей в сочетании с подавлением неспецифических детоксицирующих агентов: пропердина, лизоцима и других эндогенных бактерицидных веществ в облученном организме, играющих важную роль в защите животных как от ауто-, так и от экзогенной инфекции. Одним из центральных вопросов в изучении постлучевых нарушений приобретенного иммунитета является изучение действия ионизирующей радиации на образование антител. Хорошо известно, что радиация, даже в высоких, летальных для организма дозах, непосредственно не вызывает заметных функциональных изменений антител сыворотки крови. Многочисленными исследованиями выявлены некоторые особенности в развитии искусственного иммунитета при лучевом поражении. Так, облучение животного только тогда препятствует образованию антител, когда оно непосредственно предшествует попаданию или введению антигена в организм; иммунизация, проведенная за сутки и более до облучения, практически полностью эффективна — облученное животное сохраняет способность вырабатывать антитела. Угнетение антителообразования при введении антигена после облучения объясняется преимущественно непосредственным повреждением лимфоидной ткани и опосредованным влиянием радиации на другие антителообразующие системы. В процессе образования антител выделяют две фазы: начальную, радиочувствительную, быстропотекающую (не более 1—3 сут) и последующую — радиорезистентную фазу, охватывающую весь остальной период образования антител, когда радиация не влияет ни на динамику, ни на интенсивность этого процесса.

Подавление антителообразования в ответ на введение антиге-

на непосредственно до облучения свидетельствует о том, что, если образование антител началось, оно уже становится высокорезистентным, несмотря на поражение радиочувствительных антителообразовательных тканей (лимфатической ткани, костного мозга, селезенки). Лучевое поражение организма не вызывает изменения уровня антител, за исключением кратковременного снижения его в первые часы после облучения.

Отсутствие корреляции между общей резистентностью организма к инфекции и содержанием в крови антител у облученных животных позволило предположить, что антитела не определяют иммунитета при подавлении естественных защитных процессов в результате лучевого воздействия (Троицкий, Туманян, 1958).

Уменьшение естественной и искусственной устойчивости к инфекции может привести к обострению латентно протекающих хронических инфекционных процессов в облученном организме. Например, облучение, даже в небольших дозах, провоцирует у обезьян, носителей дизентерийных микробов, переход бессимптомной формы хронической дизентерии в клинически явную форму.

Обычно подавление иммунитета объясняют клеточным опустошением лимфоидной ткани в результате преимущественно прямого действия радиации на ткань. Однако, по мнению Н. Н. Клемпарской (1977, 1980), такое объяснение нельзя принять по трем возражениям: 1 — при действии малых доз на организм имеет место явно выраженная иммунодепрессия на фоне незначительных клеточных повреждений; 2 — даже при опустошении лимфоидной ткани введение антигена до облучения вызывает иммунный ответ и смягчение тяжести лучевого поражения; 3 — при локальном облучении небольшого объема ткани (без воздействия на всю лимфоидную систему) возникает иммунодепрессия. Такой антагонизм аутоенсибилизации и иммунного ответа подробно изучен во многих лабораториях. Аутоенсибилизация обнаружена при разных степенях тяжести лучевой болезни. Это ранняя и длительно сохраняющаяся реакция организма на облучение, степень интенсивности которой соответствует величине дозы облучения организма и тяжести поражения; аутоенсибилизация определяет иммунодепрессию, в результате которой развивается эндогенная инфекция, являющаяся главной причиной гибели облученного организма.

Таким образом, снижение иммунитета при лучевой болезни, угнетение защитных механизмов обуславливаются развивающимися в организме аутоиммунными процессами. Изменения в плазме, сыворотке крови, лимфе и других жидкостях могут происходить не только в результате прямого действия ионизирующей радиации на эти жидкости, но главным образом вследствие влияния поврежденных клеток и тканей организма; во всех случаях это приводит к поражению гуморальных защитных факторов, накоплению аутоантигенов в кровяном русле. К аутоантигенам, возникаю-

щим в облученном организме, относят продукты распада тканевых белков, а также продукты метаболизма неповрежденных тканей, не способные проникать в кровь у интактных животных.

В результате повышения проницаемости гисто-гематических барьеров, деструкции и нарушения антигенных свойств тканей

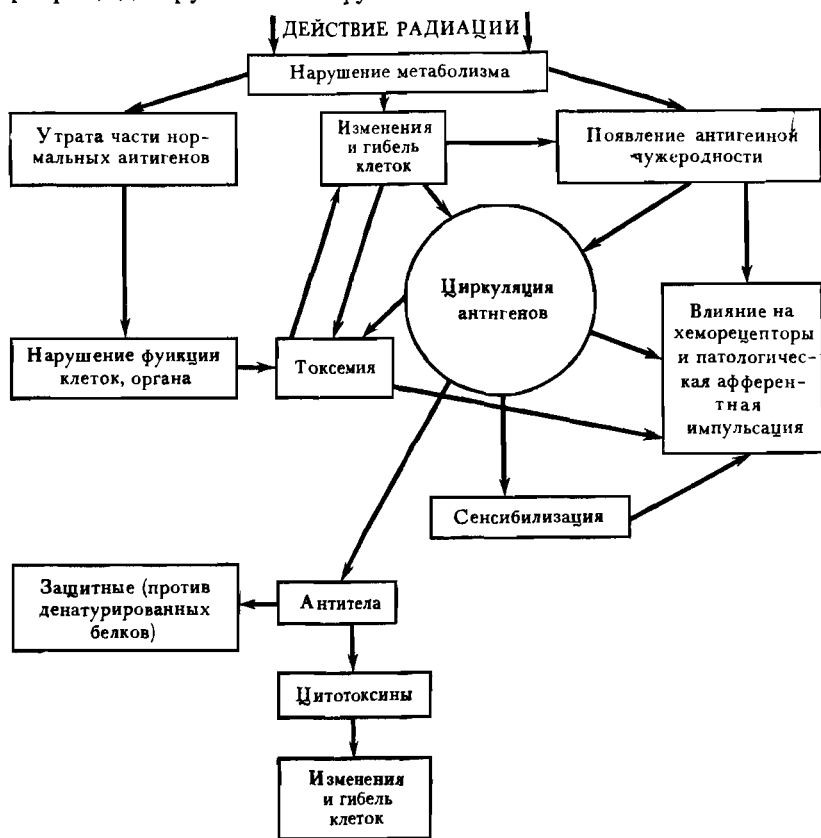


Рис. VI—11. Схема последовательности процессов, связанных с постлучевым изменением антигенных свойств тканей и циркуляции тканевых антигенов (по Петрову)

аутоантигены попадают в кровь и циркулируют в облученном организме, вызывая в нем патологические сдвиги (рис. VI—11). Как видно из рис. VI—11, ионизирующая радиация оказывает опосредованное действие (путем первичных нарушений метаболических процессов) на изменения и гибель клеток, появление антигенной чужеродности и частичную утрату нормальных антигенов, которые, в свою очередь, вызывают нарушения функций клеток и органов. Все эти изменения способствуют развитию лучевой токсемии. Циркулирующие в крови тканевые антигены сенсиби-

дизинформируют организм к инфекции и вызывают образование антител цитотоксического действия. Аутоантигены непосредственно, а также опосредованно, вследствие вызванной ими сенсibilизации, токсемии и образования цитотоксинов, оказывают влияние на хеморецепторы, вызывая патологическую импульсацию афферентных нервов.

Подавление иммунитета в облученном организме представляет собой сложный многоступенчатый процесс, в основе которого лежит опосредованное действие ионизирующей радиации. Первичное повреждение радиочувствительных клеточных структур вызывает появление тканевых антигенов, обуславливающих токсический и аутоиммунизирующий эффект. В ходе лучевой болезни развивается патологическая аутосенсibilизация, в крови циркулируют цитотоксические аутоантитела, возрастает содержание аутоантителосинтезирующих клеток, повышается чувствительность тканей к продуктам клеточной деструкции — наступает вторая фаза повреждения клеток, иммунная, значительно более выраженная, чем гибель клеток при непосредственном действии ионизирующей радиации.

Однако вопрос о биофизических и биохимических механизмах разрушения клеточных структур еще не нашел достаточно полного разрешения в радиоиммунологических исследованиях¹.

Как видно, опосредованный механизм действия ионизирующей радиации на иммунитет не частная, а общерадиобиологическая проблема. Эта проблема, интенсивно исследуемая в настоящее время Р. В. Петровым, затрагивает ключевые вопросы радиационной биофизики, связанные с реализацией поглощенной энергии ионизирующей радиации в сложных биологических системах путями усиления первичных лучевых нарушений и характером взаимосвязи развивающихся в облученном организме патологических процессов.

4. ОПОСРЕДОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ.

Радиотоксины, их природа и роль в лучевом поражении

Поражение органов и тканей облученного организма может быть следствием репродуктивной и интерфазной гибели клеток, непосредственно поглотивших энергию ионизирующего излучения.

¹ В недавно проведенных совместных исследованиях двух лабораторий — А. М. Кузина и Н. Н. Клемпарской (1978) — получены интересные данные об иницирующей роли неиммунных тканевых токсинов («радиотоксинов-хинонов») в развитии лучевой аллергии. В этих работах показана алергизирующая активность неиммунных токсических веществ и повышенная чувствительность к ним у облученных животных, что может свидетельствовать об участии радиотоксинов в формировании аутосенсibilизации облученного организма, о важной роли опосредованного действия радиации на иммунитет.

Повреждение некоторых клеток может полностью или частично восстанавливаться, часть клеток или многоклеточных систем в результате поглощения ионизирующих частиц претерпевает различные морфологические, физиологические и биохимические изменения, вырабатывает аномальные метаболиты или утрачивает способность удерживать биологически активные вещества в естественных депо. Все это способно усиливать лучевое поражение облученных элементов в организме и, возможно, вызывать различные патологические изменения тех органов и тканей, которые не оказались пораженными непосредственным радиационным воздействием. Таким образом, мы приходим к признанию возможности опосредованного эффекта ионизирующей радиации в сложном многоклеточном организме.

Экспериментальные доказательства опосредованного действия ионизирующих излучений были получены как на субклеточном уровне, так и на сложных многоклеточных организмах.

В опытах Дюри, Накао, Орда и Даниелли, Ланкера и других авторов, проведенных еще в 50-е гг., было показано, что подсадка ядер в предварительно энуклеированную и облученную цитоплазму вызывает пикноз и вакуолизацию ядер, повреждение ядрышка, угнетение синтеза ДНК и другие эффекты, аналогичные нарушениям, возникающим при облучении всей клетки или одного изолированного ядра. Поражение ядра при облучении цитоплазмы микропучками ионизирующего излучения обнаружили П. Денди и К. Смит (1964), А. М. Кузин и А. А. Вайнсон (1965, 1966) и др.

О возможности опосредованного действия радиации в многоклеточных организмах (животных и растительных) свидетельствуют такие хорошо известные факты:

1. При тотальном облучении организма морфологические, физиологические и биохимические нарушения в каком-либо органе выражены значительно сильнее, чем в случае локального облучения этого же органа эквивалентной дозой радиации.

2. Гибель и исчезновение клеток костного мозга происходят не только в облученных, но и в экранированных зонах, защищенных от радиационного воздействия. Показательны в этом отношении эксперименты А. Л. Выгодской (1968), которая наблюдала значительное опустошение костного мозга экранированной конечности уже через 1—3 ч после общего облучения крыс рентгеновскими лучами (рис. VI—12). Снижение числа клеток в необлученном участке костного мозга нельзя объяснить влиянием стресса, связанного с процедурой облучения, так как эффект «мнимого облучения», вызывающий некоторые колебания в численности клеток, ограничивается первыми тремя часами. В случае же общего облучения животного опустошение костного мозга достигает максимума в экранированной конечности к 6-му часу и сохраняется в течение 48 ч. Сопоставление характера изменений в облученном и экранированном костном мозге свидетельствует

сходной качественной картине клеточного опустошения: наблюдается перераспределение отдельных форменных элементов, подавление процессов клеточного деления при продолжающемся выходе зрелых элементов в кровь, гибель эритробластов, миелобластов и лимфоцитов (Ярмоненко, 1977).

3. Обнаружены изменения в генетическом аппарате клеток экранированных органов. Значительное увеличение числа клеток с хромосомными aberrациями обнаружено в экранированном костном мозге облученных мышей (Баракина, Янушевская, 1966). Хромосомные перестройки отмечены в клетках эпителия роговицы у тотально облученных животных при условии экранирования головы (Керкис и др., 1964).

4. Введение необлученным животным тканевых экстрактов, или вливание им крови облученных животных позволяет воспроизводить многие симптомы лучевой болезни, включая лейкопению и другие гематологические нарушения, а также морфологические изменения кроветворных органов. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с обменным переливанием крови и в опытах с животными-парабионтами, имеющими перекрестное кровообращение — облучение донора приводило к появлению многообразных симптомов лучевой болезни у животного-реципиента. Еще в одной интересной модификации подобных опытов животным вводили в кровь перфузаты из облученных тканей. При этом наблюдали в крови и тканях реципиентов различные патологические изменения, сходные с симптомами лучевого поражения тех же тканей. При изучении костного мозга продемонстрировано увеличение числа клеток с хромосомными aberrациями после введения животным экстрактов из облученных тканей (Керкис и др., 1964).

5. Опосредованный дистанционный эффект облучения был обнаружен и на растительных объектах, лишенных в отличие от животных нейрогуморальной регуляции, изменение которой в облученном организме могло бы служить объяснением результатов перечисленных выше экспериментов. В опытах А. М. Кузина и

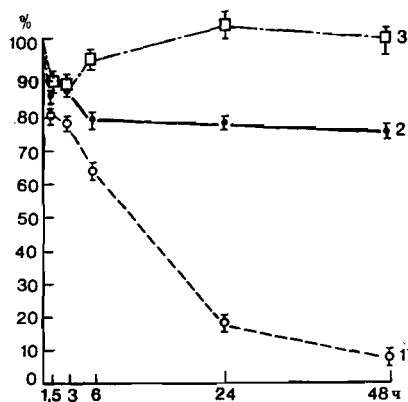


Рис. VI—12. Динамика опустошения костного мозга крыс (число клеток в % от нормы), подвергнутых сублетальному рентгеновскому облучению в дозе 10 Гр; одна конечность экранирована (Выгодская, 1968): 1 — облученный костный мозг, 2 — экранированный костный мозг, 3 — костный мозг при мнимом облучении (контроль). На оси абсцисс — время после облучения, ч; на оси ординат — общее содержание клеток костного мозга, %

сotr. лист растения *Vicia faba* подвергали облучению, тогда как остальное растение экранировали. Через 24 ч после облучения в корешках и точках роста митотический индекс снижался на 50% по сравнению с полностью экранированным растением. Если же облученный лист тотчас же после облучения срезали, то митотический индекс не изменялся. Удаление облученного листа через 4 ч после радиационного воздействия приводило к снижению митотического индекса на 15—30%. По-видимому, в облученной ткани образовывались вещества, передвигающиеся по растению и угнетающие митозы в экранированных клетках.

Таким образом, мы вправе заключить, что общая картина лучевой патологии формируется не только в результате прямого поражения ионизирующим излучением клеточных элементов различных органов и тканей, но в результате опосредованных радиационных эффектов. Представляется маловероятным предположение о том, что облучение инициирует появление какого-либо одного универсального агента, способного как усиливать лучевое поражение структур, поглотивших энергию излучения, так и вызывать повреждения различных тканевых элементов, не претерпевших непосредственного радиационного воздействия. Вероятно, опосредованные радиационные эффекты формируются под влиянием пораженной нейрогуморальной системы регуляции жизненных функций, в результате развития аутоиммунных процессов, связанных с появлением продуктов распада тканей, вследствие изменения уровня биологически активных веществ в клетках и выхода их из мест депонирования, а также многих других причин.

Вклад постлучевых изменений нейрогуморальной регуляции и системы иммунитета в развитие радиационного поражения обсуждался ранее. В настоящем разделе мы рассмотрим экспериментальные данные и некоторые гипотезы, связывающие опосредованное действие радиации с появлением в облученном организме ряда эндогенных веществ, объединенных общим названием «радиотоксины».

Предположение о том, что в крови облученных животных возникают токсические вещества, ответственные за многообразные проявления лучевой патологии, возникли еще на заре радиобиологических исследований. В 1905 г. П. Линзер и Е. Хельбер установили, что если кровь облученных животных ввести необлученным кроликам, то впоследствии развивается выраженная лейкопения. Эти авторы предположили образование и накопление в крови облученных животных «лейкотоксинов», т. е. веществ, обладающих цитотоксическим и литическим действием. С тех пор проблема лучевой токсемии обсуждается в многочисленных радиобиологических исследованиях. Во многих опытах было показано, что инъекции экстрактов из облученных животных внутривенно, внутримышечно и в кровь воспроизводят у реципиентов различные гематологические лучевые нарушения. Результаты такого рода экспериментов часто оказывались противоречивыми и

не всегда воспроизводились в разных исследованиях, особенно это относится к вопросу о времени появления и длительности накопления токсических веществ у облученных животных. Не ясным долгое время оставался вопрос о химической природе токсических агентов. За последние десятилетия проблема лучевой токсемии выросла в общую проблему роли тканевых и клеточных радиотоксинов в лучевой патологии, ей посвящено большое число обзоров и монографий (Тарусов, 1954—1962; Горизонтов, 1955—1963; Сverdlov, 1959—1968; Кузин, 1962—1980; Кудряшов, 1956—1980).

Термин «радиотоксины» был впервые предложен П. Д. Горизонтовым в 1958 г. для обозначения различных неидентифицированных гуморальных веществ, возникающих в тканях облученных животных и относящихся к аномальным метаболитам, а также к продуктам нормального метаболизма, но накапливающимся в облученном организме в избыточном количестве. Основным характерным признаком этих разнообразных веществ служит их способность вызывать или усиливать проявления лучевой болезни в связи с их токсическим действием на биологические системы и объекты. Таким образом, постулируется многофакторный характер опосредованного эффекта ионизирующей радиации, хотя следует иметь в виду, что далеко не все радиотоксины (в соответствии с данным определением) способны вызывать или усиливать лучевые нарушения в организме.

Представление о многофакторном характере опосредованных радиационных эффектов разделяли не все радиобиологи. Многие исследователи вели поиск уникального токсического агента, способного вызывать все проявления лучевой патологии (см. «холиновую теорию» Р. Вернера, «гистаминовую теорию» Ф. Эллингера). Дальнейший материал этого раздела будет посвящен рассмотрению экспериментальных данных и вытекающих из них гипотез о вкладе различных радиотоксинов в опосредованное действие радиации.

Холин, гистамин и белковые радиотоксины

В 1912 г. Р. Вернер предложил одну из первых гипотез, связывающих лучевое поражение организмов с действием токсических веществ в тканях. Развиваемая им «холиновая теория действия ионизирующей радиации» предполагала, что лучевая патология формируется за счет токсического действия холина, накапливающегося в результате радиолиза лецитина. В настоящее время известно, что холин обладает весьма слабым и ограниченным по спектру биологического действия токсическим эффектом. Токсическое действие облученного лецитина, доказанное экспериментально, скорее всего вызывается не холином, а другими продуктами радиолиза — ненасыщенными жирными кислотами или лизолецитином.

Работы Ф. Эллингера и его сотрудников (1935—1953) посвящены анализу токсического действия гистамина и его роли в лучевом поражении. Этими авторами был собран большой фактический материал об образовании гистамина в тканях облученных животных и его биологическом действии. Предложенная ими «гистаминовая теория биологического действия ионизирующей радиации» отводила гистамину и «гистаминоподобным веществам» уникальную роль в развитии «общей лучевой реакции». Образование гистамина Ф. Эллигер относил к самым ранним процессам лучевого поражения, протекающим в результате непосредственного действия радиации на клетки. Предполагалось, что при этом происходит как высвобождение гистамина из связанного неактивного состояния и переход его в свободную токсическую форму, так и радиационно-химический синтез, например из гистидина. По мнению автора, в момент облучения массовая гибель клеток радиочувствительных тканей обеспечивает быстрый выход относительно большого количества легко диффундирующего свободного, «токсически активного» гистамина — «первично образующегося токсина». Последующее высвобождение и накопление гистамина и гистаминоподобных веществ обуславливается распадом клеток радиорезистентных органов и тканей по прошествии латентного периода после облучения.

Представления Ф. Эллингера об уникальной роли гистамина в лучевом токсическом эффекте не подтвердились в дальнейших исследованиях. Показано, что для накопления в организме «токсически активного» гистамина за счет радиационно-химического синтеза требуются дозы, значительно превосходящие величину смертельной дозы для животных. Кроме того, высвобождение или образование повышенного количества гистамина в тканях облученных животных происходит под влиянием радиотоксинов, появляющихся в тканях ранее гистамина, например за счет продуктов перекисного окисления липидов (Кудряшов, 1966). К числу факторов, вызывающих значительные изменения уровня гистамина в облученном организме, относится также система нейрогуморальной регуляции, подверженная выраженному радиационному нарушению (Кричевская, 1964). Прямое токсическое действие гистамина, по-видимому, не распространяется на многие клетки и внутриклеточные структуры. Этот радиотоксин в основном системного действия, вызывающий далеко не все патологические проявления лучевой болезни, но играющий значительную роль в увеличении проницаемости сосудов, повышении емкости кровяных депо, нарушении периферического кровообращения, ухудшении кровоснабжения органов; гистамин, вероятно, ответствен за такие проявления лучевой патологии, как гипотония, эритема, повышение желудочной секреции, геморрагический синдром. Диапазон токсического действия этого вещества весьма широк, однако его нельзя считать универсальным радиомиметиком.

Критический обзор «гистаминовой теории» и других представ-

лений об универсальных и уникальных радиотоксинах можно найти в подробных монографиях и обзорах Б. Н. Тарусова, П. Д. Горизонтова, В. И. Беневоленского, А. Г. Свердлова, Ю. Б. Кудряшова и др. В настоящее время можно считать общепринятым представление о том, что в результате облучения возникает множество радиотоксинов, участвующих в формировании различных проявлений радиационного поражения.

Ставшие классическими представления П. Д. Горизонтова об образовании в облученном организме множества радиотоксинов и об их комплексном участии в лучевой токсемии подкреплены экспериментами различных авторов. В лаборатории П. Д. Горизонтова (1955—1966) показано, что разные органы облученных животных выделяют в кровь различные по химической природе радиотоксины и, следовательно, вносят неодинаковый вклад в лучевой токсический эффект. Эти работы привели их авторов к представлениям о формировании лучевой токсемии во многом за счет нарушения нейрогормональной системы, распада белковых компонентов клеток и возникновения аутоиммунных реакций. Было высказано предположение, согласно которому радиотоксины вначале, до проникновения в кровь, действуют локально, в месте своего образования, возбуждая рецепторы клеток и тканей и вызывая рефлекторные изменения деятельности органов и систем. Затем в результате нарушения проницаемости клеточных мембран радиотоксины попадают в кровь и вызывают дистанционные изменения других органов и систем.

В работах А. Г. Свердлова приводится четкое разграничение патогенетического значения опосредованных влияний нейроэндокринных и токсических механизмов. В предложенной им схеме (рис. VI—13) нейроэндокринные и токсические механизмы включаются в развитие патологического процесса уже на самых ранних этапах лучевого поражения, осуществляя опосредованное действие радиации.

К числу множественных токсических факторов, возникающих в результате облучения, следует отнести «белковые радиотоксины», подробно исследованные в работах А. Г. Свердлова (1959—1968). Автор показал, что местное облучение (ухо, бедро кролика) вызывает у животных изменение морфологического состава крови, фагоцитарной активности лейкоцитов, свертываемости крови, влияет на бактерицидность кожи и тонус кровеносных сосудов. Эти данные в сочетании с изучением динамики накопления радиотоксинов убедительно показывают причастность токсических агентов к развитию «основных проявлений» лучевого поражения — гематологических нарушений, геморрагического, панцитопенического и инфекционно-токсического синдромов. В дальнейших работах было показано, что при облучении мышей в дозе 1,5 Гр в эпителии роговицы глаза увеличивается количество клеток с хромосомными aberrациями, хотя голова животных была экранирована от действия радиации. Аналогичным действи-

ем обладали экстракты из тканей облученных животных: их введение в кровь вызывало у реципиентов повышение числа клеток с хромосомными aberrациями в костном мозге и эпителии рого-

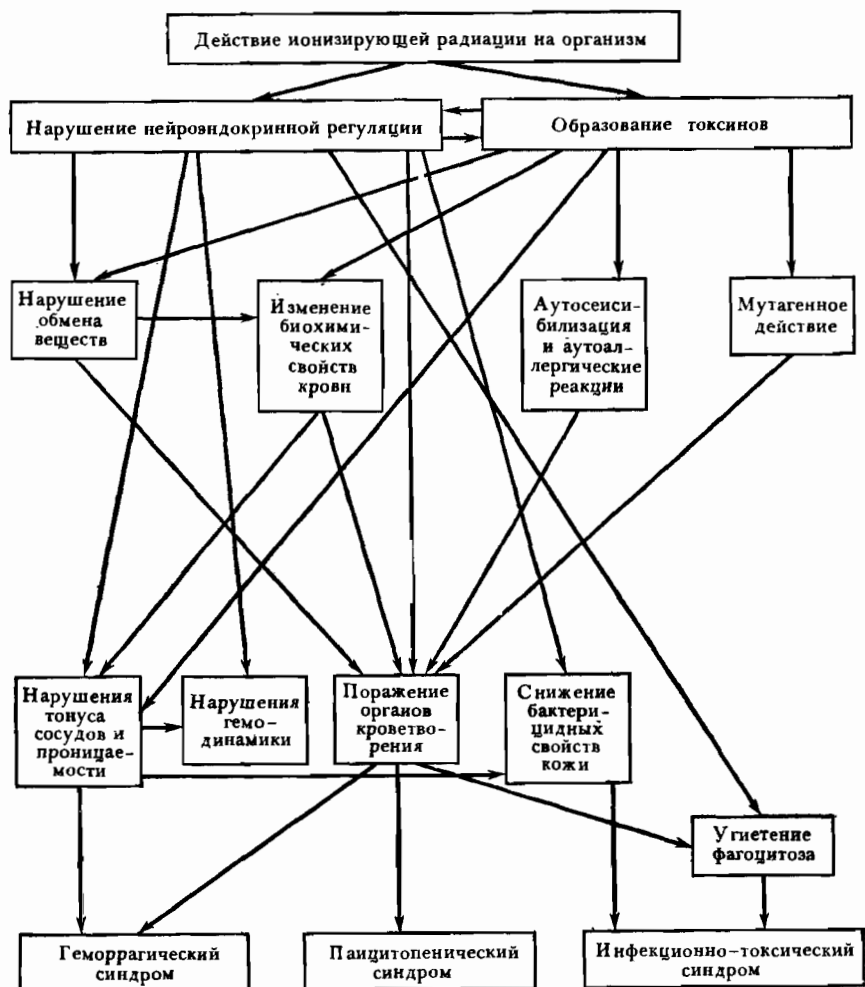


Рис. VI—13. Роль опосредованных эффектов облучения в развитии основных синдромов лучевой болезни (по Свердлову, 1968)

вицы. Содержащиеся в экстрактах токсические продукты, по данным А. Г. Свердлова, не относятся к адреналино-, гистамино- или холиноподобным веществам. Они представляют собой продукты распада белков с различной термостабильностью. Белковые радиотоксины, вероятно, возникают вследствие распада тканевых

белков, они способны вызывать гематологические нарушения и обладают мутагенным действием. Однако эти радиотоксины далеко не исчерпывают ни круг токсических веществ, индуцируемых радиацией, ни спектр возникающих в облученном организме патологических изменений.

Для выяснения механизмов опосредованного действия ионизирующей радиации необходимо оценить вклад радиотоксинов не только в развитие лучевой токсемии, но и в общий патологический процесс, охватывающий изменения крови и всех органов и тканей облученных животных. Для обозначения широкого круга патологических изменений, возникающих в результате опосредованного действия радиации, введен термин «лучевой токсический эффект» (Кудряшов, 1965, 1966). К настоящему времени изучено большое количество радиотоксинов, осуществляющих этот эффект. Помимо перечисленных выше это — группа давно и детально изучаемых радиотоксинов — продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот, хиноны и хиноноподобные соединения, а также радиотоксины, исследование которых начато в конце 70-х гг., — полиглютомат и его аналоги (Медведев и др.), абсцизовая кислота (Гродзенский, Гудков), сиаловая кислота (Врановская, Поспишил), малональдегид, (Раева), регактенон (Копылов; Вагабова, Магомедов) или «низкомолекулярные биологически активные вещества» (Сирота и др.), продукты радиолитиза аминокислот (Дуженкова).

Первичные и вторичные радиотоксины. Хиноны и липидные перекиси как первичные радиотоксины

Накопление сведений о различных химических агентах, способных вызывать лучевой токсический эффект, выдвигает на первый план исследования, посвященные анализу последовательности событий, приводящих к накоплению радиотоксинов в облученном организме и выяснению вклада каждого из образующихся токсических веществ в общую картину лучевого поражения. О важности таких исследований писал еще в 1954 г. Б. Н. Тарусов, предложивший разделить токсические агенты на «первичные» и «вторичные» по времени их образования и характеру биологического действия. В 1966 г. А. М. Кузин отмечал, что для понимания начальных, пусковых механизмов радиобиологических эффектов особое значение приобретают исследования первичных радиотоксинов, т. е. веществ, индуцируемых облучением и способных реагировать с молекулами ДНК, нарушая их структуру и генетический код, воздействующих на биологические мембраны и изменяющих характер ферментативных реакций. Согласно этим предположениям первичные радиотоксины — это группа веществ, способных вызывать множественные повреждения в облученном

организме и непосредственно участвовать в формировании отдельных радиобиологических эффектов.

Вторичные радиотоксины согласно такой схеме появляются на более поздних этапах формирования лучевого поражения в результате глубоких биохимических и физиологических изменений. Они представляют интерес для понимания терминальных этапов лучевого токсического эффекта.

Хиноны и хиноноподобные вещества

В большом числе экспериментальных исследований, выполненных А. М. Кузиным и его сотрудников (1958—1980), было доказано образование в облученных тканях радиотоксинов типа хинонов и семихинонов — продуктов аномального метаболизма, возникающих в результате усиления окислительных процессов под действием радиации. Изучение спектра токсического действия хинонов и хиноноподобных веществ позволила А. М. Кузину сформулировать общую теорию, отводящую этим радиотоксинам важную роль в опосредованном действии радиации на организм.

Первоначально эксперименты проводились на растениях — семенах бобовых, фасоли, кукурузы, пшеницы, клубнях картофеля и других растительных объектах. Во всех случаях было обнаружено накопление в облученных организмах радиотоксинов — хинонов, обладающих широким спектром радиомиметического действия. Введение в необлученные растения экстрактов, содержащих хиноноподобные радиотоксины, вызывало угнетение митозов, торможение роста и развития, подавление синтеза ДНК в клеточных ядрах, появление хромосомных aberrаций, пикноз ядер, цитолитический распад клеток и другие морфологические и функциональные изменения, характерные для радиационного воздействия. Рассматривая возможный механизм образования и действия радиотоксинов полифенольно-хиноидной природы, А. М. Кузин предлагает такую последовательность процессов: в момент облучения в клетках образуются активные радикалы биосубстратов, инициирующие реакцию окисления внутриклеточных фенолов, в первую очередь тирозина; образующиеся продукты окисления активируют тирозиназу и, возможно, другие ферменты, способствуя тем самым появлению значительного количества ортохинонов; хиноноподобные радиотоксины сорбируются ядрами клеток, угнетают синтез ДНК, блокируют включение тимидина во вновь синтезируемую ДНК, подавляют деление, рост и развитие клеток, вызывают мутации, а при высоких концентрациях радиотоксина происходит гибель клеток и организмов (рис. VI—14).

Дальнейшие исследования позволили обнаружить накопление в органах и тканях животных хиноноподобных радиотоксинов. Предполагается, что они образуются за счет усиления аутолитиче-

ческих процессов под влиянием облучения. Радиотоксины-хиноны, выделенные из растительных и животных объектов, по-видимому, идентичны по химическим свойствам и токсическому действию; введение их животным также вызывает широкий спектр радиометического действия.

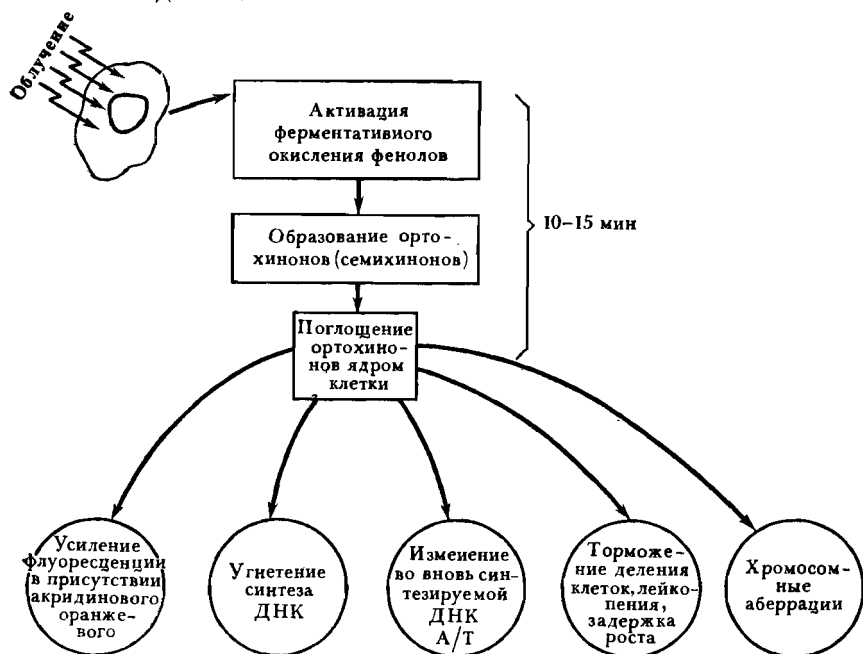


Рис. VI—14. Схема образования и биологического действия радиотоксинов — «хинонов» (по Кузину и др., 1965)

Представление об участии хинонов и хиноноподобных радиотоксинов в опосредованных радиационных эффектах дает схема, предложенная А. М. Кузиным (рис. VI—15), которая связывает с действием этих радиотоксинов возникновение практически всех нарушений, происходящих в облученном организме, вплоть до отдаленных радиационных последствий. Основные положения, вытекающие из этой схемы, активно дискутируются в радиобиологической литературе. К числу ее недостатков следует отнести отсутствие конкретных механизмов участия всего многообразия радиотоксинов в лучевом токсическом эффекте, не отражена также последовательность образования различных токсических агентов.

В последние годы в лаборатории А. М. Кузина ведутся работы по отделению радиотоксинов-хинонов от других биологически активных веществ (возможно, и других радиотоксинов) из тех экстрактов, которые обычно использовались в экспериментах и

обозначались как «радиотоксин». Так, из облученных клубней картофеля удалось в кристаллическом виде выделить радиотоксин, получивший название «регактенон». Химический анализ

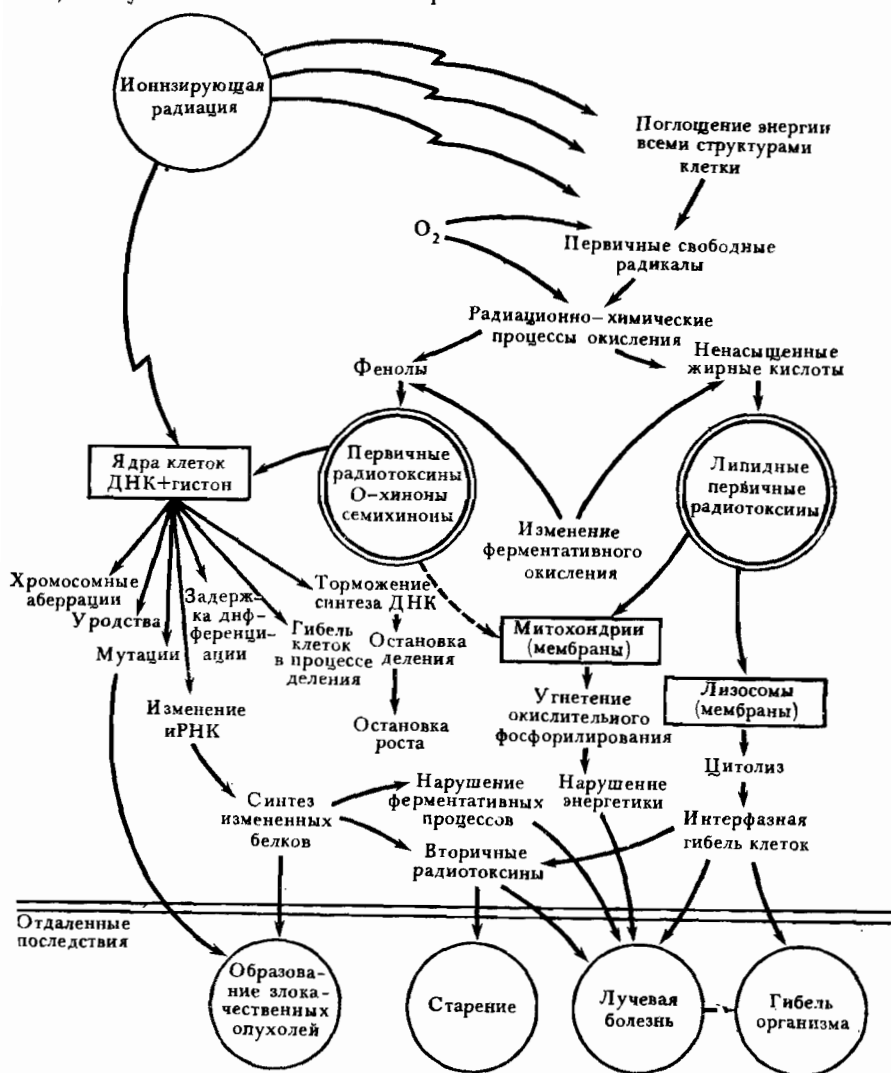


Рис. VI—15. Схема участия первичных радиотоксинов в развитии лучевого поражения организма (по Кузину, 1970)

показал, что основным компонентом очищенного радиотоксина-регактенона является ароматическое кольцо с хиноидной группой, а также другие соединения — тирозин, триптофан, лейцин, метионин, гистидин и «два неидентифицированных вещества» (Ко-

пылов, 1978). Представляет интерес сравнение действия очищенного препарата регактенона с токсическими свойствами «хинонов», исследуемых ранее. Уже первые эксперименты показали, что по своему мутагенному действию на клетках костного мозга и влиянию на рост растений регактенон обнаруживает сходство с действием ионизирующей радиации (Копылов, 1978). По-видимому, дальнейшие исследования позволят четко установить долю участия этого радиотоксина в лучевом токсическом эффекте. Предпринимаемые ранее попытки очистки гомогенатов и экстрактов облученных растений, например электрофоретическое разделение спиртового экстракта из облученных корешков бобовых, позволили выявить радиотоксины со свойствами флавоноидов. Эти соединения оказались эффективными мутагенами, ингибиторами роста и цитолizинами.

В экспериментах с очищенными препаратами радиотоксинов, проведенных в лаборатории А. М. Кузина, было показано, что их опосредованное действие не менее эффективно, чем непосредственное облучение; особенно выраженным было действие препаратов на облученное ядро. Развитие этих экспериментов позволило предположить, что прямое действие радиации на ядерный аппарат не просто суммируется с опосредованными эффектами, связанными с действием радиотоксинов, а взаимно усиливается, превосходя суммарные эффекты, вызываемые порознь прямым и опосредованным эффектом. Предполагаются следующие пути взаимного усиления радиационного поражения и действия радиотоксина:

- радиационные нарушения структуры ДНП могут повысить чувствительность ДНК к действию радиотоксина;
- радиотоксины способны усилить прямое действие радиации в результате их присоединения в местах одиночных разрывов молекулы ДНК, препятствуя тем самым действию репарирующих ферментов; действие радиотоксинов на необлученный геном может затруднять нормальное восстановление, выявляя спонтанные поломки;
- взаимодействуя непосредственно с ферментами репарации, радиотоксины в состоянии снижать их активность;
- вызванное радиацией нарушение проницаемости ядерных мембран может способствовать усилению проникновения радиотоксинов к ДНП.

Однако экспериментальная проверка этих предположений возможна лишь при использовании химически чистых препаратов радиотоксинов.

Продукты перекисного окисления липидов

В 1956 г. Ю. Б. Кудряшов опубликовал сообщение о том, что в тканях облученных животных обнаруживаются токсические вещества липидной природы, относящиеся к фракции свободных

ненасыщенных жирных кислот. Этим данным предшествовали работы В. З. Горкина и А. С. Мочалиной по изучению неиммунных тканевых гемолизинов. В последующие годы Ю. Б. Кудряшов и его сотрудники исследовали химическую природу эндогенных липидных токсических веществ, механизм их образования при лучевом поражении, возможную роль этих веществ в первичных радиобиологических процессах и патогенезе лучевой болезни.

Химическую природу липидных токсических веществ, образующихся при лучевом поражении в клетках, органах и тканях животных и растений, удалось установить с помощью методов тонкослойной и газожидкостной хроматографии и полярографии. Оказалось, что эти вещества представляют собой гидроперекиси, перекиси, эпоксиды, альдегиды и кетоны свободных ненасыщенных жирных кислот. Наиболее широким спектром токсического действия обладают гидроперекиси и перекиси (общее название «липидные перекиси»). Во многих случаях эффекты липидных радиотоксинов удалось моделировать введением в организм животных или добавлением к клеточной суспензии препаратов окисленной олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, при этом экспериментально подбиралась соответствующая степень окисления, обеспечивающая высокое содержание перекисей.

Было установлено, что липидные перекиси, накапливаясь в аномальных количествах, вызывают многочисленные морфологические, физиологические и биохимические изменения, по существу не отличающиеся от нарушений, наблюдаемых при соответствующих формах лучевого поражения: острой, острой и хронической. Исследования проводились на различных биологических объектах: на кроликах, крысах, мышах, дрожжевых клетках, клетках асцитных карцином, изолированных митохондриях печени. Во всех случаях были получены результаты, указывающие на широкий спектр радиомиметического действия продуктов перекисного окисления липидов, т. е. воздействие на биологические объекты липидными перекисями во многом имитировало процесс лучевого поражения.

Весьма важно, что наблюдаемые морфологические, физиологические и биохимические изменения не являются только лишь непосредственным результатом действия введенных продуктов перекисного окисления липидов. Липидные радиотоксины инициируют лучевую токсемию и вызывают накопление других биологически активных веществ — хинонов, холина, гистамина, продуктов распада белков. В совместных исследованиях лабораторий А. М. Кузина и Ю. Б. Кудряшова в 1966 г. было обнаружено, что введение животным липидных токсических веществ инициирует накопление в тканях радиотоксичных хинонов. Аналогичное накопление хинонов происходит после облучения. Если же животным вводили экстракты хинонов, то накопления липидных токсических веществ не было отмечено. Эти и ряд других экспериментов позволили сделать вывод о ведущей роли липидных токсических

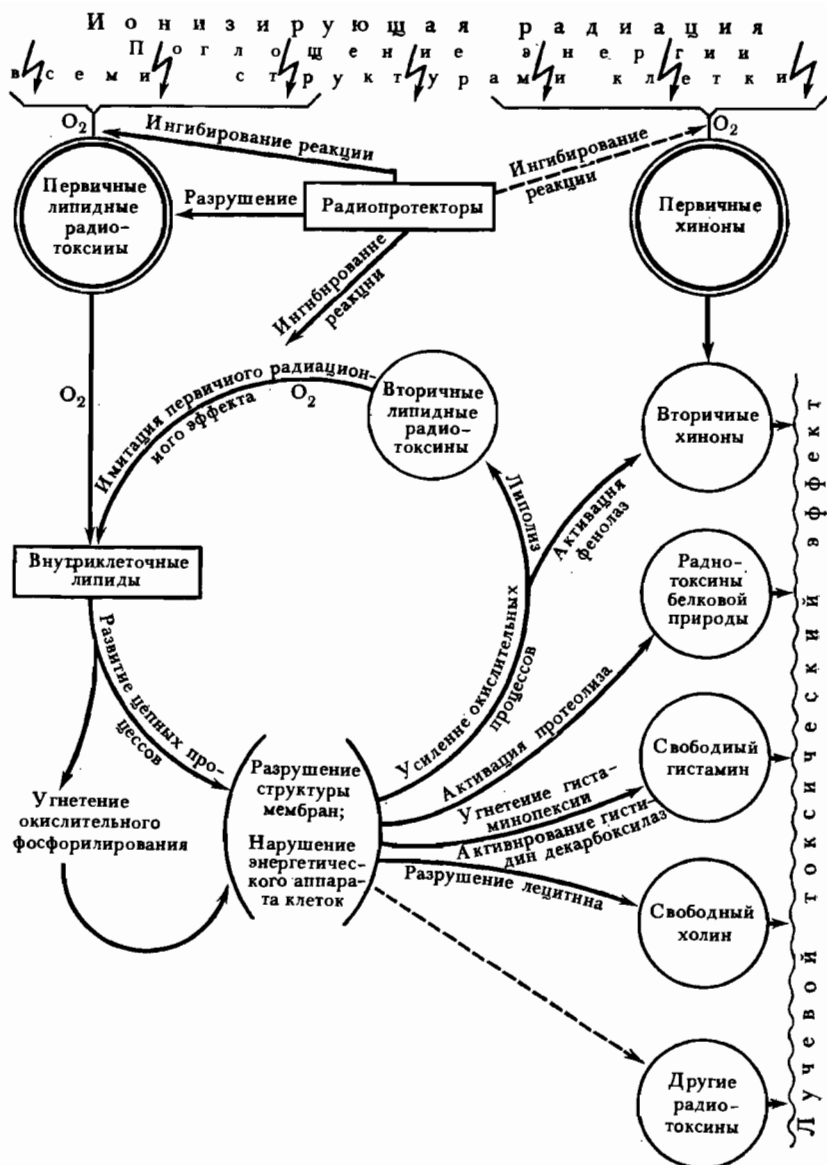


Рис. VI—16. Формирование лучевого токсического эффекта
(по Кудряшову, 1966)

ких веществ в становлении и развитии лучевого токсического эффекта (рис. VI—16). Так, изучая динамику образования липидных радиотоксинов, удалось показать, что накопление этих веществ в тканях животных происходит уже в первые минуты после

облучения. Эксперименты на клетках показали, что содержание в них липидных перекисей возрастает уже в процессе облучения в результате инициированного излучением перекисного окисления липидов. В связи с тем, что продукты перекисного окисления липидов накапливаются в тканях вскоре после облучения, индуцируют появление других радиотоксинов и инициируют многочисленные проявления лучевой токсемии, они были названы «липидными радиотоксинами», «липидными радиомиметиками» (или менее удачно — «естественными радиомиметиками»).

Значительный интерес представляет изучение количественных закономерностей накопления продуктов окисления липидов и других радиотоксинов в зависимости от величины дозы облучения и «качества излучения», т. е. значения линейных потерь энергии (ЛПЭ) для редко- и плотноионизирующего излучения. В экспериментах А. Г. Конопляникова и Ю. Б. Кудряшова (1966) изучено содержание радиотоксинов в тканях животных, облученных различными видами ионизирующего излучения с существенно отличными значениями ЛПЭ. При облучении животных равноэквивалентными по смертности дозами редко- и плотноионизирующего излучения установлено сходство в характере накопления продуктов окисления липидов в различных органах и тканях. В начальный и терминальный периоды лучевого поражения содержание токсических веществ в тканях закономерно возрастает; степень выраженности изменений зависит от величины дозы облучения; накопление радиотоксинов зависит от величины ЛПЭ-излучения — при равных значениях ОБЭ различные виды излучений сходным образом влияют на уровень радиотоксинов. В связи с этим было сделано предположение, согласно которому известные различия в первичных реакциях лучевого поражения при действии редко- и плотноионизирующего излучения могут быть связаны с неодинаковой локальной концентрацией активных молекул и их радикальными состояниями в треках ионизирующих частиц.

Значительное число исследований было посвящено анализу механизмов образования липидных радиотоксинов и их роли в лучевом поражении организмов. У облученных животных было обнаружено значительное возрастание уровня продуктов перекисного окисления липидов в радиочувствительных органах — костном мозге, семенниках, селезенке. Накопление липидных перекисей было зарегистрировано в органеллах клеток печени облученных животных — в лизосомах, микросомах, митохондриях и ядрах (Таппел, 1962; Кудряшов, 1962; Виллс, 1966; Данилов, Козлов, 1973; и др.). Большой интерес представляет обнаруженное в митохондриях радиационное нарушение процессов перекисного окисления липидов, так как продукты перекисного окисления липидов, накапливаясь в митохондриях, способны разобщать окислительное фосфорилирование (Кудряшов и др., 1964; Ленинджер, 1964), инактивировать тиоловые ферменты, окислять сульфид-

рильные группы аминокислот, пептидов и белков, повреждать митохондриальные мембраны (Хантер, 1964; Виллс, 1966). В работах, выполненных Ю. Б. Кудряшовым и сотрудниками, показано, что накопление липидных радиотоксинов в первый период лучевого поражения связано с распадом фосфолипидов в радиочувствительных клетках (главным образом, лецитина и кефалина). Ионизирующая радиация инициирует свободнорадикальное окисление фосфолипидов биомембран, вызывает отщепление ненасыщенных жирных кислот, ослабление ингибирующих свойств антиоксидантов и накопление в аномальных концентрациях продуктов перекисного окисления, способных разрушать внутриклеточные структуры. Участию липидных радиотоксинов в лучевом токсическом эффекте может состоять в том, что они индуцируют конформационные перестройки биомембран, образование гидрофильных «пор», нарушение проницаемости мембран и повреждение мембраносвязанных ферментов.

Экспериментальный материал приводит к выводу о важном значении комплекса липидных радиотоксинов не только в патогенезе лучевой болезни, но и в возникновении и развитии самого пострадиационного токсического эффекта. В пользу ведущей роли продуктов перекисного окисления липидов в сложном и многообразном проявлении лучевого токсического эффекта свидетельствуют следующие результаты опытов, выполненных на биологических объектах различного уровня организации.

1. Продукты перекисного окисления липидов образуются непосредственно в процессе облучения.

2. Наблюдается значительное накопление этих веществ в начальный период лучевого поражения.

3. Липидные перекиси инициируют образование и накопление других эндогенных токсических веществ.

4. Липидные радиотоксины повреждают энергетический аппарат клеток, вызывают конформационные изменения мембран, нарушение их проницаемости и трансформируют активность мембраносвязанных ферментов.

5. Продукты окисления высших ненасыщенных жирных кислот с высоким содержанием перекисей моделируют действие липидных радиотоксинов, проявляя широкий спектр радиомиметического действия на различных биологических системах.

Конечно, было бы неправильным сводить все проявления лучевого токсического эффекта только к образованию липидных радиотоксинов. Круг возможных радиотоксинов, вероятно, достаточно широк. Более того, мы далеки от мысли, что лучевое поражение организмов исчерпывается только действием радиотоксинов и что между лучевым токсическим эффектом и лучевым поражением можно поставить знак равенства. Даже опосредованное действие радиации на организм вряд ли можно объяснить только лучевым токсическим эффектом, хотя радиотоксины, как мы уже упоминали, влияют на развитие аутоиммунных процессов, нейро-

гуморальную регуляцию и целый ряд других жизненно важных процессов в организме.

Лучевой токсический эффект — одно из важных звеньев в цепи процессов, приводящих к возникновению и формированию необычайно многообразных и взаимосвязанных проявлений лучевого поражения, т. е. таких проявлений, которые развиваются после облучения и наблюдаются в течение всего периода лучевой болезни. По всей видимости, в комплексе радиотоксинов можно выделить так называемые первичные радиотоксины, которые служат инициаторами лучевого токсического эффекта.

В связи с возможной ключевой ролью первичных радиотоксинов в процессе лучевого поражения представляется весьма важным детально рассмотреть радиационно-химический и биофизический механизм их формирования в облученном организме.

О «пусковых» химических процессах опосредованного лучевого поражения

В проблеме пусковых химических процессов опосредованного лучевого поражения можно выделить две основные задачи: исследование субстратов, радиационное повреждение которых приводит к дальнейшему развитию лучевого поражения, и выяснение природы пусковых химических процессов, ведущих к структурным изменениям.

В начале 50-х гг., как известно, были сформулированы основные положения радиационной химии воды и водных растворов макромолекул. Экстраполяция этих данных на биологические объекты оказалась весьма плодотворной, так как позволяла, хотя и приближительно, объяснить механизм радиопрофилактического эффекта и некоторые особенности пусковых химических процессов лучевого поражения.

В дальнейшем предпринимались неоднократные попытки выяснить количественный вклад активных продуктов радиолитиза воды в радиобиологические эффекты. Для этого облучению подвергали замороженные, высушенные или лиофилизированные клетки, а также клетки в присутствии активных перехватчиков радикалов воды. Предполагалось, что в таких условиях гибель облученной клетки обуславливается главным образом вкладом прямого действия ионизирующей радиации на молекулы и надмолекулярные структуры. Гибель необработанных, но только облученных клеток относили за счет совместного прямого и опосредованного (имелось в виду действие диффундирующих радикалов воды) действия радиации. Разница в радиочувствительности между необработанными и обработанными клетками служила критерием опосредованного действия радиации через активные продукты радиолитиза воды. Результаты таких опытов представлены в табл. VI—11. Несмотря на многие ограничения, которые накладывает

Таблица VI-11

Вклад прямого и непрямого (через продукты радиолитиза воды) действия радиации в радиобиологические эффекты
(по Ш. Окада, 1974)

Радиобиологический эффект	Тип клеток	Метод анализа	Условия облучения, t°C и состав атмосферы	Вклад, %*	
				непрямого действия	прямого действия
Летальное поражение культивируемых клеток млекопитающих	клетки почки человека TI	замораживание	20 воздух	75	25
Подавление синтеза ДНК в клетках млекопитающих	асцитная карцинома Эрлиха	замораживание	20 кислород	50	50
Влияние на развитие трансплантированных яйцеклеток крыс	ткань яичника крысы	замораживание	20 воздух	50	50
Летальное поражение культивируемых клеток млекопитающих	тимоциты крысы	замораживание	37 кислород	54	46
			37 азот	26	74
Хромосомные aberrации в клетках растений	традесканция	замораживание	20 кислород	50	50
			20 азот	50	50
Летальное поражение бактерий	<i>E. coli</i>	замораживание	0 воздух	82	18
		замораживание	0 азот	53	47
		высушивание	комнатная, воздух	71	29
		лиофильная сушка	—	91	9
Летальное поражение дрожжей	гаплоидные дрожжи	замораживание	20 воздух	0	100
			20 азот	0	100

* Вклад (в %) прямого и непрямого действия рассчитан согласно уравнению:

$$\frac{1/\text{доза в замороженном или сухом состоянии}}{1/\text{доза при условиях, приведенных в таблице}} \cdot 100$$

Непрямое действие (%) = 100 — прямое действие (%).

Вклад прямого и непрямого действия относится к условиям, указанным в графе таблицы: температура и состав атмосферы.

используемый метод, все же видно, что активные продукты радиолиза воды не определяют полный эффект поражения. Обеспечивают ли продукты радиолиза воды (или в какой степени они могут обеспечить) всецело пусковые процессы опосредованного эффекта ионизирующей радиации?

Как видно из сопоставления соотношения прямого и непрямого действий излучения в лучевом поражении клетки, диффундирующие радикалы воды определяют не более половины эффекта, приводящего к лучевому поражению. Такой результат получен на основании явно завышенной оценки. Конечно, следует учитывать незначительные величины диффузии активных радикалов в клетке; среднее расстояние диффузии водных радикалов не превышает 300—350 нм. Кроме того, не учитывается возможность взаимного усиления прямого и непрямого эффектов радиации.

Исследуя возможности непрямого действия радиации через водные радикалы, радиобиологи еще не уделяли внимания важнейшей для жизнедеятельности клетки липидной фазе и системам, связанным с ней. В середине 50-х гг. был достигнут значительный прогресс в понимании структурной организации и биологической роли субклеточных мембранных структур. В этот и последующий периоды накапливается обширный экспериментальный материал о роли липидов мембран в функционировании липопroteinных ферментативных комплексов, в функциональной активности субклеточных структур. Появились первые работы, посвященные физико-химическим процессам в липидной фазе облученных клеток, липидным радиотоксинам, начались исследования механизмов перекисного окисления липидов под действием ионизирующей радиации. Так, в 1954 г. Б. Н. Тарусов сделал предположение о решающей роли цепных окислительных реакций в развитии пусковых процессов лучевого поражения. Это предположение было обосновано анализом кинетических закономерностей развития лучевого поражения при низких и средних летальных дозах и сравнением их с критерием цепных реакций. Инициирование цепей в результате распада молекул на радикалы осуществляется неодинаково для различных молекул и систем. Н. Н. Семенов (1958) придавал большое значение наличию в сложных гетерогенных системах веществ («примесей»), облегчающих развитие цепных реакций. Такие вещества легко образуют свободные атомы и радикалы. Например, радикалы перекисей являются наиболее универсальными инициаторами цепей. Анализируя реакционную способность различных субстратов и развивающихся цепных реакций, Б. Н. Тарусов и др. (1957—1966), Н. М. Эмануэль и др. (1958—1976) установили, что наиболее вероятной для развития первичных лучевых процессов является реакция окисления липидов — структурных элементов клеточных мембран. О важнейшей роли окисления биосубстратов в пусковых химических процессах лучевого поражения свидетельствуют также работы А. М. Кузина (1962—1973). В развива-

емой им «структурно-метаболической теории» биологического действия радиации большое место уделено развитию окислительных реакций в пусковых радиобиологических процессах. Придавая особое значение изменениям упорядоченного расположения макромолекул в клеточных структурах, А. М. Кузин считает, что изменение облученной структуры приводит к усилению процессов окисления биосубстратов и образованию высокоактивных продуктов окисления липидов и фенолов. Образующиеся радиотоксины, воздействуя на биоструктуры, усиливают начавшиеся в них изменения и приводят к видимым нарушениям их строения, т. е. к «вторичным радиобиологическим изменениям». Опираясь на собственные данные по образованию и действию хинонов, А. М. Кузин описал характер развития первичных окислительных процессов — путь радиационных окислительных превращений ортофенолов в ортохиноны.

Основополагающим в представлениях о пусковых химических процессах в биологических системах является вывод, сформулированный Б. Н. Тарусовым (1966): окислительные процессы в клеточных структурах протекают в очень низком стационарном режиме, который нарушается под действием ионизирующей радиации, выход процессов в нестационарный режим характеризуется усилением процессов окисления легкоокисляемых субстратов и разрушением антиокислительных систем.

Как известно, процесс образования перекисей липидов может иметь цепной свободнорадикальный характер с образованием свободных радикалов, реакционная способность которых позволяет произойти реакции



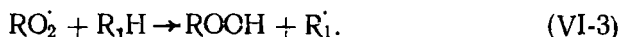
где $X^{\cdot}$ — свободный радикал, инициирующий цепь; RH — молекула жирной кислоты; $R^{\cdot}$ — радикал липида.

В присутствии кислорода происходит реакция между радикалом и молекулой O_2 :



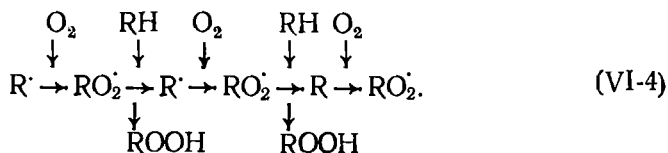
в результате которой возникают перекисные радикалы липидов. Константа скорости этой реакции 10^7 — 10^8 л/моль·с, а энергия активации практически равна нулю. Следовательно, при концентрациях кислорода выше 10^{-6} М все радикалы $R^{\cdot}$ превращаются в радикалы $RO_2^{\cdot}$.

Перекисный радикал может вступить во взаимодействие с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот с образованием гидроперекиси и нового радикала $R_1^{\cdot}$:



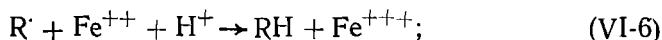
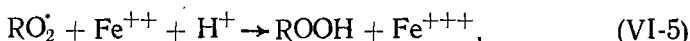
Эта реакция также имеет низкую энергию активации и высокую константу скорости, величина которой зависит от типа окисляющегося соединения.

Чередование реакций (VI—2)—(VI—3) приводит к развитию цепного процесса окисления, схема которого может быть представлена так (Владимиров, Арчаков, 1972):

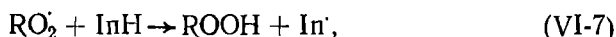


В процесс вовлекаются все новые молекулы липида RH и кислорода, в результате накапливаются гидроперекиси, а число радикалов $\text{R}^{\cdot}$ и $\text{RO}_2^{\cdot}$ не изменяется (принцип неунничтожимости свободной валентности). Скорость всего процесса лимитируется реакцией взаимодействия перекисного радикала с новой окисляющейся молекулой — реакцией продолжения цепи. С реакцией продолжения цепи конкурируют реакции, приводящие к обрыву цепей:

- реакции взаимодействия радикалов $\text{R}^{\cdot} + \text{R}^{\cdot} \rightarrow \text{R}-\text{R}$, в результате которых образуются молекулярные продукты;
- реакции радикалов с ионами переменной валентности, например с ионами железа:



- реакции радикалов с веществами-антиоксидантами (InH):

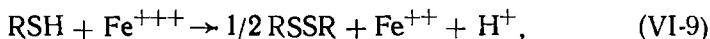


в результате которых возникают малоактивные радикалы антиоксидантов, не способные вступать в реакции с новыми молекулами (ненасыщенных жирных кислот). Они исчезают в результате комбинации с другим радикалом $\text{In}^{\cdot}$ или радикалами $\text{R}^{\cdot}$ и $\text{RO}_2^{\cdot}$.

В присутствии металлов переменной валентности описанный выше процесс приобретает разветвленный характер за счет реакции



т. е. появляются новые свободные радикалы, а значит, новые цепи перекисного окисления. Для того чтобы происходило эффективное разветвление цепей, необходимо добавлять в систему ионы металла переменной валентности или же регенерировать окисленное железо. Такая регенерация может происходить за счет сульфгидрильных соединений:



в результате образуется восстановленное железо, способное инициировать образование радикалов $\text{RO}^{\cdot}$ при взаимодействии с молекулой гидроперекиси ROOH .

Таблица VI-12

Основные реакции, связанные с перекисным окислением
липидов в биологических мембранах
(по Владимирову и Арчакову, 1972)

Стадия процесса	Реакция
Инициирование цепи . . .	$0) \text{Fe}^{++} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{H}^+} \text{HO}_2^{\cdot}$ $1) \text{HO}_2^{\cdot} + \text{RH} \rightarrow \text{R}^{\cdot} + (\text{H}_2\text{O}_2)$ $2) \text{R}^{\cdot} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2^{\cdot}$
Продолжение цепи . . .	$3) \text{RO}_2^{\cdot} + \text{RH} \rightarrow \text{RO}_2^{\cdot}$ $2) \text{R}^{\cdot} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2^{\cdot}$
Разветвление цепи . . .	$4) \text{ROOH} + \text{Fe}^{++} \rightarrow \text{RO}^{\cdot} + \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^-$ $5) \text{RO}^{\cdot} + \text{RH} \rightarrow \text{ROH} + \text{R}^{\cdot}$ $2) \text{R}^{\cdot} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2^{\cdot}$
Обрыв цепи . . .	$6) \text{RO}_2^{\cdot} + \text{RO}_2^{\cdot} \rightarrow \text{P} \rightarrow \text{P} + \text{h}\nu$ $7) \text{RO}_2^{\cdot} + \text{InH} \rightarrow (\text{ROOH}) + \text{In}^{\cdot}$ $8) \text{RO}_2^{\cdot} + \text{In}^{\cdot} \rightarrow \text{Y}$ $9) \text{RO}_2^{\cdot} + \text{Fe}^{++} \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{X}$ $10) \text{RSH} + \text{Fe}^{+++} \rightarrow \frac{1}{2} \text{RSSR} + \text{H}^+ + \text{Fe}^{++}$

Обозначения: $\text{R}^{\cdot}$ — радикал ненасыщенной жирной кислоты,

$\text{RO}_2^{\cdot}$ — перекисный радикал ненасыщенной жирной кислоты,

R , X , Y — молекулярные продукты,

InH — молекула антиоксиданта, $\text{In}^{\cdot}$ — свободный радикал антиоксиданта,

RSH — соединение, способное восстанавливать Fe^{+++} .

Общее представление о реакциях перекисного окисления липидов биологических мембран дает табл. VI—12.

Рассматривая последовательность реакций цепного перекисного окисления липидов, можно выделить три возможности значительной интенсификации процесса:

- 1 — увеличение содержания свободных радикалов, иницирующей цепи перекисного окисления;
- 2 — усиленное разложение гидроперекисей с образованием новых радикалов, иницирующих новые цепи окисления (процесс приобретает разветвленный характер);
- 3 — разрушение антиоксидантов, ингибирующих развитие процесса за счет обрыва цепей.

В многочисленных экспериментах показано, что ионизирующее излучение обладает проокислительным действием за счет индукции в липидах новых радикалов, инициирующих цепи перекисного окисления.

Работами школы Б. Н. Тарусова было доказано возникновение свободнорадикальных состояний в липидах тканей облученных животных и субклеточных мембранных структур. Существование свободных радикалов доказано методом ЭПР и привитой сополимеризации, а также при исследовании хемилюминесценции липидов из облученных клеток и тканей.

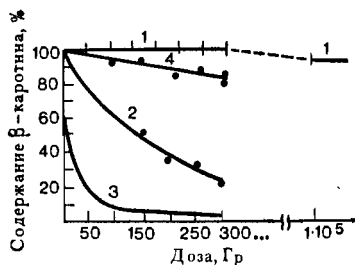


Рис. VI—17. Радиолит β-каротина в зависимости от величины дозы γ-облучения (по Кудряшову и Балтбарздысу, 1966, 1967): 1 — кристаллический β-каротин, +18°C; 2 — раствор β-каротина в олеиновой кислоте, атмосфера азота, +18°C; 3 — раствор β-каротина в олеиновой кислоте, воздушная атмосфера, +18°C; 4 — раствор β-каротина в олеиновой кислоте, воздушная атмосфера, —196°C

Ионизирующее излучение может катализировать разрушение гидроперекисей с образованием новых радикалов $RO\cdot$ и $OH\cdot$ или $ROO\cdot$. Вероятно, наиболее эффективным оказывается разрушение антиоксидантов в результате облучения. Резкое снижение содержания антиоксидантов было продемонстрировано многими исследователями с использованием независимых методов. Е. Б. Бурлакова и соавт. доказали снижение антиокислительной активности липидов из облученных органов и тканей животных; Б. Н. Тарусов продемонстрировал снижение содержания антиоксидантов при исследовании сверхслабой хемилюминесценции.

Еще в середине 60-х гг. в лаборатории радиационной биофизики МГУ им. Ломоносова были начаты работы, показавшие возможность опосредованного механизма действия ионизирующей радиации через продукты радиолит липидов.

В одной из серий экспериментов обнаружено радиационное повреждение каротина в результате прямого и опосредованного действий излучения. Данные представлены на рис. VI—17. Как видно из рисунка, кристаллический каротин обладает значительной радиорезистентностью: облучение в дозе 10⁵ Гр вызывает радиолит 10% облученных молекул. Растворение каротина в липидах (в олеиновой кислоте) приводит к резкому возрастанию его радиочувствительности. D_{37} составляет незначительную величину — всего лишь 40 Гр. Естественно, такое возрастание радиочувствительности не может объясняться увеличением линейных размеров каротина в олеиновой кислоте в десятки тысяч раз. Формально можно утверждать, что чувствительный объем увели-

чился за счет того, что в растворе достаточно попадания кванта излучения в некую область, окружающую молекулу каротина, откуда возможна диффузия поражающего агента к молекуле. Так возникло предположение о существовании опосредованного действия ионизирующей радиации в липидах. Однако более строго доказать это предположение можно лишь при изучении температурных, дозовых, концентрационных зависимостей радиолиза каротина, добавления модифицирующих радиолиз веществ.

Из рис. VI—17 следует, что радиолиз каротина, растворенного в олеиновой кислоте, резко уменьшается, если облучение растворов проводить при низкой температуре. Это свидетельствует

о температурной зависимости процессов непрямого действия ионизирующей радиации. Исследование зависимости радиолиза каротина от его концентрации в растворах олеиновой кислоты

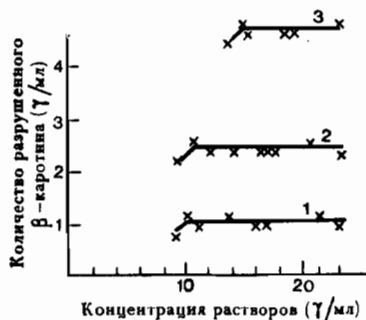


Рис. VI—18. Радиоллиз β -каротина в зависимости от его концентрации в олеиновой кислоте (по Кудряшову и Балтбарздысу, 1966, 1967): 1 — доза облучения 20 Гр, 2 — 50 Гр, 3—100 Гр.

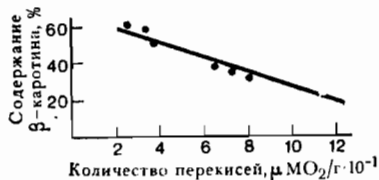


Рис. VI—19. Радиоллиз β -каротина, растворенного в олеиновой кислоте, в зависимости от содержания перекисей в растворе (по Кудряшову и Балтбарздысу, 1966, 1967).

позволило получить типичные кривые, свидетельствующие о непрямом действии радиации. Эти данные представлены на рис. VI—18. Увеличение дозы облучения вызывает повышение количества активных, диффундирующих продуктов, поэтому уровень плато кривых (1—3 на рис. VI—18) возрастает с повышением дозы γ -облучения. Высокая радиочувствительность веществ, растворенных в олеиновой кислоте, в значительной степени определяется уровнем продуктов ее окисления, в первую очередь гидроперекисей и перекисей. На рис. VI—19 показано, что предварительное окисление кислородом воздуха олеиновой кислоты приводит к резкому усилению процессов радиолиза. Облучение и последующее растворение каротина в олеиновой кислоте радиолиза каротина не усиливает даже при высоких дозах облучения.

Дальнейшие исследования показали, что вещества, модифицирующие лучевое поражение биологических объектов, аналогично влияют на процесс радиолиза растворов каротина в липидах. Так, аминоэтилизотиуроний и ингибитор свободнорадикальных

реакций — 4-метил-2,6-дитретбутилфенол — обладали радиозащитным действием. Из приведенных ранее данных можно видеть, что снижение содержания кислорода в растворе также приводит к радиозащитному эффекту. Вывод об опосредованном действии радиации в липидах подтвердили также данные о продолжительности жизни активных радикалов ненасыщенных жирных кислот. Так, используя метод «флеш-радиолиза», показали, что средняя продолжительность жизни первичных продуктов радиолиза — медиаторов реакции — не превышает 8 мс (Кудряшов, Балтбарздыс, 1966). Этот вывод особенно важен тем, что удалось определить участие перекисных радикалов липидов в непрямом эффекте ионизирующей радиации. Данные о роли перекисных радикалов липидов в непрямом механизме действия ионизирующей радиации были подтверждены в дальнейшем на других липидных растворах, системах и биологических объектах.

Известно, что в интактных клетках, тканях животных и растений, в субклеточных органеллах и мембранах содержание липидных перекисей незначительно и это количество не оказывает, естественно, повреждающего действия на биологические объекты и системы. В то же время установлено, что перекиси ненасыщенных жирных кислот, накапливаясь в клетках и тканях, способны осуществлять радиосенсибилизирующий эффект в процессе облучения ионизирующей радиацией. Работы проводились на растворах каротина, токоферола, нуклеиновых кислот, а также на клеточном и организменном уровнях. Все эти исследования подтверждают вывод о том, что радиосенсибилизирующий эффект непосредственно связан с усилением первичных лучевых реакций. Однако конкретный механизм радиосенсибилизирующего действия липидных перекисей остается все еще не выясненным.

Определенный вклад в изучение роли продуктов перекисного окисления липидов в лучевой патологии внесли работы лабораторий Е. Б. Бурлаковой и Ю. П. Козлова. В этих исследованиях основное внимание уделено проблемам образования перекисей в липидной фазе клеточных мембран и последующего изменения структуры и функциональных свойств мембран и мембраносвязанных ферментов.

Оценивая роль эндогенных липидных радиосенсибилизаторов в механизмах природной и модифицируемой радиорезистентности биологических объектов, можно предполагать, что снижение их содержания создает в тканях условия, затрудняющие протекание окислительных процессов, индуцируемых ионизирующей радиацией.

**МОДИФИКАЦИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ОРГАНИЗМОВ**

В предыдущей главе при рассмотрении сравнительной радиочувствительности мы могли убедиться в том, что различные организмы в сотни и тысячи раз различаются по степени чувствительности к радиационному воздействию. Помимо генетически детерминированных различий, наблюдаемых у объектов из разных филогенетических групп, возможны значительные вариации радиочувствительности у особей одного вида, находящихся в неодинаковых условиях питания, аэрации, температуры и т. д. Кроме того, степень лучевого поражения организмов связана с возрастом, полом, физиологическим состоянием, интенсивностью пролиферативных процессов, активностью метаболических систем и другими факторами. За счет различных внешних воздействий может быть достигнута избирательная регуляция многих перечисленных процессов. Это создает предпосылку для модификации радиочувствительности организмов.

В облученном организме наряду с развитием первичных радиационных повреждений протекают восстановительные процессы, включающие репарацию повреждений ДНК и хромосом, восстановление сублетальных повреждений клеток, размножение и дифференцировку непораженных стволовых клеток и другие, пока еще малоизученные, эффекты. Установлено, что целый ряд химических веществ может влиять на характер и интенсивность протекания репаративных процессов, что создает еще одну предпосылку для направленной модификации радиочувствительности организмов.

И наконец, широкие перспективы искусственной модификации радиочувствительности открывают результаты биофизических исследований на молекулярном и субклеточном уровнях. Биофизический анализ позволил установить причинную связь между степенью лучевого поражения организмов и характером начальных физико-химических процессов, включающих миграцию поглощенной энергии излучения, радиоллиз воды и органических молекул, перекисное окисление липидов, реакции свободнорадикальных продуктов, формирование структурных повреждений ДНК, белков, липидов и других жизненно важных макромолекул и молекулярных комплексов в клетке. Интенсивность и характер протекания перечисленных процессов зависят от присутствия в облучаемой системе молекул-примесей и кислорода, от степени агрегации макромолекул и адсорбции на них низкомолекулярных соединений и других компонентов того химического «фона», на ко-

тором разворачиваются начальные физико-химические реакции, предопределяющие биологические эффекты облучения. Различными внешними воздействиями, в первую очередь введением в организм ряда химических соединений, можно прямо или опосредованно создать в клетках и тканях условия, способствующие или затрудняющие реализацию лучевых повреждений, и таким образом либо понизить устойчивость биологических объектов к действию радиации, либо сделать их более радиорезистентными.

1. УСИЛЕНИЕ ПОРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИИ

Проблема усиления эффективности радиационного воздействия химическими соединениями привлекает внимание широкого круга исследователей. Ее важность определяется двумя основными причинами: во-первых, использование соединений, влияющих на конкретные процессы и структуры по известному механизму и усиливающих лучевое поражение, может выявить критические мишени, ответственные за гибель клетки; во-вторых, знание способов увеличения радиочувствительности клеток в различных условиях может привести к установлению путей, повышающих эффективность лучевой терапии опухолей.

Доэрти и Барнеттом в 1955 г. термином «сенсibilизация» было названо усиление лучевой реакции, обусловленное соответствующими воздействиями до и во время облучения. Вещества, обладающие таким действием, получили название радиосенсibilизаторов. Однако при усилении эффекта радиационного воздействия химическими соединениями различают: 1) синергетическое действие (потенцирование), когда комбинированный эффект двух агентов, выше, чем суммарное действие каждого из них, определенное в отдельности; 2) аддитивное действие, при котором комбинированное действие двух агентов равно сумме эффектов, вызываемых каждым из них в отдельности (в этих случаях подразумевается, что химические соединения сами оказывают определенное действие); 3) сенсibilизация, когда химическое соединение само неактивно, но при совместном действии с облучением увеличивает его эффективность. Предполагается, что истинная радиосенсibilизация ограничена временем, т. е. обусловлена влиянием на радиационно-химические процессы. В настоящее время более широко применяется термин «усиление эффективности облучения», под которым понимается любое воздействие до, во время или после облучения, приводящее к усилению эффекта сверх аддитивного. К сожалению, не всегда можно выявить, в какой момент и каким образом воздействовало данное соединение: произошло ли увеличение повреждаемости, изменилась ли реализация повреждений на радиационно-химическом уровне или репарация повреждений. В конечном итоге усиление эффективности облучения

сводится к одному из этих явлений или к их комбинации, выражающейся на молекулярном и клеточном уровнях.

Радиобиологические исследования, выполненные на клеточном уровне, показали, что выживаемость клеток в разных фазах клеточного цикла значительно варьирует; после облучения в клетках регистрируются повреждения разного типа, среди которых особое значение принадлежит повреждениям структуры ДНК; некоторые повреждения, определяемые на молекулярном и клеточном уровнях, восстанавливаются; в определенных условиях и при воздействии некоторых веществ реакция клеток на облучение может изменяться. Основываясь на клеточных параметрах, можно указать основные пути усиления действия облучения.

1. Увеличение радиочувствительности отдельных клеток.
2. Синхронизация клеток и облучение популяции в радиочувствительной фазе жизненного цикла.
3. Воздействие на репарацию повреждений на молекулярном и клеточном уровнях.

Это разделение весьма условно, так как одно и то же химическое соединение может одновременно действовать по всем механизмам: изменяя структуру ДНК и увеличивая ее повреждаемость, вызывая синхронизирующий эффект и подавляя активность систем репарации. Можно полагать, что некоторые изменения структуры ДНК, приводящие к увеличению ее поражения, будут сопровождаться уменьшением степени ее репарации и снижением восстановления на клеточном уровне.

Увеличение радиочувствительности отдельных клеток

В радиобиологических исследованиях были предприняты различные попытки увеличения радиочувствительности клеток. В основном они опирались на известные закономерности протекания первичных физико-химических процессов лучевого поражения и на представлениях о роли различных эндогенных соединений в развитии лучевого поражения клеток и субклеточных структур. Основные исследования были сосредоточены по таким направлениям: изменение молекулярной структуры ДНК; использование ингибиторов сульфгидрильных групп; поражение клеток продуктами радиолитического сенситизаторов и воздействие электрон-акцепторными соединениями.

Изменение молекулярной структуры ДНК

Структура ДНК изменяется при включении в нее галогенированных аналогов пиримидиновых оснований. Во время синтеза ДНК вместо нормального тимидина включаются 5-хлор-, 5-бром- или 5-йод-дезоксинуридины, образованные путем замещения ме-

тильной группы в пятом положении тимидина на галоиды. Радиусы Ван-дер-Ваальса метильной группы у этих галоидов различаются незначительно: наиболее близок по размеру к метильной группе атом брома — 1,95 Å по сравнению с 2,00 Å, несколько менее — атом хлора 1,80 Å, а у йода радиус равен 2,16 Å. В связи с этими различиями бромированные аналоги менее других токсичны для клеток и более интенсивно включаются в ДНК.

При включении аналогов пиримидиновых оснований в ДНК отмечается значительное повышение чувствительности к ионизирующей радиации и УФ-излучению вирусов, бактерий, клеток млекопитающих и человека. Радиосенсибилизация этими веществами, по-видимому, явление универсальное и наблюдается на всех уровнях организации.

Включение галоидированных аналогов пиримидиновых оснований в ДНК приводит к усилению основных эффектов, вызываемых ионизирующим излучением на клеточном уровне: удлинению блока вступления клеток в митоз, увеличению числа хромосомных аберраций и усилению летального действия радиации на клетки. Существенно, что включение аналогов приводит к радиосенсибилизации как клеток, так и экстрагированной из них ДНК, что является одним из доказательств роли ДНК как мишени, ответственной за репродуктивную гибель клеток.

Анализ кривых «доза—эффект» для клеток млекопитающих показывает, что в определенных условиях усиление летального эффекта облучения сопровождается уменьшением обоих параметров дозных кривых — D_0 и n (или D_q) или одного из них. Эффект зависит главным образом от концентрации препарата и степени его включения, хотя радиочувствительность увеличивается уже при замещении 1—2% тимидина.

Аналоги пиримидиновых оснований, по-видимому, не влияют на восстановление от сублетальных радиационных повреждений, но могут уменьшать способность клеток к их накоплению. В некоторых случаях аналоги тимидина снижают пострадиационное восстановление от потенциально летальных повреждений.

Механизм повышения радиочувствительности клеток к ионизирующему излучению при включении галоидированных аналогов в ДНК связан с изменением молекулярной структуры ДНК, приводящим к повышению ее радиочувствительности: увеличивается число двойных разрывов на единицу дозы облучения; повышается выход односторонних разрывов и снижается способность к их репарации; тормозится репарация комплекса ДНК-липид.

Механизм образования разрывов в галоидированной ДНК может состоять в переносе отрицательного заряда к замещенному основанию, так как оно служит более эффективным местом локализации энергии возбуждения; при этом освобождается ион галоида и образуется уридил-радикал. Методом ЭПР-спектроскопии показано, что BU₃ действительно диссоциирует на радикал и анион Br⁻. Бром-радикал реагирует с соседним сахаром, от кото-

рого отщепляется атом водорода, что приводит к разрыву нуклеотидной цепи. Существенно, что часть энергии, поглощенной ВU-нитью ДНК, переносится на нить, не включившую аналог, и вызывает в ней одонитевые разрывы.

Ингибирование сульфгидрильных групп

Наличие качественной корреляции между радиочувствительностью многих объектов и содержанием SH-групп в них свидетельствует о важной роли этих соединений в лучевом поражении. Защитное действие сульфгидрильных соединений показано на многих биологических системах. Во то же время при действии веществ, способных реагировать с SH-группами, происходит повышение радиочувствительности.

Практически все известные ингибиторы SH-групп сенсibiliзируют клетки к действию ионизирующей радиации в опытах *in vitro*, поэтому казалось вполне логичным связать механизм их действия с нейтрализацией внутриклеточных сульфгидрильных протекторов.

Йодацетамид, йодуксусная кислота (ЙУК), синкавит, менадион и другие производные хинонов, *n*-хлормеркурийбензоат (*n*ХМБ), *N*-этилмалеимид (НЭМ), карбонильные соединения и кетоальдегиды, индантрион, производные ацетофенона, диамид повышают радиочувствительность клеток преимущественно в анаэробных условиях. Причем чем выше исходный уровень тиолов, тем выше степень радиосенсибилизации, и наоборот. Так, йодацетат и НЭМ более значительно сенсibiliзируют клетки, находящиеся в резистентных G₁- и S-фазах цикла, в которых отмечается более высокое содержание SH-групп. Такая же степень сенсibiliзации наблюдается при добавлении НЭМ к S-клеткам после облучения, при этом содержание небелковых сульфгидрильных групп не восстанавливается в течение нескольких часов и сопровождается ингибированием включения тимидина в ДНК. По-видимому, уменьшение в клетках содержания SH-групп — это один из способов увеличения их радиочувствительности.

В последнее время появился ряд данных о том, что сенсibiliзация клеток к ионизирующему излучению при воздействии ингибиторами сульфгидрильных групп может обуславливаться и другими механизмами.

Радиосенсибилизующий эффект ЙУК и ее производных может объясняться действием продуктов ее радиолиза, способных реагировать с клеточными компонентами, подавлять синтез ДНК, РНК и белка, ингибировать восстановление одонитевых разрывов ДНК, нарушать проницаемость мембран. Активными радиосенсибилизаторами в этом случае оказываются промежуточные продукты, возникающие при реакции исходного сенсibiliзатора с радикалами OH[•], или радикал, образовавшийся при отщеплении йода, или сам атом йода.

Возможна также реакция (НЭМ) не только с продуктами радиолиза воды (ОН[•]), но и с органическими радикалами оснований нуклеиновых кислот, сахара и компонентами мембран, помимо SH-групп. Сенсибилизация соединениями с высокими электрон-акцепторными свойствами (производные хинонов, ацетофенона и др.) может объясняться их способностью захватывать электрон.

Механизм действия лХМБ, для которого была обнаружена корреляция между связыванием его SH-группами и сенсибилизирующей активностью, обуславливается образуемыми из него продуктами радиолиза (среди которых обнаружен ион ртути), обладающими высокой токсичностью. Кроме того, лХМБ значительно увеличивает выход одиночных разрывов ДНК, вероятно, за счет полного подавления активности ферментов репарации и дополнительного сенсибилизирующего эффекта в отношении возникновения одиночных разрывов.

При окислении почти всех небелковых SH-групп диамидом радиосенсибилизация клеток на воздухе не отмечается. Можно полагать, что эндогенные небелковые сульфгидрильные группы, являющиеся ловушками радикалов, в аэробных условиях не играют определяющей роли в радиационной реакции клеток, а увеличение радиочувствительности аноксических клеток диамидом объясняется увеличением радиационного повреждения ДНК.

Следует также учитывать, что реакция клеток может зависеть от небольшой фракции белковых SH-групп, определяющих активность ферментов пострадиационной репарации. Так, оказалось, что в невысоких концентрациях НЭМ сенсибилизирует к облучению аэробные клетки главным образом в тех фазах цикла, в которых высока способность клеток к восстановлению от радиационных повреждений (G_1 - и поздняя S-фазы); радиосенсибилизация не наблюдалась в митозе и при переходе из G_1 в S. Кроме того, НЭМ одинаково эффективен при добавлении до, во время и сразу после облучения, но неэффективен при воздействии через 2 часа после облучения. Следовательно, НЭМ может ингибировать восстановление клеток от повреждений путем связывания ферментов, содержащих SH-группы и участвующих в процессах репарации.

Необходимо учитывать, что корреляция между содержанием SH-групп и радиочувствительностью может отсутствовать при облучении в кислороде, однако обнаруживается в аноксических условиях. Возможно, что эндогенный пул сульфгидрильных соединений обуславливает повышение резистентности в аноксии.

По-видимому, ингибирование SH-групп не является единственным механизмом радиосенсибилизирующего действия приведенных выше соединений. Можно полагать, что повышение эффективности облучения ингибиторами SH-групп обусловлено: 1 — токсичностью для клеток продуктов их радиолиза; 2 — реакцией с радикалами радиолиза воды и с радикалами макромоле-

кул, индуцированными облучением; 3 — подавлением активности ферментов репарации; 4 — ингибированием химического восстановления поврежденных макромолекул за счет блокирования сульфгидрильных групп и переноса атома водорода.

Действие продуктов деградации и радиолiza радиосенсибилизатора

Повышение радиочувствительности клеток, возможно, связано с образованием токсических продуктов при облучении сенсибилизатора, его метаболической деградации, окислении и т. д.

Типичным примером радиосенсибилизаторов являются йодсодержащие вещества, например йодацетамид (ЙАА) и йодуксусная кислота. Техникoй быстрого смешивания было показано, что ЙАА, добавленный через 3 мс после облучения, не оказывает никакого эффекта; сенсибилизация наблюдается при добавлении его за 3 мс до облучения, т. е. за время, недостаточное для реакции с SH-группами. Механизм радиосенсибилизации, по-видимому, свободнорадикальный; основную роль могут играть радикалы J и J⁻ (RJ), долго живущие и достаточно избирательные в своей реактивности. Кроме того, продукты радиолiza йодсодержащих соединений могут взаимодействовать с мембранами, связываться с ДНК, подавлять синтез ДНК, РНК, воссоединять одиночные разрывы ДНК, ингибировать SH-группы.

При воздействии ряда других ингибиторов SH-групп, как указывалось выше, также образуются активные промежуточные продукты исходных соединений. В некоторых случаях эти промежуточные продукты оказывают иное действие, чем исходное соединение.

Ингибиторы радикальных реакций, имеющие фенольную структуру, были предложены для использования в биологических системах академиком Н. М. Эмануэлем. Соединения этого класса обладают радиозащитными свойствами, снижая гибель облученных животных, клеток в культуре ткани, уменьшая радиационную деполимеризацию изолированной ДНК. Пропиловый эфир галловой кислоты (ПГ), одно из соединений этого класса, при инкубации в водных растворах в присутствии кислорода окисляется, образуя в качестве промежуточных продуктов семихинонные ион-радикалы, перекись водорода, ортохинон и др. Оказалось, что радиомодифицирующее действие ПГ в значительной степени зависит от времени его контакта с клетками до облучения. Так, при введении препарата за 15 мин до облучения клеток в культуре ткани отмечается защитный эффект, сопровождающийся увеличением значения дозы D_0 . При введении ПГ за 18 ч до облучения наблюдается радиосенсибилизирующее действие, значение дозы D_0 уменьшается в 1,6 раза. При пострadiационной обработке клеток их реакция не изменяется.

Следовательно, ингибиторы радикальных реакций в зависимости от условий применения могут вызывать радиозащитный или радиосенсибилизирующий эффект. Но, по-видимому, во всех случаях для изменения радиационной реакции они, или продукты их метаболизма, должны присутствовать в клетках во время облучения. Защитное действие ПГ тогда объясняется его реакцией со свободными радикалами, возникающими при облучении, и инактивацией их. Сенсибилизирующий эффект проявляется за счет действия образующихся из исходного соединения активных продуктов радикального и нерадикального характера — семихинонных ион-радикалов, хинонов, перекисей и др., способных образовывать комплексы с радикалами макромолекул, как это показано для соединений, имеющих структуру хинонов (синкавит, менадион).

Воздействие электрон-акцепторными соединениями

Универсальная способность кислорода модифицировать эффективность облучения привела к поиску веществ, действующих по аналогичному механизму. В 60-е гг. было высказано предположение о том, что радиосенсибилизирующая активность ряда химических соединений связана с их способностью акцептировать электроны. Соединений этих в настоящее время известно довольно много, причем некоторые из них давно используются в биологических системах, другие вновь синтезированы; к ним относятся: производные глиоксаля, стабильные свободные радикалы, производные ацетофенона, нитрофураны, производные хинонов, нитробензолы, нитроимидазолы и ряд других.

Для этого обширного ряда химических соединений предполагается следующий механизм действия: в результате прямого и непрямого действия радиации образуются радикалы мишеней (подразумеваются молекулы ДНК), которые могут сразу же восстановиться химическим путем, тогда повреждение не будет реализовано; или же может произойти окисление этого радикала, акцептирование электрона кислородом или другим электрон-акцепторным соединением (ЭАС), что приведет к реализации повреждения. Далее, если произойдет ферментативная репарация, то целостность мишени может восстановиться; однако нельзя исключить возможности возникновения нерепарабельного повреждения, вызывающего гибель клетки. И действительно, этот механизм был показан в модельных системах: методом импульсного радиолиза и ЭПР-спектроскопией в водных растворах был зарегистрирован перенос электронов с оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов и нуклеотидов к сенсибилизатору. Помимо переноса электрона или даже одновременно с этим процессом возможны дополнительные радиационно-химические реакции связывания радиосенсибилизатора со свободнорадикальными продуктами моле-

ул — мишеней с образованием стабильных продуктов, вызывающих летальный эффект. Кроме того, обнаружена и токсичность для клетки промежуточных радикальных продуктов радиосенсибилизаторов, захвативших электрон.

Существенно, что при высокой концентрации эти соединения действуют и как конкурентные ловушки радикалов радиолиза воды, что приводит к уменьшению степени сенсибилизации и в некоторых случаях — к защитному эффекту.

Стабильные свободные радикалы, многие из которых впервые синтезированы и изучены в Институте химической физики АН СССР, являются эффективными радиосенсибилизаторами клеток бактерий и их спор в аноксических условиях, причем их реактивность обусловлена наличием нитроксильной группы.

Будучи свободными радикалами, эти соединения необратимо реагируют с индуцированными облучением радикалами ДНК с образованием продукта, вызывающего гибель клеток. Имеются доказательства того, что радикалы оснований нуклеотидов и ДНК быстро реагируют с триацетонамин-N-оксидом (ТАН) в водных растворах. Обнаружена корреляция между активностью разных типов нитроксильных радикалов по отношению к радикалам ОН'-оснований ДНК и их эффективностью как сенсибилизаторов клеток. Радиосенсибилизация всегда сопровождается связыванием ТАН с ДНК. Обладая высоким сродством к электронам, эти соединения захватывают электрон с молекулы мишени, образованной при ее ионизации, окисляя ее и приводя к реализации повреждения. Отсутствие эффекта в аэробных условиях можно объяснить тем, что кислород конкурирует с нитроксильным радикалом, окисляя его. Существенно, что связь ТАН с радикалом ОН ДНК отмечается только в аноксических условиях. ТАН, по-видимому, не увеличивает выхода одонитевых разрывов ДНК фагов, бактерий и клеток млекопитающих в физиологических условиях при использовании в определенной концентрации и не влияет на их воссоединение.

Таким образом, основной механизм действия ТАН заключается, очевидно, в образовании стабильного продукта ТАН—ДНК, приводящего к нарушению матричной активности ДНК с последующим нарушением синтеза ДНК.

Эффективность ТАН в клетках млекопитающих зависит от его концентрации и дозы облучения: при низких дозах облучения отмечается защитный эффект, при высоких — радиосенсибилизирующий. В оксигенированных условиях в высоких концентрациях ТАН может защищать клетки и уменьшать число одонитевых разрывов ДНК. Эффективность ТАН как радиосенсибилизатора в значительной степени падает с увеличением концентрации клеток. Этот эффект можно объяснить тем, что в присутствии большого числа клеток существенно возрастает скорость метаболизма и деградации ТАН. На клетках млекопитающих, в отличие от бактерий, обнаружена и пострадиационная сенсибилизация ТАН,

обусловленная, по-видимому, взаимодействием с долгоживущими (в течение нескольких минут) промежуточными продуктами радиолиза, хотя бактерии сенсibilизируются нитроксильными радикалами эффективнее, чем клетки млекопитающих. Так, значение дозы D_0 у бактерий уменьшается в 1,5—2,0 раза, в то время как у клеток млекопитающих — в 1,3—1,5 раза.

Невысокая радиосенсibilизирующая эффективность ТАН по отношению к клеткам млекопитающих, быстрый метаболизм и деградация стимулировали поиск других, более активных, соединений этого класса; были синтезированы более эффективные норпсевдопеллетерин-N-оксил, 2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинол-N-оксил, бис — (2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-пиперидинил)сукцинат.

Производные *п*-нитроацетопенона сенсibilизируют к облучению клетки млекопитающих так же эффективно, как и бактерии, и проявляют одинаковую активность во всех фазах клеточного цикла. Степень радиосенсibilизации клеток в культуре ткани может приближаться к кислородному эффекту и возрастает с увеличением концентрации препарата. Радиосенсibilизирующей активностью обладают только те производные *п*НАФ, которые имеют в бензольном кольце группу NO_2 , причем повышение электрон-акцепторной активности совпадает с радиосенсibilизирующей активностью, но необязательно с увеличением токсичности.

Нитрофураны — нитрофуразон, нитрофурантоин, нифуроксим — по своей активности занимают промежуточное положение между *п*НАФ и кислородом. Эффективность нифуральдезона и его водорастворимых производных в гипоксических условиях при определенных концентрациях приближается к таковой кислорода. Производные нитрофурана активны по отношению к клеткам во всех фазах цикла и в стадии покоя, причем в нетоксичных концентрациях. Эти соединения легко проникают через фосфолипидную мембрану клеток; при облучении наблюдается связывание с различными молекулами (сывороточным альбумином, ДНК), и клеткой в целом. В модельной системе в растворе ДНК было показано, что наиболее существенной для радиосенсibilизации реакцией является связывание нитрофуразона с радикалами ДНК, индуцированными облучением. При этом повреждение ДНК (одонитевые разрывы) увеличивается в такой же степени, как и радиочувствительность клеток, определяемая по их выживаемости; в то же время производные нитрофурана не влияют на воссоединение одонитевых разрывов ДНК.

Нитроимидазолы — наиболее активные и перспективные ЭАС, так как удовлетворяют практически всем требованиям, предъявляемым к радиосенсibilизаторам этого типа: вызывают избирательную сенсibilизацию гипоксических клеток, хорошо растворяются в воде и липидах, малотоксичны по отношению к нормально оксигенированным тканям, характеризуются медленной метаболической деградацией и разрушением.

Сравнение эффективности действия целого ряда ЭАС в системах *in vitro* показало, что нитроимидазолы — метронидазол (5-нитроимидазол) и мизонидазол (2-нитроимидазол, RO-07-0582) — наиболее перспективны для исследования их радиосенсибилизирующей активности по отношению к опухолям животных и человека.

Многие общие свойства, присущие ЭАС, свидетельствуют о возможности направленного изменения этими соединениями радиочувствительности и использования в радиотерапии опухолей.

Одним из главных их качеств является то, что все ЭАС не сенсибилизируют клетки в присутствии кислорода. Степень радиосенсибилизации, как правило, ниже, чем у кислорода, но для некоторых производных нитрофурана и нитроимидазола приближается к кислороду.

ЭАС должны обязательно присутствовать во время облучения, так как они влияют на процессы, происходящие в ничтожно малое время после и во время облучения.

Радиосенсибилизирующий эффект мало зависит от температуры, т. е. активность метаболических процессов в клетке не играет главной роли в механизме их действия.

Степень радиосенсибилизации ЭАС существенно зависит от концентрации препарата, скорости его метаболизма и деградации, от времени введения до облучения.

ЭАС конкурируют в клетке с веществами, которые восстанавливают образовавшиеся радикалы макромолекул до их первоначального, неповрежденного состояния. Поэтому, когда в клетке много восстановителей (например, сульфгидрильных соединений), степень радиосенсибилизации падает.

Во всех исследованных случаях обнаружена корреляция между степенью радиосенсибилизации по выживаемости клеток и электрон-акцепторной активностью использованного соединения.

Для многих ЭАС обнаружена корреляция между повреждениями ДНК, числом одонитевых разрывов, выживаемостью клеток и активностью их как акцепторов электронов. Таким образом, и в этом случае увеличение радиационного повреждения ДНК коррелирует с увеличением гибели клеток. В то же время ЭАС не подавляют воссоединения одонитевых разрывов ДНК.

Большинство известных радиосенсибилизаторов действуют на пролиферирующие клетки или на клетки в определенной фазе цикла. Радиосенсибилизирующая эффективность ЭАС не зависит от фазы клеточного цикла; в такой же степени они повышают и радиочувствительность покоящихся клеток.

Многие ЭАС увеличивают радиочувствительность клеток при облучении нейтронами; однако степень сенсибилизации значительно меньше, чем в случае рентгеновского и γ -излучения.

Использованию ЭАС в качестве радиосенсибилизаторов придается особое практическое значение в связи с тем, что для повышения эффективности терапии злокачественных новообразова-

ний желательно избирательно повреждать только опухолевые клетки. Поэтому радиосенсибилизация должна основываться на биологических различиях между опухолевыми и нормальными тканями. Известно, что опухоли характеризуются недостаточным развитием кровеносной системы и пониженным напряжением O_2 . Установлено, что гипоксические клетки, содержащиеся в большинстве опухолей человека, отличаются повышенной радиорезистентностью, могут выживать после облучения и вызывать рецидив опухоли. ЭАС позволяют избирательно повышать радиочувствительность субпопуляции именно гипоксических клеток, которые практически отсутствуют в нормальных тканях.

Повышение радиационной реакции популяции путем синхронизации клеток

Этот способ усиления действия облучения связан со значительными различиями в радиационной реакции клеток в течение цикла. В некоторых случаях амплитуда колебаний радиочувствительности столь велика, что выживаемость клеток при облучении в разных фазах цикла может различаться на порядок. Таких различий в выживаемости нельзя в настоящее время достигнуть ни одним из известных радиосенсибилизаторов и протекторов. Отсюда возникает перспектива синхронизировать клетки в наиболее радиочувствительной фазе цикла, облучать эту однородную популяцию и таким образом существенно повысить ее реакцию на облучение.

В условиях *in vitro* применяются следующие методы синхронизации:

1. Блокирование клеток в одной из фаз цикла; снятие блока приводит к одновременному, синхронному продвижению клеток по циклу. Наиболее широко используется техника блокирования клеток ингибиторами синтеза ДНК. Так, 5-фтордезоксифуридин подавляет синтез ДНК, ингибируя тимидилатсинтетазу и образование тимина, блокирует клетки в S-фазе. Метотрексат — антагонист фолиевой кислоты — подавляет синтез тимидилата и пуринрибонуклеотидов. Воздействие дезоксиаденозином, дезоксигуанозином, 5-аминоуроцилом приводит к накоплению клеток в конце фазы G_1 . Ингибирование синтеза ДНК при этом прекращается добавлением тимидина в низких концентрациях. Синхронизацию популяции в фазе G_2 на некоторых линиях клеток можно вызвать некоторыми антибиотиками — блеомицином, адриамицином, дауномицином. Для остановки деления клеток в метафазе и накопления их в митозе применяются митотические яды: колцемид, колхицин и его производные (винбластин, винкристин, подофиллин, пропезид).

2. Для селективного поражения клеток можно использовать концентрированные растворы 3H -тимидина с высокой удельной

активностью; клетки, вступающие в фазу синтеза ДНК, включают меченый тимидин и гибнут от инкорпорированного облучения; клетки в фазе G_1 выживают и далее синхронно движутся по циклу. Таким же образом можно использовать оксимочевину, которая вызывает избирательную гибель клеток в фазе синтеза ДНК и блокирование выживших клеток в конце G_1 -фазы. По окончании действия препарата выжившие клетки начинают продвигаться по циклу с высокой степенью синхронности.

В системах *in vitro* синхронизирующие агенты применяются в основном для изучения свойств клеток в разных фазах цикла и их чувствительности к различным воздействиям. Развитие методов синхронизации и техники клонирования одиночных клеток позволило обнаружить все основные радиобиологические феномены, связанные с биологией клеточного цикла.

Все представленные выше соединения и такие, как 5-фторурацил, 1- β -D-арабинофуранозилцитозин и ряд других агентов, синхронизируя клетки, в принципе могут быть использованы для повышения радиационной реакции популяции. Однако при этом необходимо соблюдать определенные требования: блок деления должен быть обратимым и специфичным, достаточно длительным для того, чтобы клетки могли доходить до нужной фазы цикла; вариации в длительности отдельных фаз цикла должны быть невелики; необходимо знать параметры клеточного цикла данной популяции, реакцию на облучение и на используемый для синхронизации агент конкретных клеток в каждой фазе цикла; и, как результат всего этого, необходимо строгое соблюдение интервала времени между введением препарата и облучением.

Воздействие на восстановление клеток от повреждений

Способность к восстановлению от повреждений обнаружена у подавляющего большинства клеток млекопитающих. Активность процессов восстановления варьирует у клеток разного типа и в разных фазах клеточного цикла. Различия в способности к восстановлению популяций объясняются разным распределением клеток по фазам цикла, преобладанием клеток с высокой (или низкой) репаративной способностью. Генетически детерминированная способность клеток к восстановлению от повреждений во многом определяет судьбу облученной клетки.

Можно полагать, что подавление процессов репарации ведет к увеличению нерепарируемых повреждений и повышению гибели клеток. Подавление восстановления клеток от сублетальных и потенциально летальных радиационных повреждений отмечается при воздействии гипо- и гипертонических растворов, вызывающих диспергирование и конденсацию хроматина, интеркалирующих агентов, кофенна. Природа этих повреждений пока не расшифрована, но возможно, что потенциально-летальные повреждения —

повреждения первичной структуры ДНК (часть одно- и двунитевых разрывов); сублетальные повреждения, не вызывающие гибели клеток, — повреждения третичной структуры ДНК, нарушения ее компактизации. Восстановление клеток от сублетальных и потенциально-летальных повреждений зависит, по-видимому, от структуры ДНК, ее конформации и стабильности, от активности процессов репликации и транскрипции, от контакта с ядерной мембраной, от структуры хроматина. Предполагается, что в основе восстановления от потенциально-летальных повреждений лежит эксцизионная репарация — «ошибочная» быстрая и «безошибочная» медленная.

Наиболее универсальными ингибиторами репараций ДНК и восстановления клеток являются соединения, способные связываться с ДНК. Это свойство объединяет разные химические соединения: интеркалирующие агенты (актиномицин Д, лугантон, акрифлавин, кинакрин, хлорокин, бромистый этидий и др.), некоторые антибиотики (дауномицин, блеомицин), комплексные соединения платины (*цис*-дихлорбис (циклопентиламин) платина II).

Эти соединения подавляют воссоединение одонитевых разрывов ДНК (актиномицин Д, акрифлавин, кофеин, блеомицин, *цис*-ПАД), репаративную репликацию (актиномицин Д, акрифлавин, кинакрин, блеомицин), воссоединение ДНК-мембранного комплекса (актиномицин Д), пострепликативную репарацию (кофеин).

Все эти соединения подавляют восстановление клеток от сублетальных и потенциально-летальных повреждений, индуцированных ионизирующим и УФ-излучением, что выражается в уменьшении выживаемости клеток при однократном и фракционированном облучении.

Однако следует учитывать, что повышение радиационной реакции клеток этими химическими соединениями связано не только с ингибированием процессов репарации. Обычно бывает трудно разделить два эффекта — усиление повреждаемости и подавление восстановления, так как в конечном счете регистрируется увеличение числа повреждений. Имеются, однако, многочисленные данные о том, что интеркалирующие соединения — блеомицин, кофеин и др. — увеличивают гибель только тех штаммов бактерий, которые способны восстанавливаться от повреждений, но не влияют на выживаемость мутантов, лишенных способности к какому-либо этапу репарации. Эти соединения эффективны при воздействии до и после облучения, но степень усиления радиационной реакции клеток уменьшается, если препарат вводится спустя некоторое время после облучения, т. е. после завершения процессов репарации. Кроме того, было показано, что эти препараты при пострadiационном воздействии изменяют форму кривой «доза — эффект», уменьшая величину плеча (значение дозы D_q) и значительно менее изменяя наклон кривой (значение дозы D_0). Если исходить из предположения о том, что ширина плеча может ха-

рактизовать способность клеток к восстановлению и аккумуляции сублетальных повреждений, то уменьшение величины плеча на кривой зависимости эффекта от дозы может свидетельствовать в пользу предположения о том, что механизм радиосенсибилизирующего действия этих агентов связан главным образом с ингибированием процессов восстановления.

Одним из широко применяемых интеркалирующих соединений является актиномицин Д. Он реагирует с гуаниловыми группами ДНК, образуя ковалентные связи, или же вставляется между парами оснований ДНК, что может обуславливать уменьшение репарации радиационных повреждений, подавление ДНК-зависимого синтеза РНК и, как следствие, синтеза белка. Размер лучевых повреждений, например число разрывов цепи на единицу абсорбированной дозы, в присутствии препарата увеличивается и одновременно уменьшается репарация лучевых повреждений. Актиномицин Д тормозит воссоединение одонитевых разрывов и репаративную репликацию ДНК, подавляет восстановление целостности ДНК-мембранного комплекса, ингибирует активность ДНК-лигаз.

Для других интеркалирующих агентов, например кинакрина, предполагается, что его плоская трехкольцевая молекула вставляется между соседними парами оснований двойной спирали ДНК. При этом наблюдается ингибирование активности ДНК- и РНК-полимераз, подавление репарации одонитевых разрывов ДНК и репаративной репликации. По-видимому, эти эффекты объясняются стерическим взаимодействием кинакрина с ДНК.

Имеются данные о том, что и другие интеркалирующие соединения — акрифлавин, бромистый этидий — ингибируют репарацию ДНК и уменьшают выживаемость клеток при однократном и фракционированном облучении.

При исследовании радиосенсибилизирующего действия комплексов платины было показано, что *транс*-изомеры вызывают в клетках образование связей ДНК-белок, *цис*-изомеры — ДНК — ДНК, а с гибелью клеток коррелирует главным образом индукция поперечных связей ДНК — ДНК.

Весьма распространенным ингибитором процессов восстановления является кофеин, в определенных концентрациях значительно повышающий гибель облученных клеток и увеличивающий число хромосомных аберраций, но в некоторых случаях не влияющий на выживаемость клеток. Оказалось, что кофеин на многих линиях клеток (но далеко не на всех) ингибирует восстановление от потенциально летальных повреждений, индуцированных рентгеновским, γ - и нейтронным облучением и тем самым увеличивает выход двунитевых разрывов ДНК.

Вполне возможно, что гетерогенность клеточных популяций по фазам цикла и другим параметрам, их различия в репаративной способности обуславливают разную эффективность некоторых ингибиторов репарации (особенно кофеина), их не универ-

сальность. Следовательно, комбинация двух агентов, подавляющих разные типы репарации, может приводить к большему усилению действия облучения. Действительно, комбинация кофеина, ингибирующего постреплекативную репарацию, и хлорокина, более существенно ингибирующего репаративную репликацию и воссоединение однонитевых разрывов, в значительно большей степени повышает эффективность облучения, чем каждый из агентов в отдельности.

Таким образом, способы повышения радиочувствительности клеток основаны на определенных молекулярных и клеточных механизмах: увеличении радиационного повреждения ДНК, подавлении процессов репарации повреждений или использовании таких фундаментальных закономерностей, как различия в радиочувствительности фаз цикла и знания параметров клеточного цикла. Можно назвать следующие основные пути усиления действия облучения на клетки:

I. Увеличение радиочувствительности клеток.

1. Изменение молекулярной структуры ДНК при включении в нее галогенированных аналогов пиримидиновых оснований.
2. Действие агентов, понижающих уровень тиолов и других протекторов в клетке.
3. Действие промежуточных продуктов радиосенсибилизатора, образуемых при его радиолизе и других превращениях в клетке.
4. Изменение быстрых физико-химических процессов при воздействии кислорода и других электрон-акцепторных соединений (в гипоксических условиях) путем окисления поврежденных облучением макромолекул и взаимодействия с ними.

II. Синхронизация клеток и облучение популяции в радиочувствительной фазе клеточного цикла.

1. Блокирование продвижения клеток по циклу.
2. Избирательная гибель клеток в одной из фаз клеточного цикла при воздействии синхронизирующего агента.

III. Подавление репарации повреждений.

1. Изменение молекулярной структуры ДНК при ее комплексовании с различными соединениями.
2. Подавление активности ферментов репарации.

Если проанализировать I и III пути усиления действия облучения, то у всех перечисленных соединений, вызывающих эффект радиосенсибилизации, можно обнаружить одно общее свойство — способность образовывать комплексы или взаимодействовать с молекулами ДНК, увеличивая радиационное повреждение ДНК или препятствуя ее репарации. Универсальность действия аналогов пиримидиновых оснований на всех системах, не зависящая от типа клеток и других условий, говорит о важности повреждения ДНК в реакции клеток. Многие из перечисленных выше

радиосенсибилизаторов не универсальны, и их эффективность может по-разному проявляться в зависимости от вида клеток. В то же время включение аналогов в ДНК всегда приводит к увеличению повреждения ДНК и повышению гибели клеток (фаги, бактерии, клетки млекопитающих и человека). Таким же универсальным является кислородный эффект — увеличение гибели при повышении напряжения кислорода. Данные о том, что в присутствии кислорода (и многих других радиосенсибилизаторов) увеличивается повреждаемость ДНК, также позволяют связать реакцию клеток с воздействием на их генетический аппарат.

Существенны также данные о корреляции между нормальной репликацией репарированной ДНК в поколениях клеток и их выживаемостью, т. е. о правильности прошедшего процесса репарации.

Агенты, взаимодействующие с ДНК (актиномицин Д, кофенн, акрифлавин, кинакрин, блеомицин, *цис*-комплексы платины и др.), препятствуют репарации повреждений всех типов на молекулярном и клеточном уровнях и увеличивают гибель клеток.

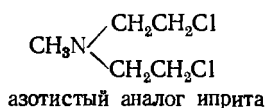
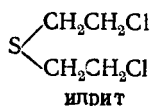
Так как ДНК находится в комплексе с другими ядерными компонентами (белки, мембраны), то и все агенты, изменяющие структуру ДНК, необязательно одинаковым образом, могут изменять способность к взаимодействию ее с этими макромолекулами. В этом случае повреждение может быть локализовано не на ДНК (или не только на ДНК). Для функциональной полноценности ДНК и репродуктивной целостности клетки необходимы определенные взаимодействия ДНК с другими макромолекулами: все, что препятствует установлению комплексов, может влиять на реакцию клеток.

Радиомиметики

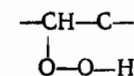
Вещества, способные усиливать действие излучения, а также вызывать многочисленные биологические эффекты, имитирующие действие ионизирующей радиации, получили название «радиомиметики». Изучение радиомиметиков представляет теоретический интерес и принесло ряд важных практических результатов. Так, З. Бак на основании известной способности аминов подавлять действие радиомиметика — горчичного газа — предположил, что амины могут защищать животных от действия ионизирующей радиации. Догадка подтвердилась: было открыто радиозащитное действие метиламина, цистеина и их аналогов.

В 40-е гг. И. А. Раппопорт, Ш. Аурбах и Д. Робсон экспериментально доказали способность радиомиметиков, как и ионизирующего излучения, вызывать мутации. Было открыто мутагенное действие иприта и детально исследован механизм химического мутагенеза.

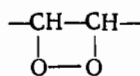
Впоследствии появилось большое количество работ по изучению противоопухолевого действия радиомиметиков. Было обнаружено, что некоторые из них подавляют рост опухолей так же, как и ионизирующая радиация. Вскоре после обнаружения токсических и мутагенных свойств иприта выяснилось, что азотистые аналоги иприта обладают широким спектром радиомиметического действия:



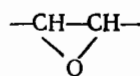
Радиомиметики, подобно ионизирующей радиации, повреждают хромосомы, временно задерживают деление клеток (задержка деления может быть обратимой в случае невысоких концентраций препаратов). Азотистые производные иприта действуют преимущественно на быстроделющиеся клетки (кровообразительных тканей, костного мозга, половых органов, слизистых оболочек кишечника и желудка, вызывают очаговое поражение волос и подавление образования антител). Отнесение того или иного вещества к радиомиметическим носит все же условный характер, так как действие химического агента значительно уже по сравнению со спектром широчайших изменений, вызываемых ионизирующей радиацией. Радиомиметики могут отличаться друг от друга широтой поражающего действия. К радиомиметикам в основном относят те вещества, химическая природа которых близка к иприту и перекисям. Это соединения, имеющие следующие функциональные группы:



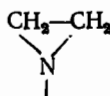
гидроперекисная



перекисная



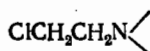
эпоксидная



этилениминная



ипритная



азотистоипритная

Как видно, многие радиомиметики могут быть отнесены к алкилирующим агентам. Наиболее эффективными оказываются те вещества, которые содержат две алкилирующие группы или более.

В настоящее время не установлено, какие стадии первичного или начального действия ионизирующей радиации имитируют радиомиметики. Известно только, что эффекты радиомиметиков сходны с самыми начальными проявлениями лучевой патологии. По мнению Александера, радиомиметики, так же как и ионизирующие излучения, не специфичны. Они способны взаимодействовать с очень многими важными составными частями клетки, и поэтому на основании данных, полученных в модельных экспериментах, невозможно судить о том, как они действуют на организм.

Как видно, трудности, возникающие при выяснении механизмов радиомиметического эффекта, сходны с трудностями, возникшими при выяснении механизмов биологического действия ионизирующей радиации. Конечно, нельзя согласиться с тем, что радиомиметики способны полностью воспроизводить эффекты ионизирующего излучения. Априори можно утверждать, что в действии любого химического агента и ионизирующей радиации есть существенные отличия. Так, никакое вещество не может одновременно проникать во все биологические структуры и одновременно воздействовать на макромолекулы, а именно такая ситуация возникает при действии ионизирующей радиации. Кроме того, высокая концентрация вещества в месте введения радиомиметика может создать сильный локальный эффект. Проведенные опыты показывают, что различия в действии миметика и радиации проявляются на клеточном уровне. Например, наибольшая чувствительность клеток к радиомиметику наблюдается в начале интерфазы, известны также различия в характере хромосомных повреждений, частоте индуцированных мутаций и др.

Исследование радиомиметического эффекта — один из подходов к изучению механизма лучевого поражения. Первичные акты взаимодействия с веществом, безусловно, различны при действии радиации и химического агента, но на каком-то этапе первичных процессов усиления и реализации повреждений оба фактора действуют во многом сходно.

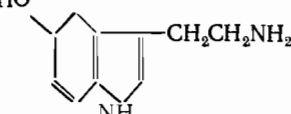
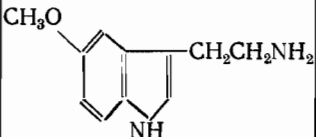
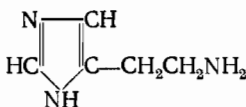
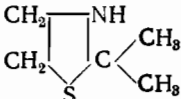
2. ХИМИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА ОРГАНИЗМОВ ОТ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ

Способность химических соединений снижать лучевое поражение простых молекулярных систем впервые была продемонстрирована В. Дэйлом в 1940 г. Изучая механизмы непрямого действия радиации на растворы ферментов, он показал, что тиомочевина, коллоидная сера и формиат уменьшают степень радиолиза ферментов, и предположил, что наблюдаемый защитный эффект осуществляется в результате конкуренции за свободные радикалы воды, возникающие при ее радиолизе. В 1948 г. Р. Латарже и Е. Ефрати описали радиозащитное действие цистеина, глутатиона, триптофана и других веществ в опытах с бактериофагом. Так в радиобиологии сформировалось представление о «защитных веществах» и «химической защите» от облучения.

В 1949 г. в двух лабораториях мира, независимо друг от друга, было сделано важное открытие: Х. Патт с сотрудниками обнаружил, что цистеин защищает крыс от лучевого поражения, а З. Бак и А. Эрв сообщили о радиозащитном действии цианида в опытах на мышах. Эти работы стимулировали поиск радиозащитных соединений среди различных классов химических веществ. В 1950 г. Г. Лимперс и В. Мошер получили данные о защите мышей от действия ионизирующей радиации с помощью тиомочевины; в начале 50-х гг. в лаборатории З. Бака выявлены противолучевые свойства цистеамина, серотонина, гистамина, триптамина, норадrenalина, тирамина. Все исследованные препараты были эффективны только при введении животным до облучения, поэтому они получили название радиопротекторов, а противолучевая защита — радиопрофилактической. К 1965 г. было изучено около трех тысяч химических соединений, однако наибольший радиопрофилактический эффект вызывали представители лишь двух классов — аминоктиолов и индолилалкиламинов. В таблице VII—1 приведены некоторые эффективные радиопротекторы, на рис. VII—1 — результаты определения противолучевой активности одного из них — β -меркаптоэтиламина (принятое обозначение МЭА). Как видно из рисунка, доза в 7 Гр смертельна для 100% особей в облученной популяции, причем введение мышам МЭА после облучения не оказывает лечебного действия. Если за 10 мин до облучения мыши получали радиопротектор в дозе 120—150 мг/кг, то доза радиации в 7 Гр не вызывала гибели ни одного из животных в течение 30 дней наблюдения. С ростом дозы радиации противолучевое действие МЭА быстро снижается: облучение в дозе 9 Гр вызывает гибель 30% защищенных животных, а доза в 11 Гр смертельна для всех мышей, получавших до облучения радиопротектор. Для определения радиозащитной эффективности радиопротекторов используют коэффициент ФИД (фактор изменения дозы облучения), который показывает, насколько надо увеличить дозу облучения защищенных животных, чтобы

Таблица VII-1

Характеристика некоторых эффективных радиопротекторов для лабораторных белых мышей и крыс

Соединение	Условное название препарата	Химическая формула препарата	Эффективные дозы при внутрибрюшинном введении, мг/кг
5-Окситриптамин	Серотонин (5-ОТ)		10—60
5-Метокситриптамин	Мексамин (5-МОТ)		10—60
β-Меркаптоэтиламин	Цистеамин (МЭА)	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	120—150
Дисульфид β-Меркаптоэтиламина	Цистамин	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	150—180
S-β-Аминоэтилтизотурионий	АЭТ	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SC} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	200—250
Натриевая соль N-аминоэтилтиофосфорной кислоты	Цистафос	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{P} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}-\text{Na} \\ \downarrow \text{OH} \end{array}$	300—400
β-Аминоэтилтиосерная кислота	Соль Бунте	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$	300—400
β-Имдазолилэтиламин	Гистамин		100—200
2,2-Диметилтиазолидин	Тиазолидин		100—150

смертность среди них сравнивалась со смертностью в контрольной группе, не получавшей до облучения радиопротектор. Так, для МЭА величина ФИД 1,7. Для расчета величины ФИД обычно ограничиваются определением дозы $LD_{50/30}$ для защищенных и контрольных животных, а отношение этих величин рассматривают как значение ФИД.

Уже первые работы по химической защите животных от поражающего действия ионизирующей радиации показали, что эффект защиты наблюдается в тех случаях, когда радиопротектор вводится в организм незадолго до облучения; противолучевая активность снижается по мере увеличения интервала времени между введением препарата и облучением биологического объекта. Хотя интервал времени для получения эффективной защиты небольшой (обычно он составляет 5—15 мин), было установлено, что этого времени достаточно для проникновения протектора в ткань животного и присутствия его в процессе облучения (Бак, 1968). При оценке продолжительности радиозащитного действия вводимых в организм веществ учитывается также длительность лучевого воздействия, которая зависит от мощности дозы облучения. Необходимость присутствия радиопротектора в системе до и во время облучения ионизирующей радиацией (в данной книге рассматриваются эффекты при действии общего однократного облучения редкоионизирующей радиацией) позволила предположить, что механизмы радиопрофилактического эффекта могут быть связаны с первичными реакциями лучевого поражения и что действие радиопротекторов направлено на предотвращение или снижение процессов радиолитического молекул. Для объяснения этих фактов было предложено несколько механизмов, которые могут действовать синергично.

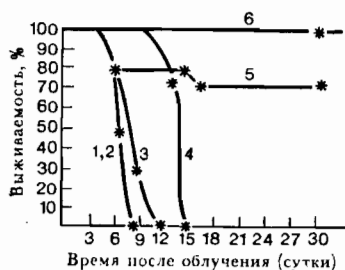


Рис. VII—1. Защитное действие радиопротектора цистеина при общем однократном облучении мышей: 1 — облучение в дозе 7 Гр, радиопротектор не вводили, контрольная группа; 2 — облучение в дозе 7 Гр и последующее введение радиопротектора; 3—6 — введение радиопротектора за 10 мин до облучения: 3 — в дозе 13 Гр, 4 — в дозе 11 Гр, 5 — в дозе 9 Гр, 6 — в дозе 7 Гр.

Физико-химические механизмы действия радиопротекторов

Представление В. Дейла о непрямом действии ионизирующей радиации и об активации водных радикалов защитными примесями в растворах первоначально было принято радиобиологами для объяснения радиопрофилактического эффекта, обнаруживаемого на животных.

Исследование радиопрофилактической активности более ста препаратов на мышах и молекулярных растворах привело З. Бака и П. Александера (1955) к выводу, что механизмы противолучевого эффекта заключаются в перехвате и инактивации водных радикалов. Согласно выдвинутой авторами гипотезе «перехвата радикалов» радиопротекторы (изучались главным образом аминотиолы) вступают в конкурентные реакции в клетке за гидроперекисные радикалы и снижают тем самым дальнейшее развитие первичных лучевых реакций.

Анализируя механизм перехвата радикалов, Д. Доэрти и др. (1957) связали радиопрофилактическое действие аминотиолов с характерным для них пространственным расположением сульфгидрильной и аминной групп в молекуле протекторов. Аминотиолы, по предположению авторов, способны образовывать свободные радикалы в устойчивой резонансной форме, которые не реагируют с молекулами клетки, а взаимодействуют со свободными водными радикалами — окислителями, подавляя развитие первичных лучевых процессов, защищая таким образом биологические системы и объекты от поражающего действия ионизирующей радиации. Образование устойчивых радикалов происходит только в том случае, если между сульфгидрильной и аминной группами имеются два или три углеродных атома. Другое содержание их в молекуле радиопротекторов приводит к исчезновению радиозащитного эффекта в связи с невозможностью образования циклической структуры молекулы.

Развитие представлений о механизмах перехвата радикалов привело П. Александера и А. Чарлсби (1955), а вслед за ними и ряд других радиобиологов к заключению, что радиопротектор способен не только инактивировать радикалы воды, но и взаимодействовать с продуктами радиолиза жизненно важных макромолекул; при этом может происходить восстановление исходного состояния облученной молекулы (или ее «починка») и инактивация молекул протектора. В 1965 г. Александер опубликовал схему противолучевого эффекта в присутствии кислорода и без него при взаимодействии радиопротектора (PSH) с радикальными формами ($\text{RO}\cdot$, $\text{R}\cdot$) биологически важных молекул ($\text{R}-\text{H}$).

Согласно этой схеме при облучении без участия кислорода образуются радикалы $\text{R}\cdot$, осуществляющие появление сшивок $\text{R}-\text{R}$: протектор препятствует появлению сшивок, и облученная молекула восстанавливается; в присутствии кислорода перехват окислительных радикалов приводит к «починке» молекул. Важное значение придается также образующимся радикалам протекторов, обладающим как поражающим, так и репарирующим действием (Эйдус, 1972). Экспериментальное подтверждение возможности инактивации радикалов биомacroмолекул радиопротекторами в клетках было получено в исследованиях Б. Смоллера и К. Эвери (1959, 1963), в которых показано, что аминотиоловые протекторы снижают количество свободных радикалов в об-

лученных дрожжевых клетках и что величина снижения свободных радикалов соответствует радиозащитной эффективности различных концентраций протектора. Эффект противолучевой защиты, как показали П. Александер и А. Чарлсби (1954), может происходить не только в результате прямого взаимодействия протектора с радикалами, но и посредством миграции энергии радиации от поглощающего участка молекулы к протектору в условиях прямого и непрямого действия ионизирующих излучений.

Основываясь на большом фактическом материале, З. Бак и А. Александер (1960) пришли к важному выводу, что один и тот же радиопротектор может обладать различными механизмами противолучевой защиты в зависимости от сложности исследуемой системы (молекулярный, клеточный и организменный уровни), содержания в ней кислорода, воды, «примесей».

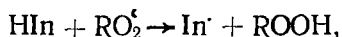
Активное использование физико-химических методов в радиобиологическом эксперименте способствовало развитию представлений о важной роли свободнорадикального состояния молекул в лучевом поражении и радиопрофилактической защите. Под термином «свободнорадикальное состояние» подразумевается состояние молекул с неспаренными электронами: триплетные состояния возбуждения, нейтральные и заряженные свободные радикалы, вакансии.

Проблеме свободнорадикальных процессов при лучевом поражении посвящено большое количество работ, обзорных статей и монографий (Блюменфельд, Калмансон, 1957, 1958; Бурлакова и др., 1957; Горди, 1958; Каюшин и др., 1969; Козлов и др., 1972; Коломийцева и др., 1960, 1962; Круглякова и др., 1964; Сапежинский, 1972; Эйдус, 1956, 1972; Эмануэль, 1963; и др.). Было обнаружено, что макромолекулы белков, углеводов, нуклеиновых кислот и липидов в свободнорадикальном состоянии, возникающем в результате прямого или непрямого действия ионизирующей радиации, а также в процессе развивающихся вторичных реакций, обладают спектром повреждающего действия и в зависимости от продолжительности жизни радикалов и их реакционной активности с разной вероятностью способны участвовать в лучевом поражении организма.

Исходя из важной роли свободнорадикальных процессов в ответной реакции разных по сложности биологических систем и объектов на действие ионизирующей радиации, Н. М. Эмануэль предположил (1958), что вещества, способные взаимодействовать со свободными радикалами и переводить их в неактивное состояние (т. е. ингибиторы свободнорадикальных процессов), могут обладать и радиозащитным эффектом. В дальнейшем это предположение получило экспериментальное подтверждение. Так, было доказано, что ингибиторы свободнорадикальных процессов способны вступать в реакции взаимодействия с радикалами типа $R^{\cdot}$:



взаимодействия с радикалами типа $RO_2^{\cdot}$:



где $R^{\cdot}$ и $RO_2^{\cdot}$ — активные радикалы, HIn — ингибитор, $In^{\cdot}$ — малоактивный радикал ингибитора.

В многолетних работах Е. Б. Бурлаковой и сотрудников (1965—1975) исследовались механизмы противолучевого эффекта ингибиторов свободнорадикальных процессов. Были изучены радиозащитные свойства пространственно-затрудненных фенолов, их аминокпроизводных, замещенных оксипиридинов и других ингибиторов.

Установлена прямая зависимость радиозащитного действия ингибиторов от их антиокислительной активности. Е. Б. Бурлакова и др. (1975) отмечали ряд особенностей в радиозащитном действии ингибиторов. К ним относятся: способность ингибиторов защищать животных от ионизирующей радиации при введении препаратов не только до облучения, но и после него (в интервале времени до 24 ч); постепенный переход от радиозащитного эффекта к радиосенсибилизирующему действию; наличие оптимальной радиозащитной концентрации препарата, значительно меньше максимально переносимой дозы. Линейная зависимость эффективности ингибитора от его дозы не обнаружена. Так, 2,6-дитретичный бутилфенол обладает наибольшим радиозащитным эффектом при введении его мышам в дозе примерно 50 мг/кг, с повышением дозы действие препарата снижается и при удвоенной концентрации эффект защиты исчезает; дальнейшее увеличение дозы ингибиторов вызывает усиление поражающего действия ионизирующей радиации. По мнению Е. Б. Бурлаковой и сотрудников (1965), наблюдаемый эффект может быть объяснен тем, что на выживаемость облученных животных оказывает влияние присутствие в организме не только ингибитора, но и продуктов его радиолиза или продуктов взаимодействия с молекулами клетки в результате активного вмешательства в биохимические процессы. Возможно, этим объясняется и сравнительно невысокая защитная активность известных ингибиторов свободнорадикальных процессов, и противоречивые данные в оценке их противолучевой эффективности (Городецкий, Барабой, 1963).

Невысокая противолучевая активность мощных ингибиторов свободнорадикальных процессов — веществ, инактивирующих в простых системах радикалы, свидетельствует о том, что эффект противолучевой защиты биологических объектов не может быть сведен только к прямой инаktivации радикалов введенными в организм радиопротекторами. Существует ряд других возражений против представлений о защите *in vivo* путем непосредственной инаktivации радикалов (Граевский, 1969; Константинова, Жеребченко, 1970; Ярмоненко, 1977). К числу основных возражений упомянутые авторы относят наличие широкого диапазона доз различных протекторов, при которых происходит оптимальная

защита; отсутствие корреляции между инактивирующей радикальностью веществ и их радиозащитными свойствами; низкое содержание протекторов в клетке для осуществления механизма инактивации радикалов. По-видимому, гипотезы противолучевой защиты, основанные на прямой инактивации радикалов, имеют наиболее полное экспериментальное обоснование лишь в опытах на простых низкомолекулярных системах *in vitro*. Уже при переходе к более сложным системам возможны также принципиально иные механизмы защиты, обусловленные спецификой строения макромолекул. Эти соображения нашли отражение в гипотезах, связывающих эффект защиты с физико-химическими процессами взаимодействия протекторов с биомacroмолекулами.

Так, в 1958 г. Л. Х. Эйдуc предположил, что при облучении макромолекул в них могут возникнуть долгоживущие скрытые (потенциальные) повреждения, которые в дальнейшем, при определенных условиях (температурные влияния, наличие кислорода или восстанавливающих веществ), реализуются или репарируются. Этим процессы радиолнза сложных молекул отличаются от радиационно-химических изменений простых систем. Энергия ионизирующей радиации, поглощенная биомacroмолекулой при прямом или косвенном действии излучений, способна мигрировать по специфическим для данной структуры макромолекулы путям, локализуясь в слабых местах молекулы, в которых нарушается система вторичных связей. Так, по данным Эйдуca, на первом этапе радиационно-химических процессов образуются скрытые повреждения, вызванные локальными нарушениями электронной структуры макромолекул, которые сохраняются достаточно долго. В белковых молекулах местами локализации неспаренных электронов могут быть дисульфидные мостики, в нуклеиновых кислотах скрытые повреждения обычно связаны с нарушением конфигурации молекул. На втором этапе лучевых физико-химических процессов может происходить как реализация, так и репарация скрытых повреждений (Эйдуc, Ганасси, 1960; Пауэрс, 1960; Эйдуc, 1964). Часть радиационных изменений макромолекул способна репарироваться путем компенсации электронных нарушений при помощи эндогенных доноров электронов (например, сульфгидрильных групп ферментов) и репарирующих радикалов низкомолекулярных веществ. Это представление высказано в гипотезе Н. А. Изможерова и др. (1970—1977) об электродонорных свойствах радиозащитных веществ. Изучению подвергались бромистоводородные соли алкилдиизотиурония, триптами и его окси- и метоксипроизводные, амидоалкилпроизводные сульфолана. Рассчитав энергетические параметры молекул методом МО ЛКАО в π -электронном приближении, авторы пришли к выводу, что в ряду диизотиурониевых производных донорная активность молекул определяется аминными группами (т. е. атомными группами в молекуле, осуществляющими непосредственное, физическое донирование электронов); для ряда индолилалкиламинов центрами донорной активно-

сти являются аминные группы боковой аминотной цепи. Расчеты энергетических параметров протекторов показали, что их радиозащитная эффективность коррелирует с электронодонорной активностью с коэффициентом ранговой корреляции, близким к единице. На этом основании Н. А. Изможеров предположил, что в основе противолучевого действия изученных им различных классов протекторов лежит электронодонорный механизм. Как видно, данное представление учитывает значимость начального физико-химического механизма лучевого поражения — эффекта ионизации, влекущего за собой возникновение электронных вакансий в структуре биологических макромолекул. Заполнение вакансий за счет введенных в биологическую систему протекторов — доноров электронов должно приводить с этой точки зрения к эффекту защиты.

Изучая защитное влияние различных «примесей» — низкомолекулярных соединений от лучевой инактивации ферментов в водных растворах, Л. Х. Эйбус (1972) выдвинул «адсорбционную» гипотезу противолучевой защиты, согласно которой введенный в исследуемую систему радиопротектор способен осуществлять радиозащитный эффект в результате адсорбции на макромолекуле, препятствуя ее конформационным перестройкам на втором этапе инактивации. Адсорбция происходит в результате слабых, легко диссоциирующих нековалентных связей. Из-за динамического характера адсорбции в каждый момент времени на макромолекуле адсорбируется (в зависимости от концентрационных соотношений) множество непрерывно заменяемых молекул органических примесей, скрепляющих третичную структуру макромолекулы до такого состояния, что она обратимо теряет способность к конформационным изменениям. При этом длительность жизни скрытых повреждений макромолекул возрастает.

Рассмотренные гипотезы физико-химических механизмов взаимодействия протекторов и макромолекул могут быть дополнены представлением, выдвинутым Д. М. Спитковским и др. (1969), В. Т. Андриановым и др. (1976), о механизмах «структурной защиты». Отмечая, что наиболее уязвимыми повреждениями с позиции самого существования надмолекулярных систем являются нарушения межмолекулярных взаимодействий, авторы обратили внимание на способность некоторых протекторов замещать поврежденные части макромолекул, восстанавливать функции межмолекулярных связей, компенсируя тем самым вклад поврежденных радиацией участков в поддержании целостности молекулярных структур. Этим объясняется не только радиопрофилактический эффект, но и пострadiaционная защита препаратами, т. е. пострadiaционное восстановление незначительных повреждений структур в молекулярных растворах. Были изучены радиопротекторы разных классов на радиационно-химической модели (растворы ДНП, на основании которых получают ДНП-структуры). В качестве критерия поражаемости молекул был принят ФУД — фак-

тор увеличения критической дозы, при которой для данной концентрации раствора ДНП образование ДНП-волокон прекращается. Эффективность исследуемых радиопротекторов иллюстрируется табл. VII—2.

Таблица VII-2

Величина ФУД для радиозащитных веществ

(составлена по данным В. Т. Андрианова и др., 1976 — ФУД на радиационно-химической модели и данным Е. Н. Гончаренко и Ю. Б. Кудряшова, 1980 — ФУД на мышах)

Вещество	ФУД на радиационно-химической модели	ФУД на мышах ЛД _{50/30}
Серосодержащие вещества		
β-Меркаптоэтиламин	30	1,5
β-Аминоэтилэтионий бромид	25	1,5
β-Меркаптоэтиламин битартрат	24	1,5
Индоллилаланиламины		
5-Метокситриптамин	18,3	1,5
6-Метокситриптамин	11	1,0
5-Хлортриптамин	6,2	1,4
7-Хлортриптамин	7,0	1,0
5-Окситриптамин	4,0	1,5
Галлаты		
Пропилгаллат	40	неактивен или слабоактивен, 1,0—1,1
Этилгаллат	31	1,0—1,1
Метилгаллат	16	1,0—1,1
Галловая кислота	14,1	1,0—1,1

Примечание. Приведенные данные следует сравнивать по относительным значениям ФУД для разных препаратов на одной и той же модели или объекте.

В. Т. Андрианов и др. (1976) подчеркивают различия в адсорбционном и структурном механизмах защиты: по адсорбционному механизму адсорбция примесей на молекуле не имеет отношения к локализации повреждений в пределах молекулы и только неспецифически способствует сохранению нативных конформаций скрытых повреждений в макромолекулах; согласно структурному механизму радиопротектор осуществляет функцию поврежденного облучением участка макромолекулы. Однако общим в адсорбционном и структурном механизмах является физико-химическое представление о взаимодействии радиопротектора с макромолекулой и обратимом предохранении (или восстановлении) ее от дальнейших пострадиационных повреждений.

В последнее время особенно часто наблюдается неудовлетворенность, возникающая при попытках использовать выводы, полученные на радиационно-химических моделях, для оценки радио-

биологических эффектов на клетках, а также на более высокоорганизованных объектах (Бонд и др., 1971; Суворов, Шашков, 1975). Одним из примеров несоответствия данных, полученных на различных уровнях исследования, может служить табл. VII—2. Так, неактивные или слабоактивные на животных галлаты оказывают более высокий эффект, чем активные серосодержащие протекторы или индолилалкиламины в случае оценки противолучевой активности препаратов на радиационно-химической модели (ДНП). Не обнаруживается корреляция при сравнении величин ФУД на моделях и мышах и в группе индолилалкиламинов. На модели индолилалкиламины оказались значительно менее эффективными, чем серосодержащие препараты. Очевидно, что выводы, вытекающие из опытов с использованием моделей, не всегда могут быть применимы к биологическим системам.

Неудовлетворенность одним только физико-химическим подходом для объяснения реакции биологических объектов на облучение и механизмы противолучевого эффекта заставляют радиобиологов искать общебиологические закономерности. Еще недавно считалось заманчивым объяснять механизм радиозащитного действия различных радиопротекторов с позиции снижения ими так называемого кислородного эффекта, механизм которого, как известно, принято считать наиболее универсальным. Проблема кислородного радиобиологического эффекта посвящено большое количество работ. Интерес к нему проявляется в значительной степени в связи с высокой защитой биологических объектов при облучении их в условиях пониженного содержания кислорода и с возможностью оценить роль кислорода в первичных механизмах лучевого поражения и радиопрофилактическом эффекте.

Кислородный эффект и противолучевая защита

Как известно, кислородный эффект — это усиление лучевого поражения в присутствии кислорода по сравнению с поражением при облучении в условиях гипоксии или аноксии. Кислородный эффект был описан еще на заре радиобиологических исследований (Шварц, 1909), однако одним из первых, кто обнаружил значительный эффект защиты в условиях гипоксии на животных, был А. Дауди и его сотрудники (1950). Используя предельно переносимое снижение концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе (для мышей — 7%, для крыс — 5%), авторы отметили высокий процент защиты животных, облученных в абсолютно смертельной дозе рентгеновских лучей (табл. VII—3).

В 1953 г. Л. Грэй и др. сделали вывод об универсальном проявлении кислородного эффекта и о типичной зависимости радиочувствительности объектов и систем от концентрации кислорода. Графически эта зависимость имеет вид гиперболы с резким начальным подъемом и продолжительным плато кривой (рис. VII—2).

Величина ФУД для многих биологических объектов достигает 2—2,5, а для некоторых объектов или систем может быть значительно выше. Зависимость радиочувствительности от содержания кислорода в среде для различных биологических объектов выражается в виде уравнения, описанного Т. Альпер и П. Говард-Фландрес (1956):

$$\frac{S_0 - S_N}{S_N} = (m - 1) \frac{[O_2]}{[O_2] + K},$$

где S_0 и S_N — радиочувствительность соответственно при данной концентрации кислорода $[O_2]$ и аноксии; m — максимальная величина радиочувствительности клеток при избытке кислорода; K — концентрация кислорода, при которой радиочувствительность составляет величину, среднюю между радиочувствительностью максимально оксигенированных клеток и клеток, находящихся в условиях аноксии (рис. VII—2).

Таблица VII-3

Влияние гипоксии на выживаемость облученных крыс (Дауди и др., 1950)

Доза облучения, Гр	Выживаемость, %	
	воздух	5% кислорода
6	63	100
8	0	100
10	0	91
12	0	81
14	0	29



Рис. VII—2. Зависимость радиочувствительности биологических объектов от содержания кислорода в окружающей атмосфере (по Грей, 1953).

По данным Л. Грея (1959), кривые зависимости радиочувствительности от концентрации кислорода практически хорошо совпадают для разных объектов; сходны при этом соответственно и величины констант.

Существование универсального кислородного эффекта на организменном, клеточном и молекулярном уровнях привело многих авторов к представлению о вмешательстве кислорода в первичные физико-химические процессы лучевого поражения (Грей, 1958, 1959; Альпер, 1958; Бак, Александер, 1963 и др.). Первоначально предполагали, что кислород способен усиливать не прямое действие ионизирующей радиации, реагируя с восстанавливающими радикалами $H\cdot$ — продуктами радиолитиза воды с образованием активных окислительных радикалов (Александер и др., 1955). Однако уже к концу 50-х гг. возникли серьезные сомнения по поводу особого значения окислительных радикалов воды в развитии первичных механизмов лучевого поражения (Вейс, 1958 и др.).

Представление о взаимодействии кислорода с продуктами радиоллиза воды было подвергнуто критике на основании опытов с обезвоженными ферментами и биологическими объектами. Так, кислородный эффект был обнаружен на «сухих» ферментах: трипсине, лизоциме, рибонуклеазе, дезоксирибонуклеазе, на бактериальных спорах и некоторых других объектах в высушенном состоянии.

В 1957 г. П. Говард-Фландрес и Т. Альпер предположили наличие конкурирующих процессов — окислительных и восстановительных — под влиянием облучения микроорганизмов. Они считали, что действие кислорода на водные радикалы может происходить в основном в очень разведенных водных растворах или суспензиях, а в клетках под действием ионизирующей радиации органические молекулы приходят в активированное состояние («метионическое состояние»), длящееся 2—100 мкс и завершающееся какой-нибудь химической реакцией. По мнению авторов, исходы метионических реакций могут быть различными: одни ведут к восстановлению нормального состояния молекул, например путем захвата электрона на место вырванного при ионизации (или путем восстановления разорванной связи, или каким-либо другим образом); другие реакции — окислительного типа — ведут к образованию продуктов окисления органических молекул типа перекисей, являющихся инициаторами радиационного поражения клетки. Таким образом, для усиливающего радиацию действия кислорода можно записать следующую реакцию:



По мнению В. П. Парибока, при снижении содержания кислорода в биологическом объекте эффект противолучевой защиты определяется не просто тем, что кислорода не хватает для первичных реакций со всеми возникающими при облучении радикалами, а скоростью взаимодействия кислорода с биомакромолекулой, находящейся короткое время (миллисекунды) после поглощения энергии ионизирующей радиации в активном свободнорадикальном состоянии. Автор предположил, что вероятность взаимодействия молекулы кислорода с короткоживущим радикалом определяется двумя величинами: временем жизни радикала и «временем ожидания» (т. е. «временем между двумя последовательными столкновениями кислорода с одной и той же точкой биомолекулы»). Увеличение концентрации кислорода приводит к снижению «времени ожидания». В том случае, когда это время снизится до величины времени жизни свободного радикала, дальнейшее увеличение концентрации кислорода не повлияет на результат реакции, уже достигшей максимума.

Как мы уже указывали, наряду с короткоживущими продуктами при облучении макромолекул могут возникать и долгоживущие скрытые повреждения, реализуемые при воздействии кислорода. По-видимому, это и обуславливает эффект кислородного после-

действия (Конгер, 1961; Шапиро, Протопопова, 1962; Карабаев, 1962 и др.). По мнению Л. М. Рождественского (1978), обнаружение долгоживущих скрытых повреждений макромолекул в условиях живых биологических объектов возможно лишь у сухих семян, находящихся в состоянии подавленного метаболизма, а в условиях нормальной жизнедеятельности в клетке происходит почти мгновенное взаимодействие первично-поврежденных молекул либо с кислородом (условия обычной оксигенации), либо с веществами-реактиваторами (условия глубокой гипоксии, аноксии). В связи с этим особое значение для получения эффективного кислородного радиосенсибилизирующего действия приобретает условия насыщения кислородом в процессе облучения; попытки получить кислородный эффект изменениями концентрации газовой среды после облучения обычно не приводят к желаемым результатам. Кроме того, установлено, что кислород, присутствующий в облучаемой системе, способен оказывать и защитное действие, т. е. вызывать так называемый обратный кислородный эффект (Альпер, 1954, 1957; Бутлер, Робинс, 1961; Ганасси и др., 1961; Эйбус, 1972). Предполагают, что прямой и обратный кислородный эффект обусловлен процессами взаимодействия кислорода с возникающими при радиоллизе радикалами низкомолекулярных примесей (репарирующими или поражающими) (Эйбус, 1972).

Представления о физико-химическом механизме кислородного эффекта наиболее тщательно разработаны в связи с исследованиями, проводящимися на молекулярном уровне. Полученные выводы часто используются авторами для объяснения механизма кислородного эффекта на клеточном и организменном уровнях. Но с усложнением организации системы появляются новые факторы, активно влияющие на чисто физико-химические процессы. Так, многие радиобиологи, анализируя кривую Грэя, приходили к ошибочному выводу о непосредственной зависимости между содержанием кислорода в среде (например, в атмосфере воздуха) и радиочувствительностью биологических объектов. Предполагалось, что кислород беспрепятственно диффундирует в клетку и его концентрация в ней равна содержанию кислорода в окружающей среде. Однако в настоящее время хорошо известно, что любой животной клетке присущ градиент кислорода и его стационарное состояние в клетках и тканях существенно отличается от содержания кислорода во внешней среде. Содержание кислорода в клетках может сильно варьировать от густоты клеточных суспензий; известна также роль биомембран в регуляции транспорта кислорода; кроме того, концентрация кислорода определяется не только его поступлением, но и потреблением в клетках. При изучении гипоксии у млекопитающих необходимо изучать также комплекс факторов, определяющих уровень кислорода в клетках, объем и скорость кровотока, артериально-венозную разницу, температуру тела, кровоснабжение разных органов, характер потребления кислорода и т. д.

Установлено, что противолучевое действие гипоксии уменьшается при снижении мощности дозы облучения (Смирнов, 1966) и при длительном содержании животного в условиях пониженного содержания кислорода (Овакимов, Ярмоненко, 1974). Радиозащитный эффект газовой гипоксии (5 и 6% содержания кислорода в азотно-кислородной газовой смеси) при общем однократном облучении мыши максимален в первые 10 мин после помещения животного в условия гипоксии, затем резко снижается и сохраняется постоянным в течение длительного времени (Ярмоненко, Эпштейн, 1977; Кримкер и др. 1978).



Рис. VII—3. Зависимость защитного эффекта от продолжительности газовой гипоксии при вдыхании мышами газовых смесей, содержащих 6% O₂ (кривая 1) и 5% O₂ (кривая 2). Общее однократное γ-облучение (по Ярмоненко и Эпштейн, 1977)

В 1978 г. Ярмоненко и Эпштейн предложили «адаптационную гипотезу» зависимости кислородного эффекта от «предыстории объектов», т. е. от их физиологического состояния. Адаптационная гипотеза основывается на экспериментальных данных авторов с использованием мышей, адаптированных к условиям кислородной недостаточности при действии острой гипоксии (рис. VII—3). Резкое снижение защитного эффекта гипоксии происходит уже в первые минуты острой гипоксии; одновременно с этим наблюдается столь же быстрое повышение устойчивости животных к гипоксии.

Сравнивая концентрации кислорода в тканях (РтО₂), в клетках (РкО₂) с кислородным эффектом (по величине ФУД) в различное время гипоксии, Ярмоненко и Эпштейн обнаружили развивающуюся во времени дискорреляцию между радиозащитным эффектом и уровне кислорода: по истечении одной минуты гипоксии (5% O₂ в газовой смеси) в различных тканях РтО₂ резко снижается и впоследствии остается на постоянном низком уровне до окончания дыхания даниной газовой смесью. Характерно, что величина ФУД изменяется во времени иначе: в первые 5—8 мин гипоксии ФУД имеет наивысшее значение (более 2,5), а затем к 20 мин снижается в полтора раза. Это несоответствие между содержанием кислорода в тканях и противолучевой защитой авторы объясняют тем, что кислородный эффект определяется не непосредственно РтО₂, а РкО₂, величина которого регулируется потреблением кислорода в клетках. Степень регуляции клеточной радиоустойчивости при кислородном эффекте, по мнению авторов адаптационной гипотезы, определяется четырьмя взаимосвязанными параметрами, которые поддаются количественной оценке: РтО₂, РкО₂, дыхательной активностью клетки и кислородной проницаемостью цитоплазматической мембраны. В ответ на действие гипоксии происходит снижение потребления клеткой кислорода и соответствующее возрастание его внутриклеточного напряжения и (или)

увеличение проницаемости клеточных мембран для молекулярного кислорода. В рамках адаптационной гипотезы, объясняющей зависимость противолучевого эффекта гипоксии от ее продолжительности, определяющая роль отводится процессам регуляции транспорта кислорода, содержание которого изменяется во времени в различных компартментах клетки. Функции регуляторов транспорта кислорода выполняют плазматические мембраны, а также дыхательная активность цитоплазмы.

Таким образом, адаптация к гипоксии имеет в основе клеточную природу нарушения метаболизма: быстрая адаптация клеток к условиям экстремального недостатка кислорода приводит к повышению в них РкО_2 и вследствие этого — к снижению защиты. Как видно, состояние клеток, их метаболизм играют важнейшую роль в механизме противолучевого эффекта гипоксии.

Универсальность проявления на различных системах и биологических объектах кислородного эффекта явилась причиной поисков единого гипоксического механизма противолучевого действия для различных классов радиопротекторов. Действительно, многие протекторы обладают способностью снижать содержание кислорода в тканях животных. Создаваемая при этом общая или местная гипоксия достигается вследствие физиологического действия протекторов, а не в результате изъятия кислорода в процессе их окисления (Константинова, Жеребченко, 1970). Парааминопропиофенон и нитрит натрия — метгемоглобинообразователи, окись углерода — карбоксигемоглобинообразователи, — препараты, вызывающие гипоксию в результате блокирования транспорта кислорода; морфин и героин угнетают дыхательный центр, а цианиды ингибируют дыхательные ферменты; серотонин, гистамин и их производные, катехоламины и другие биогенные амины создают тканевую гипоксию путем вазоконстрикторного действия. Как видно, радиопротекторы способны создавать тканевую гипоксию с помощью различных физиологических механизмов. Следует отметить, что не все радиопротекторы снижают содержание кислорода в биологических объектах. Так, высокоэффективные препараты, относящиеся к аминотиолам, вызывают радиозащитное действие, не связанное с кислородным эффектом (Бак, 1968; Константинова, Жеребченко, 1970; Ярмоненко, 1977 и др.).

Таким образом, единого гипоксического механизма защитного действия у различных радиопротекторов обнаружить не удастся.

Представление о существовании долгоживущих скрытых повреждений макромолекул и возрастании при этом объема репараций, приводящих к защите клетки от поражающего действия ионизирующей радиации, а также о способности радиопротекторов осуществлять функцию поврежденных частей биосубстрата позволило акцентировать внимание на возможности эффективной пострадиационной химической защиты. До недавнего времени существовало мнение об отсутствии пострadiационного эффекта протекторов на биологических объектах. Так, давая основное определе-

ние понятию «радиопротектор», З. М. Бак (1968) писал: «Химические протекторы (радиопротекторы) — это вещества, введение которых животному или добавление в культуральную среду перед действием ионизирующей радиации значительно снижает радиационный эффект; введение их после облучения неэффективно».

Однако еще в 1958 г. Х. Мелхинг и др. опубликовали работу, в которой сообщалось о защитном действии серотонина, однократно введенного мышам после их облучения. Защитный эффект не был высоким, и другим автором не сразу удалось его воспроизвести. Четырехкратное введение серотонина в течение одного часа после окончания облучения вызывало незначительное увеличение выживаемости у крыс (Риксон, Байерд, 1968). Позже (Шашков и др., 1971) эти данные были не только подтверждены, но и получены новые сведения о терапевтической эффективности мексамина, цистамина и АЭТ. Авторы вводили радиопротекторы крысам четырехкратно в течение одного часа после окончания облучения животных γ -лучами. Эффект защиты при таком способе введения был в 2,5—5 раз слабее, чем при профилактическом. Подводя итог работам по противолучевому эффекту радиопротекторов, вводимых животным после облучения, Н. Н. Суворов и В. С. Шашков (1975) пришли к заключению, что основные представители важнейших классов протекторов — аминотиолов и индолалкаламинов — все же могут быть эффективными при пострadiационном введении и что важную роль в таких исследованиях играет тщательный подбор условий проведения эксперимента (например, частота введения, временные параметры, концентрация препарата). Однако пострadiационное введение животным протекторов оказывает очень слабый эффект защиты и, по мнению авторов, он не может быть связан с влиянием препаратов на первичные физико-химические лучевые процессы, а, скорее всего, представляет собой ранний терапевтический эффект. Как видно и на этом примере, данные, получаемые на биологических объектах, значительно отличаются от результатов, наблюдаемых при использовании простых химических систем.

Исследования кислородного эффекта на модельных системах привели к выводу о важной роли молекулярного кислорода (процессов окисления) в первичных механизмах лучевого поражения. Если раньше кислородный эффект связывали с влиянием кислорода на процессы радиолитического разложения воды, с образованием окислительных радикалов, то в настоящее время стала очевидной необходимость изучения конкретных реакций взаимодействия биомакромолекул с кислородом и (эндогенными) низкомолекулярными веществами и учета измененного физиологического состояния клетки и всего организма под влиянием нарушенного кислородного режима и облучения. Таким образом, существенным в исследованиях противолучевого действия гипоксии становится определение роли физиологического состояния клетки в оценке ее радиорезистентности.

Окислительно-восстановительное равновесие системы и радиопрофилактический эффект

Изучая радиозащитное действие пониженного содержания кислорода в клетках и тканях животных, Х. Лазер еще в 1954 г. предположил, что не само содержание кислорода отражает степень устойчивости системы к ионизирующей радиации, а ее окислительно-восстановительный уровень, т. е. противолучевой эффект определяется глубокой перестройкой системы в направлении повышения ее антиокислительных свойств. В дальнейшем появились работы, посвященные исследованию окислительно-восстановительного равновесия в живых системах под влиянием гипоксии и радиопрофилактических веществ. Так, Д. Б. Кейтер и сотр. (1960) показали, что под влиянием гипоксии, сосудосуживающих средств и глютациона происходит снижение стационарного уровня окислительно-восстановительного потенциала у крыс. Г. В. Сумаруков (1962) на свержках, Г. В. Сумаруков, Ю. Б. Кудряшов (1963), Н. М. Добровольский (1967), В. Г. Владимиров и сотр. (1971) на млекопитающих (мышях, крысах, собаках) обнаружили коррелятивную связь между эффектом защиты тиольными радиопротекторами и изменением окислительно-восстановительного потенциала тканей. Степень радиозащитной эффективности препаратов удовлетворительно коррелировала с величиной снижения окислительно-восстановительного потенциала в мышце мышей; неактивные соединения или вещества, оказывающие слабый противолучевой эффект, вызывают лишь незначительное снижение потенциала. Продолжительность падения уровня окислительно-восстановительного потенциала после их введения животным, по-видимому, говорит о длительности действия таких протекторов. Установлено, что с увеличением интервала времени между введением радиопротектора и облучением животного наблюдается параллелизм в уменьшении радиозащитной эффективности протектора и снижении стационарного уровня величины окислительно-восстановительного потенциала тканей животных.

Аналогичные данные получены и для других серосодержащих радиопротекторов (например, для солей Бунте, тиазолидинов) (Кудряшов, 1966; Сумаруков, 1970). Исключение составляют некоторые среднеэффективные протекторы — тиазолины, они не обладают способностью изменять стационарный уровень окислительно-восстановительного равновесия.

Важно отметить, что величина окислительно-восстановительного потенциала самого протектора не может служить критерием его противолучевой активности. Так, снижение уровня окислительно-восстановительного равновесия в тканях животных после введения протекторов не зависит не только от абсолютных величин E_0 и E_h самих препаратов, но даже и от того, имеют ли растворы ра-

диопротективных веществ положительный или отрицательный знак потенциала.

Учитывая важность использования метода регистрации окислительно-восстановительного потенциала тканей как одного из возможных тестов оценки эффективности серосодержащих радиопротекторов, В. Г. Владимиров и сотр. (1972) провели работы по изучению изменения E_h мышечной ткани людей после введения им цистеамина и цистамина. Авторы пришли к выводу о правомерности использования данного метода (с учетом интенсивности обмена веществ организмов) для характеристики эффективности тиольных радиопротекторов. По мнению Г. В. Сумарукова (1970) и других авторов, изменения E_h в скелетных мышцах в общем отражают изменения, происходящие и в радиочувствительных тканях, например в селезенке.

Исследуя свойства диопротективных веществ, Ф. Ю. Рачинский и др. (1963) пришли к выводу, что наиболее общим в действии различных протекторов является их антиокислительная активность, но не все антиоксиданты способны защищать биологические объекты от действия ионизирующей радиации. Примером несоответствия реального радиозащитного эффекта на биологических объектах и физико-химических параметров препаратов *in vitro* могут служить величины окислительно-восстановительного потенциала аскорбиновой кислоты и каротина, проявляющих сильное антиокислительное и радиозащитное действие в растворах и значительно или полностью утрачивающих эти свойства в опытах на различных биологических объектах. Снижение стационарного окислительно-восстановительного потенциала в тканях, наблюдаемое при введении в организм радиопротекторов, свидетельствует о том, что система в целом под влиянием радиопротектора проявляет более выраженные антиокислительные свойства. Это связано с многочисленными и весьма разнообразными биохимическими процессами, приводящими к возрастанию содержания в измеряемой системе восстановленных недоокисленных эндогенных веществ — доноров электронов — и (или) к снижению уровня окислительных эндогенных веществ. Состав эндогенных веществ, определяющих уровень окислительно-восстановительного потенциала, может быть весьма разнообразным. Поэтому естественно предположить, что даже в том случае, когда радиопротекторы не вызывают изменения суммарного уровня потенциала в тканях животных, они все же могут привести при сохранившемся динамическом равновесии между окислительными и восстановительными формами к накоплению эндогенных веществ, ответственных за повышение устойчивости организма к действию ионизирующей радиации, например эндогенных протекторов.

Рассмотренные представления о физико-химических механизмах диопротективного эффекта основываются на фактическом материале, полученном в большинстве случаев *in vitro* на простых химических системах и моделях, и постулируют общий

принцип об ослаблении протекторами первичных процессов лучевого поражения. Противолучевые воздействия (введение радиопротекторов, создание гипоксии или аноксии) не способны предотвратить самого акта поглощения энергии ионизирующей радиации молекулами облучаемых систем, так как вероятность поглощения и количество адсорбированной энергии радиации определяются свойствами самой ионизирующей радиации и размерами внутриклеточных структур. Однако противолучевые средства способны взаимодействовать со свободными радикалами облученных молекул, инактивировать окислительные радикалы, участвующие в первичных физико-химических процессах лучевого поражения, защищать или восстанавливать биомакромолекулы от разрушения. Современные исследования в области молекулярной биофизики позволили внести существенные коррективы в представления о взаимодействии радиопротекторов с макромолекулами облучаемой системы. Появились данные о механизмах первичных повреждений макромолекул и влиянии на них протекторов. Результаты изучения сложных биологических систем поставили перед радиобиологами новые задачи — определить, в какой степени данные физико-химических экспериментов на модельных системах могут быть перенесены на живую клетку, и выяснить роль физиологического состояния биохимических изменений, возникающих в биологических объектах после введения радиопротекторов. Исследования гипоксического противолучевого эффекта и окислительно-восстановительного равновесия на биологических объектах под влиянием противолучевых средств показали необходимость учитывать биохимические изменения в клетках при оценке механизмов радиопротекторного эффекта.

Гипотеза «биохимического шока»

В середине 60-х гг. З. Бак и П. Александер предложили гипотезу «биохимического шока», согласно которой серосодержащие радиопротекторы, различные по своей химической природе, могут защищать биологические объекты по единому механизму — в результате глубоких изменений физиологических процессов в клетке в предлучевой период (Бак, Александер, 1964; Бак, 1965; Бак, Готье, 1968). Авторы гипотезы подвергли тщательному анализу работы, показывающие, что соединения, содержащие сульфгидрильные группы, способны защищать жизненно важные макромолекулы от поражающего действия ионизирующей радиации, а вещества, быстро реагирующие с тиолами («тиолопривные агенты»), повышают их радиочувствительность. По мнению авторов, для объяснения радиомодифицирующего эффекта недостаточно изменения уровня тиолов в биологическом объекте только за счет экзогенно введенных сульфгидрильных групп. Имеющийся фактический материал позволил З. Баку и П. Александеру (1964) прий-

ти к выводу, что введенный в организм серосодержащий протектор уже через несколько минут связывается белками, а количество небелковых тиольных групп медленно возрастает благодаря накоплению эндогенных сульфгидрильных веществ. Авторы отмечают, что период наибольшего защитного действия не совпадает ни с максимумом связывания протектора с белками, ни с временем появления свободного протектора.

Тиол-дисульфидное равновесие (равновесие свободных и связанных форм) в клетке является хорошо сбалансированной системой, которая, по мнению З. Бака и П. Александера, реагирует на введение серосодержащих радиопротекторов. На способность серосодержащих радиопротекторов образовывать с белками клеточные дисульфидные связи указывали еще Л. Элдъярн и А. Пил (1956). Их концепция «смешанных дисульфидов» предполагает, что сульфгидрильные радиопротекторы в течение периода, когда они оказывают противолучевое действие, могут существовать в организме в форме смешанных дисульфидов с дисульфидными и сульфгидрильными группами «мишени». Дисульфидная связь протектора с мишенью временная и восстанавливается под действием дисульфидвосстанавливающих ферментов, например редуктазы глутатиона. В дальнейшем Л. Элдъярн и А. Пил (1958, 1969), изучив большое количество тиольных препаратов, обнаружили, что только вещества, обладающие радиомодифицирующим действием, способны образовывать смешанные дисульфиды. Предположение о том, что аминогруппа радиопротектора, отстоящая от сульфгидрильной не более чем на три углеродных атома, способна образовывать водородные связи с карбоксильной группой мишени, подтверждается исключительной стабильностью смешанного дисульфида. Такой повышенно устойчивый к радиации комплекс, по их мнению, может предохранить молекулу мишени от лучевой инактивации.

Обсуждая природу мишени, Элдъярн и Пил предположили, что это должны быть какие-то радиочувствительные эндогенные тиольные белки. Однако их выводы основывались на данных, полученных на простых физико-химических моделях, и в этом заключается ограниченность концепции, которая подвергалась критическому анализу в ряде работ. Так, З. Бак (1968) отмечал, что изолированная от биохимической основы концепция «смешанных дисульфидов» не смогла объяснить ряд фактов, полученных на биологических объектах. Он пересмотрел ее с позиций новых данных, полученных на млекопитающих, и изложил концепцию «в самых общих понятиях». З. Бак предположил, что после введения тиольного радиопротектора основная его масса связывается с белками, что приводит к нарушению равновесия эндогенных свободных и связанных сульфгидрильных групп: происходит увеличение содержания тиолов (глутатиона и др.) и высвобождение ряда ферментов из связанного состояния. Этот процесс является необратимым и непродолжительным, так что в течение часа

(часов) после введения радиопротектора происходит постепенное восстановление биологических систем до нормального состояния (при отсутствии облучения). В том случае, когда на фоне введенного радиопротектора происходит облучение животного, клетки, перешедшие в состояние повышенной радиорезистентности, уже иначе реагируют на проникающую радиацию. По мнению З. Бака, сам процесс образования смешанных дисульфидов не имеет существенного значения для противолучевой защиты и в механизме радиопрофилактического эффекта основную роль играет не физико-химический процесс, а физиологическая и биохимическая перестройка в предрадиационный период. Эта перестройка («биохимический шок») характеризуется подавлением процессов ферментативного синтеза, изменением проницаемости мембран, угнетением углеводного обмена, выбросом (или расходом) из митохондрий печени «факторов сопряжения», что приводит к особому типу набухания митохондрий, не восстанавливающегося при добавлении АТФ; после введения серосодержащих протекторов возрастает содержание аскорбиновой кислоты и других неидентифицированных восстановителей в крови, резко изменяется дыхание клеток; наблюдаются также другие нарушения, являющиеся результатом биохимического шока. Как известно, под шоковым состоянием подразумевается общее тяжелое расстройство жизнедеятельности организма, вызываемое обычно каким-либо сильным стрессорным воздействием. В данном случае это реакция организма на введение серосодержащих протекторов. Обнаружив совпадение во времени проявления многочисленных биохимических изменений, объединяемых понятием «биохимический шок», с обратимым переходом клеток в состояние повышенной резистентности, З. Бак не решает вопроса о механизме радиопрофилактического эффекта исследуемых тиольных протекторов.

По мнению Л. Х. Эйдуса (1977), корреляция между проявлением биохимического шока и противолучевым эффектом не случайна и наблюдается не только для серосодержащих протекторов, но и для других защищающих химических и даже физических агентов. Он предположил, что состояние биохимического шока представляет собой частный случай общей неспецифической реакции клеток на повреждающие воздействия, известной по работам Д. М. Насонова и В. Я. Александрова (1940). Согласно этим представлениям механизм радиозащитного влияния неспецифической реакции, возникающей под действием на клетки защитных агентов, состоит в следующем. Введение радиопротекторов, так же, как и действие повреждающих агентов, вызывает изменение мембранного транспорта веществ, приводящее к нарушению существующих в клетке градиентов концентраций низкомолекулярных органических веществ; локальное увеличение их содержания в компартментах клетки способствует адсорбции дополнительных количеств этих соединений на макромолекулах, в результате этого происходит **снижение их конформационной подвижности и**

соответственно потеря биологической активности. В конечном итоге наступает состояние паранекроза, которое обратимо при умеренных повреждающих воздействиях. При этом изменяется соотношение скоростей конкурирующих между собой процессов репарации и реализации скрытых повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией в уникальных структурах, ответственных за репродуктивную гибель клетки. Л. Х. Эйдус не конкретизирует, какие именно «низкомолекулярные органические соединения» накапливаются в клетке и отвечают за ее радиорезистентность, и, естественно, в связи с этим не раскрывает конкретных процессов «для разных клеток и разных условий», справедливо считая, что абстрагирование от конкретных биохимических реакций на данном уровне анализа позволяет дать лишь общие представления о противолучевом эффекте.

Таким образом, гипотеза биохимического шока и представление о неспецифической реакции клеток лишь констатируют события, указывая на общие, суммарные изменения в клетке, на ее состояние временной устойчивости к ионизирующей радиации, но не расшифровывают конкретные механизмы противолучевого эффекта.

Излагая гипотезу биохимического шока, ее авторы подчеркивали, что биохимические изменения, наблюдаемые непосредственно после применения радиопротекторов, нельзя рассматривать как случайное или незначительное явление и что из всего многообразия изменений необходимо выделить главное, ведущее звено. В связи с этим они считали, что наиболее перспективным направлением в изучении механизмов радиопрофилактического эффекта является исследование конкретных процессов, развивающихся в организме под влиянием протекторов в предрадиационный период — период повышенной радиорезистентности.

Гипотеза «комплексного биохимического механизма действия радиозащитных средств»

Конкретные биохимические процессы, связанные с радиопрофилактическим эффектом, в течение ряда лет были объектом исследования в лаборатории Е. Ф. Романцева (1967—1978). Обширный экспериментальный материал позволил Е. Ф. Романцеву обосновать представление, которое он еще в 1967 г. сформулировал как гипотезу «комплексного биохимического механизма действия радиозащитных средств». Согласно этому представлению радиопротекторы влияют на радиочувствительные биохимические процессы уже через несколько секунд и минут после введения их животным и облучение, таким образом, происходит при «биохимических потрясениях организма». Механизм действия радиопротекторов автор назвал комплексным в связи с тем, что он осуществля-

ется одновременно несколькими путями, хотя вклад каждого из них в общий механизм противолучевого эффекта может быть различным. Предполагается, что радиопротекторы способны переводить радиочувствительные биохимические процессы в состояние повышенной устойчивости и эти изменения до начала облучения имеют существенное, а может быть и основное, значение в механизме противолучевого эффекта, обуславливая временную радиорезистентность организма. Е. Ф. Романцев и сотр. (1977) считают, что радиопротекторы в предрадиационный период способствуют созданию условий, облегчающих процессы репарации, активность которых при действии ионизирующего излучения снижается по сравнению с противоположно направленным процессом — поражением генома. Этим достигается радиозащитное действие протектора.

К числу наиболее радиочувствительных биохимических реакций клеток автор гипотезы относит согласованную систему синтеза ДНК, РНК и белка, а ее нарушение считает одним из важнейших ответов на действие ионизирующей радиации. Отмечается также высокая радиочувствительность процессов окислительного фосфорилирования, разобщение которых в митохондриях происходит уже в первые минуты при сравнительно малых дозах облучения. Была предложена схема, в которой отражены биохимические механизмы действия модификаторов лучевого поражения, вызывающие в пострadiационный период ингибирование радиочувствительных биологических систем: репликацию ДНК, биосинтез РНК и белка, а также разобщение процессов окислительного фосфорилирования, снижение содержания кислорода в клетках.

Исследование механизмов подавления биохимических систем позволило заключить, что модификаторы — тиолы — осуществляют ингибирование ферментов путем непосредственного взаимодействия с их белковой частью. Сравнивая роль дисульфидной связи в механизме противолучевого эффекта тиолов с адсорбцией и другими связями, Е. Ф. Романцев пришел к выводу, что только при образовании смешанодисульфидной связи динамика образования и распада комплекса протектор — белок коррелирует с временной характеристикой радиозащитного действия аминотиола. Количество образующихся смешанных дисульфидов быстро нарастает, достигая максимума в период 15—30 мин после введения протектора, а затем снижается.

Уровень смешанных дисульфидов, как известно, в значительной степени определяется активностью ферментативных систем: неспецифической нуклеотидзависимой дисульфидредуктазы и системы тиолтрансферазы — глутатионредуктазы. В. Б. Колина (1977) исследовала зависимость продолжительности существования смешанных дисульфидов от активности дисульфидредуктазных систем в условиях радиопрофилактической защиты и показала, что снижение активности этих ферментативных систем (благодаря удалению кофактора) приводит к увеличению времени «жизни» ди-

сульфидных связей протектора с тканевыми белками, что сопровождается удлинением радиозащитного действия протектора. Полученные данные оцениваются как еще одно доказательство того, что реализация защитного действия аминотиолов происходит в основном за счет той части радиопротектора, которая к моменту облучения связывается с тканевыми белками смешанодисульфидными связями. В противоположность радиопротекторам тиольные радиосенсибилизаторы вступают в длительный контакт с белками за счет других, недисульфидных связей; полагают, что это может играть определяющую роль в механизме радиосенсибилизирующего действия.

Связывание протекторов — аминотиолов — с ферментами смешанодисульфидными связями приводит к ингибированию их каталитической активности, например к временному торможению новообразования предшественников ДНК.

Блокирование ферментов, участвующих в образовании тимидиновых и других дезоксинуклеотидов, вызывает задержку синтеза ДНК. Ингибирование репликации ДНК, возникающее вследствие дефицита предшественников, облегчает протекание репарационных процессов на матрице еще до момента развития первичных радиационных повреждений. Считается, что облученная ДНК становится более доступной к действию ферментов, конкурирующих за субстрат, реализующих и репарирующих повреждения (Газиев, 1975, 1978). Временное блокирование тиольным протектором репликации ДНК способно, по мнению Е. Ф. Романцева и др. (1977), устранить конкуренцию ферментов за субстрат ДНК, облегчить тем самым репарацию ДНК и снизить накопление «бракованных деталей», поскольку за этот период часть повреждений ДНК успевает репарировать и последующее новообразование ДНК будет происходить на частично восстановленной матрице. Рассмотренный механизм радиозащитного действия тиольных протекторов может быть применен к репродуктивному типу гибели клеток, находящихся в стадии синтеза ДНК, а адсорбционный механизм может иметь место лишь в случае интерфазной гибели клеток. Таким образом, гипотеза комплексного биохимического действия радиозащитных средств рассматривает «охранительное торможение» биосинтеза ДНК как один из важнейших компонентов этого комплекса. Однако авторы гипотезы не исключают участия аминотиолов в защите и на стадии образования первичных повреждений ДНК.

Они отмечают, что аминотиолы не могут быть отнесены к специфическим ингибиторам репликации ДНК, поскольку известно, что тиольные протекторы способны вмешиваться буквально во все этапы, определяющие судьбу ДНК в облученной клетке, обеспечивая большой объем репараций первичных повреждений и в итоге — увеличение радиорезистентности клеток и организма. К этому остается добавить, что репарацию ДНК следует рассматривать с позиции не только функционирования ферментов метаболизма ДНК, но и надмолекулярной организации генома в клетке,

а также ядерной организации ДНК в целом (Носкин, Свердлов, 1978; Газиев, 1978; Комар, 1978).

К числу радиочувствительных биохимических систем гипотеза комплексного механизма относит также биосинтез РНК и белка. Так, Е. Ф. Романцев и др. (1977) пришли к выводу, что тиольные радиопротекторы способны влиять на все этапы синтеза РНК — от образования пуринов и пиримидинов до утилизации рибонуклеозидтрифосфатов в транскрипции ДНК — матрицы РНК-полимеразами. Они отмечают временный, обратимый характер биосинтеза РНК. Максимальная эффективность ингибирования тиольными радиопротекторами наблюдается лишь через 30—90 мин после проявления максимального радиозащитного действия протектора и образования дисульфидных связей с белком фермента, т. е. в тот период, когда тиольный радиопротектор уже не обнаруживается в тканях ни в свободном состоянии, ни в виде смешанных дисульфидов. Такое биохимическое «последствие» радиопротекторов, возможно, связано с тем, что протектор аминотиол действует как на предшествующие молекулы ферментов, так и на их биосинтез.

Вмешательство протекторов в синтез белка объясняется непосредственным их взаимодействием с ферментами или с другими структурными компонентами ядер клеток. Анализ химической связи протектора с ядерными белками показал, что только смешано-дисульфидные связи протектор — белок имеют максимум в период повышенной радиорезистентности. Считается, что временное образование смешанных дисульфидов (тиольный протектор — белок фермента) блокирует биохимические реакции, ответственные за процессы синтеза белка. Авторы предполагают также возможность влияния тиольных радиопротекторов на конформацию молекул белков, участвующих в синтезе белка в ядре клетки.

Если изучению влияния тиольных протекторов на процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и белка посвящено сравнительно большое количество работ, то индолилалкиламины в этом отношении изучены еще недостаточно. Отмечают, что введение препаратов класса индолилалкиламинов заметно не влияет на биосинтез нуклеиновых кислот. Однако не исключена возможность действия индолилалкиламинов на ферментативные системы, ответственные за ключевые обменные процессы в клетке, в частности на биосинтез белка.

Тиольные протекторы не только вызывают ингибирование процессов синтеза нуклеиновых кислот, но и существенно влияют на биоэнергетические процессы в клетке. На основании данных радиобиологической литературы и собственного фактического материала Е. Ф. Романцев пришел к выводу о разобщении процессов окислительного фосфорилирования в период максимальной радиорезистентности, вызванной введением радиопротекторов — аминотиолов. Так, исследуя влияние МЭА на содержание окисленных и восстановленных никотинамидных ферментов в субклеточных фрак-

циях печени и в крови крыс, обнаружили, что спустя 15—30 мин после введения протектора количество никотинамидных коферментов заметно уменьшается в ядрах и в надсодочной жидкости. В этот же интервал времени происходит снижение величины отношения окисленных форм никотинамидных коферментов к восстановленным, а также наблюдается снижение аэробного синтеза АТФ в ядрах тимуса крыс. Данные о разобщении процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, снижении содержания никотинамидных коферментов и ингибировании аэробного синтеза являются еще одной иллюстрацией глубоких биохимических изменений, происходящих при радиопрофилактическом эффекте.

Таким образом, ингибирование тиольными протекторами ферментов (ответственных за процессы репликации ДНК, синтеза РНК и белков, окислительного фосфорилирования) в результате образования в основном смешанных дисульфидов в предрадиационный период и в момент облучения, а также создание впоследствии условий, облегчающих процессы репарации, — все это согласно гипотезе комплексного биохимического механизма действия радиозащитных средств приводит к повышению радиорезистентности облучаемых организмов.

В отличие от рассмотренного представления о множественных процессах, переводящих биологические системы в состояние повышенной радиорезистентности, существует унитарная гипотеза, связывающая радиочувствительность биологических объектов с содержанием в них эндогенных тиолов, — сульфгидрильная гипотеза радиочувствительности.

Сульфгидрильная гипотеза

В настоящее время хорошо известна важная роль тиольных веществ в жизнедеятельности клеток. Тиолы входят в состав активных центров ферментов, играют важную роль в обеспечении проницаемости внутриклеточных мембран, являются одним из компонентов, определяющих величину стационарного окислительно-восстановительного равновесия в клетках и тканях; тиолы необходимы для формирования третичной структуры белков. Установлено также высокое сродство многих веществ, содержащих сульфгидрильные группы, к продуктам радиолиза воды и липидов; будучи активными антиоксидантами, тиольные радиопротекторы снижают первичные окислительные процессы лучевого поражения.

Еще в 1949 г. Е. Баррон, изучая радиолиз растворов ферментов, обнаружил, что тиольные группы обладают наиболее высокой радиочувствительностью по сравнению с другими группами макромолекул. В связи с этим Е. Баррон и С. Дикман (1949) предположили, что сульфгидрильные группы представляют собой уникальные структуры, поражение которых ионизирующей радиацией приводит к инактивации ферментов, повреждению тиолзависимых

внутриклеточных структур и последующему поражению и гибели клеток. Однако простое перенесение выводов, полученных на модельных системах, на биологические объекты не нашло экспериментального подтверждения. Так, в работе П. Фишера и сотр. (1950) было показано, что даже при острейшей форме лучевого поражения животных в их тканях не наблюдается изменений сульфгидрильных групп низкомолекулярных веществ и активности тиоловых ферментов. Не найдено изменений в содержании сульфгидрильных групп и другими авторами в различных органах и тканях облученных мышей, крыс и морских свинок. Наряду с этим имеются работы, в которых описано как снижение уровня эндогенных тиолов в тканях облученных животных, так и его увеличение. По-видимому, изучение общего суммарного содержания в тканях сульфгидрильных групп еще не позволяет оценивать роль тиолов в первичных процессах лучевого поражения. По мнению З. М. Бака (1968), суммарное количество тиоловых групп в тканях значительно превышает ту их долю, которая могла бы окислиться при облучении животных даже в высоких летальных дозах.

Грубое фракционирование тиолов на низкомолекулярные и белковые позволило установить некоторые закономерности в изменении уровня сульфгидрильных групп у облученных животных. Так, Л. С. Исупова (1960) обнаружила, что сразу же после облучения крыс в абсолютно смертельной дозе рентгеновских лучей (7 и 14 Гр) в печени и селезенке происходит незначительное снижение количества низкомолекулярных (небелковых) сульфгидрильных групп, которое спустя 15 мин после окончания облучения нормализуется; через 24 ч наблюдается возрастание содержания небелковых тиолов, являющееся, по мнению автора, уже следствием глубокого нарушения обменных процессов при лучевом поражении. Снижение количества белковых тиолов непосредственно после облучения крыс оказалось более значительным, особенно в семенниках.

Мысль о том, что в первичных процессах могут участвовать не все тиолы, а только незначительная их часть, присущая отдельным компартментам клетки, определенным структурам или биомолекулам, все чаще встречается в работах по изучению радиочувствительности сульфгидрильных групп в клетке.

Пока еще не удалось показать, что содержание тиольных групп в молекуле ферментов снижается за счет радиационно-химических процессов даже при использовании высоких доз ионизирующей радиации (Штреффер, 1972). Сомнения по поводу значимости ферментов в первичных физико-химических процессах лучевого поражения высказывали и другие исследователи. Однако несмотря на многочисленные критические замечания по поводу представлений Е. Баррона о повышенной радиочувствительности тиольных ферментов, сама проблема радиочувствительности высокофункциональных сульфгидрильных групп и их участия в механизмах лучевого поражения не утратила своей остроты и актуальности. Так,

попытки изучить отдельные фракции и внутриклеточные структуры позволили ряду авторов получить данные о высокой чувствительности сульфгидрильных групп к действию ионизирующей радиации. Х. Дикен и др. (1963) исследовали содержание сульфгидрильных групп в белках ядер тимуса при облучении изолированных ядер и животных. В интервале времени от 15 до 60 мин после облучения они обнаружили снижение количества тиольных групп в богатых аргинином гистонах и связали это снижение с лабильзацией комплекса ДНК. Придавая большое значение высокой функциональной активности сульфгидрильных групп гистонов ядер клеток, М. Орд и Л. Стокен (1963) считали окисление тиолов одной из наиболее радиочувствительных реакций ядра клетки. Е. Вилс и А. Вилкинсон (1967) обнаружили значительное снижение сульфгидрильных групп за счет их окисления в облученных изолированных микроструктурах печени крыс: лизосомах, митохондриях, ядрах и микросомах. Наиболее интенсивно этот процесс протекал в лизосомах. По мнению авторов, окисление тиолов при действии ионизирующей радиации на внутриклеточные структуры происходит в результате образования свободных радикальных состояний в фосфолипидах биомембран и накопления в них продуктов перекисного окисления липидов. Р. Сазерленд и А. Пил (1968) установили, что в мембранах эритроцитов существуют два типа тиолов: радиочувствительные (быстрореагирующие, составляющие всего 15% от общего содержания в мембранах) и радиорезистентные. Радиочувствительные сульфгидрильные группы мембран окисляются в облучаемых эритроцитах, а это приводит к поражению специфической структуры мембран и нарушению транспорта ионов K^+ . Однако механизм окисления тиолов в клетке при действии ионизирующей радиации все еще остается неясным в связи с трудностью постановки прямых экспериментов по выяснению участия сульфгидрильных групп в первичных радиационно-химических реакциях лучевого поражения биологических объектов. Отсутствие достаточно полных сведений о радиочувствительности тиолов в зависимости от их функций и локализации во внутриклеточных структурах и компартментах не позволяет делать окончательные выводы о возможном участии сульфгидрильных групп в первичных лучевых процессах.

Если участие сульфгидрильных групп в первичных механизмах лучевого поражения еще не определено, то в противолучевом эффекте их роль исследована значительно лучше. Первые работы по изучению роли тиолов в противолучевой защите были связаны с определением радиозащитных свойств сульфгидрильных групп в молекулах протекторов. Так, прочное блокирование или полное замещение тиольной группы в молекуле цистеаминна и ряда других аминотиолов приводит обычно к резкому снижению или потере радиозащитных свойств молекул. Однако уже эти работы показали, что, несмотря на несомненную значимость присутствия сульфгидрильной группы в молекуле радиопротектора, большую

роль играет специфичность строения всей молекулы аминокислоты в целом и что нет прямого параллелизма между количеством вводимых в организм сульфгидрильных групп в составе протектора и его противолучевой активностью. Заманчивые предположения о замене тиольным протектором идентичных структур в биомакромолекулах, поврежденных облучением, или о защите эндогенных радиочувствительных сульфгидрильных групп в белковых молекулах, как уже отмечалось, не получили прямых экспериментальных подтверждений. Так, еще П. Александер (1959) отмечал, что аминокислотные протекторы в опытах *in vitro* хотя и могут восстанавливать некоторые ферменты, поврежденные ионизирующей радиацией, однако их восстановление не обуславливает противолучевой защиты объекта.

Многочисленные исследования роли сульфгидрильных групп в противолучевом эффекте провели В. Г. Яковлев и Л. С. Исупова (1960—1966). Авторы пришли к выводу, что эффект противолучевой защиты определяется не количеством вводимых в состав радиопротекторов тиолов, а скоростью проникновения и накопления тиолов в тканях животных. Они установили, что в отличие от неэффективных в отношении противолучевого действия препаратов активные серосодержащие радиопротекторы (различные производные цистеина, тиазолидинов, солей сложных эфиров *l*-цистеина, солей восстановленного глутатиона, АЭТ) обнаруживают прямую зависимость степени их радиозащитного действия от проникновения препаратов в радиочувствительные ткани и накопления в них низкомолекулярных (небелковых) тиолов. Опыты показали, что большинство исследованных радиопротекторов вызывают максимальное увеличение небелковых сульфгидрильных групп к 20—30-й минуте после введения препаратов, т. е. в период повышенной радиорезистентности животных. Исследовались также тиольные препараты, не обладающие противолучевыми свойствами (например, неактивные производные тиазолидинов, метионина и др.). Применение их при самых различных вариантах доз и способов введения, как правило, не вызывало характерного для радиопротекторов накопления тиолов в тканях животных. В отличие от этих данных, данные В. Сербо (1962) говорят о повышении уровня тиолов в тканях после введения серосодержащих препаратов, не защищающих от лучевого поражения (меркаптоэтанол и тиогликолят натрия). Анализируя собственный экспериментальный материал, В. Г. Яковлев и Л. С. Исупова концентрировали особое внимание на механизмах проникновения экзогенных препаратов в органы и ткани животных и на биологических механизмах «обезвреживания» поступившего избыточного количества тиольных веществ. К механизму обезвреживания избытка накопленных сульфгидрильных групп авторы относили окисление тиолов, их выведение из организма, а также обратимое взаимодействие защитных препаратов с белками. Было показано, что изменения содержания белковых сульфгидрильных групп неоднознач-

ны. Так, например, цистеамин незначительно повышает, а цистеин снижает содержание тиолов белковой фракции из печени крыс. В. Г. Яковлев и Л. С. Исупова предположили, что накопление в тканях вводимых тиолов (небелковых сульфгидрильных групп) и взаимодействие серы защитных веществ с внутриклеточными белками играют решающую роль в механизме противолучевого эффекта. В ряде работ других авторов роль сульфгидрильных групп в механизме противолучевого эффекта также рассматривалась лишь в связи с распределением вводимых тиолов. Так, С. Антоку (1964) обнаружил значительное увеличение уровня тиолов (в свободной и связанной формах меченой серы) в печени, почках, селезенке, тонкой кишке и в легких мышей вскоре после введения им меченого меркаптоэтилгуанидина — ^{35}S . А. В. Титов и Э. Г. Михайлова (1963) показали, что радиоактивная сера концентрируется в радиочувствительных органах крыс через 60 мин после введения меченых цистеамина и АЭТ и что это еще не в полной мере отражает содержание в тканях радиозащитных веществ. Д. Джемиесон (1966) обнаружила достоверное повышение содержания тиолов в селезенке крыс после введения им радиозащитных доз цистеамина. Она предположила, что возрастание уровня эндогенных тиолов происходит только за счет тиолов вводимого протектора. Повышенное содержание сульфгидрильных групп в селезенке после введения цистеина Л. И. Корчак (1965) и С. П. Болл (1966) также объясняют накоплением в тканях тиолов экзогенного происхождения.

Как мы уже отмечали, идею об опосредованном действии радиопротекторов в противолучевом эффекте высказали З. Бак и П. Александер (1964), обратившие внимание на биохимические изменения в клетке под влиянием тиольных протекторов и смещение тиол-дисульфидного равновесия в направлении накопления эндогенных сульфгидрильных групп. Эта идея могла быть проверена с помощью нетиольных средств защиты от лучевого поражения при оценке уровня функционально активных тиолов в различных структурах клетки и при сопоставлении их уровня в системе с ее радиорезистентностью. Одна из попыток изучить влияние нетиольных протекторов на уровень в тканях эндогенных сульфгидрильных групп была предпринята в 1962 г. Б. Сербо. Он обнаружил, что наряду с серосодержащими протекторами (цистеамином, цистамином, аминоктилсульфуровой кислотой, аминоктилтиофосфатом натрия) серотонин вызывает увеличение эндогенных небелковых тиолов в печени и селезенке мышей. Представляют интерес также данные Л. С. Исуповой и В. Г. Яковлева (1963, 1964), показавших, что в условиях постоянно возрастающей газовой гипоксии в течение 5 ч содержание «собственных» небелковых сульфгидрильных групп в селезенке увеличивалось более чем в два раза по сравнению с нормальным уровнем. По мнению О. Касперссона и Л. Ревеза (1963), небелковые эндогенные тиолы в отличие от белковых сульфгидрильных групп способны определять

модифицируемую и природную резистентность. Было обнаружено, что линии клеток, полученные из общей популяции асцитной карциномы Эрлиха, оказавшиеся более резистентными к анаэробному облучению, содержали относительно большое количество небелковых сульфгидрильных групп (рассчитанных на клетку) по сравнению с родительским клоном. Содержание белковых тиолов при этом оставалось неизменным. Л. Ревез и Х. Бергстренд (1963) изучили действие цистеаминна в различных концентрациях на уровень небелковых сульфгидрильных групп в клетках асцитной карциномы Эрлиха и сравнили эти показатели с данными, полученными О. Возом и др. (1962) и А. Вергрозенем и др. (1963) на клетках почек человека в культуре тканей. Авторы наблюдали зависимость между степенью изменения небелковых тиолов и радиорезистентностью клеток; радиопрофилактический эффект цистеаминна зависит от того, какая концентрация небелковых сульфгидрильных групп обнаруживается в защищаемых клетках.

Таким образом, к середине 60-х гг. формируется представление о том, что химическая защита от лучевого поражения осуществляется не только за счет прямого действия самих радиопротекторов, но и в результате индуцированного ими образования эндогенных тиолов, т. е. опосредованного их действия.

В дальнейшем эти взгляды получили развитие в сульфгидрильной гипотезе, объясняющей с единых позиций механизмы модифицируемой и природной устойчивости биологических объектов к действию ионизирующих излучений (Граевский, 1969). В основе сульфгидрильной гипотезы лежат следующие положения.

1. Радиопрофилактический эффект обусловлен повышением содержания в биологическом объекте сульфгидрильных групп.

2. Эффект химической радиосенсибилизации зависит от снижения уровня эндогенных тиолов.

3. Природная радиорезистентность обусловлена количеством в клетках и тканях тиольных соединений, выполняющих роль эндогенных протекторов.

Опираясь на собственный экспериментальный материал и данные литературы, Э. Я. Граевский привел доказательства причинной связи между изменением уровня эндогенных тиолов и модифицированной радиорезистентностью биологических объектов. Было показано, что под влиянием противолучевых средств (гипоксии, гипотермии, экзогенных серосодержащих веществ, биогенных аминов) происходит повышение содержания эндогенных тиолов. Динамика их накопления в различные сроки после введения радиопротекторов, как правило, коррелирует с изменением радиочувствительности животных. На вопрос о том, какая фракция тиолов (белковая или небелковая) может быть определяющей в радиорезистентности биологических объектов, однозначного ответа пока нет. В качестве доказательства того, что возрастание уровня тиолов в тканях животных под влиянием серосодержащих радиопротекторов происходит в основном не за счет экзогенно введен-

ных тиолов, а в результате накопления собственных эндогенных сульфгидрильных групп, обычно приводят опыты по определению меченного по сере радиопротектора в различных тканях животных к моменту наиболее выраженной радиорезистентности. Согласно этим работам (Тарасенко и др., 1968, 1972) в условиях защиты количество неизмененного радиопротектора в клетках не превышает 3—6% от общего содержания тиолов и 12% от возросшего под влиянием введенного протектора уровня сульфгидрильных групп. Таким образом, эндогенным тиолом придается роль в радиорезистентности не только в том случае, когда используются протекторы, отличные от серосодержащих, или гипоксия и гипотермия, но и при введении тиольных радиозащитных препаратов.

В обосновании сульфгидрильной гипотезы большое место занимают исследования радиосенсибилизирующего эффекта. Известно, что многие радиосенсибилизаторы обладают тиолопривным действием, т. е. способностью блокировать сульфгидрильные группы. Сопоставление радиосенсибилизирующего действия различных классов веществ с их тиолопривной способностью привело ряд авторов к выводу о важной роли тиолов в формировании радиорезистентности объектов. Так, например, И. Линч и П. Говард-Фландрес предположили, что N-этилмалеимид, окись азота и кислород способны сенсибилизировать действие ионизирующей радиации путем истощения в клетке тиолов до такой степени, что происходит резкое снижение их защитных функций. Сенсибилизирующий эффект N-этилмалеимида также связывают с его способностью блокировать сульфгидрильные группы. Иного мнения придерживается Б. Бриджес, относящая радиосенсибилизирующее действие N-этилмалеимида к способности препарата вызывать токсическое действие за счет усиления процессов радиолиза молекул клетки. Ле Суан Ту (1975) изучил радиосенсибилизирующие свойства оксимочевины и метилгидразина, не обладающих тиолопривным действием, и показал в опытах на мышах и асцитной карциноме, что оба сенсибилизатора вызывают в период максимального увеличения радиочувствительности значительное снижение сульфгидрильных групп. Таким образом, несмотря на отсутствие непосредственной реакции метилгидразина и оксимочевины с эндогенными тиолами, их радиосенсибилизирующий эффект может быть объяснен с позиций сульфгидрильной гипотезы. Однако действие ряда других радиосенсибилизаторов с этих позиций не может оцениваться. По мнению Э. Я. Граевского (1969) и А. Г. Тарасенко (1972), усиление лучевого поражения некоторыми галлоидсодержащими сенсибилизаторами связано с токсическим действием продуктов их радиолиза на биологические объекты. Имеются и иные объяснения механизма радиосенсибилизирующего эффекта (для ряда нетиолопривных препаратов), исходящие из электронно-акцепторных свойств сенсибилизаторов, их способности изменять первичную структуру ДНК, подавлять ее синтез и др. (Ярмоненко, 1977). Очевидно, нет еще убедительных данных, позволяющих оце-

нить возможный вклад «сульфгидрильного механизма» в формирование пониженной радиорезистентности, вызванной радиосенсибилизаторами различных классов соединений.

Помимо химических средств, гипотермии и гипоксии модификация радиорезистентности производилась с помощью фракционированного облучения в невысоких летальных дозах. На клетках асцитной карциномы было показано, что при увеличении времени между двукратным облучением одновременно с возрастанием радиорезистентности объектов общее содержание эндогенных тиолов увеличивается. Параллельное исследование радиорезистентности и уровня сульфгидрильных групп проводилось также на клетках, находящихся на разных стадиях роста и клеточного цикла. Так, Э. Я. Граевский (1969) привел сравнительные данные из работ по изучению изменения тиолов и радиорезистентности микроспор в процессе клеточного деления. Оказалось, что в процессе мейоза и митоза происходят однонаправленные изменения содержания тиолов в клетках и их устойчивости (устойчивость оценивалась по выходу хромосомных аберраций) к действию ионизирующей радиации. Динамика изменения уровня эндогенных сульфгидрильных групп в зависимости от изменения радиорезистентности прослежена также на синхронно делящейся икре морских ежей в различных стадиях клеточного цикла, на растущих клетках асцитной карциномы Эрлиха в процессе ее старения, на синхронной культуре клеток разных штаммов хлореллы в процессе клеточного деления, на клетках в различных фазах роста. Эти данные позволили авторам заключить, что изменения радиочувствительности в цикле связаны не только с изменением генетического аппарата в клетке, но и с варьированием содержания внутриклеточных тиолов, выполняющих функции эндогенных радиопротекторов. Эти представления получили дополнительное обоснование в работе Ю. В. Корогодиной и др. (1975). Так, на диплоидных дрожжах (**штамм Мегри 139 В**) было установлено, что клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, в отличие от стационарной фазы более радиорезистентны и содержат в полтора раза больше сульфгидрильных групп. Авторы считают, что именно высокий уровень тиолов почкующихся дрожжевых клеток может определять их повышенную радиорезистентность.

В системе доказательств участия эндогенных тиолов в формировании радиорезистентности биологических объектов важную роль играет выяснение связи природной радиочувствительности с уровнем эндогенных сульфгидрильных групп. Уже первые работы, выполненные на микроспорах растений, на клеточных клонах асцитной карциномы Эрлиха, на L-клетках мышей и клетках лимфомы, свидетельствовали о том, что большей устойчивости биологических объектов к облучению соответствует более высокий уровень эндогенных тиолов. В работе З. Бака и П. Александера (1964) использованы диплоидные мутанты клеток лимфомы мышей, содержащие одинаковое количество ДНК. Авторы показали,

что уровень небелковых тиолов значительно выше у радиорезистентных клеток по сравнению с радиочувствительными.

Однако З. Бак (1965) предостерегал от окончательных выводов, поскольку восстановительные пострадикационные процессы в радиорезистентных клетках, по его предположению, протекают интенсивнее и соотношение связанных и свободных тиолов может отражать уровень метаболизма.

К настоящему времени накоплен большой фактический материал на различных биологических объектах, свидетельствующий о связи природной устойчивости к поражающему действию ионизирующей радиации с уровнем эндогенных тиолов. Обнаружена положительная (прямая) зависимость между содержанием белковых сульфгидрильных групп в кроветворных тканях мышей и крыс и индивидуальными, линейными и возрастными различиями в радиорезистентности животных. Развивая сульфгидрильную гипотезу радиочувствительности, Э. Я. Граевский, однако, отмечает, что эндогенные тиолы не всегда ответственны за радиорезистентность биологических объектов. В связи с этим представляют интерес данные В. И. Корогодина и сотр. по исследованию содержания сульфгидрильных групп в различных по радиочувствительности клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Авторы использовали радиорезистентные («дикий тип»: гаплоиды ХН-3 и диплоиды 652) и радиочувствительные (несущие мутацию *rad-54* гаплоиды Х-6 и диплоиды 512) дрожжевые клетки. У «дикого типа» дрожжей так же, как это было отмечено для *Saccharomyces ellisoideum*, штамм Мегри 139 В (Корогодина и др., 1975), клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, отличаются от клеток в стационарной стадии не только радиорезистентностью, но и повышенным уровнем эндогенных сульфгидрильных групп. В отличие от «дикого типа» дрожжевые клетки, несущие мутацию *rad-54*, не имеют существенных различий в радиорезистентности для логарифмической и стационарной фаз роста культуры. У клеток, несущих мутацию, не наблюдается также значительных изменений и в содержании тиолов. Радиочувствительность гаплоидных и диплоидных клеток различных штаммов дрожжей не зависит от содержания эндогенных тиолов; по мнению авторов, она обусловлена числом хромосомных наборов и влиянием мутации *rad-54*. Возможную роль других эндогенных модификаторов лучевого поражения типа нетиольных эндогенных радиопротекторов или эндогенных радиосенсибилизаторов авторы не учитывают.

Анализируя многочисленные экспериментальные данные, Э. Я. Граевский предположил, что эндогенные тиолы, выполняющие функцию природного внутриклеточного радиопротектора, играют решающую роль в определении радиорезистентности лишь близких в таксономическом отношении клеток (особенно клеток, гомологичных по происхождению). Вариации радиорезистентности в гомологичных, генетически близких системах или в клеточном цикле не выходят за пределы тех изменений, которые достигаются

с помощью химических модифицирующих средств, и поэтому такие колебания радиочувствительности, по мнению автора, не связаны с изменением генетического аппарата, ДНК или других биополимеров, а определяются уровнем эндогенных тиольных радиопротекторов. Он считает, что в системе существует предельный уровень накопления эндогенных тиольных радиопротекторов, выше которого уже эффект защиты не наблюдается. Это предложение может быть проиллюстрировано данными В. Синклера (1968), полученными на синхронизированной культуре клеток китайского хомячка. Введение радиозащитных доз цистеина снижает чувствительность клеток к нонизирующей радиации на всех стадиях митотического цикла, и в результате этого происходит «уравнивание» радиорезистентности каждой стадии деления. Десятикратное увеличение дозы цистеина существенно не меняет радиочувствительность клеток.

Полагают, что тиольные протекторы не могут обуславливать чрезвычайно резкие различия в радиорезистентности систематически далеких и физиологически несопоставимых объектов, поскольку различия в природной радиорезистентности часто во много раз превышают различия, достигаемые модифицирующими химическими агентами. Было показано, что, в то время как в пределах одного вида мышей или крыс обнаруживается прямая корреляция между радиорезистентностью животных и уровнем суммарных ($N=0,98$) и белковых ($r=0,71$) сульфгидрильных групп в тканях (особенно в селезенке), у животных, относящихся к разным видам, связи между радиорезистентностью и содержанием тиолов в тканях не наблюдается. Все это послужило основанием для общего вывода о том, что тиолы участвуют в формировании индивидуальной возрастной и межлинейной радиорезистентности, а различия в радиочувствительности животных, относящихся к разным видам, не связаны с «тиольным механизмом». Приведенные данные не оставляют сомнения в том, что модифицируемая и природная (в определенных пределах) радиорезистентность биологических объектов обнаруживает прямую зависимость от содержания в них тиолов, способных выполнять роль эндогенных радиопротекторов.

Сульфгидрильная гипотеза наряду с гипотезой комплексного биохимического механизма значительно расширила и углубила общий принцип, выдвинутый в 1964 г. З. Баком и П. Александром, об опосредованном механизме радиопрофилактического эффекта, согласно которому существенная роль в противолучевой защите отводится биохимическим изменениям, выражающимся в сдвиге тиол-дисульфидного равновесия в клетке в период повышенной радиорезистентности. Вместе с тем сульфгидрильная гипотеза поставила ряд вопросов, решение которых имеет важное значение для исследований механизмов противолучевого эффекта. К их числу относятся следующие:

- выяснение химической природы эндогенных тиолов, связанных с радиорезистентностью биологических объектов;

- изучение механизмов образования и радиозащитного действия эндогенных тиольных веществ;
- определение доли участия эндогенных тиольных протекторов в общем механизме противолучевого эффекта.

Вопрос о химической природе эндогенных тиолов находится еще в стадии начала исследований. Мы уже отмечали, что единого мнения по данному вопросу нет. На основании данных лаборатории Э. Я. Граевского можно предположить, что природную радиорезистентность в большей степени определяют белковые сульфгидрильные группы, а модифицированную — в равной степени низкомолекулярные и белковые. Однако имеются и другие предположения. Так, В. Б. Колина (1977) считает, что уровень свободных низкомолекулярных тиолов в тканях животных не играет решающей роли в реализации противолучевого действия серосодержащих радиопрофилактических веществ. Это мнение основывается на экспериментах по введению радиопротекторов животным, у которых в тканях предварительно снижалось содержание сульфгидрильных групп (например, с помощью циклогексена); в этом случае, несмотря на сниженный уровень эндогенных тиолов, введение крысам МЭА все же вызывает повышение радиорезистентности животных.

Имеется ряд данных, показывающих, что введение серосодержащих радиопротекторов (МЭА, АЭТ и др.) вызывает накопление свободного глутатиона (в восстановленной форме) в клетках асцитной карциномы. Однако большая часть эндогенных тиолов остается все еще неидентифицированной. Существует также мнение, что основной прирост небелковых сульфгидрильных групп (от 72 до 90%) в тканях животных обусловлен цистеамином — продуктом восстановления введенного животным цистамина (Титов и др., 1970). Таким образом, вопросы об источнике эндогенных тиолов, их конкретной химической природе все же остаются невыясненными. Следует отметить также, что, как правило, уровень эндогенных тиолов возрастает в период повышенной радиорезистентности биологических объектов незначительно, чаще всего превышая нормальный, стационарный уровень сульфгидрильных групп на 20—50%. Лишь ничтожная часть этого количества, по предположению Э. Я. Граевского, может отвечать за противолучевой эффект. Возможно, это явилось одной из причин того, что не всем удавалось обнаружить эффект накопления тиола. Так, в работах Л. И. Корчак (1970) не было обнаружено достоверных изменений ни белковых, ни низкомолекулярных сульфгидрильных групп в селезенке мышей после действия различных противолучевых средств: газовой гипоксии, серотонина, 5-метокситриптамина, морфина, героина, нитрита натрия, цистеамин, унитиола, аминоксилотизируния. Недостаточное знание химической природы эндогенных тиольных веществ связано с отсутствием чувствительных адекватных методов определения эффективных в противолучевом отношении сульфгидрильных групп. Одной из иллюстраций

к сказанному могут служить результаты опытов по определению эндогенных тиолов разными методами (Аннаева и др., 1977). Так, использование метода Бернетта и Зелигмана не позволило обнаружить изменений в содержании белковых сульфгидрильных групп в культуре клеток СОЦ при добавлении к ним цистеаминa и серотонина. Применение другого метода (метода Седлака) выявило в клетках СОЦ достоверное увеличение низкомолекулярных и белковых сульфгидрильных групп при воздействии на клетки цистеаминa (но не серотонина).

Мы не думаем, что эти и другие данные об отсутствии тиол-повышающего действия или слабой его выраженности при радиопрофилактическом эффекте можно противопоставить сульфгидрильной гипотезе. По-видимому, следует согласиться с предположением Э. Я. Граевского, что увеличение эндогенных тиолов может происходить в радиочувствительных микроструктурах клетки, однако при грубом определении общего, суммарного (или же во фракциях) содержания сульфгидрильных групп оно не заметно. Но наряду с этим предположением не следует отбрасывать возможность образования и нетиольных эндогенных веществ, способных оказывать влияние на радиорезистентность биологических объектов. К этому вопросу мы вернемся при изложении гипотезы эндогенного фона радиорезистентности.

Недостаточно полные сведения о химической природе эндогенных тиольных протекторов не позволяют оценивать конкретные механизмы их образования и противолучевого действия. Предполагается, что возрастание уровня эндогенных сульфгидрильных групп в значительной степени может зависеть от нарушения тиол-дисульфидного равновесия в клетке. Так, в работе Донцовой и др. (1978) показано, что при гипоксии в клетках миелиоидного ряда костного мозга мышей наблюдается увеличение содержания белковых сульфгидрильных групп при сохранении количественного состава белков. Авторы предположили, что защитный эффект гипоксии может быть обусловлен переходом дисульфидных связей белковых молекул в сульфгидрильные. По данным Романцева и др. (1977), значительный вклад в противолучевой эффект серосодержащих радиопротекторов могут вносить те молекулы, которые вступают во взаимодействие с внутриклеточными белками, образуя смешанные дисульфиды. Предполагают также, что появление эндогенных низкомолекулярных сульфгидрильных групп может быть связано с разрывом связей смешанных дисульфидов (низкомолекулярный тиол-белок) или с отщеплением от белков серосодержащих остатков иным путем. Не исключено и новообразование тиольных протекторов в клетке. Определенный интерес могут представлять те индуцируемые протекторами изменения в клетке, которые активируют дисульфидредуктазы цАМФ-зависимыми протеинкиназами; интенсификация дисульфидов способствует увеличению сульфгидрильных групп. Этот этап в опосредованном механизме радиопрофилактического эффекта может быть

объяснен «каскадным» принципом вовлечения системы циклических нуклеотидов (Кудряшов, Соболев, 1977). Вместе с тем не исключается возможность непосредственного взаимодействия эндогенных протекторов с продуктами радиоллиза биомакромолекул, с их радикалами.

Одной из отличительных черт унитарной сульфгидрильной гипотезы является представление об эндогенных тиолах как «основном универсальном факторе, определяющем радиочувствительность» (Граевский, Тарасенко, 1972). Этот вывод исходит из многочисленных данных о корреляции между тиол-повышающим эффектом и радиорезистентностью биологического объекта. Однако термин «корреляция» применяется большинством авторов не как строгое понятие — имеется в виду лишь положительное соответствие между наблюдаемыми феноменами. Однако известны случаи отсутствия и такого соответствия. Так, в работах В. И. Кулинского и др. показано, что наряду с синхронным повышением содержания тиолов в селезенке мышей и их радиорезистентности после введения животным серотонина, меркаптоэтиламина, норадrenalина и мезатона, при потенцировании радиозащитного действия аминокислот симпатикотропными препаратами не наблюдается одностороннего тиолповышающего и противолучевого эффекта. Все больше накапливается фактов о том, что радиоустойчивость биологических объектов причинно связана не только с уровнем эндогенных тиолов. Важное значение в оценке радиорезистентности может иметь, например, такой показатель, как антиокислительная активность клеток и тканей животных (Бурлакова и др., 1978), которая не просто отражает изменения радиочувствительности, а является одной из причин, лежащих в основе устойчивости биологических систем к действию ионизирующей радиации. Сопоставляя тиольный показатель радиорезистентности с антиокислительной активностью липидов, авторы пришли к выводу, что оба эти параметра могут быть использованы в качестве комплексного теста для определения устойчивости биологического объекта к облучению, так как уровень тиолов и антиокислительная активность липидов отражают разные стороны клеточного метаболизма, ответственного за радиорезистентность организма.

Таким образом, имеющийся в настоящее время фактический материал не позволяет говорить об эндогенных тиолах как об универсальном факторе радиорезистентности и не дает основания для вывода о том, что тиолповышающий эффект является единственным механизмом, обеспечивающим противолучевой эффект.

Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности

При изучении механизмов модифицированной радиорезистентности организмов существенная роль принадлежит исследованиям структурно-функциональных особенностей сложных систем, актив-

ности эндогенных факторов, регулирующих течение первичных физико-химических процессов лучевого поражения. Этому посвящены рассмотренные выше гипотезы, постулирующие перевод под влиянием радиозащитных агентов чувствительных к радиации биохимических процессов в состояние радиорезистентного метаболизма или связывающие устойчивость биологических объектов к облучению с тиолповышающим эффектом.

Оценив потенциальные возможности клеток в формировании повышенной устойчивости к радиационному воздействию, Ю. Б. Кудряшов и Е. Н. Гончаренко в 1969 г. сформулировали гипотезу «эндогенного фона радиорезистентности», согласно которой устойчивости биологических объектов и систем к действию ионизирующей радиации определяется рядом эндогенных веществ, способных влиять на зарождение и развитие первичных лучевых процессов. Идея, лежащая в основе гипотезы, акцентирует внимание на анализе прежде всего тех метаболических изменений, которые приводят к накоплению в клетках и тканях веществ, способных тормозить развитие первичных лучевых реакций, или же, наоборот, снижают содержание веществ, усиливающих первичные процессы лучевого поражения. Таким образом, гипотеза рассматривает возможность модификации лучевого поражения за счет мобилизации внутренних ресурсов организма эндогенными радиозащитными и радиосенсибилизирующими веществами.

К числу эндогенных защитных соединений помимо тиолов авторы гипотезы относят биогенные амины — серотонин, гистамин, дофамин, норадреналин, адреналин. Их противолучевая активность хорошо известна, однако ранее эти вещества практически не были изучены в качестве возможных участников опосредованного действия вводимых в организм радиозащитных соединений. В качестве эндогенных сенсибилизаторов радиационного воздействия рассматриваются продукты перекисного окисления липидов, главным образом гидроперекиси и перекиси ненасыщенных высших жирных кислот. Предполагается, что радиопрофилактические агенты инактивируют эндогенные радиосенсибилизаторы, подавляя таким образом активность систем, способных участвовать в развитии первичных лучевых процессов.

По мнению авторов гипотезы, не только искусственно модифицируемая, но и природная радиорезистентность определяется соотношением уровней эндогенных защитных и сенсибилизирующих веществ. Это соотношение было обозначено как «регуляторный комплекс», определяющий развитие первичных лучевых процессов и, как следствие, устойчивость биологических объектов к действию радиации. Таким образом, проблема радиорезистентности рассматривается гипотезой с позиций биофизических механизмов первичных лучевых реакций, т. е. исследуется фон, на котором разворачиваются начальные физико-химические процессы лучевого поражения. При этом предполагают, что липиды биомембран — это своеобразные мишени для ионизирующей радиации, а компо-

ненты регуляторного комплекса — эндогенные модификаторы первичных радиобиологических процессов.

К числу основных доказательств причинной связи между изменением уровня эндогенного фона радиорезистентности и профилактическим эффектом радиопротекторов авторы относят следующие:

- существует прямая зависимость между периодом защитного действия введенного радиопрофилактического вещества и изменением уровня эндогенных радиозащитных и сенсibilизирующих веществ;
- указанная зависимость сохраняется лишь при введении животным таких количеств радиопротектора, которые вызывают защитный эффект;
- вещества, близкие по химической структуре к радиопротекторам, но не защищающие биологические объекты от действия радиации, не влияют на содержание компонентов эндогенного фона;
- относительно низкий уровень эндогенных радиосенсibilизаторов и высокое содержание эндогенных радиопротекторов обнаруживаются в клетках и организмах, характеризующихся повышенной природной устойчивостью к действию радиации, но не отмечаются у близких в видовом отношении объектов, обладающих пониженной радиорезистентностью¹.

Очевидно, не все компоненты эндогенного фона играют одинаковую роль в формировании повышенной радиорезистентности. Определяющими оказываются суммарные изменения всего комплекса эндогенных протекторов и сенсibilизаторов, поэтому было бы неправильно судить о степени природной и модифицированной радиорезистентности на основании изменения какого-то одного параметра эндогенного фона. На рис. VII-4 представлены данные, полученные Ю. Б. Кудряшовым, Е. Н. Гончаренко и их сотрудниками. При изучении уровня биогенных аминов и липидных радиосенсibilизаторов в тканях животных, получавших радиозащитные препараты в различных дозах и в различные периоды до облучения; эти результаты сравниваются с аналогичными изменениями в тканях облученных животных или же животных, получавших защитные препараты не до облучения, а после него. Данные рис. VII-4 — это лишь схема, фокусирующая внимание только на относительной направленности изменений компонентов эндогенного фона. Она построена на основании многочисленных экспериментов с радиочувствительными и радиорезистентными тканями и органами, в которых определяли параметры эндогенного фона после введения различных протекторов из двух больших классов

¹ Конкретный фактический материал, посвященный обоснованию рассматриваемой гипотезы, изложен в монографии: Гончаренко Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Гипотеза эндогенного фона повышенной радиорезистентности. М., Изд-во Моск. ун-та, 1980.

соединений — аминотиолов и индолилалкиламинов — и неактивных в радиозащитном отношении, но близких по химической структуре препаратов. Кроме того, варьировались временные параметры, используемые дозы химических препаратов и степень радиационного воздействия. Как видно из рис. VII-4, используя радиопрофилактические вещества и создавая тем самым временное повышение радиорезистентности животных, удается наблюдать повышение уровня эндогенных протекторов — серотонина, гистамина, катехоламинов — и снижение содержания эндогенных липидных радиосенсибилизаторов в органах и тканях. Эти данные свидетельствуют о том, что модифицируемой радиорезистентности животных соответствует изменение уровня эндогенных протекторов и сенсибилизаторов. Они послужили отправной точкой для исследования механизмов природной устойчивости к облучению с позиций эндогенного фона. Изучались различные виды животных, отличающиеся устойчивостью к радиации: морские свинки, лабораторные крысы и мыши различных линий, сирийские хомячки, суслики, сурки, монгольские песчанки, — значение $LD_{50/30}$ для которых соответственно равно 1,9; 4,0—5,0; 5,1; 5,6; 7,0 и 12,0 Гр. Экспедиционные работы в районах обитания радиорезистентных грызунов показали, что растения, которыми питаются эти устойчивые к радиации виды, содержат вещества, обладающие противолучевым действием. Перевод этих животных на рацион лабораторного вивария, в котором отсутствовала естественная растительная пища, приводил к возрастанию их радиочувствительности. Было установлено, что существует прямая зависимость между общей радиорезистентностью животных каждого вида и устойчивостью к облучению их «критических органов» — кроветворных и кишечника. В зависимости от дозы облучения у каждого вида животных наблюдались обе характерные формы лучевого поражения — костномозговая и кишечная, причем у более радиорезистентных видов обе формы поражения проявлялись при более высоких дозах облучения. В связи с этим возник вопрос: не связана ли более высокая радиорезистентность животных и их критических органов с изменением эндогенного фона? Е. Н. Гончаренко и сотр. показали, что содержание серотонина в тканях радиорезистентных грызунов в 3—7 раз выше, а гистамина — в 2—3 раза выше, чем в тех же тканях крыс, более чувствительных к действию

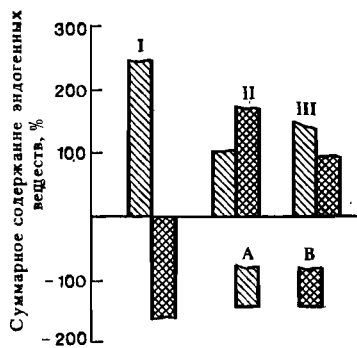


Рис. VII-4. Сравнение суммарного уровня биогенных аминов (А) и эндогенных радиосенсибилизаторов (Б) в тканях животных после введения радиопротекторов (I), облучения (II), введения радиопротекторов и последующего облучения (III).

радиации. Далее авторы показали, что уровень биогенных аминов наиболее высок в кроветворных тканях по сравнению с тканями пищеварительных органов. Уровень липидных радиосенсибилизаторов оказался более высоким у тех видов, которые обладают более высокой радиочувствительностью. Полученный материал свидетельствует о связи между параметрами эндогенного фона и природной радиорезистентностью, кроме того, видно, что фон повышенной радиорезистентности в большей степени характерен для кроветворных органов и, следовательно, играет более важную роль при поражении костного мозга, чем при кишечной форме поражения.

Таким образом, при искусственных и природных вариациях радиочувствительности мы наблюдаем изменения важнейших параметров фона, т. е. происходит накопление эндогенных веществ, способных ослаблять первичное лучевое поражение, и снижение уровня потенциальных сенсибилизаторов лучевого поражения. Однако одна только констатация факта изменения параметров биохимического фона, на котором разворачиваются процессы лучевого поражения, еще ничего не говорит о конкретных биофизических механизмах, с помощью которых достигается повышенная радиорезистентность.

Роль эндогенных продуктов перекисного окисления липидов в развитии и модификации лучевого поражения. Рассмотрению этого вопроса посвящена значительная часть раздела, в котором анализируются пусковые физико-химические механизмы опосредованного действия радиации (см. гл. 224). Здесь же подчеркнем, что продукты перекисного окисления липидов всегда имеются в небольших концентрациях в интактных клетках и тканях. Их исходный стационарный уровень играет важную роль в зарождении и развитии первичных процессов лучевого поражения. Об этом свидетельствует способность продуктов перекисного окисления липидов осуществлять непрямой механизм первичного действия ионизирующей радиации и, таким образом, усиливать действие радиации на различные биологические системы и объекты. Препараты и воздействия, повышающие устойчивость животных к действию радиации, значительно снижают уровень продуктов перекисного окисления липидов в органах и тканях к моменту, когда их противолучевое действие наиболее выражено. В этом случае облучение биологических объектов совершается в условиях невысокого содержания промоторов окислительных реакций. Это создает благоприятный биохимический фон, на котором замедляется развитие первичных лучевых окислительных процессов.

Участие биогенных аминов в противолучевом эффекте. Работами Е. Н. Гончаренко и сотр. было показано, что накопление эндогенного серотонина, гистамина и катехоламинов после введения животным радиопротекторов происходит главным образом за счет новообразования аминов в результате ферментативного декарбоксилирования их предшественников. В меньшей степени этот эффект

связан с торможением скорости инактивации аминов за счет окислительного дезаминирования. Представляют также интерес работы В. И. Кулинского и сотр., показавших возможность «мобилизации» катехоламинов, заключающейся в переходе аминов из депонированного неактивного состояния в физиологически активную форму. По-видимому, в организме животного введенные радиопротекторы увеличивают уровень биогенных аминов в результате влияния на различные типы клеток, например:

- на клетки, в которых происходит новообразование биогенных аминов и их депонирование;
- на клетки, рецептирующие биогенные амины при их перераспределении;
- на клетки, выполняющие обе эти функции.

Каким же образом реализуется противолучевой эффект биогенных аминов? Обсуждению подлежат по крайней мере три пути реализации эффекта в организме животных: 1 — за счет «кислородного эффекта», связанного с сосудосуживающим действием этих соединений; 2 — за счет прямого влияния биогенных аминов на перекиси в процессе перекисного окисления липидов; 3 — в результате участия биогенных аминов в регуляции клеточного обмена.

1. *Гипоксическое действие биогенных аминов.* Многие авторы связывают радиозащитный эффект серотонина, гистамина и др. биогенных аминов исключительно с их вазоконстрикторным действием, которое приводит к снижению скорости циркуляции крови, гипотонии и в результате этого — к гипоксии в таких радиочувствительных тканях, как селезенка, костный мозг, семенники и др. В пользу такого предположения говорит большое число экспериментальных данных, многие из которых суммированы в монографиях З. Бака (1968) и П. Г. Жеребченко (1971). Упомянем некоторые из них. После введения эффективных в радиозащитном отношении биогенных аминов в радиочувствительных тканях отмечается падение напряжения кислорода, которое коррелирует со степенью защиты от облучения; при повышении давления кислорода во вдыхаемом воздухе радиозащитное действие аминов уменьшается; фармакологические антагонисты биогенных аминов устраняют их гипоксическое действие и снимают противолучевую активность. Однако в 1967 г. А. Хасегава и Х. Лендал получили доказательства существования негипоксического механизма защиты, составляющего около половины радиозащитного действия серотонина. Этот результат был получен при сопоставлении противолучевой эффективности серотонина, гипоксии и совместного действия серотонина и гипоксии. В последующее десятилетие был получен фактический материал, свидетельствующий о существовании механизмов защиты биогенными аминами, не зависящих от системной гипоксии, позволяющих рассматривать вопрос о «клеточной компоненте» в радиопрофилактическом действии этого класса веществ. И действительно, многими авторами показано

радиозащитное действие биогенных аминов на одиночных клетках, дробящейся икре морского ежа, культивируемых клетках млекопитающих и других объектах, защита которых от радиационного воздействия может быть связана лишь с реализацией внутриклеточных механизмов, отличных от вазоконстрикторного действия и вызванной им системной гипоксии.

2. *Прямое действие биогенных аминов на липидные перекиси и процессы перекисного окисления.* Работами Е. Н. Гончаренко, А. С. Соболева и сотр. показано, что в опытах *in vitro* инкубация биогенных аминов с продуктами перекисного окисления липидов приводит к одновременному уменьшению в реакционной смеси как количества перекисей, так и изученных аминов. Методом тонкослойной хроматографии удалось обнаружить при этом появление продуктов взаимодействия аминов с липидами. Аналогичный результат параллельно был получен в лаборатории Е. Б. Бурлаковой в работах по термическому окислению метилолеата.

Иллюстрацией взаимодействия биогенных аминов с липидными перекисями и связанного с этим снижения их сенсibilизирующего действия могут служить эксперименты с облученными растворами каротина в олеиновой кислоте. Как указывалось ранее, липидные перекиси, присутствующие в растворе, усиливают радиоллиз каротина за счет непрямого механизма поражения. Добавление в эту систему аминов, например серотонина и дофамина, в значительной степени предотвращает радиосенсibilизирующее действие липидных перекисей. В опытах с микросомами было показано, что биогенные амины препятствуют накоплению продуктов перекисного окисления липидов в процессе окисления, протекающего в микросомах слизистой тонкой кишки, т. е. в радиочувствительной системе. Это касается как НАДФН, так и аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов. Дальнейший анализ показал, что в этих условиях биогенный амин — серотонин — ингибирует НАДФН-цитохром *c*-редуктазу, т. е. начальное звено в цепи НАДФН-зависимого транспорта электронов.

Имеющиеся данные позволяют предположить, что радиозащитное действие биогенных аминов, увеличенный уровень которых соответствует состоянию повышенной радиорезистентности, может реализовываться через влияние на уровень эндогенных липидных радиосенсibilизаторов. Биогенные амины способны как непосредственно разрушать перекиси, так и подавлять процессы перекисного окисления липидов в микросомах.

3. *Участие биогенных аминов в системе клеточной регуляции.* Учитывая высокую биологическую активность аминов, можно ожидать, что увеличение их содержания в клетках и тканях под влиянием введенных радиопротекторов воздействует не только на процессы окисления липидов, но и на другие стороны метаболизма, роль которых в создании радиорезистентности организма еще предстоит установить. В связи с этим особенно важным представляется исследование способности биогенных аминов влиять на

систему циклических нуклеотидов, выполняющих, как известно, важнейшую роль регуляторов клеточного метаболизма. В 1970 г. Х. Лангендорф высказал предположение, согласно которому радиопротекторы-аминотиолы связываются рецепторами плазматической мембраны, стимулируют аденилатциклазу, увеличивая таким образом концентрацию внутриклеточного цАМФ, что приводит к глубоким перестройкам биохимических процессов, повышающих радиорезистентность организма. Тогда же в работе В. И. Кулинского была высказана мысль о том, что противолучевое действие катехоламинов реализуется опосредованно, через систему цАМФ. Эти гипотезы представляли несомненный интерес, так как под контролем циклических нуклеотидов находятся многие радиопоражаемые и регулируемые протекторами процессы: клеточное деление, биосинтез нуклеиновых кислот, гликолиз, липолиз, проницаемость биомембран и др. Однако схема, предложенная Х. Лангендорфом, оказалась недостаточно правильной. Не получило подтверждения предположение о том, что тиольные радиопротекторы связываются аденилатциклазой, хотя участие цАМФ в защитном действии радиопротекторов экспериментально подтверждалось.

Работы, выполненные А. С. Соболевым и сотр. в лаборатории радиационной биофизики МГУ, показали, что существует важное начальное звено в действии радиопротекторов на систему цАМФ — это высвобождение в тканях биогенных аминов, которые осуществляют запуск системы циклических нуклеотидов путем активации аденилатциклазы. В пользу такого заключения свидетельствуют результаты экспериментов, показавших, что:

- введение аминотиолов животным в дозах, оказывающих радиозащитный эффект, вызывает отчетливое увеличение уровня цАМФ в радиочувствительных тканях;
- аминотиолы активируют синтез и мобилизацию биогенных аминов в органах и тканях;
- биогенные амины в тех концентрациях, в которых они образуются в тканях под действием серосодержащих радиопротекторов, стимулируют аденилатциклазу радиопоражаемых тканей, тогда как аминотиолы не влияют на активность аденилатциклазы;
- из сопоставления динамики изменения концентрации цАМФ после введения животным серосодержащих радиопротекторов и биогенных аминов следует, что в первом случае максимум накопления цАМФ приходится на 10—15 мин, а во втором случае — на 1—2 мин; так как различий в поступлении в кровь обоих типов радиопротекторов не отмечено, предполагается, что аминотиолам необходимо некоторое время для активации синтеза и выброса в кровь активаторов аденилатциклазы — эндогенных аминов.

Рассматривая литературные и упомянутые выше данные,

Ю. Б. Кудряшов и А. С. Соболев (1977) предложили следующую схему участия цАМФ в противолучевом эффекте.

1. Серосодержащие радиопротекторы активируют синтез и высвобождение биогенных аминов.

2. Биогенные амины-радиопротекторы — экзогенные и (или) эндогенные — связываются рецепторами клеток.

3. Возрастает активность аденилатциклазы.

4. В клетках повышается уровень цАМФ.

5. В ответ на повышение содержания цАМФ активируются протеинкиназы (этот эффект непосредственно не моделируется радиопротекторами).

6. Протеинкиназы, воздействуя на эффекторные системы, оказывают модифицирующее влияние на метаболизм клетки.

Следует подчеркнуть, что изменения оказываются однотипными для различных по химической природе радиопротекторов. Среди многочисленных процессов, контролируемых системой цАМФ, наибольший интерес могут представлять процессы, формирующие эндогенный фон радиорезистентности. К их числу, по-видимому, относится цАМФ-зависимый эффект увеличения содержания тиолов в клетках под влиянием радиопротекторов. Этому вопросу посвящена серия работ, выполненных В. И. Кулинским и его сотр. По их мнению, катехоламины, увеличивающие в радиочувствительных тканях уровень тиолов, активируют НАДФН-дисульфидредуктазу, что приводит к возрастанию в клетках количества восстановленных сульфгидрильных групп и повышает их радиорезистентность. В этот процесс возможно вовлечение цАМФ-зависимых протеинкиназ, что позволяет авторам таким образом детализировать схему участия цАМФ в противолучевом эффекте: катехоламины — адренорецептор — аденилатциклаза — цАМФ — протеинкиназа — дисульфидредуктаза — увеличение в клетках содержания тиолов — радиопрофилактический эффект. При этом В. И. Кулинский считает, что клеточная радиочувствительность зависит не просто от накопления сульфгидрильных групп, а в более общем виде — от соотношения процессов окисления и восстановления.

Существенным моментом в опосредуемом через систему цАМФ механизме действия радиопротекторов является запуск этой системы биогенными аминами. Возможно, что этот процесс — первый каскад в механизме действия радиопротекторов. Второй каскад — это система цАМФ, которая производит дальнейшее «обезличивание» радиопротектора, так как последующая передача сигнала защиты осуществляется уже другими молекулами — цАМФ и цАМФ-стимулируемыми протеинкиназами. Само узнавание радиопротектора системой цАМФ может сводиться к эффекту высвобождения эндогенных аминов в тканях или происходит при действии экзогенного протектора — амина — на рецепторы клеток.

Следует подчеркнуть, что в рассматриваемых схемах цАМФ

отводится роль внутриклеточного регулятора метаболизма, а не эндогенного радиопротектора, непосредственно выполняющего функции защиты внутриклеточных структур от действия радиации. Поэтому не оправданы были бы попытки поиска линейной зависимости радиорезистентности объектов и уровня цАМФ. Корреляции нет, как известно, и для тщательно описанного в литературе цАМФ-зависимого гликогенолиза, вызываемого гормонами. По-видимому, роль цАМФ состоит в передаче «сигнала защиты» внутри клетки различным метаболическим системам, которые переводят клетку в состояние повышенной радиорезистентности.

Вопрос о связи между системой циклических нуклеотидов и радиорезистентностью биологических объектов обсуждается в литературе с 1971 г., когда Х. Лагендорф сумел снизить эффективность тиольных радиопротекторов с помощью препарата LB-46, блокирующего β -рецепторы, которые осуществляют активацию аденилатциклазы катехоламинами. Прямые эксперименты по изменению устойчивости клеток к ионизирующей радиации путем добавления цАМФ в среду инкубации или же при введении препарата животным не выявили противолучевой активности цАМФ. Возможно, это связано с чрезвычайно слабой способностью цАМФ проникать через плазматические мембраны. В связи с этим особый интерес представляют работы, в которых делаются попытки косвенно изменить уровень внутриклеточного цАМФ, используя активаторы и ингибиторы ферментов, ответственных за образование и разрушение цАМФ. Трудность таких исследований состоит в том, что известные активаторы и ингибиторы обладают весьма широким спектром биологического действия. Так, кофеин и теофиллин (ингибиторы фосфодиэстеразы) угнетают репарацию ДНК, причем этот эффект не связан с действием препаратов на активность фосфодиэстеразы и уровень цАМФ. Все же имеющиеся данные свидетельствуют о наличии связи между повышением уровня цАМФ и увеличением радиорезистентности эукариотических клеток. Что же касается прокариот, то здесь наблюдается противоположная картина — повышенное содержание цАМФ усугубляет лучевое поражение. Предполагают, что это может быть связано с увеличением активности эндонуклеаз и усилением вторичной деградации ДНК. По данным Кумар (1976), мутанты *E. coli*, дефицитные по аденилатциклазе или по цАМФ-рецепторному белку, обладают повышенной устойчивостью к радиации по сравнению с родительским диким штаммом. Все это может быть связано с различиями в структуре и функционировании системы цАМФ в эукариотических и прокариотических клетках.

Исследование вклада процессов клеточной регуляции в эффект противолучевой защиты интенсивно проводится в настоящее время. В последние годы внимание радиобиологов привлекает изучение системы цГМФ, являющейся антагонистом системы цАМФ во многих процессах клеточной регуляции, в частности в процессе синтеза ДНК. Имеются пока еще косвенные указания на то, что

радиопротекторы, непосредственно или опосредованно ингибируя гуанилатциклазу, способны влиять на систему цГМФ и, таким образом, влиять на радиорезистентность клеток (Кудряшов, Со-

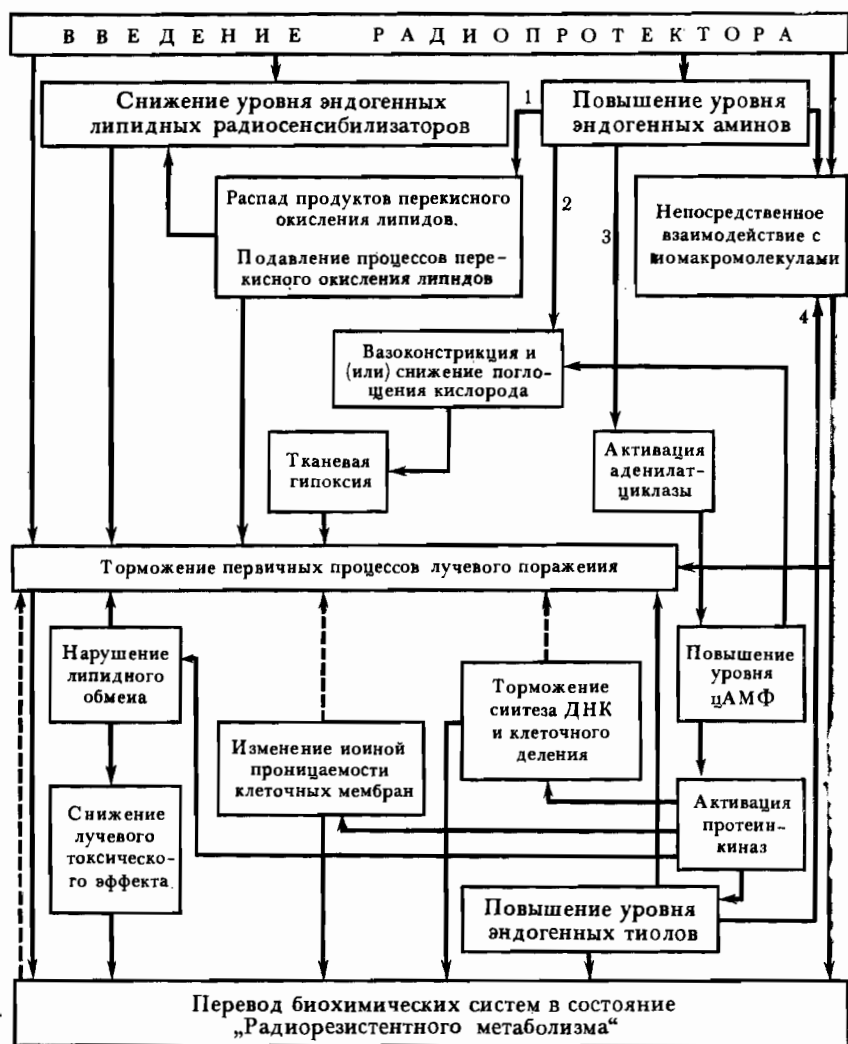


Рис. VII—5. Пути реализации эндогенного фона повышенной радиорезистентности (по Гончаренко и Кудряшову, 1980).

болев, 1977). Однако экспериментальных данных, подтверждающих это предположение, пока еще недостаточно.

Рассматривая участие биогенных аминов в формировании эн-

догенного фона радиорезистентности, можно заключить, что эти биологически активные соединения помимо гипоксического действия и способности влиять на процессы перекисного окисления липидов, осуществляют передачу «сигнала» от радиопротектора в клетку. При этом однотипный сигнал может быть передан различными по химической природе радиозащитными веществами, заключается он в активации системы циклических нуклеотидов. Внутри клетки этот «сигнал защиты» опосредован цАМФ и цАМФ-стимулируемыми протеинкиназами. Это своеобразная «биохимическая воронка», собирающая «сигналы защиты» и трансформирующая их в «радиорезистентный метаболизм» — может увеличиться уровень внутриклеточных серосодержащих веществ, тормозится синтез ДНК и клеточное деление, модифицироваться липолиз и ионная проницаемость и др. Вопрос об участии каждого из цАМФ-зависимых процессов в противолучевом эффекте требует дальнейших углубленных исследований.

Материал, посвященный путям реализации эндогенного фона радиорезистентности в плане гипотезы, предложенной Ю. Б. Кудряшовым и Е. Н. Гончаренко, иллюстрирует схема на рис. VII—5. Как видно из этой схемы, радиозащитные препараты к моменту своей наибольшей эффективности формируют в организме такой комплекс физиологических и биохимических изменений, который переводит организм в состояние повышенной радиорезистентности. В этом комплексе изменений особенно важным представляются:

- торможение перекисного окисления липидов и разрушение эндогенных радиосенсибилизаторов, а следовательно, торможение первичных процессов лучевого поражения;
- формирование тканевой гипоксии за счет прямого или опосредованного через биогенные амины действия радиопротектора на физиологические системы, например за счет вазоконстрикторного действия;
- влияние на систему клеточной регуляции путем активации аденилатциклазы, повышения уровня цАМФ, активации протеинкиназ и других регуляторных систем.

Предполагается, что разнообразные проявления эндогенного фона радиорезистентности взаимосвязаны и каждый из них в той или иной мере принимает участие в формировании повышенной устойчивости биологических объектов к действию радиации.

ЛИТЕРАТУРА

- Акоев И. Г., Максимов Г. К., Малышев В. М. Лучевое поражение млекопитающих и статистическое моделирование. М., Атомиздат, 1972.
- Амирагова М. И., Жеребченко П. Г., Комар В. Е. и др. Пределы модифицируемости лучевого поражения. М., Атомиздат, 1978.
- Анрианов В. Т., Ахрем А. А., Писаревский А. Н., Спитковский Д. М. Радиационная биофизика ДНП-хроматина. М., Атомиздат, 1976.
- Бак З. Химическая защита от ионизирующей радиации. М., Атомиздат, 1968.
- Бак З., Александер П. Основы радиобиологии. М., ИЛ, 1963.
- Бонд В., Флиндер Т., Аршамбо Д. Радиационная гибель млекопитающих. М., Атомиздат, 1971.
- Бурлакова Е. Б. Свободнорадикальный механизм регуляции клеточного метаболизма и его связь с другими регуляторными системами. — В кн.: Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии. М., Наука, 1976.
- Восстановление и репаративные механизмы в радиобиологии. М. Атомиздат, 1972.
- Гончаренко Е. Н., Кудряшов Ю. Б. Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности. М., Изд-во Моск. ун-та, 1980.
- Граевский Э. Я. Сульфгидрильные группы и радиочувствительность. М., Атомиздат, 1969.
- Гродзенский Д. Э. Радиобиология. М., Атомиздат, 1966.
- Гуськова А. К., Байсоголов Г. Д. Лучевая болезнь человека. М., Медицина, 1970.
- Даренская И. Г. и др. Относительная биологическая эффективность излучений. Фактор времени облучения. М., Атомиздат, 1969.
- Дертиигер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. М., Атомиздат, 1973.
- Жестяников В. Д. Восстановление и радиорезистентность клетки. Л., Наука, 1968.
- Ильин Л. А., Воробьев А. И., Иванов В. А. и др. Руководство по медицинским вопросам противорадиационной защиты. М., Медицина, 1975.
- Иванов В. И., Лысов В. Н. Основы дозиметрии. М., Атомиздат, 1971.
- Капультцевич Ю. Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М., Атомиздат, 1978.
- Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М., Изд-во Моск. ун-та, 1973.
- Корогодин В. И. Проблемы пострadiационного восстановления. М., Атомиздат, 1966.
- Клемпарская Н. Н., Львицина Г. М., Шальнова Г. А. Аллергия и радиация. М., Медицина, 1968.
- Комар В. Е., Хансони К. П. Информационные макромолекулы при лучевом поражении клеток. М., Атомиздат, 1980.
- Краевский Н. А. Очерки патологической анатомии лучевой болезни. М., Медгиз, 1957.
- Кудряшов Ю. Б. Практикум по общей биофизике, вып. 7. М., Высшая школа, 1962.
- Кудряшов Ю. Б., Беренфельд Б. С. Радиационная биофизика. М., Изд-во Моск. ун-та, 1979.
- Кузин А. М. Радиационная биохимия. М., Изд-во АН СССР, 1962.
- Кузин А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. М., Наука, 1970.
- Кузин А. М. Молекулярная радиобиология клеточного ядра. М., Атомиздат, 1973.

- Ли Д. Е. Действие радиации на живые клетки. М., Атомиздат, 1963.
- Линденбратен Л. Д. Медицинская радиология. М., Медицина, 1969.
- Мазурик В. К. Некоторые проблемы радиационной биохимии ДНК. — В кн.: Радиационная биохимия. Современные проблемы радиобиологии. т. 4. М., Атомиздат, 1975.
- Окада Ш. Радиационная биохимия. М., Мир, 1974.
- Парибок В. П. Репарационные системы клетки и вопрос об их чувствительности к лучевым воздействиям. Цитология. Т. 9, М., 1967.
- Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Готлиб В. Я. Клеточные факторы реакции опухолей на облучение и химиотерапевтические действия. Первичные и начальные процессы биологического действия ионизирующей радиации. М., Наука, 1972.
- Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Радиационная иммунология и трансплантация. М., Атомиздат, 1970.
- Радиационное поражение и восстановление структур и функций макромолекул. М., Медицина, 1977.
- Радиационные эффекты в физике, химии и биологии. М., Атомиздат, 1965.
- Радиотоксины, их природа и роль в лучевом поражении. М., Атомиздат, 1966.
- Романцев Е. Ф. Радиация и химическая защита. М., Атомиздат, 1968.
- Романцев Е. Ф., Савич А. В. Химическая защита от ионизирующей радиации. М., Медгиз, 1958.
- Рябченко Н. И. Радиация и ДНК. М., Атомиздат, 1979.
- Свердлов А. Г. Опосредованное действие ионизирующих излучений. М., Атомиздат, 1968.
- Современные проблемы радиационных исследований. Т. 1—7. М., Атомиздат, 1970, 1971, 1972, 1975, 1976, 1977, 1978.
- Суворов Н. Н., Шашков В. С. Химия и фармакология средств профилактики радиационных поражений. М., Атомиздат, 1975.
- Сумаруков Г. В. Окислительное равновесие и радиочувствительность. М., Атомиздат, 1970.
- Сэтлоу Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. М., Мир, 1964.
- Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения. М., Атомиздат, 1962.
- Тимофеев-Рессовский Н. В., Иванов В. И., Корогодин В. И. Применение принципа попадания в радиобиологии. М., Атомиздат, 1968.
- Томсон Дж. Защита млекопитающих от ионизирующих излучений. М., Атомиздат, 1964.
- Фриц-Ниггли Х. Радиобиология, ее основы и достижения. М., Атомиздат, 1961.
- Хуг О., Келлерер А. Стохастическая радиобиология. М., Атомиздат, 1969.
- Эмануэль Н. М. Роль свободных радикалов в радиобиологических процессах и некоторые новые возможности в разработке средств против лучевого поражения. — В кн.: Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений. М., Изд-во АН СССР, 1963.
- Эйдус Л. Х. Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучений. М., Атомиздат, 1972.
- Эйдус Л. Х. Неспецифическая реакция клеток и радиочувствительность. М., Атомиздат, 1977.
- Ярмоненко С. П. Противолучевая защита организма. М., Атомиздат, 1969.
- Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных. М., Высшая школа, 1977.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Предисловие</i>	3
<i>Введение</i>	4
<i>Глава I.</i> Первичные процессы поглощения энергии ионизирующих излучений	16
1. Общая характеристика процесса поглощения энергии	16
2. Пространственное распределение ионов. Относительная биологическая эффективность различных видов ионизирующих излучений	30
<i>Глава II.</i> Зависимость биологического эффекта от поглощенной дозы излучения. Принцип попадания и концепция мишени	45
<i>Глава III.</i> Инактивация макромолекул прямым действием ионизирующего излучения	57
1. Феноменологический анализ лучевого поражения макромолекул	59
2. Первичные физические процессы, приводящие к инаktivации макромолекул при прямом действии излучения	66
<i>Глава IV.</i> Инактивация макромолекул в водных растворах. Непрямое действие ионизирующего излучения	96
1. Радиационно-химические превращения молекул воды	98
2. Реакции растворенных органических молекул с продуктами радиолитического разложения воды	103
3. Реакции радикалов органических молекул, ведущие к образованию стабильных продуктов	105
4. Количественные характеристики непрямого действия радиации в водных растворах	107
5. Модификация лучевого поражения растворенных молекул	109
6. Связь между типом структурного повреждения и характером инаktivации макромолекул в водных растворах	112
<i>Глава V.</i> Действие ионизирующих излучений на клетку	118
1. Реакция клеток на облучение	118
2. Количественные характеристики гибели облученных клеток	121
3. Модификация лучевого поражения клеток	125
4. Первичные физико-химические процессы в облученной клетке	127
5. Анализ механизмов лучевого поражения клеток	133
6. Восстановление от радиационного повреждения	143
<i>Глава VI.</i> Действие ионизирующей радиации на целостный организм	151
1. Сравнительная радиочувствительность организмов	151
2. Действие ионизирующих излучений на млекопитающих, острая и хроническая лучевая болезнь	159
3. Изменения в органах и тканях облученных животных	170
4. Опосредованное действие ионизирующих излучений. Радиотоксиканты, их природа и роль в лучевом поражении	207
<i>Глава VII.</i> Модификация радиочувствительности организмов	233
1. Усиление поражающего действия радиации	234
2. Химическая защита организмов от лучевого поражения	251

Юрий Борисович Кудряшов,
Борис Семенович Беренфельд

ОСНОВЫ
РАДИАЦИОННОЙ
БИОФИЗИКИ

Заведующая редакцией
Н. М. Глазкова

Редактор *Н. М. Горелик*

Мл. редакторы:
М. Ю. Буянова, Т. В. Властовская

Художник *Б. С. Вехтер*

Художественный редактор
И. П. Смирнов

Технический редактор
Э. С. Кондрашова

Корректоры
*Н. В. Тютина,
Л. А. Кузнецова*

Тематический план 1982 г. № 157
ИБ № 1829

Сдано в набор 29.12.81. Подписано к печати
13.04.82. Л-110049. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага
тип. № 1. Гарнитура Литературная. Высокая
печать. Усл. печ. л. 19,0. Уч.-изд. л. 22,07
Зак. 316. Тираж 5600 экз. Цена 1 р. 10 к.
Изд. № 1791

Ордена «Знак Почета» издательство
Московского университета.
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.
Типография ордена «Знак Почета» изд-ва МГУ.
Москва, Ленинские горы