



ФМБА РОССИИ
Федеральное медико-биологическое агентство



Медико-биологический университет
инноваций и непрерывного образования
ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Адрес: г. Москва, ул. Живописная, д. 46, стр. 8

Тел.: 8 (499) 190-96-92

Сайт: www.mbufmbc.ru

Абдуллаев С.А., Лизунов В.Ю.

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

**Учебное пособие для самостоятельной работы
ординаторов высших учебных заведений и аспирантов
по специальности 1.5.1. Радиобиология**

Москва, 2026

Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр Российской Федерации —
Федеральный медицинский биофизический центр
имени А.И. Бурназяна»
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИННОВАЦИЙ И НЕПРЕРЫВНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Абдуллаев С.А., Лизунов В.Ю.

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

**Учебное пособие для самостоятельной работы
ординаторов высших учебных заведений и аспирантов
по специальности 1.5.1. Радиобиология**

Москва 2026

УДК 616-08: [616-006+616.15]
ББК 53.530(55.6)
А912

Абдуллаев С.А., Лизунов В.Ю. Основы молекулярно-клеточных механизмов биологического действия ионизирующих излучений. Учебное пособие для самостоятельной работы ординаторов высших учебных заведений и аспирантов по специальности 1.5.1. Радиобиология. — М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2026. — 74 с.

Авторы:

Абдуллаев С.А. — доцент кафедры медико-профилактических дисциплин с курсами радиационной гигиены и радиационной медицины Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, доктор биологических наук;

Лизунов В.Ю. — заведующий кафедрой медико-профилактических дисциплин с курсами радиационной гигиены и радиационной медицины Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, кандидат медицинских наук, доцент.

Рецензенты:

Осипов А.Н. — руководитель отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Управления радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, профессор РАН, доктор биологических наук.

Васильев С.А. — заместитель директора по развитию Томского НИМЦ, руководитель лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, доктор биологических наук.

Издание предназначено для самостоятельной работы ординаторов и аспирантов по специальности 1.5.1. Радиобиология кафедры медико-профилактических дисциплин с курсами радиационной гигиены и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, а также для студентов медико-биологических факультетов высших учебных заведений.

В учебном пособии рассмотрены базовые основы молекулярно-клеточных механизмов биологического действия ионизирующих излучений, типы повреждений ДНК, механизмы репарации ДНК, поражения на уровне клетки, лучевые реакции тканей и органов, а также отдаленные последствия облучения.

Изучение и освоение материалов учебного пособия поможет будущему квалифицированному специалисту успешно и эффективно выполнять мероприятия радиационной безопасности и радиационного контроля на радиационно-опасных объектах.

ISBN 978-5-93064-445-6

© ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна
ФМБА России, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ	8
1.1. Радиационные повреждения ДНК	8
1.2. Механизмы репарации ДНК.	11
1.2.1. Эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов	11
1.2.2. Репарация односторонних и двухцепочечных разрывов ДНК.	13
1.3. Задержка прохождения клеточного цикла	16
2. ЛУЧЕВЫЕ ПОРАЖЕНИЯ НА УРОВНЕ КЛЕТКИ.	19
2.1. Задержка клеточного деления	19
2.2. Хромосомные аберрации и микроядра.	22
2.3. Утрата клоногенного потенциала	26
2.3.1. Оценка выживаемости клеток <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	26
2.4. Радиационно-индуцированный апоптоз и некроз.	29
2.5. «Эффект свидетеля»	34
2.6. Нестабильность генома.	39
3. ЛУЧЕВЫЕ РЕАКЦИИ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ.	42
3.1. Радиационные синдромы	42
3.2. Кровотворная форма острой лучевой болезни.	47
3.3. Кишечная форма острой лучевой болезни.	50
3.4. Кожная форма острой лучевой болезни	53
3.5. Другие формы острой лучевой болезни	57
3.6. Некоторые клинические закономерности лучевой болезни человека	59
3.7. Комбинированные и сочетанные радиационные поражения.	62
3.8. Процессы восстановления в облученном организме	64
4. ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ.	67
4.1. Общая характеристика отдаленных последствий	67
4.2. Неопухолевые формы отдаленных последствий облучения	69
4.3. Опухолевые формы отдаленных последствий облучения	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	73

ВВЕДЕНИЕ

В результате облучения все клеточные структуры подвергаются повреждениям. Вероятность поражения тех или иных молекул определяется их размером: чем крупнее молекула, тем, естественно, больше вероятность ее повреждения. Именно поэтому в качестве основной мишени радиационного поражения клетки рассматривается ДНК.

Суммарная протяженность всех молекул ДНК, присутствующих в составе типичной человеческой клетки, достигает примерно двух метров. ДНК распределена по 46 хромосомам, в каждой хромосоме имеется только одна молекула ДНК (до ее репликации при подготовке клетки к делению), длина которой, в зависимости от размера хромосомы, варьирует от 1,7 до 8,5 мм. Гены, кодирующие тот или иной белок, находятся только в двух хромосомах, одна из которых унаследована от отца, а другая — от матери. Ген, наличие которого определяет мужской пол ребенка, представлен в клетке в единичной копии в Y-хромосоме.

В зависимости от конкретной отрасли биологических исследований, ключевое значение могут иметь различные аспекты структуры ДНК. Здесь укажем на те, которые существенны для понимания механизма действия ионизирующих излучений на клетку.

Молекула ДНК является двухцепочечной, построенной из повторяющихся участков (звеньев), образуемых дезоксирибозой (относящейся в химическом плане к сахарам) и фосфорной кислотой, которые, в свою очередь, соединены между собой эфирными связями (рис. 1).

Данная компонента ДНК именуется её сахаро-фосфатным остовом (или остовом молекулы). К каждому кольцу дезоксирибозы присоединено одно из четырех оснований — пуриновых (аденин или гуанин) или пиримидиновых (тимин или цитозин). Основание вместе с дезоксирибозой образует нуклеозид.

В роли фундаментальных строительных блоков молекулы ДНК выступают нуклеотиды — нуклеозиды, у которых дезоксирибоза соединена с остатком фосфорной кислоты (фосфорилированные нуклеозиды). Каждое из оснований имеет две или три водородные связи с одним из оснований противоположной нити ДНК (аденин — с тимином, гуанин — с цитозином). Одна из нитей определяет генетическую информацию клетки и с нее считывается информация по расположению аминокислот

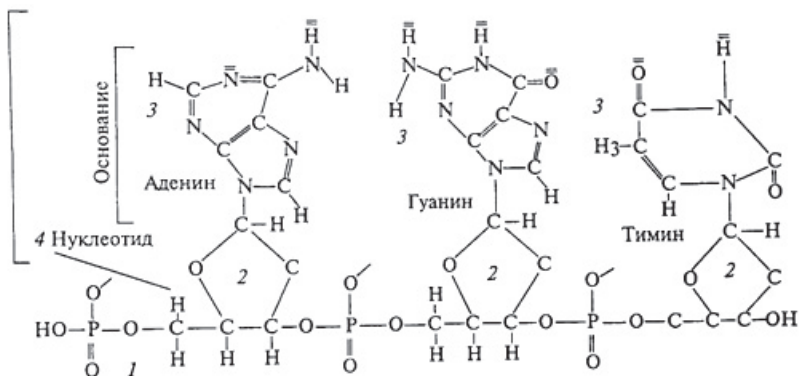


Рис. 1. Строение одной из двух нитей ДНК (С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон, 2004).

1 — сахаро-фосфатный скелет; 2 — пятичленный сахар (дезоксирибоза);
3 — основание (в данном случае аденин); 4 — нуклеотид (в данном случае дезоксиаденозин)

в белках, а вторая служит для точного воспроизведения этой нити в процессе удвоения ДНК при подготовке клетки к делению.

В клетке различные участки ДНК одной и той же молекулы находятся очень близко друг к другу из-за многократного сворачивания ДНК в структуры все большего и большего диаметра (рис. 2).

Двойная спираль ДНК имеет диаметр 1,7 нм (эта величина часто для простоты принимается равной 2 нм), расстояние между витками спирали равно 3,4 нм (см. рис. 6.2, а). Участки нити ДНК длиной около 200 пар нуклеотидов периодически сворачиваются вокруг структур, образованных белками основного характера — гистонами, формируя нуклеосомы диаметром 11 нм (рис. 2, б). ДНК, связанную с белком, называют хроматином, а всю структуру — «бусинками (нуклеосомы) на нитке». Нуклеосомная нить в свою очередь складывается в структуры диаметром 30 нм (рис. 2, в), образующие так называемые гигантские петли общей длиной 300 тыс. пар оснований. Эти петли строго фиксируются внутри ядра, прикрепляясь белковым «якорем» к ядерной мембране и фибриллярной сети ядерного матрикса. Каждая гигантская петля хроматина в нескольких точках прикрепляется к молекуле топоизомеразы II, создавая структуру,

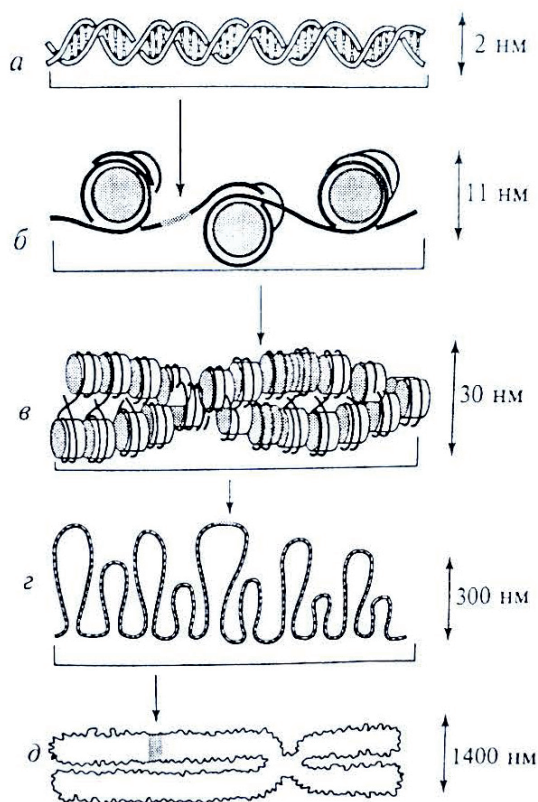


Рис. 2. Строение участка молекулы ДНК и ее пространственная упаковка в интерфазном ядре и после (конденсации) в хромосоме делящейся клетки (С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон, 2004).

a — двойная спираль ДНК; *б* — молекула ДНК, свернутая в нуклеосомы; *в* — нуклеосомная нить; *г* и *д* — следующие уровни хроматина

называемую розеткой, лепестки которой образуются нитью ДНК длиной 50 тыс. пар оснований. Следующие уровни упаковки хроматина — петли шириной 300 нм, из которых формируются петли шириной 700 нм, располагающиеся поперек хроматиды (рис. 2, *г*). Хромосома в метафазе состоит из двух хроматид, одна из которых образована «родительской», а вторая — синтезированной в S-периоде новой нитью ДНК (см. рис. 2, *д*). Хроматиды соединены между собой центромерой (Ц), образуя хромосому.

В анафазе хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к полюсам деления клетки. В этот момент бывшие хроматиды начинают называться хромосомами дочерних клеток. Плотность упаковки отдельных участков ДНК постоянно меняется, что связано с синтезом на ней РНК в момент считывания информации для синтеза белков, а также с репликацией (удвоением) ДНК при подготовке клетки к делению. С позиций радиобиологии важен факт теснейшего пространственного расположения различных частей одной и той же молекулы ДНК в интерфазной клетке и в хромосоме (рис. 2, з) и, кроме того, близкое расположение молекул ДНК, принадлежащих разным хромосомам.

В настоящем учебном пособии рассмотрены базовые основы молекулярно-клеточных механизмов биологического действия ионизирующей излучений, типы повреждений ДНК, механизмы репарации ДНК, поражения на уровне клетки, лучевые реакции тканей и органов, а также отдаленные последствия облучения. Данное издание предназначено для самостоятельной работы ординаторов и аспирантов по специальности 1.5.1. Радиобиология кафедры медико-профилактических дисциплин с курсами радиационной гигиены и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, а также для студентов медико-биологических факультетов высших учебных заведений. Изучение и освоение материалов пособия поможет будущему специалисту успешно и эффективно выполнять мероприятия радиационной безопасности и радиационного контроля на радиационно-опасных объектах.

1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

1.1. Радиационные повреждения ДНК

Воздействие на молекулу ДНК как прямой ионизации, так и атаки гидроксильными радикалами (ОН) приводит к дестабилизации и последующему разрыву ковалентных связей, соединяющих атомы в ее структуре. Разрыв связей в сахаро-фосфатном скелете нарушает непрерывность нити ДНК. Если разорвана одна из нитей, говорят об *однонитевом* или *одиночном разрыве*. Совпадение разрывов противоположных нитей ДНК в одной точке приводит к появлению двойных (двунитевых) разрывов. Известно, что одиночные разрывы постоянно возникают в клетке и без всякой связи с облучением, просто вследствие тепловой нестабильности ДНК, а также в результате некоторых окислительных и ферментативных процессов. Более того, одиночные разрывы даже необходимы: при репликации ДНК молекула должна быть расплетена на участке синтеза, для чего одна нить должна иметь возможность вращаться относительно другой, чего невозможно достичь без ее разрыва. Предполагается, однако, что при облучении возникают не только одиночные разрывы, аналогичные возникающим спонтанно, но еще появляются «комплексные», при которых в скелете ДНК рядом находится сразу несколько разорванных связей; такие разрывы репарируются хуже, чем возникающие в нормальных условиях.

Двойные разрывы образуются как при случайном пространственном совпадении одиночных разрывов в противоположных нитях ДНК (вероятность которого возрастает с увеличением накопленной дозы редкоизирующего излучения), так и вследствие одномоментного повреждения обеих нитей при выделении в данном микрообъеме клетки большого количества энергии. Даже при действии редкоизирующих излучений выделение энергии по объему клетки происходит не абсолютно равномерно, а дискретными порциями разной величины, так что в примерно равном объеме атомам может быть передано от нескольких электрон-вольт до нескольких сот электрон-вольт. При действии плотноизирующих излучений общее число разорванных межатомных связей будет таким же, однако они

будут менее равномерно распределены по длине молекулы ДНК. Общее число очагов поражения будет меньшим, зато «тяжесть» (концентрация разорванных межатомных связей на единицу микрообъема) каждого из них будет больше. Таким образом, при действии плотноионизирующих излучений число двойных разрывов на единицу дозы оказывается выше, чем при действии редкоионизирующих видов радиации. Так как одиночные разрывы репарируются гораздо лучше, чем двойные, тяжесть поражения клетки с увеличением доли двойных разрывов возрастает. Именно это и служит причиной более высокой относительной биологической эффективности плотноионизирующих излучений.

Разрыв межатомных связей в сахаро-фосфатном скелете ведет к нарушению непрерывности молекулы ДНК, что препятствует считыванию с нее генетической информации (если разрыв приходится на транскрибируемый участок генома), а также нормальной репликации ДНК и последующему распределению генетического материала между клетками. Разрыв скелета может сопровождаться разрывом связей в той части молекулы дезоксирибозы, которая не участвует в построении скелета ДНК. Такое повреждение рассматривается одновременно и как разрыв, и как повреждение нуклеотида.

Если в молекуле дезоксирибозы разорвана одна из связей, не участвующих в построении скелета ДНК, то принято говорить о повреждении нуклеотида, а если в нуклеотиде повреждена одна из связей в пуриновом или пиримидиновом основании, то говорится о повреждении основания (а не нуклеотида, хотя основание является частью нуклеотида). Поврежденные основания и нуклеотиды подвергаются дальнейшим химическим изменениям. Примером является окисление гуанина до 8-оксогуанина. Атака ДНК высокоактивными радикалами воды приводит к модификации оснований, например, присоединение радикала OH^* к тимину превращает его в тимингликол.

Разрывы скелета ДНК частично элиминируются самостоятельно, частично с помощью систем ферментативной репарации. Репарация не всегда заканчивается восстановлением исходной молекулы. Вместо воссоединения разорванной связи может возникнуть связь между свободными концами двух противоположных нитей молекулы ДНК, между свободными концами в местах разных разрывов одной и той же нити ДНК

и даже между свободными концами разных молекул ДНК. Такое разнообразие новых связей является следствием того, что нити ДНК в ядре упакованы весьма плотно. Неправильное воссоединение разрывов приводит к возникновению хромосомных перестроек. Разрывы молекулы ДНК и окружающих ее белков при неправильном воссоединении приводят к образованию ДНК-белковых сшивок.

Неверная репарация оснований, а также их химическая модификация ведет к еще одному дефекту молекулы — появлению так называемых неспаренных (англ. - *mismatch*) оснований. В молекуле ДНК в норме существуют только две пары комплементарных оснований — аденин-тимин и гуанин-цитозин. Замена одного из оснований каждой пары ведет к изменению генетического кода. Выше говорилось о появлении в молекуле 8-оксогуанина вследствие окисления гуанина. Во время репликации ДНК в синтезируемой цепи вместо комплементарного к гуанину цитозина напротив 8-оксогуанина будет вставлен аденин. При синтезе информационной РНК неверное основание приведет к неправильной кодировке и последующему включению в белковую молекулу ошибочного аминокислотного остатка. Помимо этого, некомплементарное основание меняет геометрию молекулы ДНК.

Некомплементарные основания образуются не только в результате облучения, но возникают и спонтанно как дефекты сложного процесса репликации ДНК. Поэтому системы репарации ДНК всегда активно работают в клетке, вне какой-либо связи с воздействием ионизирующей радиации. Однако облучение увеличивает как общее количество дефектов, так и создает поражения, которые по количеству на единицу длины молекулы превосходят повреждения, возникающие в нормальных условиях.

При воздействии редкоионизирующего излучения в дозе 2 Гр, вызывающем гибель от 10 до 90 % клеток разных тканей человека, в ДНК одной клетки образуется около 2000 односторонних и 80 двусторонних разрывов, повреждается 1000 оснований и формируется 300 сшивок с белком. Именно эти поражения и лежат в основе радиационной гибели клетки, длительного нарушения эффективности деления ее потомков и злокачественного перерождения, а в случае воздействия на половые клетки — и генетических последствий облучения родителей для потомства.

1.2. Механизмы репарации ДНК

Как было отмечено ранее, ДНК подвержена непрерывным повреждениям, выражающимся в разрывах межзатомных связей. Следовательно, без наличия специализированных ферментативных систем, отвечающих за репарацию ДНК, жизнедеятельность клетки была бы невозможна. Открытие и детальное изучение этих систем было проведено в радиобиологических исследованиях, что явилось серьезным вкладом радиобиологии в молекулярную биологию.

В настоящее время о работе этих систем известно довольно много, включая строение многих генов, кодирующих белки, осуществляющие репарацию. Основным источником сведений о репарации отдельных видов повреждений ДНК стали эксперименты на микроорганизмах. Выводы этих работ были проверены на клетках лабораторных животных, в том числе клетках, мутантных по различным генам репаративных белков, а также на клетках, полученных от лиц, отличающихся повышенной чувствительностью к действию ионизирующей радиации.

1.2.1. Эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов

При эксцизионной репарации поврежденных или измененных (неспаренных) оснований первым шагом является их удаление ДНК-гликозилазами. Образовавшаяся брешь должна быть заполнена идентичным основанием, однако в клетке нет фермента, который мог бы это сделать. Присоединить основание к дезоксирибозе, уже находящейся в цепи ДНК, также невозможно. Дело в том, что в клетке синтез цепи ДНК сразу идет с использованием более крупных строительных элементов — фосфорилированных нуклеотидов, состоящих из основания, дезоксирибозы и трех остатков фосфорной кислоты (два из которых отщепляются во время синтеза). Таким образом, заполнить брешь надо не основанием, а нуклеотидом, но, чтобы его вставить, надо освободить для него место, удалив дезоксирибозу из цепи. Эта операция выполняется в два этапа двумя ферментами — нить ДНК разрезается ДНК-эндо-нуклеазой выше и ниже места повреждения, а затем брешь расширяется примерно на 30 оснований фосфодиэстеразой (разрушающей эфирные связи между дезоксирибозой и остатками фосфорной кислоты). Расширение бреши необходимо для работы ДНК-полимераз, которые

способны наращивать нить ДНК с правильной последовательностью оснований, используя в качестве матрицы противоположную, интактную нить. Затем вновь синтезированная часть цепи своим вторым концом соединяется с остальной частью нити ДНК-лигазами (рис. 3).

Практически так же протекает и репарация поврежденных нуклеотидов, только она начинается сразу с действия ДНК-эндонуклеазы.



Рис. 3. Схема эксцизионной репарации поврежденных и неспаренных оснований и нуклеотидов ДНК (С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон, 2004).

- 1 — репарация ДНК в случае повреждения небольшого числа оснований (нуклеотидов);
- 2 — репарация ДНК в случае повреждения большого числа оснований (нуклеотидов)

Если одно поврежденное основание или нуклеотид находятся вблизи другого поврежденного основания или однонитевого разрыва, то система репарации дает сбой. Либо гликозилазы не могут удалить два близко расположенных поврежденных основания, либо ошибка возникает на следующем этапе — разрез противоположной нити ДНК эндонуклеазой приводит к формированию двунитевого разрыва, репарация которого, как говорилось выше, проходит с определенными ошибками.

1.2.2. Репарация однонитевых и двухцепочечных разрывов ДНК

Повреждения в цепочке ДНК, затрагивающие ее сахаро-фосфатный каркас, можно обнаружить разными способами. Самый наглядный из них — это анализ того, как ДНК распределяется при центрифугировании в растворе сахарозы с изменяющейся концентрацией. Чем больше в ДНК двойных разрывов, тем короче ее фрагменты, тем меньше их седиментационная подвижность и тем выше они будут находиться в градиенте после центрифугирования. Центрифугирование в так называемой нейтральной (по величине pH) сахарозе выявляет только двойные разрывы ДНК. Разрывы лишь одной из нитей ДНК при этом не выявляются, так как оба фрагмента разорванной нити связаны с неповрежденной комплементарной нитью и оседают как единое целое. Для выявления одиночных разрывов ДНК должна быть расплетена на одиночные нити (этот процесс называется денатурацией ДНК). Достигается это подщелачиванием среды, что приводит к разрыву водородных связей между комплементарными основаниями. При помещении ДНК в градиент сахарозы, приготовленный с добавлением щёлочи, происходит денатурация ДНК, и каждая из нитей разделяется на фрагменты уже по местам одиночных разрывов. Профиль распределения ДНК по седиментационной подвижности в этом случае определяется числом одиночных разрывов. При центрифугировании ДНК, выделенной из клеток сразу после облучения, в нейтральном и щелочном градиенте определяется степень ее радиационного поражения; выделение ДНК через разные сроки после облучения позволяет оценить динамику элиминации одиночных и двойных разрывов (принято говорить о «воссоединении» разрывов ДНК).

Простые одиночные разрывы ДНК элиминируются ДНК-ли-газами, восстанавливающими связи между атомами сахара-фосфатного скелета. Лигазы — ферменты, которые постоянно восстанавливают связи в скелете ДНК, рвущиеся в результате тепловых процессов или атаки ДНК радикалами, образующимися в процессе нормального метаболизма. При воздействии излучений часть одиночных разрывов сопровождается более глубоким повреждением дезоксирибозного кольца и/или потерей основания. В этом случае воссоздание непрерывной нити ДНК производится уже не ДНК-лигазами, а идет по более сложной схеме — механизму эксцизионной репарации нуклеотидов.

Репарация одиночных разрывов ДНК является эффективным и быстропротекающим процессом.

Репарация двойных разрывов ДНК является более сложной для клетки и проходит с меньшей эффективностью и большим числом ошибок. Репарация осуществляется двумя путями — за счет негомологичного воссоединения концов и методом гомологичной рекомбинации (рис. 4). При негомологичном воссоединении концов две части каждой из разорванных нитей ДНК воссоединяются лигазами. Этот вид репарации двойных разрывов идет на всех стадиях цикла, но он недостаточно эффективен в плане восстановления непрерывности нити и, кроме того, приводит к неправильному сращению нитей, следствием чего являются хромосомные перестройки.

Репарация путем гомологичной рекомбинации в основном происходит при облучении клетки в конце S-периода и в периоде G₂, т.е. при разрыве той части молекулы ДНК, которая уже реплицировалась, так что для нее имеется неповрежденный аналог. Вместе с тем может использоваться и неповрежденная другая молекула ДНК, имеющая гомологичную последовательность оснований. Участок, используемый для рекомбинации, должен иметь не менее двухсот пар нуклеотидов, располагающихся в той же последовательности, как у ДНК вблизи сайта двойного разрыва. При гомологичной рекомбинации один конец разорванной нити ДНК встраивается в неповрежденный гомолог, на котором, как на матрице, проходит синтез недостающих участков нитей ДНК. Новые части затем «подшиваются» лигазами к основной части молекулы ДНК.

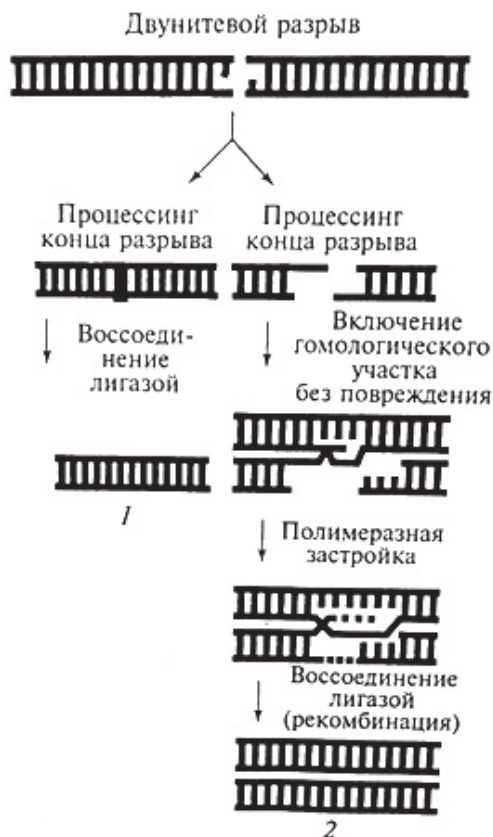


Рис. 4. Схема репарации двунитевых разрывов (С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон, 2004).

1 — за счет нехомологичного воссоединения концов;
2 — путем гомологичной рекомбинации

В условиях плотной пространственной упаковки молекул ДНК в клетке неверная репарация разрывов молекулы приводит не к воссоединению оторванных друг от друга фрагментов ДНК, а к пересортировке (транслокации) участков ДНК по ее длине, соединению двух различных молекул, относящихся к разным хромосомам (образованию мостов), и ряду других хроматидных и хромосомных aberrаций. Отсутствие репарации

приводит к отделению участка ДНК от основной молекулы — образованию ацентрического фрагмента.

Приведенные данные о механизме репарации различных видов повреждения ДНК описывают только ее основные этапы. На самом деле эти процессы проходят с участием большого количества ферментов. Так, в эксцизионной репарации от момента распознавания повреждения и до окончания процесса уже установлено участие, по крайней мере, 13 ферментов. Неудивительно, что работа столь сложной системы не может быть полностью эффективной как в плане попыток удаления всех нанесенных ДНК повреждений, так и в отношении качества конечного продукта.

Ясно, что чем выше доза радиации, тем больше вероятность сохранения повреждений, а потому последствия облучения больше сказываются на жизнедеятельности клетки. Вместе с тем для некоторых видов клеток в диапазоне низких уровней (0,1–0,5 Гр) установлены факты большего снижения выживаемости, чем при облучении в более высоких (на несколько десятых грея) дозах, что связывают с нечувствительностью репаративных систем клетки к совсем малым повреждениям ДНК. Предполагается, что в таких клетках работа репаративных систем нуждается в индукции, которая происходит после накопления в ДНК определенного количества повреждений.

В целом вопросы восстановления ДНК остаются недостаточно изученными. Очень мало известно, например, о взаимодействии ферментных систем, участвующих в транскрипции РНК на ДНК, репликации ДНК и репарации ее радиационных повреждений. Изучение эффективности репарации различных видов повреждений ДНК в широком диапазоне доз, которым подвергается человек, от долей до десятков грей, является важной задачей радиобиологии.

1.3. Задержка прохождения клеточного цикла

Состояние ДНК играет определяющую роль в клеточном цикле и его регуляции, поэтому молекулярно-биологическая сторона такого важного явления, как задержка клеточного деления, будет рассмотрена в данной главе, а его феноменология — в следующей, вместе с другими проявлениями лучевых реакций клеток.

Жизненный цикл клетки, период от одного деления до другого, подразделяется на четыре фазы: митоз (М), период синтеза ДНК (S -период), предсинтетический период (G_1 , от англ. gap — разрыв, под которым понимается перерыв между видимым в микроскоп митозом и определяемым с помощью автордиографии периодом синтеза ДНК) и постсинтетический период (G_2) между окончанием синтеза ДНК и вступлением клетки в митоз.

Общая длительность цикла культивируемых *in vitro* опухолевых клеток человека, с которыми проводится основная масса радиобиологических экспериментов, составляет около 24 ч, при длительности периода G_1 , ≈ 10 ч, $S \approx 8$ ч, G_2 , ≈ 5 ч и М — 1 ч. Клетки опухолей человека лимфоидного происхождения могут иметь цикл короче 10 ч. У клеток крипт кишечного эпителия мыши длительность митотического, или, как его еще называют, генерационного цикла составляет примерно 19 ч, период G_1 , длится $\sim 9,5$ ч, S -период — 7,5 ч, а период G_2 , и митоз — примерно по 1 ч. У многих клеток грызунов митотический цикл существенно короче и составляет 7–12 ч.

Быстро делящиеся клетки, особенно стволовые, имеют укороченный период G_1 , в то время как дифференцированные клетки имеют столь длинный период G_1 , что его обозначают как G_0 , и называют стадией покоя. Иногда клетки останавливаются в продвижении по циклу в фазе G_2 , и тогда стадия покоя определяется как $G_{2,0}$.

В медленно обновляющихся тканях большинство клеток находится в G_0 -периоде, т. е. периоде покоя; его длительность составляет недели, месяцы и даже годы (например, клеток ЦНС). «Покоящиеся» клетки — это резерв репопуляции, они переходят к синтезу ДНК и делению в случае гибели от различных причин

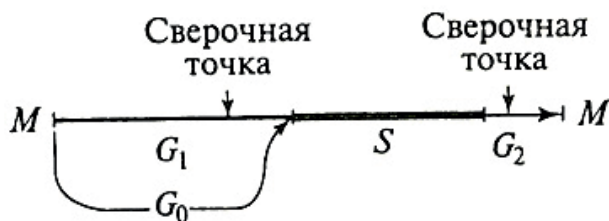


Рис. 5. Схема митотического цикла М — митоз; G_1 — предсинтетический (по отношению к синтезу ДНК) период; S — стадия синтеза ДНК; G_2 — постсинтетический период; G_0 — период покоя. (С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон, 2004)

части клеточного пула. Таков, например, механизм посттравматической регенерации тканей или возобновления роста опухоли после ее облучения.

Продвижение клетки по циклу определяется активацией последовательно сменяющих друг друга циклинзависимых киназ — ферментов, фосфорилирующих аминокислотные остатки в белках и тем самым меняющих их конформацию и энзиматическую активность. Каждая циклинзависимая киназа состоит из собственно каталитической единицы, обозначаемой как *Cdk* с определенным номером, и регуляторной субъединицы — одного из циклинов. Уровень экспрессии циклинов и, в несколько меньшей степени, каталитической единицы киназы, меняется по мере продвижения клетки по циклу. Для перехода от одной стадии цикла к другой необходимо образование нового комплекса каталитической единицы с одним из циклинов, а также фосфорилирование определенных аминокислотных остатков (прежде всего, треонина) в ее молекуле. Негативная регуляция продвижения клетки по фазам цикла осуществляется ингибиторами циклинзависимых киназ — белками семейств *Ink4* и *Cip/ Kip*. После выполнения своей функции циклинзависимые киназы инактивируются вследствие распада циклина.

В клеточном цикле имеется несколько так называемых свечных точек, «чекпойнтов» (англ. check point — пост контроля на границе), при прохождении которых ферментативные системы проверяют ДНК на повреждения, и в случае их выявления активируют ингибиторы циклинзависимых киназ, что замедляет переход клеток из одной фазы в другую. Вероятно, замедление перехода дает больше возможности для репарации повреждений ДНК, возникающих в процессе нормальной жизнедеятельности клетки. При нанесении клетке значительного количества повреждений эта система также приводит к задержке прохождения цикла, но, по-видимому, не может обеспечить необходимый уровень восстановления. Блок в прохождении цикла нагляднее всего проявляется в виде задержки наступления первого постлучевого митоза. Фиксация поведения облученных клеток с помощью специальных видов видеосъемки, показывает, однако, что при одной и той же дозе облучения клетки с длительной задержкой продвижения по циклу (более поздним наступлением митоза) впоследствии погибают с большей вероятностью, чем клетки с меньшей задержкой.

2. ЛУЧЕВЫЕ ПОРАЖЕНИЯ НА УРОВНЕ КЛЕТКИ

2.1. Задержка клеточного деления

Снижение числа делящихся клеток после облучения было замечено уже вскоре после открытия рентгеновских лучей, что и послужило одним из оснований к их применению для подавления опухолевого роста. Задержка в наступлении очередного деления наблюдается почти у всех клеток облучаемой популяции, причем ее длительность зависит от дозы ионизирующего излучения.

Первые количественные данные по этому вопросу были получены на клетках млекопитающих, культивируемых *in vitro*, что стало возможным в широких масштабах в пятидесятые годы XX в. В начале 60-х появились методы синхронизации клеток, под которой понимают накопление клеток в одной из фаз генерационного цикла. Один из таких методов заключается во введении в культуральную среду веществ, препятствующих синтезу ДНК, так что клетки, находившиеся в этот момент в S-периоде, останавливаются в продвижении по циклу, а остальные доходят до S-периода и накапливаются в его начале. После удаления ингибитора (снятия «блока») клетки относительно синхронно начинают двигаться по циклу.

Дж. Ф. Скайф изучил действие облучения на прохождение генерационного цикла клетками почки человека, синхронизированными в S-периоде. Облучение приводило к задержке в наступлении волны митотической активности. У необлученных клеток митозы начинали появляться спустя 6 ч после снятия синхронизирующего блока, а их максимум приходился на 9 ч. После облучения клеток максимум митотической активности сдвигался на более позднее время пропорционально поглощенной дозе, при этом снижалась и величина максимума митотической активности. Пострадиационная задержка митозов при дозе 5 Гр достигала 7 ч (сдвиг пика митозов с 10 до 17 ч после снятия блока).

В дальнейшем было установлено, что длительность задержки деления у некоторых видов клеток меняется в зависимости от стадии клеточного цикла, в которой они находились при облучении, у других она относительно постоянна при облучении во время всей интерфазы.

Появившиеся в последние годы возможности длительной видеосъемки клеток с компьютерным анализом судьбы нескольких поколений ее потомков позволили получить новые данные о задержке клеточного деления, а также о пути и динамике гибели клеток после облучения.

К. Чу и соавторы в лаборатории профессора В. Дюи провели наблюдение за 231 клеткой рака мочевого пузыря человека линии *EJ30-15* в течение нескольких генерационных циклов как до облучения, так и после него. Поэтому для каждой клетки было известно, за какое время до облучения она закончила деление, и через сколько часов после воздействия она должна была бы войти в очередной митоз. Генерационный цикл этих клеток составляет $19 \pm 2,5$ ч, из которых на стадию G_1 , приходится 3–10 ч, на S — 7–8 ч и на G_2 — от 2 до 5 ч. Клетки были облучены в дозе 6 Гр.

На рис. 6 представлены результаты двух экспериментов, обозначенных соответственно треугольниками и кружками,

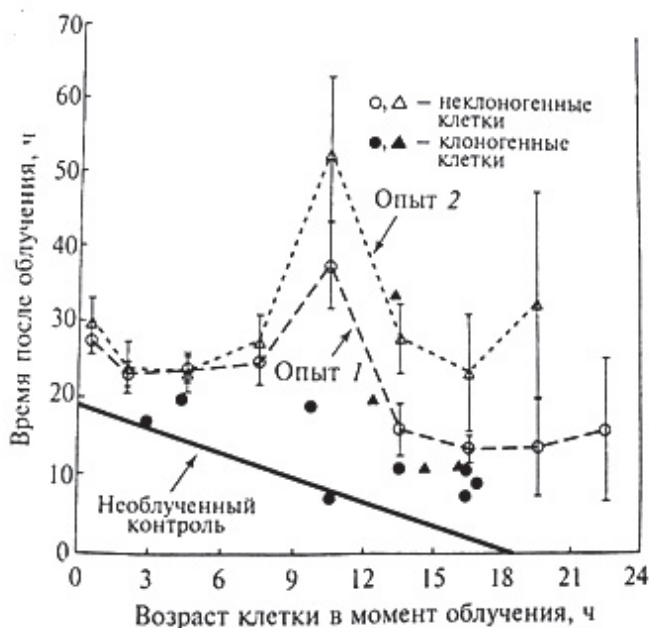


Рис. 6. Задержка в наступлении митоза после облучения клеток карциномы мочевого пузыря человека линии *EJ30-15* в дозе 6 Гр в разное время после предыдущего деления

в которых клетки были облучены в дозе 6 Гр. Светлые значки относятся к клеткам, впоследствии утратившим способность к размножению, темные — к клеткам, сохранившим клоногенный потенциал. На кривых представлены результаты анализа данных видеосъемки клеток до и после облучения, а также видеосъемки необлученных клеток, растущих в тех же культуральных флаконах.

Линия контроля соединяет точки 19,5 ч на оси абсцисс и ординат, соответствующие средней длительности цикла необлученных клеток. Величина задержки в наступлении митоза — расстояние по вертикали между кривыми для облученных клеток и прямой для интактных клеток.

Сохранили способность к делению в ряду нескольких поколений всего 12 облученных клеток, потомство которых образовало колонии, состоящие из более чем 50 клеток каждая. В этой группе клеток задержка в прохождении цикла была относительно небольшая, они вошли в деление через 17–22 ч после предыдущего. У остальных клеток, которые в дальнейшем погибли, облучение привело к значительной задержке наступления первого митоза. У клеток, облученных в периоде G_1 , задержка митоза составила ≈ 7 ч, в поздней S - и G_2 -фазе она достигла 20–25 ч; наибольшую задержку испытывали клетки, подвергшиеся облучению в середине S -периода — в среднем она была равна 35 ч. Часть клеток погибла в интерфазе, причем не по апоптотическому пути, который ранее часто связывали с интерфазной гибелью клеток, а по некротическому.

В той же лаборатории было показано, что после облучения эмбриональных фибробластов крыс, имеющих цикл продолжительностью $11 \pm 0,3$ ч, облучение в дозе 4 Гр вызвало трехчасовую задержку в наступлении деления, независимо от того, в какой фазе цикла находилась клетка в момент воздействия. При дозе 9,5 Гр задержка возросла, но всего на 1 ч, при этом ее длительность также осталась независимой от фазы цикла.

У клеток мышины лимфомы *L5178Y-S* и клеток лимфомы человека *MOLT-4*, генерационный цикл которых равен соответственно 7 и 9,5 ч, облучение в дозе 4 Гр привело к удлинению цикла в 1,5–2 раза. Особенно сильно увеличилась длительность пострепликативного периода G_2 .

Клетки мышины лимфомы линии *ST4* после облучения в дозе 2,5 и 4 Гр погибали по апоптотическому пути в первые 2 ч после

воздействия, так что по отношению к ним о задержке в прохождении цикла говорить не приходится.

Таким образом, различным видам клеток свойственны совершенно разные реакции на облучение, что будет подтверждено далее многочисленными примерами.

2.2. Хромосомные aberrации и микроядра

Хромосомные aberrации (перестройки) являются классическим проявлением лучевого поражения клеток. Их появление и их количество соответствует дозе облучения, что используется при биологической дозиметрии. Появление aberrаций отражает образование разрывов молекулы ДНК и дефекты ее репарации. Разрывы приводят к фрагментации хромосомы. Под фрагментом понимают ту часть хромосомы, которая не связана с центромерой. Центромера — это структура, расположенная в середине хромосомы, за которую она притягивается к полюсу деления, иными словами, — к месту, где будет формироваться ядро будущей дочерней клетки. Фрагмент хромосомы, не связанный с центромерой, не притягивается к полюсу деления и распределяется между дочерними клетками случайным образом. Фрагменты хорошо видны во время метафазы и особенно анафазы, когда все хромосомы притянуты нитями веретена к полюсам деления, а фрагменты остаются посередине клетки. После завершения деления клетки, т. е. в интерфазе, фрагменты проявляются как микроядра — участки конденсированной ДНК, в то время как почти вся остальная ДНК переходит в деконденсированное состояние.

Неверное воссоединение разрывов, когда при репарации происходит соединение участков ДНК из разных мест одной и той же хромосомы или разных хромосом, во время митоза проявляется в виде хромосомных перестроек.

Aberrации изучают в клетках, находящихся в метафазе или анафазе, когда все интактные хромосомы расходятся по полюсам клетки, а в центре остаются фрагменты и связанные между собой хромосомы («мосты»), которые должны были бы разойтись по дочерним клеткам. Метафазный анализ хромосом проводят только *in vitro*, а анафазный можно проводить и *in vivo*.

Для получения статистически значимых результатов при изучении зависимости числа хромосомных перестроек от дозы

излучения методом метафазного анализа требуется проанализировать хотя бы несколько десятков так называемых метафазных пластинок. Классическим объектом изучения являются лимфоциты, которые запускаются в деление с помощью фитогемагглютинина, вводимого в питательную среду. Так как лимфоциты растут во взвеси, клетки в состоянии митоза нельзя получить стряхиванием с подложки. Митотические клетки накапливают введением в среду колхицина (колцемида) или других агентов, не дающих клетке закончить деление, но не препятствующих конденсации хроматина в хромосомы и вступлению клетки в митоз.

Однако в метафазной пластинке, в которой тесно собраны все хромосомы, невозможно исследовать их структуру. Для расщепления хромосом клетки помещают в гипотонический раствор, где объем клетки значительно увеличивается, так что хромосомы расходятся друг от друга. Путем «раскапывания» клеточной суспензии на влажное стекло хромосомы каждой клетки равномерно распределяются на большей площади, что облегчает их детальное изучение. Заметим, что в метафазе каждая хромосома выглядит как буква X, в анафазе — как «галочка» (>). Левая и правая часть буквы x (при вертикальном расположении ее длинной оси) называются хроматидами, а после их расхождения в анафазе — хромосомами. Каждая хромосома в анафазе состоит из двух плеч, называемых, из-за обычно разной длины, коротким и длинным плечом. В месте соединения плеч — в вершине «галочки», или центре хромосомы, состоящей из двух хроматид, располагается центромера (называемая кинетическим тельцем хромосомы).

При переходе клетки от метафазы к анафазе центромера делится пополам и половинки расходятся по полюсам деления, разделяя хромосому (X) на две части, что обеспечивает равное распределение генетической информации каждой хромосомы между дочерними клетками.

После образования новой клетки каждая ее хромосома содержит одну молекулу ДНК. В S-периоде молекула ДНК удваивается. В прометафазе каждая из этих молекул упаковывается в хроматиду, а две «сестринские» хроматиды соединяются друг с другом центромерой, формируя метафазную хромосому.

Возникающие в клетке абберрации подразделяют на хромосомные и хроматидные. Хромосомные абберрации возникают в случае, когда клетка подверглась облучению в предсинтетической стадии цикла или в *S*-периоде, но до начала удвоения определенного участка своего генома. При неверном воссоединении оторванных друг от друга фрагментов ДНК такое нарушение воспроизводится во время репликации (удвоении). Итогом является образование дицентриков — хромосом, имеющих две центромеры, что может сопровождаться появлением ацентрических фрагментов, хорошо видных при сравнении метафазных пластинок облученных и необлученных лимфоцитов. Обмен фрагментами между хромосомами проявляется в виде реципрокных транслокаций.

Хроматидные абберрации возникают в клетке, облученной уже после завершения репликации всей ДНК или того ее участка, разрыв которого и приведет к формированию абберрации. Разрыв одной из хроматид проявится в виде ее укорочения и образования ацентрического фрагмента, который будет виден при мета- или анафазном анализе. Разрыв обеих хроматид может проявиться различным образом — образованием двух фрагментов, их слиянием в один (принято говорить о «липкости» концов разорванных хроматид и хромосом, что способствует образованию различных видов перестроек, например, внутрихромосомных обменов) или соединением сестринских хроматид. Кольцевые хромосомы, не содержащие центромеры появляются в результате внутривлевого обмена, происходящего на фоне так называемой интерстициальной делеции (вырезания участка хромосомы внутри плеча с последующим соединением концов интерстициального фрагмента). Вследствие взаимного притяжения сестринских хроматид оба кольца обычно лежат рядом и с наложением одного на другое.

В анафазе центромера хромосомы разделяется на две части, которые растягиваются веретеном деления к полюсам клетки. В случае связи хроматид «конец в конец» они вытягиваются между полюсами клетки, образуя «мост».

Абберрации, сопровождающиеся образованием ацентрических фрагментов и дицентриков, получили название нестабильных, так как приводят к гибели самой облученной клетки или ее ближайших потомков из-за невозможности равномерного

распределения генетического материала между дочерними клетками. Перестройки, сопровождающиеся только перемещением участков пораженных хромосом, когда весь генетический материал остается связанным с центромерой и может распределяться между дочерними клетками, относят к стабильным перестройкам, так как они могут передаваться в ряду клеточных поколений, сохраняясь в организме в течение многих лет. Примером являются транслокации, когда участок генома перемещается в новое для него место, но продолжает функционировать. Их изучение стало возможным благодаря разработке методов дифференцированной окраски отдельных участков хромосом. Такие методы позволяют обнаруживать, например, симметричные обмены и инверсии в клетках лиц, подвергшихся облучению более 50 лет тому назад в результате атомных взрывов и радиационных аварий.

В настоящее время одним из наиболее совершенных методов анализа хромосомных перестроек является использование флюоресцентной метки, присоединенной к фрагментам ДНК, комплементарным для ДНК определенных участков генома. Для него обычно используют английское название — FISH (от *fluorescence in situ hybridization*). Один из его вариантов — метод мультиплексной дифференциальной окраски (*mFISH*) — позволяет окрашивать каждую из 24 различных хромосом человека (у человека 22 парные и 2 парные/непарные хромосомы) определенным образом, используя «библиотеку ДНК» к каждой хромосоме, в которой ДНК помечены различными флуорохромами, число которых может достигать до пяти. Наиболее широко хромосомные aberrации используют для оценки поглощенных доз при облучении человека. Тест проводят в культуре лимфоцитов периферической крови.

Из ацентрических фрагментов хромосом, которые из-за отсутствия центромер не были распределены по ядрам дочерних клеток и остались в цитоплазме, образуются так называемые микроядра, представляющие собой глыбки хроматина, располагающиеся в цитоплазме интерфазной клетки. Количество микроядер на клетку коррелирует с дозой излучения и также как хромосомные aberrации используется в качестве показателя для целей «биологической» дозиметрии.

2.3. Утрата клоногенного потенциала

Подсчет хромосомных аберраций или микроядер позволяет довольно точно оценить радиочувствительность клеток, однако оба метода весьма трудоемки. Основные данные о радиочувствительности получены путем изучения выживаемости клеток, с помощью оценки их клоногенной способности, под которой понимается способность клетки образовывать видимую невооруженным глазом колонию. Согласно договоренности исследователей, клетка после облучения считается «выжившей», если она образует колонию, состоящую из более чем 50 клеток. Естественно, что учет выживаемости проводится в сроки, достаточные для образования крупных колоний всеми интактными клетками. Для образования видимой глазом колонии облученная клетка должна совершить не менее 5 полностью успешных делений, т. е. делений, в результате которых дочерние клетки также будут способны к делению. Обычно для клеток грызунов после их облучения достаточно 5–8 дней роста, учет выживаемости клеток человека проводят через две недели после облучения.

Заклячая описание этого центрального для радиобиологии метода оценки радиочувствительности, подчеркнем, что с его помощью определяется не доля погибших после облучения клеток (которые выходят из-под наблюдения, а потому и не могут быть учтены), а доля выживших.

2.3.1. Оценка выживаемости клеток *in vitro* и *in vivo*

Метод оценки радиочувствительности, основанный на утере способности клетки к клонообразованию, был разработан в 1956 г. Т. Паком и П. Маркусом на примере клеток карциномы шейки матки человека линии *HeLa*. И по сей день этот метод является «золотым стандартом» количественной радиобиологии, с которым сравнивают данные других методов оценки. Идея определения клоногенности позднее была применена к тканям *in vivo*, что позволило определить радиочувствительность клеток костного мозга, эпителия кожи и кишечника и клеток некоторых других тканей.

Рассмотрим методику определения выживаемости клеток в культуре применительно к клеткам, растущим прикрепленными к стенке культурального сосуда (в монослое). Сначала

клетки снимают со стенок раствором трипсина, часто с добавлением ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), связывающей ионы кальция и магния, необходимые для прикрепления клеток к подложке. Затем полученную суспензию разбивают до одиночных клеток, подсчитывают их концентрацию и засевают клетки по чашкам Петри таким образом, чтобы общее число колоний, выросших в каждом варианте опыта, позволяло получить статистически значимый результат. Обычно на каждую экспериментальную точку должно быть просчитано около 400 колоний, что дает оценку числа выросших колоний с ошибкой в 5 %. Чтобы такое количество колоний могло расти, не мешая друг другу, берут по несколько чашек Петри на точку. Чем больше доза излучения, тем больше сеют клеток на чашку.

Облучение проводят в разное время относительно посева клеток. В зависимости от задач исследования, клетки могут быть облучены в монослое, в суспензии, а также в виде одиночно сидящих через несколько часов после посева, когда они уже прикрепятся к подложке и вступят в период активного роста. Облучение проводят в серии доз обычно с интервалом между ними в 2 Гр и в диапазоне до 10–20 Гр. После облучения клетки выращивают в инкубаторе указанное выше время, после чего выросшие колонии фиксируют, окрашивают и подсчитывают. Колонии, не доросшие до 50 клеток, как показывает опыт, не дорастают до учетной величины и при значительном удлинении периода роста.

Выживаемость при каждой дозе излучения определяют как отношение числа колоний, выросших в облученных чашках, к числу колоний, выросших в контроле, с учетом, что в опыте по указанной выше причине высевает больше клеток. Интактные клетки стабильных клеточных линий в норме способны к образованию колоний с эффективностью свыше 90 %. При работе с клетками, взятыми прямо из опухолей, приходится мириться с низкой клонообразующей способностью, составляющей иногда несколько процентов. Такая низкая эффективность клонообразования в контроле вносит в расчеты значительную ошибку, так что наиболее точные данные о радиочувствительности получены для клеток из установившихся клеточных линий, почти все из которых имеют опухолевое происхождение. Дело в том, что неограниченно долго *in vitro* удастся выращивать только клетки, подвергшиеся злокачественной трансформации, при которой

происходит их иммортализация (приобретение способности к неограниченному размножению), а клетки здоровых тканей человека культивируют ограниченное время. Правда, методами генной инженерии уже созданы иммортализованные линии нормальных клеток человека.

Иногда для сравнения радиочувствительности большого числа разных видов клеток используют сокращенный тест, определяющий клонообразующую способность при облучении в одной дозе — 2 Гр, соответствующей разовой дозе «стандартного» курса лучевой терапии. Выживаемость после облучения в такой дозе обозначают как $SF_{2гр}$, или просто SF_2 .

Хотя при использовании теста на клоногенную активность клетки делятся всего на две категории — сохранившие и утратившие этот потенциал, реальная картина богата полутонами. Если колонии, образуемые необлученными клетками, растут с одинаковой скоростью, то колонии, выросшие при делении облученных клеток, варьируют по размеру, причем с ростом дозы вариабельность увеличивается. Медленный рост колоний в основном определяется постоянной, из поколения в поколение, гибелью части вновь образующихся клеток, о чем говорилось в предыдущем разделе. Имеются данные, что повышенная вероятность гибели сохраняется в течение 30 делений потомков облученной клетки.

Такой характер роста облученных клеток имеет разные следствия применительно к опухоли и нормальным тканям. Что касается влияния облучения на опухоли, то тест дает четкий ответ на вопрос о том, насколько уменьшилась фракция клоногенных клеток после того или иного воздействия. Ситуация более сложная в отношении нормальных тканей — клоногенный потенциал «выживших» клеток варьирует от одной клетки к другой, т. е. не все клоногенные клетки могут считаться равными контрольным по своим свойствам, и их остаточное поражение, определенная «дефектность», могут сохраняться в течение длительных сроков.

В 1961 г. канадские ученые Дж. Тилл и Е. Мак-Куллох предложили метод определения радиочувствительности стволовых клеток гемопоэтической ткани. Они ввели клетки костного мозга в хвостовую вену летально облученным мышам-реципиентам, у которых через неделю на селезенке появились видимые невооруженным глазом колонии, состоящие из потомков введенных клеток.

Путем сравнения числа колоний, образующихся при введении клеток от облученных в разных дозах и интактных мышей, ими были получены типичные кривые выживания.

Этот метод, получивший название экзокOLONиального теста, широко используют и в настоящее время для оценки радиочувствительности гемопоэтических клеток донора. Радиочувствительность собственных стволовых гемопоэтических клеток оценивают с помощью эндоКОЛОНИАЛЬНОГО теста — путем подсчета числа колоний, образующихся на селезенке на 8–10-й день после облучения из мигрирующих туда клеток костного мозга самого облученного животного. Рост клеток в селезенке обеспечивается утерей ее собственной клеточной популяции.

К настоящему времени разработаны методы оценки количества выживающих клоногенных клеток кожи и тонкого кишечника, хряща, яичек, почечных канальцев, молочной и щитовидной желез.

2.4. Радиационно-индуцированный апоптоз и некроз

Остановимся теперь на характере гибели клеток, проявляющейся в снижении их клоногенного потенциала. Ее принято подразделять на два вида — апоптоз и некроз.

Апоптоз, при наблюдении за клетками в культуре с помощью фазоконтрастной оптики проявляется в виде нескольких последовательных стадий: ошаривании клетки, выпячивании из этого шара участков цитоплазмы, так называемых блебов (пузырей), их полном исчезновении, прекращении движения цитоплазмы, изменении светопреломления и распаде клетки на «апоптотические тельца». Апоптотические тельца представляют небольшие сферические образования, окруженные остатками клеточной мембраны и содержащие фрагменты ДНК, а также интактные клеточные органеллы. Апоптотические тельца *in vitro* полностью распадаются, а *in vivo* утилизируются окружающими клетками, а также макрофагами.

Очень четко развитие апоптоза проявляется при наблюдении за клетками, окрашенными двумя флюоресцентными красителями ДНК, один из которых всегда легко проникает через клеточную мембрану (краситель Hoechst 33324, имеющий синюю флюоресценцию), а второй доходит до ДНК только после нарушения целостности клеточной оболочки (пропидий йодид,

флюоресцирующий в красной области спектра). До начала апоптоза ядро имеет равномерную синюю окраску, указывающую на равномерное распределение ДНК по его объему; с началом апоптотического процесса наблюдается конденсация ядерного материала в синие глыбки хроматина, цвет которых затем меняется с синего на розовый вследствие нарушения целостности мембраны и поступления в клетку йодида пропидия. Изменение цвета сопровождается возрастанием общей флюоресценции глыбок из-за присоединения к ДНК сразу обоих красителей. Далее происходит распад клетки на апоптотические тельца, в которых видна яркая флюоресценция ДНК.

Гибель клеток по некротическому пути начинается с увеличения объема клетки и разрыва клеточной мембраны. Ядро клетки сразу окрашивается йодидом пропидия. Разрыв мембраны происходит без ошаривания клетки. Предполагается, что именно рано наступающее нарушение целостности клеточной мембраны приводит к выходу цитоплазматического материала во внеклеточное пространство, из-за которого в организме развивается воспалительная реакция (напомним, что апоптотическая гибель клеток не сопровождается воспалением).

Клетки могут значительно различаться по времени гибели после облучения. Лимфоциты периферической крови, а также некоторые (но не все) клетки лимфоидного происхождения погибают в первые часы после облучения, не доходя до деления. Большинство других клеток погибает в течение нескольких дней после облучения, при этом некоторые из них проходят несколько делений, так что погибают «внуки», «правнуки» и т.д. облученной клетки.

Ранее было принято подразделять гибель клетки на два варианта — интерфазную, под которой понимали гибель клетки в интерфазе до вступления ее в первый постлучевой митоз, и репродуктивную, происходящую в момент деления. Интерфазную гибель связывали с особо высокой радиочувствительностью клеток, которая свойственна клеткам лимфоидного происхождения. Считалось, что по репродуктивному механизму погибают клетки иного происхождения. В последующем интерфазную гибель до вступления клетки в первый митоз стали связывать уже не только с временным фактором, но и с определенным механизмом гибели, а именно с апоптозом. Репродуктивную гибель связывали с некротическим путем развития лучевого поражения,

обусловленным утратой генетического материала в процессе деления клетки.

Однако сейчас уже ясно, что гибель клеток практически всегда происходит в интерфазе, но не только перед первым постлучевым делением, но в интерфазе после второго и последующих делений.

Причем клетки погибают в интерфазе как по апоптотическому, так и по некротическому пути. Таким образом, в современном понимании вопроса ранее широко употребляемые термины «репродуктивной и интерфазной гибели» практически утратили свой первоначальный смысл, поэтому в последующих главах термин «интерфазная гибель» будет означать гибель клеток в первые часы после облучения.

Гибели клеток предшествуют различные изменения в их поведении, одним из которых является появление гигантских клеток, в качестве критерия образования которых некоторые авторы установили 15-кратное увеличение занимаемой клеткой площади подложки (ясно, что этот критерий выбран произвольно). Во многих клеточных культурах всегда присутствуют гигантские клетки, но их число обычно не превышает 1–2 %, в то время как после облучения оно возрастает в несколько раз. Различают два пути образования гигантских клеток — увеличением массы неделящейся клетки, в том числе происходящем при делении ядер без деления самой клетки, но чаще путем слияния потомков только что разделившейся клетки. У облученных клеток бывает не только два, но и большее число «потомков» — у них нередко происходит мультиполярное деление, когда клетка делится на три и большее число частей.

Клетки линии EJ30, облученные в дозе 6 Гр, показали, что их гибель проходит в основном по некротическому пути. Показателем этого служит разрыв клеточной мембраны с последующим выходом содержимого клетки наружу. Гибель и распад клетки наступает как в первой интерфазе после облучения, так и при прохождении интерфаз между всеми 10 последующими делениями клеток. Гибели часто предшествует образование гигантских клеток — как за счет деления ядер без деления клетки, продолжавшей увеличивать свою массу, так и путем обратного слияния дочерних клеток. Среди потомков 231 облученной клетки сформировалось 105 гигантских клеток, более чем десятикратно превосходящих по занимаемой площади необлученные

клетки. Наиболее быстро, в течение прохождения первого и второго генерационного циклов, погибали клетки, облученные через 9–12 ч после митоза, когда они находились в середине S-периода. Отсутствие гибели по апоптотическому пути может быть связано с мутацией у этих клеток TP53, из-за чего утеряна активность белка TP53, участвующего в запуске этого процесса. Часть облученных клеток и их потомков погибала после входа в митоз.

Иная картина наблюдалась при облучении мышинных клеток лимфоидного происхождения линий ST4 и L5178Y-S и клеток лимфобластного лейкоза человека линии MOLT-4. Для этих клеток была характерна гибель по апоптотическому пути. Клетки линии ST4 после облучения в дозе 2,5 и 4 Гр погибали в первые часы после облучения рис. 1.1а. Уже через после облучения клетки прекращали менять свою форму, а на мембранах появлялись блебы, исчезавшие через 20 мин, после чего клетки ошаривались и без признаков жизнедеятельности, только слегка увеличиваясь в объеме, находились последующие 2–4 ч. затем происходил распад, который, однако, у этих клеток проходил сразу, без образования апоптотических тел. Весь процесс от вхождения клетки в апоптоз до ее полного распада занимал менее 10 ч. При снижении дозы до 1 Гр в интерфазе погибало 90 % клеток, а гибель потомков большинства оставшихся клеток проходила в разные сроки уже после первого митоза, но с точно такой же картиной апоптоза. Обратим внимание, что апоптотические тела у этих клеток не образовывались.

Клетки L5178Y-S и MOLT-4 демонстрируют иной характер гибели — после облучения в дозе 4 Гр в интерфазе, до наступления митоза, погибло 3 % клеток L5178Y-S и 24 % клеток MOLT-4. Остальные клетки погибли после митоза, в подавляющем большинстве в сроки до 60 ч после воздействия. В основном гибель наступала через 18–30 ч, во время первого или второго митоза (генерационный цикл у этих клеток, как было сказано в главе 7.1, составляет соответственно 7 и 9,5 ч). Гибели часто предшествовал удлинённый период G2, во время которого клетка вдвое перерастала по величине обычную премитотическую клетку. Затем следовал мультиполярный митоз или простое деление, приводившие к образованию сразу трех-четырех клеток, которые быстро сливались в одну. Образовавшиеся многоядерные клетки проходили несколько раундов блеббинга

клеточной мембраны, а также фрагментации на несколько клеток с их последующим воссоединением, после чего следовало формирование апоптотических телец и окончательный распад. Авторы исследования определили такую динамику гибели, как *поздний интерфазный и поздний митотический апоптоз*.

Динамика гибели клеток линии L5178Y-S не изменилась после повышения дозы до 10 Гр, что подтверждает строго детерминированный характер процесса апоптоза в клетках каждого вида. Отметим, что при столь разной динамике и картине гибели клеток трех линий их радиочувствительность, оцениваемая по способности образовывать макроколонии, была практически одинакова: D_0 равнялась 0,49 Гр для ST4, 0,66 Гр для L5178Y-S и 0,59 Гр для клеток MOLT-4.

Относительно различий в динамике гибели клеток высказывается предположение, что гибель в первые часы после облучения обусловлена более активной работой сигнальной системы включения апоптоза в ответ на нерепарированные двойные разрывы ДНК, в то время как более поздняя гибель связана с обнаружением нарушений строения хромосом в периоде G, а гибель в митозе — с хромосомными аберрациями. У клеток ST4, характеризующихся быстрой гибелью, имеется нормальный («дикого типа», не мутантный) ген *Trp53*, продукт которого, белок Trp53, успешно контролирует рост и дифференцировку клеток. У двух других клеточных линий белок Trp53 либо мутантен, либо у них одновременно присутствует белок мутантного и дикого типов, что и может быть причиной отсутствия быстрого реагирования клеток на повреждение ДНК.

Аналогичную картину гибели клеток по апоптотическому пути наблюдали Х. Форрестер и другие при изучении эмбриональных крысиных фибробластов, иммортализованных трансфекцией (искусственным введением в геном) онкогена *c-Myc*. Более 95 % этих клеток после облучения в дозе 4 Гр погибали по апоптотическому пути. Гибель клеток, попавших под облучение в середине и второй половине S-периода наступала до первого деления, в то время как клетки, облученные в других фазах цикла, до момента гибели проходили от одного до шести делений. В итоге апоптоз наступал в сроки от 2 до 150 ч после последнего деления клетки. От момента ошаривания клетки до ее распада могло пройти значительное время, от 5 до 40 ч.

Облучение в дозе 9,5 Гр приводило к более быстрой гибели клеток. Интересно, что после трансфекции геном *Ras* 40 % клеток погибало по апоптотическому пути, а 60 % клеток прекращало деление, но не погибало в течение, по меньшей мере, шести суток. В качестве примера еще более длительного переживания облученных клеток можно привести и собственные наблюдения за клетками меланомы мышей линии В-16, подвергнутых облучению в дозе 100 Гр. Хотя облучение в столь высокой дозе приводило к полному прекращению деления после прохождения нескольких митозов, еще и через три месяца после облучения в культуральном сосуде сохраняется большое количество клеток, хотя и сильно изменивших свой вид.

Отметим, что эти клетки нельзя назвать сохранившимися «жизнеспособность», так как в радиобиологии этот термин «зарезервирован» для клеток, сохранивших «клоногенность», т. е. способность дорастать до видимых глазом колоний, что свидетельствует об их значительном пролиферативном потенциале.

2.5. «Эффект свидетеля»

Коммунальный эффект, также называемый «эффектом свидетеля» (по англ. *bystander effect*), заключается в поражении клеток, находящихся вне зоны воздействия радиации, но контактирующих тем или иным способом с облучаемыми клетками. При этом имеется в виду как непосредственный контакт облученных и необлученных клеток, так и их нахождение в одном и том же культуральном сосуде, а в ряде случаев — и контакт необлученных клеток со средой, в которой другие клетки подвергались облучению.

Феноменология «опосредованного» действия излучений изучается в опытах двух видов: исторически первыми были эксперименты по цитотоксическому действию биологических жидкостей, в которых происходило облучение клеток, на интактные объекты.

В последние годы наибольший интерес вызывают технически сложные эксперименты по локальному облучению отдельных клеток в культуре или даже отдельно цитоплазмы и ядра отдельных клеток с регистрацией различных форм цитотоксического эффекта у окружающих интактных клеток. Таким образом, коммунальный эффект наблюдается как *in vitro*, так и *in vivo*.

Еще в 1954 г. В.Б. Парсонс и соавторы сообщили об индукции хромосомных aberrаций в клетках костного мозга грудины у детей, которым производили облучение селезенки по поводу хронического гранулоцитарного лейкоза. В 1967 г. Дж. Г. Холловей и Л.П. Литтлфилд описали индукцию хромосомных aberrаций в лимфоцитах, культивируемых на среде с плазмой крови, взятой у больных, прошедших часть курса противоопухолевой лучевой терапии. Образование в крови облученных людей и экспериментальных животных неких факторов, вызывающих такие же эффекты, как и прямое облучение, в последующем было подтверждено в нескольких исследованиях. В работах И. Эмерита с соавторами 1985–1995 гг. было показано, что эти кластрогенные факторы имеют небольшой молекулярный вес — от 1000 до 10 000 дальтон и что в их возникновении играет роль оксидативный стресс и перекисное окисление липидов. На участие высокоактивных производных кислорода указывает снижение эффекта при введении в среду антиоксидантов и диметилсульфоксида, перехватчика радикалов.

В работах 2000–2003 гг. С. Мотерсилл, С.Б. Сеймур и их сотрудники продемонстрировали, что при облучении культуры клеток или эксплантата ткани в широком диапазоне доз — от 1 сГр до 5 Гр, в культуральную среду выделяются термолабильные, но устойчивые к замораживанию факторы (скорее всего, белковой природы), которые вызывают гибель интактных клеток, длительное снижение их клоногенного потенциала, а на молекулярном уровне — быстрое изменение проницаемости клеточной мембраны для кальция с последующим изменением проницаемости митохондриальных мембран и образованием высокореактивных соединений кислорода. При изучении продукции этого фактора облученным в культуре эпителием мочевого пузыря, взятого от различных больных, выяснилось, что эпителий от одних больных его продуцирует, а эпителий от других больных — нет.

Остановимся теперь на исследованиях, в которых в клеточных культурах облучали отдельные клетки или их отдельные структуры и наблюдали эффект в соседних «клетках-свидетелях». Начало исследованиям положили Х. Насагава и Дж.Б. Литтл, которые в 1992 г. изучили индукцию сестринских обменов хроматид в клетках китайского хомячка линии СНО при низкоинтенсивном облучении α -частицами. Авторы обнаружили

сестринские обмены у 30 % клеток после облучения культуры в дозе 0,31 мГр, при которой α -частицы попадают не более чем в 1 % клеток. Изучение обнаруженного эффекта другими авторами показало, что сигнальные вещества формируются с участием оксидативного стресса, а для проявления эффекта важен межклеточный контакт. Необходимость непосредственного контакта облученных и необлученных клеток трудно увязать с данными исследователей, показавших переход и длительное сохранение этих факторов в бесклеточной питательной среде. Это свидетельствует о том, что вопрос о механизме опосредованного действия ионизирующих излучений находится в стадии начального изучения. Данный вопрос представляет большой интерес и с позиций определения роли этого удивительного явления в определении результатов обычных опытов с облучением клеток: погибают ли клетки только вследствие выделения в них самих энергии излучения или их поражение дополнительно усиливается за счет «коммунального» эффекта лучевого воздействия.

Один из подходов к изучению механизма явления — локальное облучение отдельных клеток или их участков площадью в несколько микрон микропучками заряженных частиц. В этих опытах для облучения используются ускоренные ядра гелия $^3\text{He}^{2+}$ или протоны, а также характеристическое (мягкое) рентгеновское излучение. Облучение производят через коллиматоры, к которым с помощью компьютеризованного столика микроскопа подводятся клетки, выращиваемые в специальных тонкостенных чашках Петри. Аппаратура дает возможность локального облучения десятков тысяч клеток в час в заранее заданной дозе, например, избранным числом α -частиц, протонов или квантов рентгеновских лучей. Показательны эксперименты, проведенные Б.Д. Михаэлом (2003) в Греевской лаборатории с облучением клеток китайского хомячка микропучками рентгеновских лучей (рис. 7). В чашку Петри высевали по 150 клеток, из которых облучали либо одну, либо пять, либо каждую из 150 клеток, а потом определяли способность клеток к образованию колоний. Общее число фотонов, получаемое клетками в чашке, всегда было одинаковым, независимо от того, пришлось ли они на одну, пять или на все 150 клеток. Приведенные на рисунке кривые выживаемости проведены с использованием α, β -модели, включающей поправку на включение малыми дозами радиации про-

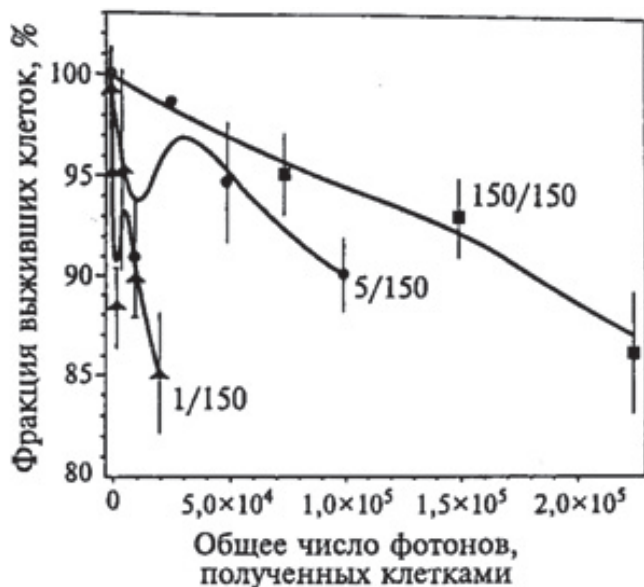


Рис. 7. Коммунальный эффект при облучении клеток китайского хомячка линии V-79 рентгеновским характеристическим излучением углерода, имеющим энергию 0,28 кэВ (по Б.Д. Михаелю, 2003)

цессов клеточной репарации (за спадом выживаемости следует подъем при повышении дозы), и около кривых стоят значки, показывающие, какое количество клеток подверглось облучению. Полученные данные показывают, что наиболее сильное падение клонообразующей способности всех находившихся в чашке клеток произошло в случае, когда облучению подверглась только одна из них (нижняя кривая); эффект облучения был существенно менее выражен (т. е. кривая выживаемости располагалась выше) в случае, когда то же самое количество квантов радиации было равномерно распределено между всеми находившимися в чашке клетками. Гибель необлученных клеток в основном происходила в G_2 , — фазе цикла, независимо от того, облучали ли клетки в фазе G_1 , или G_2 .

В предыдущих опытах, проведенных в той же лаборатории, было показано, что воздействие двадцатью протонами на одну примерно из 200 клеток китайского хомячка, находившихся в

чашке Петри площадью 70 мм², приводит к гибели в среднем 14 не-облученных клеток, в то время как облучение в такой же дозе, т. е. 20 протонами, каждой из имеющихся в чашке клеток приводит к гибели всего 40 из 200 клеток. В аналогичных исследованиях выявлен также повышенный уровень мутирования в клетках, находившихся рядом с клетками, подвергшимися локальному воздействию альфа-частиц или рентгеновских лучей. На клетках глиомы человека линии *TG89G* показано уменьшение выживаемости при их помещении в среду, взятую от этих клеток, подвергнутых облучению в другой культуральной посуде. Отметим, что на клеточных культурах коммунальный эффект снижения выживаемости столь ярко проявляется только в области малых доз радиации, когда общее падение клоногенной активности не спускается ниже 89 % от контрольных значений.

В качестве следующего примера коммунального эффекта можно привести результаты опытов О.В. Белякова и др., проведенных *in vitro*, но уже не на клеточной, а на тканевой системе. Авторы подвергали облучению α -частицами эксплантаты мочеточников свиньи. При использовании 10 α -частиц на пути их пробега, согласно расчету, в среднем оказывались всего четыре клеточных ядра (остальные частицы проходили только через цитоплазму). Последующее обследование эксплантата методом двухфотонного зондирования выявило 8 тыс. клеток с признаками лучевого поражения.

При исследовании коммунального эффекта на разных тканевых системах было обнаружено, что большую роль играет тип и облучаемых клеток, и клеток «рецепторов», воспринимающих сигнал. Таким образом, эффект может проявляться на одних тканевых системах и полностью отсутствовать на других.

В качестве разновидности коммунального эффекта сейчас рассматриваются и многочисленные данные о существовании опосредованного (дистанционного) эффекта радиации, проявляющегося на уровне целого организма в виде поражения тканей, находящихся на значительном расстоянии от облучаемого участка тела.

Пока не получено данных об увеличении интенсивности коммунального эффекта с ростом дозы облучения, что выделяет его из других радиобиологических эффектов, для которых характерно строгое соответствие величины эффекта дозе воздействия.

Изучение образования соединений, передающих сигнал об облучении на интактные клетки, и каскада биохимических реакций, возникающих в клетках в ответ на поступление такого сигнала, указывает на участие в этом процессе такого универсального передатчика сигналов, как окись азота — NO. При исследовании роли непосредственного межклеточного взаимодействия показано участие в осуществлении коммунального эффекта белка коннексина 43 — межклеточного передатчика сигналов. Введение антител к фактору некроза опухолей, а в среду также подавляет выраженность коммунального эффекта. Однако в целом механизм этого удивительного явления остается малоизученным.

2.6. Нестабильность генома

Еще одним проявлением лучевого поражения клетки является «генетическая нестабильность», под которой понимается длительное сохранение отклонений в строении и функционировании генетического аппарата, в конечном счете, ДНК-белкового комплекса. Впервые это явление было обнаружено как сохраняющаяся в течение 12–25 поколений повышенная (10^{-6}) частота трансформации мышинных клеток $C3H \cdot 10T^{1/2}$ после однократного рентгеновского облучения. При облучении клеток китайского хомячка линии *CHO* повышенный уровень мутагенеза выявлялся на протяжении минимум 30 генераций у 10 % клеток, переживших облучение. В облученных лимфоцитах повышенная частота хромосомных перестроек зарегистрирована после 10 делений.

Высокая частота хромосомных перестроек наблюдалась в потомках облученных клеток и *in vivo*, в клетках костного мозга мышей и в клетках эмбрионов после облучения зиготы мышей. В отдельных экспериментах генетическая нестабильность проявляется в возрастании числа точковых мутаций.

Механизмы индукции и поддержания генетической нестабильности не ясны. Имеются данные как о роли прямого поражения ДНК, так и о влиянии на генетическую нестабильность измененного клеточного метаболизма, хотя в этом случае не ясно, передаются ли эти изменения от клетки к клетке каким-то

цитоплазматическим фактором или существенную роль играют изменения генетической информации, записанной в ДНК.

Роль прямого поражения ДНК следует из экспериментов, в которых показано дополнительное возрастание генетической нестабильности в потомстве клеток, облученных в присутствии бромдезоксимуридина, который способствует увеличению числа радиационных нарушений именно в молекуле ДНК. Новым методом обнаружения нестабильности генома стало изучение вариабельности мини и макросателлитных последовательностей ДНК, характеризующихся высокой природной вариабельностью. А.И. Газиев и др. (2000) исследовали методом полимеразной цепной реакции с произвольно выбранным праймером ДНК, выделенную из ткани самцов мышей до облучения, и ДНК, выделенную из тканей их потомков первого поколения. Облучение отца в дозе 10 и 50 сГр при мощности дозы 1 сГр/мин привело к увеличению в ДНК потомства числа так называемых «неродительских полос» соответственно на 13 и 47 % по сравнению с тканями необлученных животных. Возрастание полиморфизма продуктов полимеразной цепной реакции рассматривается авторами как указание на возможность повышения у потомства облученных родителей числа точковых мутаций, хромосомных aberrаций и изменения характера генной экспрессии.

В качестве примера данных, указывающих на роль иных (помимо ДНК) структур в развитии генетической нестабильности, приведем результаты экспериментов, в которых участки цитоплазмы фибробластов человека локально облучали ускоренными ядрами гелия. При прохождении через участок цитоплазмы четырех ядер, что практически не сказывалось на жизнеспособности клеток, у части их потомков наблюдалось образование микроядер (следствие фрагментации ДНК) на протяжении 40 поколений.

При облучении в такой же дозе только ядра образование микроядер в трех первых поколениях было более частым, чем после облучения цитоплазмы, но эффект быстро снижался и через несколько поколений становился менее выраженным, чем после облучения участка цитоплазмы. В экспериментах с облучением цитоплазмы гибридных клеток человека и хомячка всего пятью ускоренными ядрами гелия наблюдалось тройное увеличение частоты мутаций в локусе *CD59 (SI)*. Введение в среду перехват-

чиков радикалов и угнетение синтеза внутриклеточного глутатиона резко снижало частоту мутаций, что интерпретируется как указание на участие в этом процессе реактивных продуктов кислорода.

Интересно, что облучение цитоплазмы приводило в основном к возрастанию числа точковых мутаций, которые характерны для спонтанного мутагенеза, а локальное облучение ядра увеличивало частоту хромосомных перестроек. Вероятно, итоговый эффект длительной нестабильности генома после облучения является результирующим непосредственного поражения генома самим излучением и дополнительного поражения продуктами измененного клеточного метаболизма. На такую возможность указывает увеличение количества высокореакционноспособных продуктов кислорода у 80 поколений клеток *GM10115*, мутантных по белку p53. У этих клеток изменение метаболизма коррелировало с повышенной по сравнению с контрольными культурами некротической и апоптотической гибелью, которая, однако, не была связана с активностью p53.

3. ЛУЧЕВЫЕ РЕАКЦИИ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Особенности лучевого поражения многоклеточного организма определяются двумя факторами: а) радиочувствительностью тканей, органов и систем, непосредственно подвергшихся облучению; б) величиной поглощенной дозы излучения и ее распределением в пространстве и во времени.

При лучевом воздействии не все клетки поражаются в равной степени, а тканевой эффект не равен сумме клеточных эффектов. Тем более нельзя рассматривать лучевые реакции органов и систем как совокупность клеточных реакций.

3.1. Радиационные синдромы

Острое облучение млекопитающего, в том числе и человека, может привести к возникновению у него острой лучевой болезни или местных лучевых травм. Характер и тяжесть лучевых повреждений зависит от вида излучения, величины поглощенной дозы и ее пространственного микрораспределения по организму, мощности дозы и длительности облучения.

В зависимости от пространственного распределения дозы по телу среди острых облучений различают общее (тотальное) облучение, при котором все участки организма получают соизмеримые дозы, и местное (локальное) облучение, при котором лучевому воздействию подвергается какая-либо ограниченная область тела, тогда как дозы на остальные участки организма существенно ниже.

Во всех случаях облучение организма проявляется в сокращении средней продолжительности жизни. При остром облучении с вероятным смертельным исходом говорят о продолжительности жизни после облучения. Зависимость средней продолжительности жизни экспериментальных животных от дозы при остром облучении являлась предметом тщательных исследований с момента возникновения радиобиологии и радиационной медицины.

Большинство видов млекопитающих не погибают при дозах 1–1,5 Гр; при дозах 1,5–2 Гр отдельные особи погибают на 20–30 сутки после облучения. По мере роста дозовых нагрузок вероятность гибели возрастает, а средняя продолжительность жизни уменьшается (наклонный участок кривой). При дозах 4–6 Гр гибель особей достигает 100 %, а средняя

продолжительность жизни сокращается. Дальнейшее увеличение дозовых нагрузок вызывает 100 % гибель экспериментальных животных, средняя продолжительность жизни при этом практически не меняется в диапазоне доз до 100–120 Гр (плато на кривой) и равна 4–6 суток. Резкое сокращение средней продолжительности жизни до 1–2 суток наблюдается при дозах 200–300 Гр. Дозы в несколько тысяч грей приводят к “гибели под лучом”.

Радиационная гибель млекопитающих, отражаемая каждым из участков кривой, обусловлена различными биологическими механизмами. На первом наклонном участке кривой в дозовом диапазоне 1,5–6 Гр причиной гибели является только поражение кроветворных органов, приводящее к резкому изменению состава крови. Гибель организма обусловлена ослаблением иммунитета, уменьшением числа тромбоцитов и связанными с этим многочисленными кровоизлияниями. На переходном участке кривой (6–8 Гр) и в области плато (8–100 Гр) все животные гибнут вследствие несовместимых с жизнью поражений органов пищеварения, прежде всего тонкого кишечника. Поражение кроветворных органов при этих дозах не менее тяжелое, но кроветворная форма ОЛБ развиться не успевает. Вследствие лучевого поражения эпителия тонкого кишечника нарушаются его барьерные функции, что вызывает проникновение в организм инфекции, диарею, последующее сгущение крови и коллапс. Любое из этих явлений может стать причиной гибели организма.

При еще более высоких уровнях облучения (второй наклонный участок кривой) происходит острое радиационное поражение центральной нервной системы. Гибель организма при таких дозах обусловлена прямым разрушением нервных клеток и нарушением кровообращения головного мозга.

В случае неравномерного по телу облучения гибель организма может быть обусловлена другими причинами. При общем преимущественном облучении кожи в дозах более 7 Гр слабопроникающим излучением, например, β -излучением от облака радиоактивных газов или аэрозолей, у человека может развиваться кожная форма острой лучевой болезни. Гибель организма в этом случае вызывается нарушением барьерной функции кожи, отравлением организма продуктами распада тканей, а также болевым синдромом.

При преимущественном облучении головы в дозах 50–70 Гр у животных возникает тяжелое поражение слизистых ротоглотки, приводящее к так называемому оральному синдрому. Гибель животных происходит вследствие невозможности принимать пищу и воду.

Таким образом, гибель животных после острого облучения происходит вследствие несовместимого с жизнью поражения какого-либо одного органа или ткани организма. Поражения других систем организма при этом либо не происходит, либо оно не успевает развиваться в такой мере, чтобы стать причиной гибели. Так, при радиационной гибели мелких лабораторных животных, происходящей на 14–30 сутки, обусловленной дозами, вызывающими кроветворный синдром, практически не происходит поражение тонкого кишечника, а тем более центральной нервной системы.

После доз излучения, приводящих к гибели организма на 4–14 сутки, когда причиной гибели является поражение тонкого кишечника, несовместимое с жизнью поражение кроветворных органов наступает на 10–15 сутки. Поэтому поражение кроветворных органов, отягощая общую картину острой лучевой болезни в кишечной форме, играет, тем не менее, второстепенную роль. То же происходит при синдроме центральной нервной системы, который успевает полностью развиваться и привести к гибели организма значительно раньше, чем мог бы развиваться кишечный и, тем более кроветворный синдром острой лучевой болезни.

Все это позволило выдвинуть концепцию критического органа. Для каждого диапазона доз острого облучения имеется свой жизненно важный орган (ткань), обладающий высокой радиочувствительностью, радиационное поражение которого вызывает гибель организма в сроки, в которые радиационное поражение других жизненно важных систем, если оно и произошло в рассматриваемом дозовом диапазоне, не успевает развиваться до опасных для организма стадий. Именно эти органы и ткани получили название критических. Под критическими органами понимают жизненно важные органы или системы, первыми выходящие из строя в исследуемом диапазоне доз, что обуславливает гибель организма в определенные сроки после облучения. Между средней продолжительностью жизни и величиной поглощенной дозы в организме существует строгая

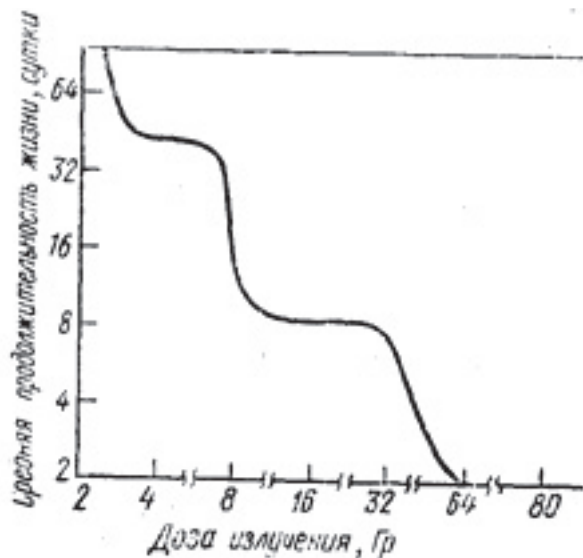


Рис. 8. Зависимость средней продолжительности жизни человека от дозы излучения (Ярмоненко, 1984)

зависимость, определяемая различиями в радиочувствительности отдельных жизненно важных (критических) систем (рис. 8).

Обозначенные участки кривой соответствуют основным клиническим синдромам — 1 — костномозговому (кровотворному); 2 — желудочно-кишечному; 3 — церебральному. Ступенчатый характер отмирания, связанный с выходом из строя критических систем, является общебиологической закономерностью и обнаружен в опытах на многих живых объектах. Разрыв между дозами, начинающими вызывать определенные формы гибели, указывает на разницу в радиочувствительности отдельных систем. Наличие плато на кривой свидетельствует о пороговости регистрируемого эффекта, поэтому несовместимое с жизнью повреждение той или иной системы наступает по достижении определенного уровня поражения. Области перегиба между отдельными плато соответствуют дозам, при которых возможны те и другие формы гибели.

При общем остром облучении в дозах 1,5–6 Гр критическими являются органы кроветворения, в дозовом диапазоне 10–100 Гр — эпителий тонкого кишечника, выше 100 Гр — центральная нервная система.

Целостный организм в норме постоянно находится в состоянии обновления, в ходе которого клетки, завершив свой жизненный цикл, замещаются новыми, образовавшимися в результате деления аналогичных или более молодых клеток, появившихся, в свою очередь, в результате деления клеток-предшественников. В норме в системах клеточного обновления наблюдается состояние устойчивого динамического равновесия между размножением, созреванием, функционированием и гибелью клеток.

Во взрослом организме некоторые системы, например, нервная система, состоят из клеток, уже не способных к размножению. Другие системы и органы (мышцы, скелет, печень, селезенка, капиллярная сеть сосудов) находятся в состоянии кажущегося покоя. При этом все их клетки зрелые, но могут спорадически или периодически стимулироваться к размножению, например, повреждением или разрушением части органа, естественной гибелью соседних клеток. Однако число дочерних поколений этих клеток ограничено. Клетки барьерных и защитных систем организма (эпителий кишечника, эпидермис кожи, слизистые ротоглотки и носа, клетки половых желез, кровь и кроветворные органы) обновляются постоянно и с большой скоростью. В широком диапазоне доз критическими органами оказываются именно быстро обновляющиеся ткани. Вредные для организма последствия острого облучения, возникновение острой лучевой болезни и вероятность гибели определяются в большинстве случаев радиационным поражением быстро обновляющихся систем.

Уже на ранних этапах развития радиобиологии (Бергонье и Трибондо) было установлено, что зрелые клетки даже обновляющихся систем радиорезистентны, и только очень большие дозы ионизирующих излучений способны ослабить их функциональные свойства и даже убить их. Лишь при дозах, приводящих к массовой гибели зрелых клеток, могут быть существенными поражения органов, состоящих из неделящихся клеток, например, головного мозга.

Таким образом, неудовлетворительная работа пораженного излучением органа или системы связана не столько с тем, что

после облучения не могут нормально работать или гибнут зрелые, функциональные клетки, но прежде всего с тем, что орган недостаточно снабжается функциональными клетками, что, в свою очередь, приводит к уменьшению их числа ниже уровня, необходимого для работы органа на время, которое может оказаться несовместимым с жизнью особи.

3.2. Кроветворная форма острой лучевой болезни

При кратковременном общем облучении организма человека и многих видов млекопитающих в дозе 1Гр и более развивается острое лучевое поражение. Через некоторое время после облучения (тем меньшее, чем больше доза) появляются первичные признаки поражения: потеря аппетита, покраснение кожи, общая слабость, головная боль, тошнота, рвота. Интенсивность этих симптомов (всех или части из них) периодически усиливается с частотой тем большей, чем больше доза, а затем прекращается. Наступает период мнимого благополучия, в течение которого самочувствие и работоспособность облученного близки к норме. Длительность этого латентного периода сокращается с ростом дозы, а при дозе, превышающей 10 Гр он вообще отсутствует, и первичная реакция непосредственно переходит в следующую стадию развития острой лучевой болезни — ее разгар. При дозах, не превышающих 3–6 Гр, а при лечении и до 10 Гр у человека сохраняется вероятность выжить. В этом случае наступает более или менее быстрое восстановление здоровья — полное или частичное. Вероятность выживания убывает с ростом дозы, а при дозах более 5–6 Гр она равна нулю.

В диапазоне доз до 6 Гр поражение организма и исход острой лучевой болезни определяются острым лучевым поражением органов кроветворения, в результате которого, а также вследствие лучевой гибели некоторых зрелых клеток через какое-то время после облучения (1–25 суток) резко изменяется число клеток крови. При больших дозах катастрофически уменьшается число лейкоцитов и тромбоцитов, что может привести к гибели.

Непосредственной причиной гибели чаще всего является инфекция, с которой организм не может справиться из-за плохого состояния периферической крови и угнетения иммунной системы, а также множественные кровоизлияния, возникающие вследствие подавления системы свертывания крови. Так

формируется и развивается кроветворная (гемопоэтическая или костномозговая) форма острой лучевой болезни. Ионизирующее излучение воздействует на клетки костного мозга и крови, повреждает их в соответствии с их радиопоражаемостью и вносит тем самым изменения в состав крови и в клеточную систему ее обновления. Сильнее всего поражаются делящиеся неспециализированные клетки из первых поколений системы клеточного обновления. Более радиорезистентны не столь часто делящиеся созревающие клетки костного мозга, зрелые же клетки крови отличаются высокой радиорезистентностью, особенно безъядерные (эритроциты и тромбоциты). Некоторую аномалию представляют собой зрелые лимфоциты, отдельные группы которых очень чувствительны к воздействию излучения. Однако, если принять во внимание способность этих клеток к интенсивному делению в процессе выполнения своих функций, их высокая радиочувствительность не будет выглядеть столь необычной.

Таким образом, острое облучение прежде всего наносит повреждения клеточным структурам красного костного мозга. Радиопоражаемость клеток различных линий различается незначительно, а их способность к репарации слабая (экстраполяционное число кривой доза-эффект практически равно 1).

В первые 1–3 ч после кратковременного облучения изменение клеточности красного костного мозга не успевает проявиться. Но уже через сутки после облучения в дозе 1–2 Гр в красном костном мозге остается 80–90 % начального числа клеток; при дозе 3–4 Гр — 70–75 %; 5–7 Гр — 4–50 % и более 8 Гр — 15–20 %. Оставшиеся клетки — это макрофаги, зрелые гранулоциты, клетки стромы и кровеносных сосудов. Погибшие клетки за 1–2 суток удаляются макрофагами.

Опустошение костного мозга начинается сразу же после облучения за счет: а) временного прекращения деления всех клеток, независимо от их дальнейшей судьбы; б) гибели малодифференцированных и делящихся клеток; в) неизменности продолжительности клеточного созревания и времени жизни зрелых клеток.

Наиболее кратковременно пребывание в красном костном мозге клеток эритроидного ростка, и поэтому он опустошается быстрее и интенсивнее, чем другие. Дольше всех в красном костном мозге созревают моноциты, и соответственно их росток подавляется в костном мозге в наименьшей степени.

В период опустошения в красном костном мозге наблюдаются клетки с видимыми нарушениями. Опустошенный костный мозг заполняется кровью. Уцелевшие от интерфазной гибели кроветворные клетки через несколько часов выходят из блокировки и начинают делиться. В результате через 4–6 сут даже после облучения в дозах, превышающих абсолютно смертельные, в уцелевших сайтах костного мозга обнаруживаются очаги регенерации, содержащие клетки разных ростков. Однако при больших уровнях облучения эти очаги могут впоследствии исчезнуть, так как они возникают из пораженных кроветворных клеток, способных к ограниченному числу делений.

Уцелевшие стволовые клетки после прекращения блокировки начинают интенсивно делиться. Ускорение восстановления пула стволовых клеток достигается также вовлечением в процесс размножения покоящихся клеток (находившихся в фазе G₀) и сокращением длительности клеточного цикла. Скорость созревания клеток при этом не меняется. В результате такого процесса восстановления в костном мозге появляются новые очаги регенерации. Время их появления зависит от дозы, но они возникают даже при дозах, превышающих минимальные абсолютно смертельные.

Действие ионизирующих излучений на циркулирующую кровь обусловлено поражением кроветворения, тогда как клетки крови относительно радиорезистентны. Блокирование кроветворения после облучения приводит к постепенному прекращению поступления новых клеток в делящийся и созревающий пул клеток ККМ. Естественная убыль зрелых форменных элементов из крови происходит в нормальном темпе и не компенсируется поступлением новых клеток.

Гибель человека от кроветворной формы ОЛБ чаще всего обусловлена развитием инфекций. Это объясняется тем, что гранулоциты (прежде всего нейтрофилы) производятся в ККМ в течение 5–13 суток, а живут в организме 1–2 суток. Прекращение поступления их в кровь, а из нее — в ткани тела приводит к быстрому опустошению организма. Тромбоциты производятся за 8–10 суток и столько же времени живут в организме. Поэтому поражение излучением тромбоцитарного ростка также существенно сказывается на числе пластинок в крови, хотя и не так резко, как на нейтрофилах. Эритроциты производятся за 2–7 суток, живут в крови 110–130 суток. Поэтому

прекращение продуцирования эритроцитов не скоро сказывается на формуле крови. Лимфоциты очень чувствительны к облучению ($D_0 = 0,2-0,3$ Гр) и быстро погибают интерфазно. Их образование идет с минимальной производительностью. Этим объясняется быстрое угнетение пула лимфоцитов после облучения и медленное восстановление его активности. Однако временный дефицит лимфоцитов обычно не сказывается решающим образом на судьбе организма.

Таким образом, для судеб облученного организма наибольшее значение в изменении состава крови имеет число нейтрофилов.

3.3. Кишечная форма острой лучевой болезни

При развитии желудочно-кишечного синдрома у млекопитающих наиболее важные изменения после облучения происходят в тонком кишечнике. Именно лучевое поражение тонкого кишечника определяет картину кишечной формы острой лучевой болезни. Под кишечной формой ОЛБ понимают такое острое лучевое поражение организма, при котором главные симптомы, тяжесть и исход поражения обусловлены лучевым поражением эпителия тонкого кишечника. В результате облучения происходит клеточное опустошение ворсинок и крипт кишечника, кинетика которого аналогична таковой для красного костного мозга, но имеет другие количественные характеристики.

На клеточном уровне с увеличением дозы облучения первыми поражаются отдельные клетки в нижней части крипты, погибающие через несколько часов даже после облучения в дозе порядка 0.1 Гр. Сразу же после облучения как неспецифическая реакция на раздражающий фактор возрастает ферментативная активность энтероцитов ворсинки и части клеток созревающего пула, хотя деление их блокируется. Блокированные клетки продолжают расти, увеличиваясь в размерах по сравнению с нормальными клетками. Длительность блокирования митозов зависит от дозы облучения. По окончании блокирования клетки снова вступают в цикл. Клетки, увеличившиеся в период блокирования митоза, либо погибают вследствие хромосомных aberrаций, либо образуют двухъядерные клетки. Наиболее чувствительны к воздействию излучения делящиеся клетки крипт. На тканевом уровне за время блокировки митозов с неизменной скоростью продолжают движение энтероцитов в вершине ворсинки

и их сращивание в просвет кишки. Убыль числа клеток не компенсируется пополнением из размножающегося пула, и число клеток на ворсинках уменьшается. За счет естественной убыли уменьшается и часть функциональных клеток на дне крипты, а часть клеток Панета гибнет под воздействием облучения.

Уход клеток с ворсинок частично компенсируется увеличением размера облученных клеток, крипта изменяет форму и ссыживается. Клеточность эпителия достигает минимума, после чего возрастает, приближаясь к нормальному клеточному уровню системы крипта-ворсинка. Если в результате облучения гибнут все стволовые клетки крипты, то подъема клеточности не происходит, и крипта гибнет. Ворсинки мало изменяются после облучения, если не считать первоначального повышения ферментативной активности энтероцитов. Однако вскоре после облучения ухудшается питание энтероцитов вследствие нарушений сосудистой сети: отечности, повышения проницаемости стенок, замедления тока крови. Когда на поверхность ворсинки начинают проступать дегенеративные клетки, то размеры ворсинки, клеточность ее эпителия уменьшаются — ворсинки уплощаются. Процесс уменьшения клеточности ворсинки идет с постоянной скоростью независимо от уровня облучения.

У измененных клеток ослаблена связь с базальной мембраной, наблюдаются зазоры между клетками, нарушается нормальное функционирование эпителия ворсинок. Энтероциты из всасывающих клеток превращаются в выделяющие. Продолжается только всасывание жиров, но они плохо продвигаются по цитоплазме клеток. Если деятельность крипт восстанавливается, то постепенно восстанавливается и эпителий ворсинок.

На уровне органа (тонкого кишечника) послелучевое изменение эпителия ворсинок, вызванное обращением функции энтероцитов из всасывающей в выделяющую, обуславливает нарушение барьерных функций эпителия тонкого кишечника. Из организма уходят вода, гидраты, электролиты и белки. Из-за ухудшения всасываемости в нижний отдел тонкого кишечника и в верхний отдел толстого кишечника поступают большие количества желчи измененного состава, что вызывает диарею.

Диарею, которую можно считать индикатором начала нарушения барьерной функции эпителия тонкого кишечника, начинается (у мышей) при снижении клеточности эпителия ворсинок примерно до 20 % исходного уровня.

На уровне организма лучевое поражение эпителия тонкого кишечника проявляет себя во многом подобно холере. Наблюдается длительный водянистый понос, вздутие кишечника. При общем остром облучении человека понос начинается на 5–6-е сутки, а смерть наступает на 7–14-е сутки, т.е. через 2–9 суток после начала поноса. Наряду с поражением эпителия тонкого кишечника наблюдается задержка пищи в желудке и резкое уменьшение числа лейкоцитов в крови.

Причиной гибели, несомненно, является нарушение барьерной функции эпителия тонкого кишечника, с которым организм не в состоянии справиться. В просвет кишки уходят вода, электролиты, белки. Теряется более половины объема плазмы крови и вследствие сгущения крови наблюдается коллапс, являющийся непосредственной причиной гибели организма.

Специфической особенностью кишечной формы острой лучевой болезни является то, что сроки гибели от нее при общем облучении организма слабо зависят от дозы в характерном для нее диапазоне. На дозовой зависимости средней продолжительности жизни многих млекопитающих наблюдается так называемое плато. Это объясняется тем, что начало нарушения барьерной функции эпителия тонкого кишечника слабо зависит от дозы и скорее носит пороговый характер, а с нарушением барьерной функции, продолжающемся более 2 суток, организм (при общем облучении) уже не в состоянии справиться.

Считается, что в случае острого лучевого поражения тонкого кишечника (без оказания квалифицированной медицинской помощи) гибель человека может наступить на 12–14 сутки после облучения.

Таким образом, острая лучевая болезнь в кишечной форме возникает в результате вызванного облучением нарушения барьерной функции эпителия тонкого кишечника и проявляется как следствие этого нарушения. Поражение эпителия тонкого кишечника определяется поражением стволовых клеток его крипт, которое, в свою очередь, определяется полученной ими дозой излучения. Нарушение барьерной функции эпителия тонкого кишечника возникает при замещении определенной части его поверхности дегенеративными энтероцитами при ее частичном оголении, т.е. при снижении клеточности эпителия ниже определенного предела. Тяжесть поражения организма определяется общими потерями через эпителий тонкого кишечника

жидкостей организма, т.е. тем, на какой части поверхности эпителия нарушена его барьерная функция и как долго.

В кишечной форме острой лучевой болезни выделяют следующие дозовые диапазоны: а) при равномерном облучении в дозах от 2–5 до 6–8 Гр радиационное поражение эпителия тонкого кишечника невелико и всегда может смениться его восстановлением; б) в диапазоне доз от 6–8 до 25–30 Гр при хорошем состоянии крови и иммунитета (только локальное облучение кишечника) поражение может

быть преодолено; в) в диапазоне доз более 25–30 Гр восстановление эпителия тонкого кишечника невозможно из-за гибели крипт; г) облучение даже небольшой части тонкого кишечника в дозе более 50–60 Гр определяет принципиально иную (токсическую) форму лучевого поражения, поскольку приводит к поражению стенки кишечника, ее прободению и несовместимо с жизнью.

3.4. Кожная форма острой лучевой болезни

Кожная форма острой лучевой болезни возникает при общем внешнем облучении человека в поле слабопроникающего излучения, создающего большие дозовые нагрузки в поверхностных тканях организма и значительно меньшие — во внутренних органах. Такие облучения возможны при попадании человека в радиоактивное облако высокоактивных газов и аэрозолей в случае радиационной аварии либо при такой аварии, во время которой человек окажется облит высокоактивной жидкостью. При вынужденном выходе космонавта в открытое космическое пространство в пределах радиационных поясов Земли или при солнечной вспышке ему также грозит облучение кожных покровов.

Кожная форма острой лучевой болезни не вполне вписывается в общепринятую классификацию острых облучений, так как, с одной стороны, она может возникнуть при облучении ограниченной области тела — его поверхности и, с другой стороны, является поражением организма и не может быть отнесена к локальной лучевой травме. Граница между острой лучевой болезнью и лучевой травмой в этом случае протекает в зависимости от распространенности поражения кожи и его тяжести.

Среди клеток кожи наибольшей радиопоражаемостью отличаются базальные клетки эпидермиса и клетки эндотелия сосудов

дермы. Созревающие и функциональные клетки эпидермиса, фибробласты и мышечные клетки дермы, клетки нервной ткани практически не повреждаются при дозах и в сроки, характерные для острого лучевого поражения кожи.

В эпидермисе как ткани продвижение созревающих и функциональных клеток к поверхности кожи и их потеря продолжают после облучения с прежней скоростью. Поступление новых клеток в базальный слой и из него — в слой шиповидных клеток прекращается на период блокирования делений базальных клеток. При дозах 15–25 Гр деление базальных клеток блокируется на 10–15 суток. Размножение базальных клеток в зависимости от дозы раньше или позже восстанавливается и даже ускоряется по сравнению с нормой. Если убыль базальных клеток не успевает своевременно скомпенсироваться, их число падает до нуля, эпидермис отслаивается и оголяется дерма.

Если базальные клетки эпидермиса, находящиеся в слое дермы, остались мало пораженными, то восстановление эпидермиса, как и при тепловых ожогах, происходит за счет этих клеток очагами по всей пораженной поверхности кожи в местах расположения придатков кожи. Восстановление погибших участков эпидермиса может произойти за счет наползания пласта с соседних непораженных участков ткани.

После облучения кожи в дерме как ткани при дозах больше 5–7 Гр возникает первичное покраснение (первичная эритема), являющееся сосудов и притока крови к коже. Истинная эритема — покраснение и воспаление кожи — при дозе на дерму порядка 12 Гр появляется через 10 суток, к 15-м суткам достигает максимума, на 20–30 сутки ослабевает, но может вновь разгореться даже через 2 месяца. Эта эритема также связана с усилением кровообращения в коже.

Д.П. Осанов показал, что, когда лучевому воздействию подвергается кожа по всей толщине, первичным процессом поражения оказывается потеря эпидермиса в сроки, зависящие от кинетики его клеточной популяции и не зависящие от дозы (если только она не выше пороговой — около 16 Гр). Если воздействовать только на дерму, оставляя неповрежденным эпидермис, то все равно развивается отек и омертвление кожи. Омертвление (из-за разрушения сосудистой сети) наступает тем раньше, чем больше доза.

Наиболее чувствительный признак облучения кожи как органа — появление уродливых волос. Если доза на луковицы превысит 3–5 Гр, волосы выпадают, но затем отрастают; выпадение становится необратимым при дозе более 7 Гр.

Тканевые эффекты облучения последовательно проявляются в коже как органе покраснением и отеком (эритемой); воспалением с усиленным шелушением или воспалением с образованием пузырей; образованием язв при оголении дермы и отмиранием кожи при глубоких поражениях дермы. Пороговая доза для появления эритемы 5–7 Гр. В диапазоне доз 8–15 Гр наблюдается шелушение, а при 15–25 Гр — влажное шелушение. Все эти эффекты лучевого поражения кожи наблюдаются при других — тепловых, световых и химических ожогах кожи.

При равномерном по глубине облучении кожи в дозах более 15 Гр пузыри образуются на 17-е сутки и проходят на 32–36-е сутки, если клеточность базального слоя восстанавливается. При дозах более 20 Гр с 50-х суток наблюдается повторное или продолжающееся повреждение, вызывающее образование язв и омертвление.

После облучения в дозе до 15 Гр кожа практически всегда восстанавливается, при 22 Гр она восстанавливается в 50 % случаев, при дозах больше 26 Гр — очень редко.

На уровне организма повреждение кожи вызывает кожную форму ОЛБ. Если площадь ожога не превышает 15 % площади кожи человека или 10 % при глубоких ожогах (с поражением дермы на всю глубину), то поражение относится к легким, в случае ожога на 15–20 % — к средним, 20–60 % (до 40 % при глубоких ожогах) — к тяжелым и при большей площади ожога — к крайне тяжелым.

Тяжесть поражения может быть спрогнозирована по индексу Франка (ИФ), который равен проценту площади кожи с поверхностным ожогом плюс утроенный процент с глубинным ожогом. При ИФ до 30 смертность $\leq 1\%$; от 30 до 60 — до 20 %; от 60 до 90 — около 50 %; при ИФ более 90 — до 100 %. Эта зависимость была получена для тепловых ожогов, а для радиационных поражений она неизвестна.

Кожная форма ОЛБ проявляется в виде ожогового шока и острого ожогового отравления организма с возможным осложнением из-за нагноения пораженных участков кожи. Ожоговый шок возникает вследствие чрезмерного раздражения

рецепторов кожи, массовой гибели клеток и разрушения сосудистой сети, что приводит к нарушению питания кожи и общему нарушению кровообращения в организме, расстройству обменных процессов и деятельности ряда жизненно важных органов. Уход жидкости из крови через нарушенную сосудистую сеть в межклеточное пространство вызывает сгущение крови и снижение артериального давления.

В легкой форме ожоговый шок возникает при ИФ менее 20–30 и проявляется в ознобе, бледности, дрожи, усиленном сердцебиении, тошноте. Тяжелый ожоговый шок развивается при ИФ не более 60 и проявляется в таких дополнительных симптомах как боли в обожженных участках кожи, учащенное дыхание, жажда и общее тяжелое состояние. При ИФ больше 60 возникает крайне тяжелый ожоговый шок, который, как правило, заканчивается гибелью пострадавшего. Острое ожоговое отравление происходит за счет продуктов распада погибших клеток и развития раневой инфекции. Оно проявляется в повышении температуры, изменении состава крови, мозговых нарушениях, быстром похудении и других признаках острого отравления. При глубоких ожогах нагноение ожоговых ран усугубляет поражение организма.

Таким образом, как и в случае кишечной формы ОЛБ, при кожной форме ОЛБ причиной гибели организма является утрата кожей барьерной функции. При поражении эпителия тонкого кишечника происходит утрата жидкостей организмом, что является решающей причиной гибели организма. При поражении кожи жидкая фракция кожи также уходит, но не из организма, а в межклеточные пространства ввиду разрушения микроциркуляционной сети. Эти нарушения возникают потому, что кожная форма ОЛБ проявляется при более высоких дозах, чем кишечная. Нарушение же барьерной функции эпидермиса приводит к инфекционному поражению обнаженных участков дермы, утяжеляющему поражение и являющемуся одной из важных причин гибели организма. В развитии ожогового шока существенную роль играет также поражение кожи как многофункционального органа чувств.

3.5. Другие формы острой лучевой болезни

Токсемическая форма ОЛБ вызывается массовой гибелью клеток многих тканей и подобна ожоговому отравлению; церебральная форма ОЛБ связана с гибелью клеток головного мозга и нарушением мозгового кровообращения. В обоих случаях речь идет о необновляющихся или медленно обновляющихся системах.

При развитии кроветворной, кишечной и кожной форм ОЛБ кроме ведущей при данной форме ткани — кроветворной, ЭТК, эпидермиса или дермы — страдают также другие ткани организма, что может утяжелять течение болезни. Среди органов и тканей с активно размножающимися клеточными популяциями можно отметить слизистые оболочки рта, глотки и носа.

Будучи интенсивно обновляющейся иерархической тканью (время обновления 0,5–2 недели), слизистые оболочки чувствительны к облучению. Особенно чувствительны они в местах расположения лимфатических узлов и различных желез. Уже при дозах 3–5 Гр, через несколько суток возникает боль в деснах и глотке, они опухают и воспаляются. Затем эти явления распространяются на другие слизистые; возникает кровоточивость, изъязвление и омертвление тканей (на 2-й неделе после облучения).

Таким образом, по радиопоражаемости слизистые оболочки близки к красному костному мозгу и именно поэтому их поражение является составной частью кроветворного синдрома ОЛБ. Наибольшая выраженность патологических явлений совпадает со временем разгара болезни (в конце 3-й недели после облучения), а восстановление опережает восстановление кроветворения, если последнее происходит.

Вместе с тем, поражение слизистых во многом подобно лучевому поражению кожи, хотя наблюдается при значительно меньших дозах и протекает быстрее. Из-за меньших значений дозы подлежащие ткани слизистых не страдают столь сильно, как при кожной форме ОЛБ, и поэтому язвы на слизистых заживают.

Итак, лучевое поражение слизистых оболочек рта, глотки и носа не является самостоятельной формой острой лучевой болезни, и либо участвует в кроветворном синдроме, утяжеляя течение болезни, либо представляет собой местное лучевое поражение при локальном облучении головы или верхней половины тела.

К органам с активно обновляющимися клеточными популяциями относятся семенники, в состав которых входит иерархического типа ткань, производящая сперматозоиды. Длительность сперматогенеза составляет 64 ч. Уже через несколько часов, начиная с дозы 0,1 Гр, погибают некоторые клетки — ранние предшественники сперматозоидов, что проявляется в уменьшении числа сперматозоидов через 1,5 мес. Такая отсроченность эффекта облучения связана с длительным периодом созревания сперматозоидов и относительной радиорезистентностью более зрелых клеток-предшественников, которые нечувствительны к дозам до 3 Гр.

Дозы больше 0.8 Гр уже приводят к исчезновению сперматозоидов из спермы и к временной стерильности через 4 мес после облучения. Дозы больше 4 Гр вызывают более быстрое снижение клеточности спермы, поскольку начинают поражаться более поздние клетки-предшественники, и стерильность наступает через 2 мес. При 6 Гр производство сперматозоидов еще может возобновиться спустя 1 год, а при больших дозах наступает полная стерильность.

Таким образом, по радиопоражаемости семенники близки к красному костному мозгу и могут повреждаться в диапазоне доз кроветворной формы ОЛБ. Так как система производства сперматозоидов характеризуется относительно медленным клеточным обновлением, эффекты лучевого поражения в ней являются в более поздние сроки, чем кроветворная форма ОЛБ.

Легкие часто оказываются критическим органом при лучевой терапии опухолей, локализованных в верхней половине торса человека, что затрудняет подведение необходимой дозы излучения к очагу заболевания. Облучение легких в дозах больше 8,5 Гр приводит через 1–3 мес. к воспалению, трудно поддающемуся излечению и часто оканчивающемуся гибелью через 3–7 мес. Для лучевого поражения легких СД50 оценивается как 9,5 Гр.

Причиной лучевого воспаления легких считают поражение клеток альвеол и эндотелия кровеносных сосудов. Поражение легких по срокам и интервалу поражающих доз лежит за пределами кроветворной формы ОЛБ, а по срокам — также и кишечной формы. Поэтому оно не комбинируется с указанными формами ОЛБ и существует только для специфических условий лучевой терапии и локальных лучевых поражений.

Клеточное обновление в легких и других органах и тканях с медленным размножением клеток не может играть заметной роли в уменьшении тяжести поражения, обусловленной облучением активно делящихся тканей, зато может усугубить тяжесть поражения таких тканей.

Реакция ЦНС на лучевое поражение характеризуется отсутствием клеточных потерь. Обусловлено это тем, что зрелая нервная ткань — непролиферирующая система, состоящая из высокодифференцированных клеток, замещение которых в течение жизни не происходит. Гибель клеток, приводящая к церебральному синдрому, происходит при огромных дозах. До сих пор не выяснено, является ли причиной гибели нервных клеток их непосредственное повреждение, или гибель происходит вследствие повреждения других систем, прежде всего кровеносных сосудов.

3.6. Некоторые клинические закономерности лучевой болезни человека

Характерной чертой острой лучевой болезни является волнообразность клинического течения. А.К. Гуськова и Г.Д. Байсоголов различают три периода в течении ОЛБ: 1) период формирования; 2) период восстановления и 3) период исходов и последствий. Период формирования ОЛБ в свою очередь можно разделить на 4 фазы: 1) фаза первичной острой реакции; 2) фаза кажущегося клинического благополучия (скрытая или латентная фаза); 3) фаза выраженных клинических проявлений (фаза разгара болезни); 4) фаза раннего восстановления.

ОЛБ различают по степени тяжести поражения — она возникает при облучении в дозах 1–10 Гр. При меньших дозах отмечают реакции со стороны отдельных систем. В диапазоне 1–10 Гр различают три степени тяжести ОЛБ:

ОЛБ I (легкой) степени — 1–2 Гр;

ОЛБ II (средней) степени — 2–4 Гр;

ОЛБ III (тяжелой) степени — 4–6 Гр.

Вероятность развития острой лучевой болезни той или иной степени тяжести при данной дозе облучения определяется индивидуальной радиочувствительностью организма. При дозах 1–6 Гр развивается ОЛБ по кроветворному синдрому. При дозах 6–10 Гр развивается переходная форма болезни, протекающая

как 3-я степень тяжести, но с поражением кишечника. При дозах 10–20 Гр возникает типичная форма ЖКТ, заканчивающаяся смертельным исходом через 8–16 сут. При дозах 20–80 Гр развиваются токсемические поражения. Смерть наступает на 4–7 суток при мозговой и менингитной симптоматике. Наконец, при дозах выше 80 Гр возникает церебральная форма поражения с коллапсом и судорогами, завершающаяся смертью на 1–3 суток.

При дозах 1–10 Гр развивается кроветворная форма ОЛБ, при которой наиболее четко проявляется периодизация клинических проявлений.

Фаза первичной острой реакции возникает довольно скоро (в первые минуты-часы) и проявляется во всех случаях облучения при дозах, превышающих 2 Гр. Появляется тошнота, рвота, усиливающаяся после приема жидкости, исчезает аппетит. Ощущается сухость и горечь во рту.

Пострадавшие испытывают чувство тяжести в голове, головную боль, общую слабость, сонливость. Продолжительность фазы 1–3 дня. Неблагоприятными в прогностическом отношении признаками, свидетельствующими о суммарной дозе ~ 10 Гр, являются: развитие шокоподобного состояния с падением артериального давления, кратковременная потеря сознания, понос. На участках кожи, подвергшихся облучению в дозах 6–10 Гр возникает преходящая гиперемия в виде загара.

Фаза кажущегося клинического благополучия проявляется через 2–4 дня после облучения. Симптомы первичной реакции исчезают, самочувствие больных улучшается или даже нормализуется. Продолжительность фазы 14–32 дня. При очень тяжелых поражениях (дозы > 10 Гр) эта фаза отсутствует. У больных отмечается выпадение волос и неврологическая симптоматика, которая постепенно сглаживается.

Фаза выраженных клинических проявлений обнаруживается к концу латентного периода. Самочувствие больных вновь резко ухудшается, нарастает слабость, повышается температура, увеличивается СОЭ. Возникает геморрагический синдром — кровоизлияния в кожу, слизистые оболочки, ЖКТ, мозг, сердце и легкие. Опасность кровотечений в жизненно важных органах, поддерживаемая тромбоцитопенией, и возникновение инфекционных осложнений из-за резкого и длительного (более 2 недель) агранулоцитоза составляет основную угрозу жизни больных в этот период. К концу фазы выявляется и начинает

прогрессировать анемия. Отражением нарушения обмена веществ и диспептических расстройств (потеря аппетита и поносы) является резкое снижение массы тела. Эта фаза продолжается от 1 до 3 недель и заканчивается либо смертью больного, либо переходит в фазу раннего восстановления.

Фаза раннего восстановления вначале характеризуется нормализацией температуры, улучшением самочувствия, появлением аппетита, восстановлением сна. Прекращается кровоточивость, исчезают или ослабевают диспептические расстройства. У больных быстро нарастает масса тела. Происходит постепенное восстановление показателей крови. Продолжительность фазы 2–2,5 месяца. К концу 3 месяца от начала заболевания обычно самочувствие становится вполне удовлетворительным, хотя отдельные проявления поражения еще имеют место — рост волос возобновляется только к 4-му месяцу, через 4–6 месяцев восстанавливается воспроизводительная способность.

Самостоятельной нозологической формой лучевого поражения является хроническая лучевая болезнь (ХЛБ), развивающаяся при продолжительном облучении организма в малых дозах. Своеобразие ХЛБ состоит в том, что в активно пролиферирующих тканях, благодаря интенсивным процессам клеточного обновления, длительное время сохраняется возможность морфологического восстановления тканевой организации. В то же время такие стабильные в клеточно-кинетическом отношении ткани, как нервная, сердечно-сосудистая и эндокринная, на хроническое лучевое воздействие отвечают сложным комплексом функциональных реакций и крайне медленным нарастанием дистрофических изменений, природа и радиобиологический механизм которых малоизучен. Выраженный синдром ХЛБ развивается при суммарных дозах 0,7–1 Гр при интенсивности 0.001–0.005 Гр/сут.

Различают 4 прогностические категории ОЛБ: а) выживание невозможно — если доза облучения основной массы тканей тела достигает 5–6 Гр (несмотря на медицинский уход и самую совершенную терапию); б) выживание возможно — при дозах 2–4,5 Гр при своевременном и квалифицированном лечении; в) выживание вполне вероятно — при дозах 1–2 Гр; г) выживание несомненно — при дозах менее 1 Гр.

3.7. Комбинированные и сочетанные радиационные поражения

Комбинированные радиационные поражения (КРП) представляют собой сочетание радиационных поражений с различными механическими повреждениями (ранениями, контузиями, переломами и др.) и ожогами.

Массовые КРП людей впервые были зарегистрированы при атомных бомбардировках японских городов Хиросима и Нагасаки в августе 1945 г. При этом было отмечено, что у лиц, находящихся от эпицентра взрыва на расстоянии до 2000 м, КРП имели место в 48–50 %, на расстоянии — 2000–5000 м — в 23–25 %. Источником загрязнения ран, ожоговых поверхностей и кожных покровов радиоактивными веществами могут явиться продукты ядерного взрыва. Они представляют определенную опасность только при наземном ядерном взрыве.

При КРП клиника и характер течения лучевой болезни существенно отличаются от чистых форм: травма изменяет течение лучевой болезни, ухудшает прогноз. Особенности патологического процесса при этих поражениях определяет синдром взаимного отягощения (синергический эффект), который имеет характерные клинические, гематологические и иммунологические особенности. Сумма взаимоотягощающих воздействий существенно меняет течение поражения. Установлено, что при КРП синдром взаимного отягощения проявляется укорочением латентного периода острой лучевой болезни, снижением естественной неспецифической сопротивляемости организма инфекционным процессам, более выраженной лейкопенией, нарушением заживления ран (растянутость первой фазы в течение раневого процесса), нарушениями свертывающей системы крови и возникновением вторичных кровотечений, появлением в более ранние сроки выраженной анемии. Степень выраженности синдрома взаимного отягощения зависит от дозы облучения, вида и тяжести сопутствующей травмы, в некоторой степени от индивидуальной резистентности организма и фактора времени. Она может в большей степени определяться тяжестью травмы и в меньшей — дозой облучения. Так, при комбинации легкой степени ожога или легкой травмы с сублетальной дозой облучения синдром взаимного отягощения слабо выражен или может отсутствовать. В то же время комбинация легкой степени

лучевой болезни с тяжелым механическим повреждением или глубоким и распространенным ожогом может сопровождаться выраженным синдромом взаимного отягощения. Имеет значение и фактор времени (промежуток времени между действием двух поражающих факторов), а также последовательность нанесения поражений. Так, рана, полученная до облучения, иногда не утяжеляет течение лучевой болезни. Высказывается предположение, что в этих случаях повышение устойчивости организма к облучению объясняется, с одной стороны, усиленным образованием в организме гистамина, с другой — реакцией со стороны надпочечников, благодаря которой возрастает неспецифическая сопротивляемость организма радиационному фактору. Отмеченная закономерность характерна только для относительно легкой механической травмы, которая не угнетает компенсаторные возможности организма. При получении раны после облучения синдром взаимного отягощения более выражен, характеризуется более медленным, чем обычно, заживлением ран и ожогов, повышенной летальностью.

Сочетанные радиационные поражения включают внешнее облучение ионизирующим излучением от источников, находящихся вне организма, и попадание радиоактивных веществ внутрь организма. Развивающаяся после сочетанного облучения лучевая болезнь протекает в более тяжелой форме. При этом имеют место признаки, характерные как для внешнего γ -облучения (эпидемия, геморрагический синдром, лейко- и лимфопения и др.), так и для внутреннего (радиационный катарально-геморрагический гастроэнтерит с язвенно-некротическими процессами в печени и других органах). Летальный исход среди пораженных животных выше, чем при соответствующих дозах только внешнего и внутреннего облучения. Например, внешнее γ -облучение овец в дозе 300 Р и внутреннее ежедневное поступление йода-131 в дозе 45,0 мкКи/кг массы в течение 30 дней по отдельности не вызывает гибели животных. Сочетанное же действие этих двух факторов сопровождается развитием у овец тяжелой формы ОЛБ с 40–50 %-ной гибелью в первые 2 мес поражения.

Первичные реакции при сочетанном облучении проявляются, как и при внешнем γ -облучении. В период мнимого благополучия отмечается неустойчивость пульса, сердцебиение, повышение артериального давления. Период разгара развивается в более ранние сроки и имеет более продолжительное течение. Наблю-

даются умеренные изменения морфологического состава периферической крови и развитие лейкопении, тромбоцитопении, анемии, опустошение костного мозга. Последнее связано с нарушением и угнетением клеточной пролиферации, уменьшением митозов, появлением патологических форм клеток. На коже и слизистых оболочках могут отмечаться множественные кровоизлияния, возможны кровотечения из носа, замедление свертываемости крови. Характерным является поражение щитовидной железы, ее дисфункция, что связано не только с местным поражением самой железы, но и с облучением других отделов нейроэндокринной регуляции (гипоталамуса, надпочечников и др.). Со стороны желудочно-кишечного тракта наблюдаются функциональные (поносы) и морфологические (множественные кровоизлияния, изъязвления на слизистой оболочке рта и желудка) изменения.

β -ожоги кожи при сочетанном поражении протекают тяжело. Восстановительный период проходит вяло, длительно сохраняются остаточные явления и неустойчивость функционального состояния отдельных органов и систем.

При сочетанном радиационном поражении в клиническом проявлении лучевой болезни преобладают изменения, характерные для превалирующего вида облучения. Следовательно, основным поражающим фактором сочетанного лучевого поражения на следе радиоактивного облака является общее внешнее γ -облучение. Однако попадание радиоактивных изотопов в организм в этих условиях необходимо учитывать при оценке состояния животных и прогнозировании исхода лучевых поражений.

3.8. Процессы восстановления в облученном организме

Восстановление организма после острого лучевого поражения в первом приближении можно свести к пролиферации клеток, сохранивших жизнеспособность, вследствие которой восполняется убыль популяции клеток критических органов и восстанавливается их функциональная активность. Процессы восстановления в организме человека и животных после облучения протекают с различной скоростью: наивысшей в активно пролиферирующих тканях и минимальной в тканях с низким уровнем физиологической регенерации.

Распространенным методом оценки пострадиационного восстановления организма является изучение его чувствительности к повторному облучению, производимому в разные сроки после первоначального радиационного воздействия. Этот метод и положенная в его основу теория восстановления организма впервые были предложены Г.А. Блэром (1955), а затем развиты Г.О. Дэвидсоном. В качестве меры чувствительности организма к моменту повторного облучения принимают величину ЛД_{50/30}. Эту дозу сравнивают с дозой, вызывающей тот же эффект при однократном облучении.

Согласно классической теории Блэра, пострадиационное восстановление протекает с постоянной скоростью (пропорционально величине поражения) по экспоненциальному закону. Это относится не ко всей величине начального поражения, а к определенной его части. Другая часть начального поражения существует в виде доли необратимого поражения, величина которой пропорциональна общей накопленной дозе.

В соответствии с этой теорией «чистое» поражение — эффективную дозу — можно выразить следующим выражением:

$$Dt = D[f + (1-f)e^{-\beta t}],$$

где f — необратимая часть поражения; $(1-f)$ — доля обратимого лучевого повреждения; β — скорость восстановления в сутки, %; t — количество суток; e — основание натурального логарифма.

Если повторное облучение и определение ЛД_{50/30} проводить через разные промежутки времени, то по разнице между величинами ЛД_{50/30} однократного и повторного облучений можно определить изменение во времени величины остаточного радиационного поражения (его необратимую компоненту), темп восстановления радиорезистентности организма и период полувосстановления организма — время, необходимое для восстановления организма от лучевого поражения на 50 %.

Период полувосстановления ($T_{1/2}$) практически является константой, как правило, увеличивающейся с продолжительностью жизни животного. По данным разных авторов, он равен 2–8 суток для мыши; 6–9 суток для крысы; 14–18 сут для собаки; 20–28 сут для осла. Для человека $T_{1/2}$ составляет 25–45 суток; за среднее принимают значение, равное 28 суткам при скорости восстановления ~ 0.1 % в час.

В общем виде концепция Блэра-Дэвидсона была подтверждена дальнейшими исследованиями радиобиологов. Вместе с тем, начали накапливаться факты, противоречащие ей. Прежде всего были получены данные об уменьшении радиочувствительности некоторых лабораторных животных к повторному облучению после предварительного нелетального облучения. В работах ряда авторов отмечалось, что не всегда удается зарегистрировать необратимую компоненту лучевого поражения. Период же полувосстановления, а, следовательно, и константа восстановления в уравнении Блэра, не являются постоянными величинами и зависят от дозы излучения.

Все эти данные послужили основой для критики концепции Блэра-Дэвидсона по следующим соображениям: а) при первом и повторном облучениях возможно несоответствие между временем протекания одних и тех же процессов; б) оценочные тесты при первом и повторном облучении могут оказаться несопоставимыми; в) принципиально невозможно равенство эффективности доз первого и второго облучения в любом их сочетании.

Все эти соображения не снижают ценности количественных принципов Блэра и свидетельствуют о необходимости внесения соответствующих корректив при построении и анализе конкретных экспериментов. При рассмотрении процессов пострадиационного восстановления организма необходимо выделить наиболее ответственное звено в цепочке развивающихся событий, поражение и восстановление которого поддается количественному учету. Самыми подходящими объектами в этом случае являются критические в данном диапазоне доз ткани и органы.

4. ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ

4.1. Общая характеристика отдаленных последствий

Одной из особенностей биологического действия различных видов ионизирующих излучений на организм является возникновение отдаленных последствий поражения.

МКРЗ принято представление о беспороговости основных эффектов облучения, а также возникновения отдаленных соматических и генетических последствий. Тем не менее, для некоторых видов отдаленных эффектов установлен весьма низкий уровень доз, которые с некоторой долей приближения могут считаться пороговыми. Отдаленные последствия лучевых поражений могут возникнуть как в результате однократного внешнего воздействия ионизирующего излучения или однократного поступления радиоактивных веществ, так и в результате хронического поступления радионуклидов в организм или облучения в малых дозах.

Некоторые авторы считают, что при воздействии малых доз излучений наблюдаются так называемые сверхлинейные эффекты. При действии ионизирующего излучения на клетки наблюдаются киллирующие (летальные) и мутагенные (канцерогенные эффекты); при этом чем выше доза, тем сильнее киллирующий эффект и тем меньше канцерогенный, и наоборот. С уменьшением дозы возрастает продолжительность жизни животных, что способствует развитию и проявлению опухолевой реакции, длительный латентный период которой при малой дозе коррелирует с естественной продолжительностью жизни.

С увеличением возраста меняется внутренняя среда организма как результат накопления «поломок» на разных структурных уровнях организма под действием различных экзогенных и эндогенных факторов. Изменения во внутренней среде могут способствовать развитию опухолей под влиянием малых доз ионизирующего излучения.

Сокращение продолжительности жизни — универсальный эффект облучения, характерный для организмов различных видов.

Отдалённые последствия облучения часто отождествляют с изменениями, происходящими при *естественном старении*. Этой точке зрения во многом способствует феноменологическое

сходство проявлений многих отдалённых последствий и старения: появление злокачественных опухолей, развитие катаракт, склерозирование сосудов, поседение, ослабление эластических свойств кожи и т. д. Так как в результате облучения продолжительность жизни сокращается и указанные изменения наступают в более раннем возрасте, то говорят об *ускоренном радиационном старении организма*.

Наряду с внешним сходством этих явлений имеются и различия. Хотя современная геронтология не имеет пока надежной теории причин старения организма, есть основания предположить, что формирование ведущих отдалённых последствий облучения (сокращение продолжительности жизни и канцерогенез) имеют если не единый механизм, то во многом являются следствием каких-то общих изменений. При рассмотрении вопросов пострадиационного восстановления отмечалась неполноценность многих восстановительных процессов, особенно ярко проявляющаяся в тканях с низким уровнем физиологической регенерации. Именно клетки этих тканей вследствие очень слабо протекающих процессов репарации как бы запоминают имевшее место радиационное воздействие, и их функциональная неполноценность легко выявляется в экспериментах. Если учесть, что организм млекопитающих состоит преимущественно из стабильных (в цитокINETическом отношении) органов, то можно предположить, что в течение длительного времени после облучения он представляет собой функционально неполноценную систему. Ярким следствием универсального характера функциональной неполноценности организма и является формирование такой интегральной реакции, как сокращение продолжительности жизни, которое можно рассматривать как проявление необратимой компоненты лучевого поражения.

Если для правильной интерпретации механизмов летального действия ионизирующего излучения на организм человека и животных решающее значение имеет изучение закономерностей гибели облучённых клеток, то для понимания отдалённых последствий облучения и, в частности, его влияния на продолжительность жизни — изучение тех клеток, которые выживают после облучения.

Существует две основные гипотезы, трактующие патогенез отдалённых эффектов. Согласно одной из них, отдалённые последствия, проявляющиеся через годы и десятилетия после воздействия излучений, объясняются в основном повреждением

кровеносных сосудов, дегенерацией клеток и тканей, развитием поздних фиброзов соединительной ткани. Другое направление предполагает, что разнообразные отдаленные эффекты, наблюдаемые в различных органах и тканях, можно объяснить нарушением клеточной кинетики. По этой гипотезе острые радиационные эффекты происходят рано в быстро делящихся тканях, а отдаленные эффекты проявляются поздно в медленно пролиферирующих или непролиферирующих тканях.

Все виды отдаленных последствий биологического действия ионизирующих излучений делят на опухолевые и неопухолевые формы.

4.2. Неопухолевые формы отдаленных последствий облучения

К неопухолевым формам относят различные патологические изменения организма, или отдельных органов функционального или органического характера.

Здесь относятся апластические и гипопластические состояния кроветворения, анемии, атрофические и гипопластические состояния ЖКТ, стерильность, различного рода склеротические процессы и дисгормональные нарушения.

Гипопластические состояния в кроветворной ткани, слизистых ЖКТ, половых органах возникают в хронической фазе лучевого поражения при кумуляции высоких поглощенных тканевых доз. В отдаленные сроки у экспериментальных животных отмечали достоверное снижение клеточных элементов костного мозга, снижение показателей крови до нижней границы нормы.

У человека гипопластическое состояние кроветворения при хроническом воздействии ионизирующего облучения формируется при кумуляции доз 1,5–4,0 Гр в условиях тотального облучения. Описаны случаи развития анемий у рентгенологов и радиологов через 10–15 лет после непрерывной работы в контакте с излучением или радиоактивными веществами. Изменения в сердечно-сосудистой системе характеризуются дегенеративными и склеротическими изменениями в сердечной мышце, отмечены также ожирения оболочки сосудов, отложения кальция в мышечной оболочке аорты, узелковый перикартериит.

Склеротические состояния развиваются после непосредственного воздействия ионизирующего излучения на паренхиматозные клетки и различные структуры тканей и органов.

При развитии этих эффектов наблюдается прямая дозовая зависимость, наличие пороговых уровней ионизирующего излучения, составляющих 1–5 Гр. Склеротические изменения характеризуются развитием пневмосклероза, цирроза печени, нефросклероза, артериосклероза, хроническими лучевыми дерматитами, поражением центральной нервной системы, некрозами костной ткани и лучевыми катарактами.

Показано, что циррозы печени возникают при инкорпорации гепатотропных изотопов, при поступлении значительных количеств равномерно распределяющихся α -излучателей. Лучевой нефросклероз, как правило, связан с непосредственным действием ионизирующего излучения от инкорпорированных радионуклидов, выводящихся через почки, на капилляры клубочков почек. Патология со стороны ЖКТ связана с поражением кишечника плохо резорбирующимися в ЖКТ изотопами. При этом иногда наблюдали склеротические изменения сосудов и атрофию лимфоидного аппарата кишечника. Развитие пневмосклероза происходит в отдаленные сроки после ингаляционного поступления плохо резорбирующихся в легкие радионуклидов. Поражения кожи типа хронических дерматитов и кератодермий отмечали через 4–12 лет у лиц после взрыва атомной бомбы в Хиросиме и Нагасаки.

Возникновение лучевых катаракт обычно связывают с прямым действием ионизирующего излучения, так как имеется линейная зависимость в кривой доза-эффект. Наибольшей катарактогенной активностью обладают нейтроны, ОБЭ которых по этому показателю в зависимости от энергии составляет от 4,5 до 9. Пороговые катарактогенные дозы для протонов с энергией 25–640 МэВ составляют 1–6 Гр, для внешнего β -облучения — 4,2 Гр.

Для дисгормональных нарушений характерным является отсутствие прямой дозовой зависимости и низкий уровень пороговой дозы. Пусковым механизмом для дисгормональных расстройств служит начальное лучевое угнетение, повреждение функции и структуры половых желез, щитовидной железы и надпочечников. Изменения наблюдаются во всех железах внутренней секреции. Однако степень их выраженности, тип изменений и частота зависят от дозы изотопа и пола животных. Более выраженные эндокринные нарушения возникают у самок.

В гипофизе у облученных самок уменьшается число ацидофильных клеток. В надпочечниках увеличивается количество

пигментных клеток. В щитовидной железе отмечается гиперфункция с гиперпластическими изменениями. К дисгормональным неопухолевым эффектам относится ожирение, а также частичная или полная стерильность.

4.3. Опухолевые формы отдаленных последствий облучения

К опухолевым формам отдаленной лучевой патологии относятся новообразования различных органов и тканей, лейкозы.

Возникновение опухолей различных органов и тканей во многом зависит от избирательной способности радионуклида депонироваться в том или ином органе. Так, остеотропные радионуклиды чаще вызывают опухоли костной ткани. Острота развития остеосарком снижается с уменьшением мощности дозы. α -Излучатели в этом отношении примерно в 10–20 раз эффективнее β -излучателей. Выход остеосарком существенно зависит от степени резорбции и пути введения радионуклида и практически не зависит от пола животного. Одной из основных причин образования костных опухолей является поражение костной ткани в результате воздействия излучения депонированного радиоактивного вещества. Прогрессивный рост опухоли начинается при подавлении иммунологического надзора. Средний латентный период развития остеосарком у человека составляет 30 лет. Этим объясняется увеличение частоты остеосарком с возрастом. Остеосаркомы чаще всего возникают в губчатой кости, редко на периостальных поверхностях, не возникают из клеток гаверсовых каналов и из остеоцитов внутри объема костной ткани.

При воздействии радионуклида в костной ткани возникают потенциально опухолевые клетки, которые длительное время могут находиться в дремлющем латентном состоянии. Клетки с выраженной пролиферативной потенцией наиболее часто превращаются в опухолевые.

Потенциально злокачественная клетка остается в дремлющем состоянии до тех пор, пока не получит стимул к делению. Такими стимулами могут быть внешние и внутренние факторы, в том числе и естественные процессы перестройки поверхности в данном участке кости. Механизм развития остеосарком зависит не только от прямого воздействия радионуклидов на костные клетки. В образование опухолевого клона вовлекаются

иммунные, нейроэндокринные механизмы. Важное значение в генезе остеосарком при отложении остеотропных радионуклидов имеют сосудистые нарушения. Минимальной остеосаркомогенной дозой для костной ткани человека считается 12 Гр.

Существенное место в патологии опухолевых форм занимают лейкозы. Описаны случаи развития лейкозов в отдаленные сроки поражения у людей и животных в результате воздействия внешнего облучения и инкорпорированных радионуклидов.

Показано, что радиоактивные вещества, обладающие смешанным типом излучения (β и γ), малой энергией и равномерно распределяющиеся, обладают большей лейкомогенной активностью, чем радионуклиды с избирательным накоплением в отдельных органах. Форма лейкозов во многом зависит от возраста животных — у молодых развиваются менее дифференцированные формы, у старых — дифференцированные формы. Частота возникновения лейкозов у самцов значительно больше, чем у самок.

В патогенезе лейкозий важное место принадлежит активации латентных эндогенных вирусов онкогенов, ошибкам репарации ДНК, возникновению соматических мутаций в кроветворных клетках, нарушениям гормональной регуляции клеточного гомеостаза и понижению иммунологической устойчивости организма.

Различия в поглощенных дозах, вызывающих разные опухоли, зависят от того, что является ведущим — прямое или опосредованное воздействие излучения. Там, где главный фактор развития опухоли — непосредственное повреждение тканей, необходима кумуляция высоких уровней доз (до 100 Гр и больше). Такая доза вызывает возникновение опухолей костной ткани, кожи, печени и ЖКТ. Когда в процессе канцерогенеза определяющими являются опосредованные факторы (гормональные влияния), бластомогенная доза оказывается в 10–100 раз меньшей.

Таким образом, радиоактивные вещества и источники внешних облучений в отдаленные сроки могут вызвать разнообразные изменения в органах и тканях животных. Частота и степень выраженности опухолевых и неопухолевых форм отдаленных последствий во многом зависит от мощности дозы воздействия, вида излучения, пола, возраста животных, а также исходного функционального состояния организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев Б.М. Лучевая терапия запущенных форм злокачественных новообразований. – М.: Медицина, 2014.
2. Бадмаев К.Н. Радиационная диагностика и лучевая терапия. К.Н. Бадмаев, Р.В. Смирнов. – М., 2012.
3. Батын А.Н., Бученков И.Э., Власова Н.В. Молекулярная и клеточная радиобиология: учебное пособие. – Минск: Высшая школа. – с. 239 2024.
4. Бутомо Н.В., Гребенюк А.Н., Легеза В.И. и др. Основы медицинской радиобиологии / Под ред. И.Б. Ушакова. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2004. – 384 с.: ил.
5. Виленчик М.М. Модификация канцерогенных и противоопухолевых эффектов излучений. – М., 2016.
6. Газиев А.И. Молекулярные механизмы репарации односторонних разрывов ДНК, индуцируемых гамма-радиацией: диссертация ... доктора биологических наук: 03.00.01. – Пушкино, – с. 293. 1975.
7. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, Ленингр. отд-ние, 1979.
8. Кишковский А.Н. Лучевая терапия неопухолевых заболеваний / А.Н.Кишковский, А.Л.Дударов. – Л.: Медицина, 2012.
9. Коггл Дж. Е. Биологические эффекты радиации: Пер. с англ. М.: Энергоатомиздат, 1986.
10. Коряковский Ю.С., Акатов А.А. Радиация в медицине: учебное пособие. – Москва: [б. и.] – 28 с. – (Библиотечка Общественного совета Госкорпорации «Росатом»), 2009.
11. Кудряшов Ю.Б. Основные принципы в радиобиологии // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001. – Т. 41, №5. – С. 531 – 547.
12. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: физматлит, 2004. – 448 с.
13. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). Учебник / Под ред. В.К. Мазурика и М.Ф. Ломанова. – М.: Физматлит, 2004. – 443 с.
14. Ластовкин В.Ф. Основы радиационной безопасности: учеб. пособие / Нижегород. гос. архитектур. – строит. ун-т – Н. Новгород: ННГАСУ – с.143. 2017.
15. Легеза В.И., Драчев И.С., Чепур С.В. Осложнения лучевой противоопухолевой терапии: (клиника, патогенез, профилактика, лечение). – Санкт-Петербург: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство «СпецЛит», – с. 207, 2022.
16. Лысенко Н.П., Пак В.В., Рогожина Л.В., Кусурова З.Г. Радиобиология. – 6-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, – с. 572. 2023.
17. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующих излучений на организмы млекопитающих // Радиационная биология. Радиоэкология. — Т. 39, №1. – С. 91 – 98. 1999.
18. Моисеев А.А. Справочник по дозиметрии и радиационной гигиене / А.А. Моисеев, В.И. Иванов. – М.: Медицина, 2015.

19. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия воздействия ионизирующих излучений. – М.: Медицина, 1991.
20. Нормы радиационной безопасности (НРБ – 99/2009): Санитарные правила и нормативы (СанПиН 2.6.1.2523 – 09): утв. и введ. в действие от 01 сентября 2009 г. взамен СанПиН 2.6.1.758 – 99. Зарегистрированы в Министерстве юстиции РФ 14.08.2009, рег. № 14534.
21. Обатуров Г.М. Биофизические модели радиобиологических эффектов. – М.: Энергоатомиздат, 1987.
22. Пелевина И.И., Афанасьев Г.Г., Готлиб В.Я. Клеточные факторы реакции опухоли на облучение и химиотерапевтические воздействия. – М.: Наука, 1978.
23. Петин В.Г. Генетический контроль модификаций радиочувствительности клеток. – М.: Энергоатомиздат. 1987.
24. Руднев А.В. Радиационная экология. – М.: Изд-во МГУ, 1990.
25. Саврасов Д.А., Карташов С.С., Михайлов А.А. [и др.]. Радиобиология. Биологическое действие ионизирующих излучений и лучевые поражения сельскохозяйственных животных: учебное пособие для вузов – Санкт-Петербург: Лань – с. 168. 2024.
26. Степанов В.Г. Ветеринарная радиобиология: учебное пособие. – 2-е изд., стер. Санкт-Петербург: Лань – с. 352. 2022.
27. Степанова Е.Н., Стрелова О.Ю., Легеза В.И., Гребенюк А.Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины: учебное пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: Фолиант – с. 232. 2015.
28. Холл Э.Дж. Радиация и жизнь. – М.: Медицина, 1989.
29. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А. Радиобиология человека и животных. Учеб. пособие / Под ред. С. П. Ярмоненко. – М.: Высшая школа, с. 550. 2004.

Формат 60х90/16, объем 4,625 усл. печ. л.
Бумага 80 г/м². Офсетная. Гарнитура Times New Roman.
Тираж 1000 Заказ № 2026-445-мбу
Отпечатано в типографии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
123098, Москва, ул. Живописная, 46
Тел. +7 (499) 190-93-90
rcdm@mail.ru, lochin59@mail.ru
www.fmbafmbc.ru

