

ЛЕКЦИЯ 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

1. Радиационно-химические повреждения белков
2. Радиационно-химические повреждения липидов
3. Радиационно-химические повреждения углеводов

1. Радиационно-химические повреждения белков

Изучение действия ионизирующего излучения **на растворы белковых молекул** позволило выделить основные реакции повреждения белковой молекулы: отщепление водорода по связи С–Н от углеродного атома с образованием белкового радикала; расщепление белка с образованием амида и карбонильного соединения; нарушение и разрыв первичной, вторичной и третичной структур, сопровождающиеся образованием низкомолекулярных фрагментов или полимеризацией молекулы белка, радиационно-химические нарушения аминокислот. Специфической реакцией белков на высокие дозы облучения является денатурация, при которой белок переходит в нерастворимую форму без изменения химического состава. При облучении прямолинейная структура белковой молекулы может изменяться до спиралевидной и глобулярной. В водных растворах существенную роль в радиационных превращениях белковых молекул играют продукты радиолиза воды – радикал OH° и гидратированный электрон e_{aq}^- . Свободные радикалы могут локализовываться в определенных местах молекулы. Через промежуточные соединения, возникающие по центрам локализации радикалов OH° , белки расщепляются с образованием фрагментов белковых молекул. При облучении белковых молекул также регистрируются разрывы водородных, гидрофобных и дисульфидных связей, образование сшивок между белковыми молекулами. Установлено, что при облучении клеток свободные радикалы OH° , локализованные в разных участках белковой молекулы, могут вызывать процессы полимеризации и возникновение ковалентных сшивок белков с молекулой ДНК. Облучение вызывает нарушение конформационного состояния, что приводит к ослаблению способности белка регулировать самосборку надмолекулярных структур. Радиационно-химические повреждения структуры белковой молекулы приводят к нарушению их основных функций – ферментативной, гормональной и рецепторной.

Белки входят в состав многочисленных ферментов клетки, которые катализируют различные процессы обмена веществ в клетках. При облучении белков происходит инактивация ферментов, т.е. потеря способности их регулировать все ферментативные процессы обмена веществ в клетках. Хорошо изучена реакция на облучение **ферментов**, катализирующих разложение нуклеиновых кислот (ферменты ДНК-азы) и белков (фермент трипсин). Причинами инактивации ферментов могут быть изменения пространственной конфигурации фермента, разворачивание белковой глобулы, а также изменение аминокислотного состава в результате повреждения поверхностных участков фермента. В присутствии кислорода инактивация ферментов усиливается в несколько раз. Образование продуктов

радиолиза белковых молекул в живых клетках, облученных дозами, близкими к полуметаллическим, обычно невелико. Прямое повреждение белковых молекул, по-видимому, не имеет решающего значения для жизнеспособности клеток, так как в клетке много одинаковых молекул и возможен синтез новой идентичной белковой молекулы.

2. Радиационно-химические повреждения липидов

Липиды находятся в клетке в довольно больших количествах и входят в состав различных мембран (клеточной, ядерной, лизосомной, митохондриальной, эндоплазматической и др.), на которых происходят многочисленные биохимические процессы клеточного метаболизма. Радиолиз липидов сопровождается накоплением продуктов радиационно-химического превращения ненасыщенных жирных кислот, которые входят в состав липидов. Среди этих продуктов имеются перекиси, гидроперекиси и липидные перекиси. Выходы липидных перекисей могут составлять несколько сотен молекул на 100 эВ поглощенной энергии. Возникающие при этом свободные радикалы претерпевают ряд превращений, взаимодействуя с неповрежденными молекулами, друг с другом и с кислородом. В последней реакции образуется активный перекисный радикал, который, реагируя с исходной карбоновой кислотой, приводит к образованию гидроперекиси и нового перекисного радикала. Этой реакцией начинается цепной процесс окисления липидов, для продолжения которого необходимо наличие в среде кислорода. Конечными продуктами радиолиза жирных кислот являются карбонильные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, углекислый газ. В живой клетке цепная реакция окисления липидов невозможна, потому что происходят одновременно другие реакции, препятствующие этому процессу. Радиационно-химические реакции окисления липидов приводят к нарушению структуры клеточной мембраны, поэтому нарушается ионный баланс клетки из-за выравнивания концентрации калия и натрия, а также проницаемость мембраны, поэтому нарушается приток питательных веществ в клетку и отток из клетки продуктов метаболизма.

2. Радиационно-химические повреждения углеводов

Углеводы представлены в природе моносахаридами (4–8 атомов углерода) и полисахаридами (более 8 атомов углерода). Радиолиз моносахаридов сопровождается образованием дезоксисахаридов, дезоксикетосоединений, млоидиальдегида (МДА). Облучение полисахаридов вызывает разрыв углеродных связей и нарушение структуры, изменение физико-химических свойств, деполимеризацию, т.е. образование более простых молекул.

При радиолизе других органических молекул происходит нарушение их структуры в результате разрыва связей С–С, С–Н и связей углерода с функциональными группами С–R. Возникают радикалы различных типов. Среди продуктов появляются не только фрагменты углеводородной цепочки, но и продукты превращения функциональных групп. Например, при радиолизе спиртов, эфиров и кетонов образуется водород (реакция дегидрирования), при радиолизе органических кислот – двуокись углерода (реакция декарбоксилирования), при радиолизе аминов – аммиак (реакция

дезаминирования). Происходят также реакции синтеза, т.е. образование более сложных молекул в результате полимеризации простых молекул и функциональных групп.

Действие ионизирующих излучений на **нуклеиновые кислоты** – ДНК, разные формы РНК – изучено более основательно. ДНК содержится в ядре в виде двойной незамкнутой спирали, а также в митохондриях и пластидах в виде двойной цепочки, замкнутой в кольцо. Исследованиями доказано, что в развитии лучевого поражения клетки особо важное место принадлежит молекулярным повреждениям компонентов генетически важных молекул, в частности ДНК, входящей в состав хромосом. Определяющая роль повреждения ДНК основывается на том, что гигантские молекулы ДНК в гаплоидном наборе хромосом не повторяют друг друга, представляя собой уникальную структуру клетки. Поэтому исследование радиационно-химических повреждений молекул нуклеиновых кислот приобрело большое значение в изучении радиобиологических эффектов.

Облучение **ДНК в водных растворах и сухих препаратах** вызывает в первую очередь радиолиз ее структурных единиц: оснований, нуклеотидов, углеводной части, что приводит к нарушению структуры молекулы. К основным радиационно-химическим реакциям оснований относят дезаминирование пуриновых оснований (аденина и гуанина) и цитозина, образование пиримидиновых и пуриновых радикалов при разрыве пиримидинового или имидазольного кольца, образование гидроперокисных радикалов, образование в водных растворах кетильных радикалов при участии радикалов H° и OH° .

Сведений о радиационно-химических изменениях нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот значительно меньше. Однако они позволяют сделать вывод о том, что в основаниях, облученных в составе этих трех структурных единиц, происходят качественно те же изменения, что и в основаниях, облученных в свободном виде. Установлено, что выходы реакций оснований, входящих в состав молекулы ДНК, меньше, чем при облучении их в свободном состоянии. Это связано с тем, что часть продуктов радиолиза воды (в основном радикалы OH°) вступают в реакцию взаимодействия с углеводной частью молекулы. Радиационные выходы повреждения пиримидиновых оснований превышают выходы разложения пуриновых.

У дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, облучение приводит к образованию дезоксирибозилрадикалов, которые возникают чаще всего при взаимодействии радикала OH° с одним из атомов водорода дезоксирибозы. Эти радикалы претерпевают реакции дегидратации и гидролиза с образованием окислительных и восстановительных продуктов. В результате изменений в углеводной части происходит разрыв полинуклеотидных связей, сопровождающийся выделением свободных оснований. Связь $C3'PO_4$ более радиочувствительна, чем связь $C5'PO_4$. При действии продуктов радиолиза воды на углеродные атомы, не связанные с фосфорной группой, возникают неустойчивые соединения – лабильные фосфатные эфиры, которые, подвергаясь гидролизу, образуют дополнительное количество фосфорной кислоты.

Облучение растворов ДНК вызывает структурное изменение молекулы ДНК. Целостность “скелета” ДНК, или первичной структуры, определяется межуглеродными связями $C_3' - C_4'$; $C_4' - C_5'$ и фосфорными связями $C_5' -$

ОРО – С₃'. Разрушение любой из этих связей приводит к одиночному (однонитевому) разрыву нуклеотидной цепи. Одиночные разрывы обнаруживают по уменьшению молекулярного веса одиночных нитей ДНК, а также по концентрации выделившегося фосфата, по выходу МДА (млоидиальдегида). По мере накопления одиночных разрывов (при увеличении дозы облучения) расстояние между ними в комплиментарных цепях уменьшается и возникают двойные разрывы, приводящие к уменьшению молекулярного веса ДНК. Количество двойных разрывов накапливается пропорционально квадрату дозы облучения. При облучении ДНК редко ионизирующим излучением соотношение между двойными и одиночными разрывами составляет от 1:20 до 1:50. Оно снижается с увеличением плотности ионизации.

Изменения во вторичной структуре молекулы проявляются в виде разрывов водородных связей между комплиментарными основаниями, что вызывает частичную денатурацию молекулы ДНК. Выход разрывов водородных связей рассчитывается по доле оснований, оставшихся спаренными в ДНК после облучения. Все разрывы молекулы ДНК разделяются на две группы: первичные, которые происходят в момент облучения под действием излучения, и пострадиационные, которые происходят после облучения, в результате радиационно-химических реакций молекулы ДНК с другими молекулами и свободными радикалами.

При облучении сухой ДНК и ДНК, содержащей небольшое количество воды, было обнаружено увеличение ее молекулярного веса и зафиксировано образование разветвленных структур. Облученная в вакууме ДНК теряет растворимость. Эти факты объясняются образованием ковалентных сшивок (слипание нитей) в молекуле ДНК при облучении. Присутствие воды увеличивает образование сшивок, а наличие кислорода препятствует этому процессу. Известны сшивки нескольких типов: продольные (между поврежденными основаниями), поперечные (между двумя нитями ДНК) и сшивки между нитями ДНК и молекулами белка. Возникновение сшивок является результатом образования ковалентных связей трех типов: между двумя реакционно-способными концами полимерной цепи, между поврежденными основаниями и между поврежденными основаниями и сахарофосфатными остатками. Однако механизм образования и молекулярная природа сшивок не выяснены до конца.

На рис. 3 приведены схемы структурно-радиационных повреждений молекулы ДНК и указаны места в молекуле ДНК, где наиболее легко реализуется поглощенная энергия излучения, что проявляется в виде различных нарушений целостности молекулы.

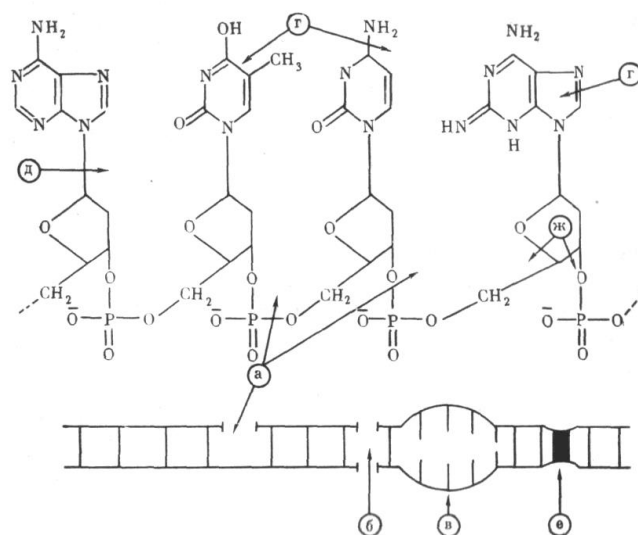


Рис.3. Основные радиационно-химические повреждения молекулы ДНК: а – одиночные разрывы; б – двойные разрывы; в – частичная денатурация молекулы в результате распада *l*-водородных мостиков; г – радиационные изменения оснований; д – отщепление оснований; е – образование сшивок; ж – распад дезоксирибозы.

Повреждение оснований выявляют при изучении оптической плотности раствора. Разрывы водородной связи и денатурацию ДНК выявляют по увеличению поглощения ультрафиолетового света раствором ДНК. Разрывы нитей ДНК определяют по уменьшению молекулярной массы молекулы. Однонитевые разрывы выявляют методом сидментации (центрифугирования) в щелочном градиенте сахарозы (рН=12), двунитевые разрывы – в нейтральном градиенте сахарозы.

Выход повреждений ДНК при облучении клеток дозами, вызывающими репродуктивную гибель клеток, т.е. потерю способности клеток к делению, незначителен. Однако и при очень малом выходе повреждений могут нарушаться структура и функции этих молекул в клетке. ДНК клетки как объект радиобиологических реакций существенно отличается от ДНК простых радиобиологических систем. В составе хромосом ДНК находится в виде двойной незамкнутой спирали. В митохондриях, пластидах и клетках прокариот (клетки без ядер) ДНК представлена в виде двойной цепочки, замкнутой в кольцо. Клеточная ДНК хранит генетическую информацию клетки в виде генетического кода. **Генетический код** – это последовательность чередования нуклеотидов в молекуле ДНК, которая определяет порядок расположения аминокислот в белке. Повреждение оснований ДНК при облучении клетки может быть причиной генных (точковых) мутаций организма, а также причинами нарушения генетического кода и появления генных мутаций. Это связано с потерей, разворотом, дубликацией и заменой оснований. Синтез ДНК предполагает образование двух комплиментарных цепей, идентичных матричной молекуле. При облучении порядок чередования оснований в молекуле ДНК может нарушаться. Замена одного из оснований в каждой паре приводит, во-первых, к изменению геометрии молекулы ДНК, во-вторых, к изменению генетического кода и последующему включению в молекулу белка ошибочного аминокислотного остатка, что приводит к появлению измененных молекул белка. В середине 80-х годов у молекулы ДНК живых организмов открыли минисателлиты, которые состоят из коротких повторяющихся фрагментов ДНК длиной 10–60 нуклеотидов. Основная роль минисателлитов в клетке – регулирование активности генов. Мутации

минисателлитов происходят в 1000 раз чаще, чем мутации обычных генов. При этом частота мутаций увеличивается при облучении ионизирующим излучением. Мутации минисателлитов, выявленные у детей, рожденных после Чернобыльской катастрофы от облученных родителей, в два раза превосходят мутации у детей, рожденных от необлученных родителей.

К настоящему времени доказано, что при облучении хромосомной ДНК клеток наблюдаются следующие первичные реакции: окисление пиримидиновых оснований и распад пуриновых оснований, обратимые и необратимые разрывы водородных связей, конфигурационные изменения надмолекулярных структур ДНК, внутри- и межмолекулярные сшивки полимерных цепей. В живых клетках ДНК связана с белками – гистонами, образуя самый сложный комплекс – хроматин, куда входят ДНК, РНК и белковые компоненты. Синтез ДНК и его задержка совпадают с этими же процессами у гистонов. Элементарная хромосомная нить образована спиралью ДНК, скрепленной гистонами. Облучение вызывает образование сшивок ДНК–белок по причине радиолиза пиримидиновых оснований с образованием пиримидиновых и перекисных радикалов. Повреждения сахарофосфатных связей приводят к возникновению поперечных ковалентных сшивок ДНК–ДНК, а также сшивок ДНК–белок и ДНК–мембранный комплекс. При облучении клеток может распадаться ДНК–мембранный комплекс и нарушаться синтез молекулы ДНК. Главную роль в образовании сшивок играют продукты радиолиза пиримидиновых оснований (пиримидиновые и перекисные радикалы) и меньшую роль – продукты повреждения пуриновых оснований. При облучении клеток однонитевые разрывы вызывают потерю способности молекулы скручиваться в спираль, и структура молекулы становится кольцевой. Двунитевые разрывы вызывают переход кольцевой структуры в линейную. Разрывы нарушают целостность молекулы ДНК, что препятствует считыванию с нее генетической информации, нормальной репликации ДНК и распределению генетического материала между клетками. После облучения разрывы ДНК частично восстанавливаются, поэтому не всегда поврежденная и восстановленная ДНК идентична неповрежденной матричной ДНК, т.е. имеет место ошибочная репарация. Места разрывов могут соединяться в различных комбинациях. Неправильное восстановление разрывов приводит к возникновению хромосомных aberrаций. При облучении клеток тканей человека в дозе 2 Гр погибает 10–90% клеток. В ДНК одной клетки образуется около 2000 однонитевых разрывов и до 80 двунитевых, при этом повреждается около 1000 оснований и образуется около 300 сшивок ДНК с белками. При облучении клетки повышается активация ферментов ДНК-аз, которые вызывают деполимеризацию ДНК. Разрушение ядерных и цитоплазматических мембран при облучении создает условия для ферментативного повреждения молекулы ДНК.

Кроме вышеперечисленных реакций ДНК в клетке имеет место дистанционное действие на ДНК радиотоксинов – стабильных продуктов радиолиза клеточных и межклеточных молекул, а также происходят различные процессы, вызывающие вторичное (опосредованное) повреждение ядерных структур и молекулы ДНК. Установлено, что гидратированные электроны взаимодействуют с гистонами, что приводит к нарушению связей и структуры самих гистонов, нарушению связей гистонов с ДНК и изменению структуры хроматина. В ядре образуются органические гидроперекиси,

которые входят в состав радиотоксинов. Взаимодействие радикала ОН с фенолами и полифенолами в присутствии кислорода приводит к образованию ортохинонов и оксиортохинонов. Эти вещества являются мутагенами, ядами и ингибиторами, под действием которых изменяются свойства оснований, нарушается активность генов и формируются разрывы нитей ДНК. Совокупность всех изменений вызывает нарушения синтеза ДНК, РНК и белка, поэтому нарушается деление клеток. Синтез ДНК – очень радиочувствительная реакция. В зависимости от величины дозы он замедляется, нарушается или прекращается вообще. Синтез ДНК нарушается на следующих этапах:

- 1) обменные реакции, приводящие к синтезу трифосфатов четырех нуклеотидов;
- 2) начало синтеза ДНК, т.е. освобождение молекул ДНК от белков; раскручивание цепи и присоединение ДНК-полимеразы;
- 3) синтез ДНК;
- 4) радиационное угнетение синтеза ферментов, ответственных за синтез ДНК.

Косвенно на синтез ДНК оказывают влияние различные радиотоксины, которые всегда возникают в облученных клетках. Структурные повреждения ДНК (однонитевые и двунитевые разрывы) являются основной причиной гибели клеток при облучении.

Следует отметить, что реакции, связанные с потерями и модификациями оснований, так же как и разрывы фосфорозэфирных и межуглеродных связей, неспецифичны для ионизирующего излучения, так как выход многих продуктов этих реакций наблюдается при воздействии некоторых химических и физических факторов, клеточных ферментов типа эндо- и экзонуклеаз, ультрафиолетового излучения.

РНК, представленная в клетке несколькими формами (матричная, рибосомальная, транспортная), относится к массовым молекулярным структурам клетки, т.е. формы повторяются или содержатся в нескольких копиях и в отличие от ДНК могут синтезироваться в требуемом количестве в клетке. Поэтому их радиационное повреждение менее значительно при лучевом поражении клетки. В основном типы радиационного повреждения молекул РНК такие же, как и молекулы ДНК.

Таким образом, при облучении клеток ионизирующим излучением происходит радиолиз микромолекул и макромолекул клеток, в результате которого изменяются свойства молекул, возникают первичные и вторичные радиотоксины, поэтому изменяются процессы обмена веществ в клетке, нарушается синтез ДНК, белков, что приводит в конечном итоге к гибели клеток.