

## ЛЕКЦИЯ 6

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

#### Реакция клеток на облучение

1. Радиочувствительность клетки в разных фазах жизненного цикла
2. Формы клеточной гибели при облучении клеток
3. Хромосомные aberrации при облучении клеток

#### 1. Радиочувствительность клетки в разных фазах жизненного цикла

Клетка размножается делением, при котором происходит передача наследственной информации от материнской клетки двум дочерним клеткам. Универсальным способом деления соматических клеток является митоз, а половых – мейоз. Период от начала одного деления до начала другого называется **митотическим циклом**, который состоит из **интерфазы и митоза**. Выделяют следующие периоды интерфазы:

- 1) **G<sub>1</sub>** – предсинтетический период (синтез веществ, необходимых для репликации ДНК);
- 2) **S** – синтетический (репликация ДНК);
- 3) **G<sub>2</sub>** – постсинтетический (синтез веществ, необходимых для деления клетки).

Митоз составляет  $\frac{1}{7} - \frac{1}{10}$  времени клеточного цикла, длится примерно 1 час и разделяется на четыре фазы: профазы, метафазы, анафазы и телофазы.

В разных фазах митотического цикла у клеток растений и животных обнаружена закономерная изменчивость радиочувствительности. У растений закономерности изучались на клетках корневых меристем проростков, у которых синхронизирован первый митоз, т.е. большинство клеток делятся одновременно. При оценке радиочувствительности клеток в фазах цикла по критерию выживаемости клеток установлено, что максимальная радиочувствительность наблюдается у клеток, находящихся в конце G<sub>1</sub>-периода и начале S-периода. Клетки высоко- радиоустойчивы в начале G<sub>1</sub>-периода. При репликации ДНК фермент ДНК-аза разрезает нить на две части и происходит временная десперилизация участков ДНК. Облучение клетки в это время может вызывать образование одностранных разрывов в разных местах молекулы. Если до прохождения «вилки репликации» одностранные разрывы не успевают восстановиться, тогда могут возникать двустранные разрывы ДНК, поэтому деление клетки прекращается и она погибает.

Установлено, что в зависимости от фазы цикла в клетках изменяется содержание естественных радиопротекторов – их концентрация повышается в радиочувствительных фазах цикла. Радиочувствительность клеток во всех фазах жизненного цикла зависит от дозы облучения. В то же время разница радиочувствительности между фазами при облучении клеток разными дозами значительна. Например, при дозе, равной 10 Гр, выживаемость клеток, облученных в S- и G<sub>1</sub>-периодах, различается в 15 раз, а при дозе, равной 3 Гр, различия для этих периодов составляют 1,5 раза.

Клетки вне цикла или покоящиеся клетки ( $G_0$ -клетки) высоко радиоустойчивы. При гибели делящихся клеток эти клетки выходят из состояния покоя, начинают деление, за счет которого возобновляется структура тканей. При терапии раковых опухолей значительно подавляется деление раковых клеток. В то же время раковые клетки, находящиеся в покое, выходят из этого состояния, начинают делиться и формируют новую опухоль в ткани.

## 2. Формы клеточной гибели при облучении клеток

Согласно классификации Хансона и Комара гибель клетки бывает следующих видов: насильственная (под влиянием различных условий); физиологическая (конечный этап нормальной жизни клетки); программируемая (закономерная гибель на различных стадиях эмбриогенеза и морфогенеза); беспричинная (без видимых причин).

Закономерным проявлением действия излучения на клетки является подавление способности клеток к делению. **Потеря способности клеток к неограниченному размножению называется репродуктивной, или митотической, гибелью клеток.** Эта форма гибели клетки широко распространена в природе. Она хорошо изучена, потому что ее можно наблюдать при культивировании клетки вне организма, производить количественную оценку и фотосъемку.

Клетки, дающие стерильное потомство, считают погибшими. Погибшие клетки не всегда имеют признаки видимых повреждений. Они живут после облучения до начала первого деления, поэтому их гибель регистрируется в процессе первого пострадиационного митоза, значительно реже гибель клетки наблюдается во 2, 3 и 4-м митозах. **Живые клетки проходят 5 митозов и продолжают делиться до формирования колоний.** В культуре тканей в облученных клетках выделяют следующие аномальные явления:

1) многополюсные клетки в первом пострадиационном митозе (по причине повреждения центриолей);

2) формирование гигантских клеток при слиянии двух сестринских клеток или двух соседних клеток. Эти клетки проходят 2 – 3 митоза и погибают.

**Основной причиной репродуктивной гибели клеток являются структурные повреждения молекулы ДНК** (однонитевые и двунитевые разрывы, сшивки между нитями ДНК и сшивки ДНК–белок), которые регистрируются в мета- и анафазе как хромосомные аберрации. **К критериям репродуктивной гибели относят, во-первых, выживаемость или способность клеток к размножению.** Количественно гибель клеток оценивают по клоногенной активности клеток путем сравнения ее величины в двух вариантах опыта. В первом варианте определяют выживаемость у облученных клеток, а во втором – выживаемость у необлученных клеток. Оба варианта клеток высевают в чашки Петри на питательную среду и помещают на 7–14 дней в термостат до появления видимых колоний. **Выживаемость клеток определяется как отношение числа колоний, выросших из облученных клеток, к числу колоний, выросших из необлученных клеток.** Поэтому выживаемость измеряется не в целых числах, а в десятичных. Погибшие клетки не формируют колоний, не анализируются, поэтому этот критерий не дает информации о причинах гибели клеток. Для оценки репродуктивной гибели используют цитологический метод или мета-

анафазный анализ, т.е. анализируются клетки, находящиеся в метафазе и анафазе. При метафазном анализе выявляют все типы хромосомных aberrаций у клеток, находящихся в метафазе. При анафазном анализе выявляют только мосты или тяжи из хромосомного материала в области экватора и фрагменты хромосом. **В качестве второго критерия радиочувствительности** используют количество или процент хромосомных aberrаций в мета- и анафазе и их роль в гибели клеток, потому что клетки теряют способность к делению в основном при формировании в области экватора тяжей из хромосомного материала. Количественный анализ репродуктивной гибели клеток проводят на основании анализа графика «доза-эффект» или графика зависимости выживаемости клеток от величины дозы. Облучение клеток дозами в десятки и сотни грей в первые часы после облучения вызывает прекращение обмена веществ клеток, гибель клеток, которая наступает в первой интерфазе после облучения, до вступления клеток в митоз, а также в интерфазах между последующими делениями. **Такой вид гибели клеток называется интерфазной гибелью.** Установлено, что с увеличением дозы облучения постепенно увеличивается количество погибших клеток. Существует пороговая доза, после которой поражение клеток не зависит от величины дозы, потому что каждая клетка облучается многократно и наблюдается эффект перепоражения клеток. Причиной интерфазной гибели являются структурные хромосомные aberrации. За счет разрывов молекулы ДНК нарушается структура хроматина и нарушается связь ДНК с мембранным комплексом, поэтому прекращается синтез ДНК. Вышедшие из поврежденных лизосом ферменты (протеазы и ДНК-азы) разрушают ДНК, что ведет к распаду хромосом и к пикнозу (распаду) ядра. Гибель клеток в первые часы после облучения также связана с выявлением ферментами невосстановленных двунитевых разрывов ДНК. Ферменты каспазы и другие разрушают поврежденную ДНК на фрагменты. При облучении активность этих ферментов возрастает, поэтому усиливается распад хроматина. В клетках возрастает активность ферментов протеаз, которые разрушают белок. В культуре клеток и в тканях выделяют два вида гибели клеток: **апоптоз и некроз.**

**Апоптоз** – это программируемая гибель клеток, которая всегда происходит в норме. Значение апоптоза при облучении клеток заключается в недопущении размножения клеток с ошибками в генетическом аппарате. **Апоптоз имеет несколько последовательных стадий:** 1) приобретение клетками формы шара; 2) прекращение движения цитоплазмы и ее вакуолизация; 3) распад клетки и ядра на фрагменты. В фрагментах есть хроматин, митохондрии, лизосомы и другие органеллы, заключенные в клеточную мембрану. Благодаря наличию мембраны содержимое фрагментов не выходит в ткань, поэтому в ней не развиваются воспалительные процессы. В последующем фрагменты уничтожаются макрофагами и другими клетками. При некрозе выделяют следующие стадии: 1) увеличение объема клетки; 2) разрыв клеточной мембраны; 3) выход содержимого клетки за ее пределы в ткань и формирование воспалительных процессов.

Для изучения интерфазной гибели используют следующие критерии: 1) окраска клеток специфическими красителями, которые окрашивают живые или мертвые клетки и ядра; 2) определение количества ядер в клетках, находящихся в состоянии пикноза; 3) определение интенсивности поглощения клетками кальция-40 и хрома-51 (живые клетки поглощают эти

элементы); 4) определение уровня потребления кислорода клетками (живые клетки потребляют кислород).

### 3. Хромосомные aberrации при облучении клеток

Основной причиной гибели клеток при облучении являются структурные повреждения молекулы ДНК, которые обнаруживаются цитологическими методами в виде хромосомных перестроек или aberrаций хромосом. К концу 1940 года были классифицированы все виды хромосомных aberrаций и началось изучение связи возникновения хромосомных aberrаций с дозой облучения. Хромосомы состоят из ДНК и белков гистонов. Они хорошо видны при делении клеток. При облучении клеток с хромосомами происходит два **основных процесса**: 1) разрыв хромосом и хроматид. Хроматиды образуются в анафазе при разделении хромосом центромерами; 2) соединение их разорванных концов с образованием различных структур.

Выделяют структурные и количественные хромосомные aberrации. При структурных aberrациях количество хромосом не изменяется, а при количественных – уменьшается или увеличивается (полиплоидия, гаплоидия и анеуплоидия). Хромосомные aberrации разделяются на **внутрихромосомные** (делеции, инверсии, инсерции и дупликации) и **межхромосомные** (обмены участками или транслокации). В зависимости от времени возникновения в митотическом цикле клетки aberrации разделяются на хромосомные и хроматидные. Хромосомные aberrации возникают в  $G_1$ -периоде, а хроматидные – в конце S- и  $G_2$ -периодов.

В репродуктивной гибели клеток основную роль играют такие хромосомные aberrации, как делеции (образование фрагментов хромосом) и транслокации (межхромосомные обмены).

**Делеции бывают концевые и внутренние.** При **концевых делециях** образуются ацентрические фрагменты (т.е. кусочки хромосом без центромеры) в результате повреждения одного или двух плечей хромосомы и кольцевая хромосома, которая образуется при замыкании двух поврежденных плечей в кольцо. Кольцевые хромосомы могут делиться в анафазе, распрямляться, переплетаться и образовывать петли и различные конфигурации в виде цепочек и петель. Они регистрируются только во время первого пострadiационного митоза, затем теряются с частотой 50% на деление. При **внутренних делециях** в результате двойного разрыва хромосомы выпадает ее фрагмент. Оставшиеся части хромосомы соединяются и формируют укороченную хромосому. Фрагменты хромосом остаются в цитоплазме и образуют микроядра в одной из дочерних клеток. В клетке одновременно может повреждаться не одна, а несколько хромосом. Образование фрагментов приводит к потере генетической информации клеток. Потеря фрагментов не всегда приводит к гибели клеток в первых митозах. Гибель происходит в более поздних митозах (после 5-го митоза). Фрагментация хромосом при облучении клеток является одной из основных хромосомных aberrаций при хроническом облучении малыми дозами клеток растений, животных и человека, находящихся в зонах радиоактивного загрязнения.

**Межхромосомные обмены** могут быть **симметричные** (между гомологичными участками хромосом) и **асимметричные** (между негомологичными участками хромосом). Завершенные симметричные

обмены не вызывают потерь генетического материала, не препятствуют делению клеток. В результате асимметричных обменов образуются: 1) дицентрические мосты, представляющие собой тяж (фрагмент) из хромосомного материала в области экватора между двумя дочерними клетками при делении материнской клетки; 2) кольцевые хромосомы; 3) микроядра из фрагментов. Мосты препятствуют нормальному расхождению хромосомного материала к полюсам клетки и делению клеток в анафазе, что приводит к гибели клетки. Завершенные асимметричные обмены, или **реципрокные транслокации**, являются источниками генетических нарушений, которые накапливаются в клетках и передаются из поколения в поколение, создавая “генетический груз” популяции и способствуя появлению мутаций.

При хроническом облучении растений, произрастающих в зоне отчуждения и отселения, типичными хромосомными aberrациями являются фрагментация хромосом, кольцевые хромосомы и реципрокные транслокации. Хромосомные нарушения у растений в условиях хронического облучения представлены в приложении.

Структурные aberrации хроматидного типа возникают во время удвоения и после удвоения хромосом. Хроматидные aberrации могут захватывать одну хроматиду, обе хроматиды или часть её поперечного сечения. Для хроматидных aberrаций характерны разнообразные межхроматидные обмены и более высокая степень незавершенности обменов.