

ЛЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Реакция клеток на облучение

1. Сублетальные и потенциально летальные повреждения клеток. Пострадиационное восстановление клеток от повреждений.
2. Молекулярные механизмы репараций при облучении клеток

1. Сублетальные и потенциально летальные повреждения клеток. Пострадиационное восстановление клеток от повреждений.

В облученных клетках одновременно происходят два процесса: повреждение и восстановление повреждений. Процесс восстановления повреждений называется **репарацией**. Репарация может быть полной или частичной. Репарация происходит на всех уровнях: **во-первых**, на молекулярном уровне (устраняется повреждение биологически важных структур ядра и цитоплазмы, поэтому они не реализуются на более высоком уровне, т.е. на клеточном); **во-вторых**, на субклеточном уровне (восстановление белоксинтезирующих систем и других энергетических систем); **в третьих**, на клеточном уровне (восстановление способности клеток к делению; **в четвертых**, на тканевом уровне (восстановление поврежденных облучением участков ткани за счет деления покоящихся клеток). В облученной клетке формируются сублетальные и потенциально летальные повреждения, поэтому выделяют **два вида репарации**:

1. Восстановление от сублетальных повреждений;
2. Восстановление от потенциально летальных повреждений.

Сублетальные повреждения – это такие изменения в клетках, которые сами по себе не вызывают гибели клеток, но способствуют их инактивации при последующем облучении. Сублетальные повреждения выявляются методом фракционированного облучения. Для проявления этих повреждений необходимым условием является их взаимодействие с другими такими же повреждениями. Количественную оценку восстановления клеток от сублетальных повреждений дал М.Элкинд в 1961 году при проведении опытов на клетках животных и использовании метода дробления дозы на две отдельные фракции с интервалом между фракциями в несколько часов. Он установил, что у большинства клеток репарация сублетальных повреждений происходит **волнообразно и зависит от интервала времени между фракциями**. Это связано с нахождением клеток в разных фазах жизненного цикла, которые характеризуются разной радиочувствительностью. При увеличении интервала времени между фракциями от 2 до 6 часов клетки переходят из радиоустойчивых стадий в более радиочувствительные (G_1 и S) стадии, поэтому снижается их выживаемость и возрастает гибель. При восьмичасовом интервале времени наблюдается увеличение выживаемости клеток, что связано с возобновлением процесса деления. При увеличении и уменьшении интенсивности деления клеток временной интервал между фракциями для разных типов клеток неодинаков.

На растительных клетках установлено, что с увеличением времени между фракциями выживаемость клеток возрастает до определенного значения времени, после которого она не зависит от интервала времени между фракциями. Это происходит, потому что с увеличением времени между фракциями большинство клеток переходит в более устойчивые фазы клеточного цикла, поэтому возобновляется нормальный процесс деления клеток. Эффективность восстановления сублетальных повреждений оценивается по двум показателям: **1-й показатель** – величина фактора восстановления. Это отношение выживаемости клеток при фракционированном облучении ($N_{\text{фр}}$) к выживаемости клеток при однократном облучении ($N_{\text{од}}$). Его величина зависит от скорости перехода клеток в более радиочувствительные фазы цикла и от репарации. Фактор восстановления определяется по формуле $\text{ФВ} = N_{\text{фр}}/N_{\text{од}}$;

2-й показатель – величина разности доз двукратного и однократного облучений, при которых наблюдается одинаковый радиобиологический эффект. Он определяется по формуле $\text{ЭВ} = D_2 - D_1$. При дроблении дозы на большее количество фракций формула имеет другой вид: $\text{ЭВ} = (D_2 - D_1) \times (N - 1)$, где N – количество фракций.

Потенциально летальные повреждения – это такие изменения, которые вызывают гибель клеток, но в определенных условиях могут полностью восстанавливаться, поэтому гибель клеток не наблюдается. Они выявляются по изменению выживаемости клеток под влиянием изменения условий, в которых клетки находятся в первые часы после облучения. В разные годы на клетках различных объектов установили влияние условий пострадиационного культивирования клеток на их выживаемость. В 1959 году В.И. Корогодин доказал существование восстановления потенциально летальных повреждений на клетках дрожжей. Облученную суспензию клеток он высевал в двух вариантах: на питательную среду и на «голую среду» и определял выживаемость клеток. У клеток, высеянных на питательную среду, выживаемость составляла 0,2%, а у клеток, высеянных на «голую среду», выживаемость составила 40%. Повышение выживаемости облученных клеток на «голой среде» произошло за счет репарационных процессов. Для выявления репараций облученные клетки культивируют в необычных условиях: 1) на растворах, лишенных питательных веществ («голая среда»); 2) на растворах с недостатком сахарозы; 3) на растворе хлористого натрия; 4) на растворах, содержащих вещества, подавляющие процессы обмена веществ; 5) при пониженной температуре; 6) в темноте.

Не все сублетальные и потенциально летальные повреждения подвергаются репарации, поэтому восстановление клеток от повреждений не бывает полным. Невосстановленные повреждения также могут быть результатом ошибочной репарации. Классификация повреждений клеток при облучении на потенциально летальные и сублетальные носит относительный и условный характер, потому что природа этих повреждений одинакова.

2. Молекулярные механизмы репараций при облучении клеток.

Причинами сублетальных повреждений являются однонитевые разрывы ДНК, а причинами потенциально летальных повреждений – двунитевые разрывы ДНК. Поэтому репарация клеток сводится к репарации молекулы ДНК. Репарация повреждений молекулы ДНК – это сложный процесс, все

механизмы которого в клетке многократно продублированы и находятся под генетическим контролем. Некоторые виды репарации, например эксцизионная репарация коротких участков ДНК, проходят практически без ошибок. Репарация ДНК происходит при участии семи основных групп ферментов:

- 1) нуклеазы (вырезают поврежденные основания);
- 2) инсертазы (встраивают новое основание, идентичное поврежденному);
- 3) лиазы (расщепляют пиримидиновые димеры);
- 4) эндонуклеазы (разрезают ДНК возле поврежденного основания);
- 5) экзонуклеазы (удаляют поврежденный участок);
- 6) ДНК-лигазы (сшивают нуклеатиды);
- 7) ДНК-полимеразы (контролируют синтез ДНК на комплиментарной матрице).

Выделяют три типа репарации ДНК:

1. **Дорепликативная репарация**, т.е. восстановление ДНК до синтеза. Она состоит из двух процессов: **ферментативного** и **эксцизионного**. **Ферментативная репарация** – это восстановление однонитевых и двунитевых разрывов с участием ферментов (лигаза, эндонуклеаза и ДНК-полимераза). Например, восстановление однонитевых разрывов происходит при участии лигазы и идет в два этапа: 1) образование фермент-субстратного комплекса; 2) встраивание комплекса в молекулу ДНК и восстановление ее структуры. Восстановление поврежденной цепи ДНК при помощи ферментов отражено на рис. 5.

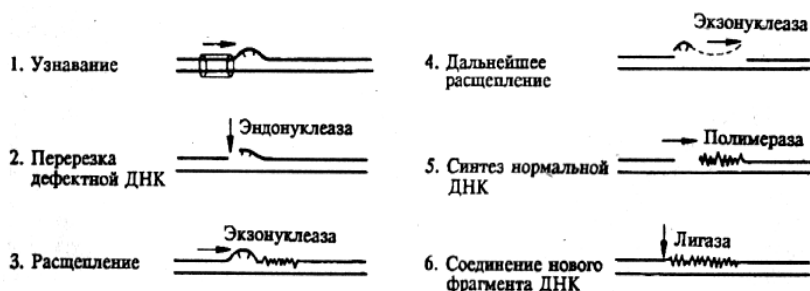


Рис.5. Восстановление поврежденной цепи ДНК при помощи репарирующих ферментов.

Предполагается, что существует три типа репарации однонитевых разрывов ДНК: 1) медленная репарация (до 1 часа); 2) быстрая репарация (до 10 минут); 3) сверхбыстрая (до 2 минут). Репарация двунитевых разрывов ДНК связана с восстановлением молекулярной массы ДНК и происходит за 2,5 часа. Для репарации двунитевых разрывов необходимо наличие неповрежденных участков в гомологичной нити ДНК. Репарация осуществляется путем генетической рекомбинации, т.е. путем формирования временного комплекса поврежденного участка и его восстановления на поврежденной нити ДНК. **Эксцизионная репарация** – это процесс вырезания поврежденных оснований в молекуле ДНК. Эксцизионная репарация происходит в **четыре этапа**: **1-й этап**: эндонуклеаза «узнает» поврежденный участок и производит разрез; **2-й этап**: экзонуклеаза удаляет поврежденный участок; **3-й этап**: при участии ДНК-полимеразы происходит синтез нового участка идентичного поврежденному; **4-й этап**: вставка

восстановленного участка и сшивка восстановленных участков ДНК-лигазой. Синтез ДНК осуществляется на восстановленной молекуле ДНК. Для прохождения этой репарации необходимо наличие неповрежденной комплиментарной цепи ДНК.

2.Репликативная репарация – восстановление ДНК в процессе удвоения. Этот вид репарации практически не изучен. Есть сведения о том, что повреждения ДНК удаляются в зоне роста цепи ДНК. Однако нет доказательств, что восстановленная ДНК идентична исходной.

3.Пострепликативная репарация – восстановление ДНК после удвоения. Этот тип репарации практически не изучен. Однако установлено, что ДНК не всегда полностью восстанавливается.

Если повреждения ДНК не восстановились, тогда в нитях дочерней ДНК будут пробелы, поэтому молекула ДНК будет иметь меньшую молекулярную массу. Установлено, что клетки могут сохранять жизнеспособность, несмотря на дефекты в ДНК. Сохранение измененной структуры ДНК в поколениях клеток является причиной отдаленных последствий облучения. Кроме вышеперечисленных типов репараций ДНК выделяют также **одноэтапную, ошибочную и индуцибельную репарацию ДНК**. При **одноэтапной** репарации некоторые типы повреждения оснований в молекуле ДНК очень быстро восстанавливаются под влиянием специфических ферментов за один этап, которые сразу вырезают и заменяют поврежденное основание или вставляют потерянное основание. При **ошибочной** репарации могут возникать нарушения молекулы ДНК, поэтому в результате ошибочной репарации формируются вторичные повреждения структуры ДНК или остаются неузнанными и невосстановленными дефекты молекулы ДНК. Ошибочная репарация всегда существует в природе, поэтому в естественных популяциях всегда возникают мутации, благодаря которым поддерживается определенный уровень спонтанного мутогенеза и полиморфизма популяций, что обеспечивает эволюционное развитие видов. При облучении ошибочная репарация проявляется в аномальной форме сублетальных и потенциально летальных повреждений. **Индукцибельная репарация, или SOS-репарация**, происходит в клетках при наличии «сигнала бедствия», т.е. когда в цепи ДНК имеются серьезные нарушения, а ферментативная система не включается в репарационные процессы, поэтому может происходить ошибочная репарация. При повреждении ДНК в облученных клетках могут возникать генные продукты, которые в норме в клетках отсутствуют и осуществляют и ускоряют репарацию ДНК. SOS-репарация имеет значение при адаптации видов к хроническому облучению, потому что появление генных продуктов способствует повышению радиоустойчивости клеток и организмов. Предполагается, что в клетках могут восстанавливаться непрочные поперечные сшивки между нитями ДНК и сшивки между нитями ДНК и белком.

У некоторых бактерий, гриба-нейроспора, сине-зеленой водоросли (анацистис), некоторых клетках животных и человека к настоящему времени выделены генные мутации, контролирующие радиационные процессы. Известны вещества, подавляющие репарацию ДНК, которые называются **ингибиторы**: кофеин, кумарин, акрифлавин, хлорамфиникол. Хорошо изучено действие кофеина, который подавляет эксцизионный процесс, активность ДНК-полимеразы и лигаз, пострепликативную репарацию и

рекомбинационные процессы. Молекула кофеина может вклиниваться между основаниями в молекуле ДНК, поэтому она маскирует нарушения ДНК, которые должна опознавать репарационная система. Предполагается, что в цитоплазме клеток есть эндогенные вещества, которые могут ускорять или замедлять репарацию и природа которых неизвестна.