**Конспекты**

**лекций по теме: «Биологическое действие излучений»**

***Лучевые реакции молекул***

В процессах взаимодействия ионизирующих излучений с веществом энергия излучений передается атомам и молекулам окружающей среды, в том числе клеток, тканей организмов. В механизме формирования биологического ответа на действие ионизирующих излучений на живые объекты условно можно выделить следующие этапы:

* **первичные физические явления** - поглощение энергии излучения атомами и молекулами биологического объекта, в результате чего они могут претерпевать возбуждение, ионизацию или диссоциацию;
* **радиационно-химические процессы,** при которых образуются свободные радикалы, взаимодействующие с органическими и неорганическими веществами по типу окислительно-восстановительных реакций;
* **биологические реакции** - обусловливают изменения функций и структур органов и систем и реакций целостного организма. Они определяют в конечном итоге механизм развития и специфику патологического процесса.

Энергия ионизирующих излучений при прохождении через биологическую ткань передается атомам и молекулам, что приводит к образованию ионов и возбужденных молекул. Это первый, физический этап формирования биологического ответа клетки на лучевое воздействие.

***Таблица 1. Электрические взаимодействия* *заряженных частиц со средой***

|  |  |
| --- | --- |
| http://profbeckman.narod.ru/MED9.files/MED9001.jpg | **Заряженные частицы.** Проникающие в ткани организма альфа и бета-частицы теряют энергию вследствие электрических взаимодействий с электронами тех атомов, близ которых они проходят. Гамма-излучение и рентгеновские лучи передают свою энергию веществу несколькими способами, которые в конечном счете также приводят к электрическим взаимодействиям. |
| http://profbeckman.narod.ru/MED9.files/MED9002.jpg | **Электрические взаимодействия**. За время порядка десяти триллионных секунды после того, как проникающее излучение достигнет соответствующего атома в ткани организма, от этого атома отрывается электрон. Последний, заряжен отрицательно, поэтому остальная часть исходного нейтрального атома становится положительно заряженной. Этот процесс называется ионизацией. Оторвавшийся электрон может далее ионизировать другие атомы. |
| http://profbeckman.narod.ru/MED9.files/MED9003.jpg | **Физико-химические изменения**. И свободный электрон, и ионизированный атом обычно не могут долго пребывать в таком состоянии и в течение следующих десяти миллиардных долей секунды участвуют в сложной цепи реакций, в результате которых образуются новые молекулы, включая и такие чрезвычайно реакционноспособные, как **"свободные радикалы".** |
| http://profbeckman.narod.ru/MED9.files/MED9004.jpg | **Химические изменения.** В течение следующих миллионных долей секунды образовавшиеся свободные радикалы реагируют как друг с другом, так и с другими молекулами и через цепочку реакций, еще не изученных до конца, могут вызвать химическую модификацию важных в биологическом отношении молекул, необходимых для нормального функционирования клетки. |
| http://profbeckman.narod.ru/MED9.files/MED9005.jpg | **Биологические эффекты.** Биохимические изменения могут произойти как через несколько секунд, так и через десятилетия после облучения и явиться причиной немедленной гибели клеток, или такие изменения в них могут привести к раку. |

В развитии поражения после воздействия ионизирующих излучений выделяют несколько стадий: физическую, физико-химическую, химическую и биологическую (табл. 2). Первые три из них оцениваются как первичные или добиологические. Они в значительной степени являются общими как для живых организмов, так и для химических соединений, их растворов, смесей.

***Таблица 2***

**Основные стадии в действии ионизирующих излучений на биологические системы**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Стадия** | **Процессы** | **Продолжительность** |
| **Физическая** | **Поглощение энергии излучения; образование ионизированных и возбужденных атомов и молекул** | **10-16 – 10-15 с** |
| **Физико-химическая.** | **Перераспределение поглощенной энергии внутри молекул и между ними, образование свободных радикалов** | **10-14 — 10~11 с** |
| **Химическая** | **Реакции между свободными радикалами и между ними и интактными молекулами.**  **Образование широкого спектра молекул с измененными структурой и функциональными свойствами** | **10-6 — 10-3 с** |
| **Биологическая** | **Последовательное развитие поражения на всех уровнях биологической организации —**  **от субклеточного до организменного; развитие процессов биологического усиления и репарационных процессов** | **секунды — годы** |

Соответственно, в живых клетках органическими н неорганическими (кроме воды) молекулами поглощается *около 25% энергии, а водой приблизительно 75%.*

На *физико-химической стадии* поглощенная энергия мигрирует по макромолекулярным структурам и распределяется между отдельными биомолекулами, что сопровождается разрывами химических связей там, где эти связи менее прочны. По окончании физико-химической стадии разрывы связей обнаруживаются преимущественно в определенных структурах. В белковых молекулах — это аминокислоты, в нуклеиновых кислотах — это азотистые (в первую очередь, пиримидиновые) основания.

В основе первичных радиационно-химических изменений молекул могут лежать два механизма:

**Прямое действие излучения**

**1) *прямое действие*,** когда данная молекула испытывает изменения (ионизацию, возбуждение) непосредственно при взаимодействии с излучением; ***Прямое действие*** *ионизирующего облучения может вызвать непосредственно гибель или повреждение (обратимое или необратимое) клеток организма.*

***Непрямое (косвенное)*** *действие излучения*

***Повреждение биомолекул*** *химически активными продуктами* ***радиолиза воды*** *называют****непрямым (косвенным)*** *действием излучения.*

**2) *косвенное действие*,** когда биологическая молекула непосредственно не поглощает энергию ионизирующего излучения, а получает **эту энергию** от радиолиза молекулы воды. Поскольку **60 - 70 %** массы биологической ткани составляет вода, рассмотрим различие между прямым и косвенным действием излучения на ее примере.

Начальные процессы радиолиза, приводящие к образованию радикалов **Н**• и **ОН**•, представлены на схеме:

**Н2О → Н2О+ + е**-

Вырванный электрон также очень быстро передает энергию окружающим молекулам воды, в результате чего возникает сильно возбужденная молекула воды **Н2О+**, которая диссоциирует с образованием отрицательного иона воды:

**Н2О** + **e- → Н2О**-

Ионы такого рода, образование которых возможно только при действии ионизирующего излучения, крайне не устойчивы. Эти ионы **Н2О+** и**Н2О**-

отличаются от образующихся при электролитической диссоциации молекул воды ионов **Н+** и **ОН**-. Продуктом превращения **Н2О+** и **Н2О**- являются свободные радикалы. При расщеплении ионов воды образуются свободные радикалы:

**Н2О+** → **Н+** + **ОН**• и **Н2О**- → **Н**• + **ОН**-

Точка у химического символа означает, что данный атом или группа атомов являются свободными радикалами. Итак, при воздействии ионизирующего излучения на чистую воду возникают свободные радикалы **Н**• и **ОН**•. **Н**• – это атомарный водород. В таком состоянии атом водорода может существовать только очень короткое время – порядка 10**-5** – 10**-6** сек.

В этот срок два атома водорода либо соединяются вместе, образовав молекулу водорода, либо образовавшиеся при расщеплении молекулы воды свободные радикалы **Н**• и **ОН**• соединятся, создав молекулу воды, либо **Н**• потеряет электрон, отдав его другому атому, и превратится в ион **Н+** либо же, наконец, если в воде растворено какое-нибудь вещество, **Н**• может присоединиться к нему. Столь же неустойчив и свободный радикал **ОН**•. В этой совокупности атомов одна валентность кислорода связана с водородом, а другая остается не занятой. Для превращения в устойчивое соединение необходимо замещение в радикале **ОН**• свободной валентности. Нужно, чтобы непарный электрон стал парным и в образовавшейся молекуле было бы четное число электронов.

Гидроксильный ***радикал ОН****•****,*** образующийся в процессе радиолиза воды, выступает как очень ***сильный окислитель***. Радикал водорода **Н**• и гидратированный электрон обладают высокой реакционной способностью ***как восстановители.***

***Свободные радикалы содержат неспаренные электроны и отличаются чрезвычайно высокой реакционной способностью.*** Время их жизни в воде не более **10-5 с**. За это время они либо рекомбинируют друг с другом, либо реагируют с субстратом.

**H•+H•→H2**

**OH• + OH• → H2O2**

Свободный радикал химически весьма активен. В присутствии растворенного в воде кислорода образуются и другие продукты радиолиза:

Ионизирующее излучение → **Н2О + O2 → OH• + HO2•** (гидропероксид)

или **H• + O2 → HO2•**

*Таким образом, разложение воды, в которой растворен кислород, идет с образованием радикала HO****2****•.*

Полагают, что радикал HO**2**•, соединяясь с таким же радикалом, превращается в перекись водорода и кислород.

**HO2• + HO2• → H2O2• + O2•**

При наличии в воде растворенного соединения радикал HO**2**• или как его называют гидропероксид, в силу своих окисляющих свойств будет отнимать электрон от другого соединения, превращаясь в ион HO**2**-, а последний во всех растворах, кроме сильнощелочных, переходит в перекись водорода:

**HO2• + Н+ → H2O2•**

Образованием ***свободных радикалов завершается физико-химическая стадия*** действия ионизирующего излучения на поглощающую среду.

*В следующей стадии –* ***химической*** *свободные радикалы реагируют с растворенными в воде веществами.* Преимущественно, это будет ***реакция окисления*** *(с присоединением кислорода, отнятием водорода или отнятием электрона)****,*** но возможны и ***реакция восстановления*** *(отнятием кислорода, присоединением водорода или электрона).*

В среде, содержащей *органические вещества (белки, углевлды*, *нуклеиновые кислоты*) образуются ***их свободные радикалы***, более долгоживущие, чем радикалы воды.

Получающиеся в процессе радиолиза воды свободные *радикалы и окислители, обладая высокой химической активностью, вступают в химические реакции с молекулами белка, ферментов и других структурных элементов* биологической ткани, что приводит к изменению биологических процессов в организме. В результате ***нарушаются обменные процессы, подавляется активность ферментных систем, замедляется и прекращается рост тканей, возникают новые химические соединения, не свойственные организму, - токсины.*** Это приводит к нарушению жизнедеятельности отдельных систем или организма в целом. Здесь реакций идут с разрывом связи -С-Н, разрыв двойной межуглеродной связи, отщепление присоединенной группы NH2. Также идет процесс *димеризация -* образование нового вещества путём соединения двух структурных элементов (молекул, в том числе белков) в *комплекс (димер).*  Одним из важных примеров может служить *димеризация пиримидинов* в составе молекулы ДНК, приводящая к *возникновению меланомы у человека. Дезаминирование* — процесс удаления аминогрупп от аминокислот в ходе дезаминирования, с образованием а*ммиака.* Аммиак является токсичным для человека, поэтому существуют ферменты, превращающие аммиак в мочевину или мочевую кислоту. Все эти процессы приводят к образованию токсических организму продуктов типа альдегиды, кетоны, спирты.

На молекулярном уровне облучение биосистем вызывает набор характерных изменений, обусловленных *взаимодействием биомолекул с самим излучением либо продуктами радиолиза воды.* К таким изменениям относятся *разрывы, сшивки, изменения последовательности мономеров в молекулах биополимеров, потеря ими фрагментов, окислительная модификация, образование аномальных химических связей с другими молекулами и др.*

***Индуцированные свободными радикалами химические реакции вовлекают в этот процесс многие сотни и тысячи молекул, не затронутых излучением***. *В этом состоит специфика действия ионизирующего излучения на биологические объекты.* Никакой другой вид энергии (тепловой, электрической и др.), поглощенной биологическим объектом в том же количестве, не приводит к таким изменениям, какие вызывают ионизирующее излучение.

В дальнейшем происходит ***миграция поглощенной энергии* по *макромолекулярным структурам, разрывы химических связей, образование свободных радикалов и реакции между ними и исходными молекулами.*** При этом возникают ***молекулы нового****, часто* ***чужеродного для организма*** *состава.* *Эти эффекты* могут быть ***следствием поглощения энергии* излучения самими *макромолекулами белков, нуклеопротеидов, структурами внутриклеточных мембран.*** В этом случае говорят **о *прямом действии***излучения.

*В клетке организма в аналогичной ситуации процесс протекает значительно сложнее, чем при облучении воды, так как поглощающим веществом здесь служат крупные органические молекулы, повреждаемые прямым действием радиации либо продуктами радиолиза воды. Возникающие при этом органические радикалы также обладают не спаренными электронами, а, следовательно, крайне реакционноспособны. Располагая большим количеством энергии, они легко могут привести к разрыву химических связей в жизненно важных макромолекулах. Кроме того, биологический эффект облучения усиливается за счет кислорода, который всегда присутствует в среде и обладает сенсибилизирующим действием (см. ниже). Наиболее важными являются повреждения ДНК и биологических мембран*.

Виды радиационных повреждений ДНК и механизмы их репарации.

При облучении клетки поражаются все ее структуры. 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.

Среди ***нуклеиновых кислот***наиболее вероятной внутриклеточной мишенью

является **ДНК -** самая большая по размеру и наиболее биологически значимая молекула.

При *радиолизе нуклеиновых кислот* обнаружены разрывы молекулы ДНК, потерю оснований и изменения их состава, изменения *изменения в азотистых основаниях,*  нуклеотидных последовательностей, **сшивки ДНК—ДНК и ДНК—белок,** отмечены *разрывы гликозидной связи* ***углевод-основание*** и *фосфоэфирной связи* ***углевод-фосфат.*** Кроме того, происходят ***одиночные и двойные разрывы тяжей ДНК***, ***разрывы водородных связей*** между ***комплементарными основаниями в двойной спирали, ковалентные сшивки.*** *Двойные разрывы тяжей ДНК являются* ***критической реакцией для репродуктивной гибели клеток.***

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.

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.

Одиночные разрывы не приводят к поломкам молекулы ДНК, так как разорванная нить прочно удерживается на месте водородными, гидрофобными и другими видами взаимодействий с противоположной нитью ДНК и, кроме того, структура довольно хорошо восстанавливается мощной системой репарации. Многие авторы поэтому склонны думать, что одиночные разрывы сами по себе (если они не переходят в двойные) не являются причиной гибели клеток.

При действии излучений с небольшой плотностью ионизации (γ- и рентгеновское излучение, быстрые электроны***) 20—100 одиночных разрывов вызывают один двойной.***

***Плотно ионизирующие излучения вызывают значительно большее число двойных разрывов.***

Такие виды лучевого поражения макромолекул удается регистрировать непосредственно после облучения в виде аберраций хромосом.

***Расчеты показывают, что уже при дозе 1 Гр в каждой клетке человека повреждается 5000 оснований молекул ДНК, возникает 1000 одиночных и 10 - 100 двойных разрывов, каждый из которых может стать причиной возникновения аберрации.***

***При дозах до 20 Гр*** двойные разрывы являются следствием одновременного повреждения обеих нитей ДНК. С увеличением дозы облучения, более того, возрастает вероятность перехода одиночных разрывов в двойные, так как увеличивается возможность того, что независимые разрывы в противоположных цепях возникают друг против друга.

***Непосредственной причиной репродуктивной гибели клеток являются, прежде всего, двойные разрывы цепей ДНК и повреждения ДНК-мембранного комплекса.***

***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.

Разрывмежатомных 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.

*Разрывы скелета ДНК частично элиминируются самостоятельно, частично с помощью систем ферментативной репарации. Репарация не всегда заканчивается восстановлением исходной молекулы.* Неправильное воссоединение разрывов приводит к возникновению *хромосомных перестроек (аберраций).* Разрывы молекулы ДНК и окружающих ее белков при неправильном воссоединении приводят *к образованию ДНК-белковых сшивок.*

Еще одним важным для организма результатом лучевого повреждения ДНК является возникновение наследуемых повреждений ***генетического материала - мутаций, следствием которых может быть злокачественное перерождение соматических клеток (клетки тела) или дефекты развития у потомства***. Вызванная облучением дестабилизация ДНК, *процесс репарации* ее повреждений могут способствовать внедрению в геном клетки или активации онковирусов, ранее существовавших в геноме в репрессивном состоянии. При воздействии малых доз облучения эти процессы являются одним из наиболее существенных проявлений повреждающего действия радиации.

Повреждения ДНК в дальнейшем проявляются хромосомными аберрациями, основными видами которых являются фрагментация хромосом, формирование хромосомных мостов, дицентриков, кольцевых хромосом, внутри- и межхромосомных обменов и т. п. В их основе лежат одиночные и двойные

разрывы цепочек ДНК, повреждения ДНК-мембранного комплекса, разрушение связей ДНК-белок, повышающее уязвимость ДНК при атаке вторичными радикалами и ферментами, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, нарушения вторичной, третичной и четвертичной структуры этого биополимера. Некоторые из этих повреждений, в частности одиночные разрывы, могут подвергаться репарации с участием ферментов эндонуклеаз, экзонуклеаз, ДНК-полимераз, ДНК-лигаз. Двунитевой разрыв ДНК чаще всего не подвергается репарации и приводит к гибели клетки, а неправильная репарация приводит к появлению мутаций.

Каждое из этих событий могло бы иметь фатальные последствия, *если бы не существовало системы, способной ликвидировать большинство возникших повреждений ДНК.* Существование в клетках *механизмов и ферментных систем, обеспечивающих восстановление большинства начальных повреждений ДНК*, обусловлено необходимостью поддержания стабильности генома, восстановления от постоянно возникающих повреждений ДНК в результате воздействия радиационного фона, присутствия в среде химических мутагенов***. Без таких механизмов организм не достигнет взрослого состояния,*** *не оказавшись жертвой злокачественного образования или каких-то других последствий повреждения генетического материала.*

Доказано существование **ферментативных систем,** способных репарировать начальные радиационные повреждения генетического аппарата клетки. Изучение биохимических механизмов ***репаративных процессов*** показало, что ***облученные клетки способны выщеплять поврежденные азотистые основания, воссоединять разрывы полинуклеотидных цепей ДНК.***

*Становится общепринятым* ***рассмотрение радиобиологического эффекта как результата интерференции*** *двух противоположно направленных процессов — развития начального радиационного поражения и его элиминации за счет функционирования репарирующих систем.*

***Репарация***свойственный клеткам всех организмов процесс восстановления природной структуры ДНК, поврежденной при нормальном биосинтезе ее в клетке или под воздействием различных физических или химических агентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки.

**Основные группы ферментов репарации:**

1. нуклеозидазы - производят выщепление оснований;

2. инсертазы - производят встраивание оснований

3. лиазы - производят расщепление пиримидиновых димеров;

4. эндонуклеазы - проводят инцизию - разрез ДНК возле повреждения;

5. экзонуклеазы - проводят эксцизию - удаление поврежденного участка;

6. ДНК-полимеразы - проводят синтез ДНК по комплементарной матрице;

7. ДНК-лигазы - производят сшивку нуклеотидов.

Восстановление одиночных разрывов - происходит с участием ДНК-лигаз, характерна при действии ионизирующих излучений, вызывающих образование большого числа однонитевых разрывов ДНК.

Восстановление двойных разрывов - возможно в том случае, когда имеется копия генетической информации (например, при диплоидном наборе хромосом). В основе данной репарации - сложный процесс рекомбинации с реципрокным обменом нитей ДНК и последующим восстановлением повреждений. При этом образуются так называемые "структуры Холидея", которые в дальнейшем подвергаются разделению с образованием 2 нормальных нитей ДНК.

Изменения обнаруживаются и в других молекулярных компонентах клетки. Наблюдаются повреждения азотистых оснований и разрывы цепей РНК,

**РНК,** представленную в клетке рядом форм – ***матричной, рибосомальной, транспортной,*** относят к массовым структурам клетки: *они повторяются, содержась во многих копиях*, и в случае необходимости могут синтезироваться в требуемом количестве. Поэтому *радиационное повреждение РНК не столь ответственно за лучевое поражение клетки,* как *повреждение молекул ДНК.* В основном *типы радиационных повреждений РНК сходны с таковыми для ДНК.*

***Радиочувствительность*** ***белков***во многом определяется *радиочувствительностью входящих в их состав аминокислот.* Ряд ***радиочувствительности аминокислот*** по мере ее снижения выглядит так: серосодержащие (*цистеин, метионин*); некоторые циклические (*тирозин, триптофан, гистидин*); имеющие в остатке азотсодержащие группы (*аргинин, аспарагин, глутамин*); аминокислоты, не содержащие в остатке присоединенных групп, или содержащие - ОН (*фенилаланин, пролин, валин, лейцин, изолейцин, глицин, серин, треонин).* Данные по радиочувствительности аминокислот нельзя безоговорочно переносить на белки - их поражаемость ***зависит от расположения остатков аминокислот, структуры белковой молекулы.***

При действии ионизирующих излучений на белковые молекулы индуцируются изменения в аминокислотных остатках, образующих макромолекулу. Эти изменения начинаются возникновением продуктов ***отщепления карбоксильных групп***с разрывом связи **С-С,** аминогрупп с разрывом связи **С-N.** Существенные изменения возникают в структуре остатков серусодержащих аминокислот. В водных средах существенную роль в радиационно-химических превращениях белковых молекул играют продукты *радиолиза воды –радикалы* **ОН**.и **гидратированный электрон**  ***aq e*** . В результате первичного размена энергии в молекуле белка возникают ***свободнорадикальные формы***, которые принимают участие в дальнейших реакциях. Через промежуточные соединения, образующиеся по центрам локализации свободнорадикальных состояний, белки расщепляются и образуются ***фрагменты*** белковых молекул. Вместе с тем, свободные радикалы могут инициировать процессы полимеризации в разных участках белковой молекулы, образовывать *амиды и карбонильные соединения;* *нарушения водородных связей может сопровождаться* ***денатурацией белков.***

*Неодинаковость радиационного повреждения различных аминокислотных остатков в молекуле белка является причиной нарушения вторичной и третичной структур белка.* Кроме того, может нарушаться функционирование **активных центров ферментов** или же центров аллостерического взаимодействия.

С утратой свойственных неповрежденным белкам конформационных состояний связано ослабление способности белка к молекулярному узнаванию, определяющему самосборку надмолекулярных структур, таких, как мультиэнзимные комплексы, хроматин, цитоскелет, электрон-транспортная цепь митохондрий (хлоропластов).

Учитывая *множественность молекул* отдельных белков, возможность их синтеза **de novo** в случае дефицита, при умеренных облучениях ***прямое повреждение белковых молекул не имеет решающего значения для жизнеспособности клеток.***

Основной количественной характеристикой радиационно-химических процессов является величина выхода продуктов реакции.

Другая мишень действия радиации на клетки - **внутриклеточные мембраны**.

Например, *во множественных участках мембран* излучение инициирует цепи **перекисного окисления** липидов. Развитие окислительных процессов принимает **автокаталитический** характер, *происходит массовая деградация мембран и связанных с ней ферментативных ансамблей, нарушается ионный гомеостаз клетки, накапливаются токсические продукты, высвобождаются ферменты из мест специфической локализации и т. д.* И как следствие этого к дезорганизации ядерных структур и гибели клетки.

***Фосфолипиды***формируют клеточные мембраны. Они могут служить *мишенью*, так как повреждение их даже в небольших количествах может изменить *проницаемость мембран и нарушить обменные процессы в клетке.*

*Радиолиз* ***углеводов***начинается с ***отщепления водорода от одного из углеродных атомов*** с образованием ***углеводного радикала.*** После этого *отщепление молекулы воды и присоединение к радикалу Н или ОН приводит к образованию карбонильного соединения.*

В зависимости от ***величины*** поглощенной дозы и *индивидуальных особенностей организма*, вызванные изменения могут быть ***обратимым****и* или ***необратимыми*.**

В дальнейшем под действием физиологических процессов в клетках возникают функциональные изменения, подчиняющиеся уже биологическим законам жизни и гибели клеток, и отклонения в жизнедеятельности организма.

**2.1. Молекулярный уровень воздействия**

При облучении водных растворов даже чистых химических веществ могут наблюдаться чрезвычайно сложные процессы. Тем более это относится к таким сложным молекулам, как белки или нуклеиновые кислоты, которые в результате облучения подвергаются различным химическим или физико-химическим изменениям.

**Схема катаболизма нуклеиновых**

**кислот и нуклеотидов.**

При физическом взаимодействии ионизирующего излучения с живыми тканями в процессе превращения этого излучения в химическую энергию в организме зарождаются *активные центры радиационно-химических реакций.* Основным непосредственным результатом поглощения энергии излучения любым веществом, в частности биообъектом, является *ионизация и возбуждение его атомов и молекул.* При этом образуются *«горячие» (высокоэнергетичные) и исключительно реакционные частицы – осколки молекул: ионы и свободные радикалы.* В дальнейшем происходит ***миграция поглощенной энергии* по *макромолекулярным структурам и между отдельными молекулами, разрывы химических связей, образование свободных радикалов и реакции между ними и другими, как уже поврежденными, так и исходными молекулами.*** При этом возникают *молекулы нового, часто* ***чужеродного для организма*** *состава.* ***Эти эффекты*** могут быть *следствием поглощения энергии* излучения самими *макромолекулами белков, нуклеопротеидов, структурами внутриклеточных мембран.* В этом случае говорят о *прямом действии* излучения. Поскольку у человека основную часть массы тела составляет *вода (порядка 75%),* *первичные процессы* во многом определяются поглощением излучения водой клеток, *ионизацией молекул воды с образованием высокоактивных в химическом отношении* ***радикалов типа ОН- и Н+ .*** В присутствии ***кислорода образуется также свободный радикал гидроперекиси (H2O-) и перекись водорода (H2O2), являющиеся сильными окислителями.***При радиолизе воды происходит сдвиг кислотно-щелочного баланса, изменения в окислительно-восстановительных процессах, приводящие к нарушению обмена веществ в организме. *Продукты радиолиза активно вступают в реакцию с белковыми молекулами, часто образуя токсичные соединения.* Образовавшиеся *исключительно вредные для организма и реакционноспособные перекисные соединения, запускают целую цепь последовательных биохимических реакций и постепенно приводят к разрушению клеточных мембран (стенок клеток и других структур).* Это приводит к нарушениям жизнедеятельности отдельных функций или систем организма в целом.

Среди ***нуклеиновых кислот***наиболее вероятной внутриклеточной мишенью

является **ДНК - самая большая по размеру и наиболее биологически значимая молекула.** *Мономерные* составляющие нуклеиновых кислот - ***нуклеотиды*** – включают в себя *три компонента*: ***азотистое основание (пурин или пиримидин),* *пентозу (рибозу или дезоксирибозу) и фосфат-ион.*** При *радиолизе нуклеиновых кислот* обнаружены *изменения в азотистых основаниях,* отмечены *разрывы гликозидной связи* ***углевод-основание*** и *фосфоэфирной связи* ***углевод-фосфат.*** Кроме того, происходят ***одиночные и двойные разрывы тяжей ДНК***, ***разрывы водородных связей*** между ***комплементарными основаниями в двойной спирали, ковалентные сшивки.*** *Двойные разрывы тяжей ДНК являются* ***критической реакцией для репродуктивной гибели клеток.***

**РНК,** представленную в клетке рядом форм – ***матричной, рибосомальной, транспортной,*** относят *к массовым структурам клетки*: *они повторяются, содержась во многих копиях*, и в случае необходимости могут синтезироваться в требуемом количестве. Поэтому *радиационное повреждение РНК не столь ответственно за лучевое поражение клетки,* как *повреждение молекул ДНК.* В основном *типы радиационных повреждений РНК сходны с таковыми для ДНК.*

***Радиолиз углеводов***начинается с ***отщепления водорода от одного из углеродных атомов*** с образованием ***углеводного радикала.*** После этого *отщепление молекулы воды и присоединение к радикалу Н или ОН приводит к образованию карбонильного соединения.*

***Повреждение биомолекул*** *химически активными продуктами* ***радиолиза воды*** *называют****непрямым (косвенным)*** *действием излучения.*

В зависимости от ***величины*** поглощенной дозы и *индивидуальных особенностей организма*, вызванные изменения могут быть ***обратимым****и* или ***необратимыми*.**

Прямое действие ионизирующего облучения может вызвать *непосредственно гибель или повреждение* (обратимое или необратимое) *клеток* организма. В дальнейшем под действием физиологических процессов в клетках возникают функциональные изменения, подчиняющиеся уже биологическим законам жизни и гибели клеток, и отклонения в жизнедеятельности организма.

Радиочувствительность ***белков***во многом определяется р*адиочувствительностью* *входящих в их состав аминокислот.*  Ряд ***радиочувствительности аминокислот*** по мере ее снижения выглядит так: серосодержащие (*цистеин, метионин*); некоторые циклические (*тирозин, триптофан, гистидин*); имеющие в остатке азотсодержащие группы (*аргинин, аспарагин, глутамин*); аминокислоты, не содержащие в остатке присоединенных групп, или содержащие - ОН (*фенилаланин, пролин, валин, лейцин, изолейцин, глицин, серин, треонин).* Данные по радиочувствительности аминокислот нельзя безоговорочно переносить на белки - их поражаемость ***зависит от расположения остатков аминокислот, структуры белковой молекулы.***

При действии ***ионизирующих излучений на белковые молекулы*** индуцируются изменения в аминокислотных остатках, образующих макромолекулу. Эти изменения начинаются возникновением продуктов ***отщепления карбоксильных групп***с разрывом **связи С-С,** аминогрупп с разрывом **связи С-N.** Существенные изменения возникают в структуре остатков серусодержащих аминокислот. В водных средах существенную роль в радиационно-химических превращениях белковых молекул играют продукты *радиолиза воды –радикал*

**ОН**.и **гидратированный электрон**  ***aq e*** . В результате первичного размена энергии в молекуле белка возникают ***свободнорадикальные формы***, которые принимают участие в дальнейших реакциях. Через промежуточные соединения, образующиеся по центрам локализации свободнорадикальных состояний, белки расщепляются и образуются ***фрагменты*** белковых молекул. Вместе с тем, свободные радикалы могут инициировать процессы полимеризации в разных участках белковой молекулы, образовывать *амиды и карбонильные соединения;* *нарушения водородных связей может сопровождаться* ***денатурацией белков.***

*Неодинаковость радиационного повреждения различных аминокислотных остатков в молекуле белка является причиной нарушения вторичной и третичной структур белка.* Кроме того, может нарушаться функционирование **активных центров ферментов** или же центров аллостерического взаимодействия.

С утратой свойственных *неповрежденным белкам* конформационных состояний связано *ослабление способности белка к молекулярному узнаванию, определяющему самосборку надмолекулярных структур,* таких, как мультиэнзимные комплексы, хроматин, цитоскелет, электрон-транспортная цепь митохондрий (хлоропластов).

Учитывая *множественность молекул* отдельных белков, возможность их синтеза **de novo** в случае дефицита, при умеренных облучениях ***прямое повреждение белковых молекул не имеет решающего значения для жизнеспособности клеток.***

Основной количественной характеристикой радиационно-химических процессов является величина выхода продуктов реакции.

**Радиационно-химический выход** измеряется ***числом превратившихся в ходе радиационно-химической реакции молекул на 100 эВ поглощенной энергии излучения.*** Суммарный выход радиационно-химических превращений воды составляет около 4. Полное описание радиационно-химических процессов в клетке представляет собой сложную задачу и обычно ограничивается упрощенным подходом, обращая внимание на значение повреждений молекул, выполняющих наиболее важные в жизнедеятельности функции.

**2.2. Клеточный уровень воздействия**

Клеточный уровень воздействия включает в себя все нарушения и процессы, обусловленные изменениями функциональных свойств облученных клеточных структур. Наиболее *опасными повреждениями клетки являются повреждения механизма* ***митоза и хромосомного аппарата*** Количество клеток с такими повреждениями в облученной популяции находится ***в прямой зависимости от дозы облучения,*** блокирования процессов физиологической регенерации, жизнестойкости организма. Изменения на клеточном уровне приводят к *нарушению наследственных структур, угнетению кроветворения, подавлению сперматогенеза,* т.е., в конечном счете, влияют на весь механизм жизнедеятельности организма многоклеточных и высших животных.

Повреждения внутриклеточных структур приводят к изменению, извращению *метаболических процессов* в клетках, следствием чего является появление новых нарушений уже после окончания воздействия радиации. Например, нарушения строения нуклеотидов и их последовательностей в ДНК и РНК ведут к дефициту необходимых для нормальной жизнедеятельности продуктов матричного синтеза, а также к наработке несвойственных клетке, чужих для нее продуктов. Нарушение структуры ферментов приводит к замедлению ферментативных реакций, накоплению аномальных метаболитов, часть которых имеют свойства радиотоксинов. Такой ход событий назван «биологическим усилением». В результате совокупности этих процессов могут возникнуть серьезные нарушения жизнедеятельности, и даже гибель клетки. С другой стороны, возникшие повреждения могут быть залечены с восстановлением в итоге нормальной жизнедеятельности клетки. Чем выше доза облучения, тем больше возникает первичных повреждений, и тем меньше возможность их полного восстановления. Повреждение и гибель клеток лежат в основе развития поражения тканей, органов и организма в целом при всех видах радиационных воздействий.

*Метаболизм* – 1) то же, что обмен веществ. 2) В более узком смысле – *промежуточный обмен*, т.е. превращение определенных веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

В клеточных популяциях с митотическим делением клеток после облучения сначала отмечается *кратковременное увеличение частоты митозов, а затем падение до определенной минимальной величины.***Подобное явление назвали «*первичным эффектом излучений*».** Вслед за этим *число делящихся клеток снова увеличивается при условии, что величина дозы излучений была не очень велика и не все клетки потеряли способность к размножению.* Минимальное число митозов и время их появления зависят от величины дозы излучений. В случае *облучения, раковых клеток*, когда применяются обычные для лучевой терапии дозы, *минимальное число митозов большей частью наблюдается через несколько часов.* Затем следует *медленное повышение их числа,* что определяется как **«*вторичный эффект излучений*».**

Для первичного и вторичного эффекта излучений характерны определенные типы хромосомных изменений. При *первичном эффекте в клетках*, еще сохраняющих митотическую активность, обнаруживаются преимущественно следующие типы хромосомных изменений: *пикноз ядра, псевдоамитозы и склеивание хромосом, а также агглютинация хроматина.* В противоположность этому *при вторичном эффекте* наблюдаются *структурные изменения хромосом.* Хромосомные аберрации вторичного эффекта морфологически проявляются в клетках преимущественно в виде образования фрагментов и хромосомных мостиков.

Механизм хромосомных изменений при первичном и вторичном эффекте различен. Хромосомные изменения, типичные для первичного эффекта, возникают главным образом в тех клетках, которые во время облучения имели митотическую активность и находились в стадии метафаза. У определенного числа этих клеток наблюдаются митозы, частота которых снижается в результате облучения. У других митотически делящихся клеток, достигших или прошедших стадию метафазы, митозы продолжаются, но в более замедленном темпе.

**Феномен пострадиационного восстановления** обусловлен тем, что при облучении в клетках, среди прочих, возникают и такие повреждения, которые обычно приводят клетку к гибели, но при определенных условиях могут быть устранены системами ферментативной репарации. **Такие повреждения принято называть потенциальными.** Их дальнейшая судьба после возникновения двоякая: либо они репарируются, и тогда клетка выживает, либо реализуются, и тогда она гибнет.

Термин потенциальное повреждение — чисто формальное, феноменологическое понятие, так как не определяет какое-либо конкретное молекулярное повреждение, а потому может применяться к любому виду радиационных поражений. В отношении репродуктивной гибели клеток наиболее изучены два вида потенциальных повреждений - ***сублетальные и потенциально летальные,*** различающиеся по способу их выявления.

Сублетальные повреждения выявляют методом фракционированного облучения, а потенциально летальные — по изменению выживаемости клеток под влиянием изменения условий, в которых они находятся в первые часы после облучения. Например, не исключено, что часть двойных разрывов ДНК, образовавшихся при облучении клеток в предсинтетический период, может быть восстановлена за время, оставшееся до репликации ДНК, а те из них, что клетка не успела «залечить» до момента синтеза ДНК, становятся летальными и вызывают ее гибель, образуя аберрации хромосом. Очевидно, что эффективность репарации, т. е. долю выживших клеток, можно увеличить, если искусственно удлинить период G1.

Среди молекулярных повреждений особое место занимает радиационное поражение ДНК, которую часто называют основной мишенью при действии радиации на клетки. Структуры ДНК уникальны. Если повреждения молекул других типов могут быть скомпенсированы за счет оставшихся неповрежденными молекул белков, полисахаридов и т.п., то в случае ДНК такой путь исключен. Однако, если дело идет о ДНК в *неделящихся клетках*, повреждение каких-то участков ее цепи может и не сказаться существенно на жизнедеятельности этих клеток. Для *делящихся клеток* значение повреждения ДНК трудно переоценить. Если в результате облучения возникли называвшиеся ранее повреждения ДНК, например, двойные разрывы или сшивки, нормальная репликация осуществиться не может. *При формировании хромосом повреждения ДНК проявляются возникновением мостов, фрагментов и других типов хромосомных аберраций, многие из которых летальны, поскольку при них невозможно равномерное распределение генетического материала между дочерними клетками.* Эта форма гибели клеток в *митозе* получила наименование *репродуктивной гибели*.

**Реакция клеток на облучение**

Судьба облученной клетки определяется соотношением эффективности процессов биологического усиления и репарации. Чем выше доза облучения, тем выше вероятность того, что в результате процессов биологического усиления появятся необратимые изменения, приводящие к гибели клетки, ее злокачественному перерождению, нарушению пролиферативной активности, ограничению дифференцировочных потенций, снижению функциональных возможностей и т. п. Чем ниже доза, тем меньше повреждений возникло в клетке и тем вероятнее восстановление от возникших повреждений, сохранение жизнеспособности и основных функций клетки.

Реакции клеток на облучение можно разделить на два основных типа: **летальные***,* при которых клетка погибает (репродуктивная и интерфазная клеточная гибель), и ***нелетальные,***при которых клетки сохраняют свою жизнеспособность (радиационный блок митозов, формирование нелетальных мутаций, развитие функциональных и метаболических нарушений в клетках).

*Во всех делящихся клетках сразу после облучения временно прекращается митотическая активность:* развивается так называемый ***«радиационный блок митозов».***Длительность задержки деления тем больше, чем выше доза, однако обычно радиационный блок митозов продолжается не дольше суток. Блок митозов объясняют нарушением процессов, регулирующих клеточное деление, в частности нарушением образования веретена, обеспечивающего расхождение хромосом в митозе. Задержка деления в клетках активно пролиферирующих тканей (таких, например, как костный мозг) является одной из существенных причин опустошения этих тканей. В то же время *торможение процесса деления объективно может* ***благоприятно*** *сказаться на судьбе облученной клетки, поскольку в результате увеличивается время для репарации лучевого повреждения до вступления клетки в митоз.* По выходе из блока митозов часть клеток, в которых не произошла репарация постлучевых повреждений, подвергаются гибели, причем с повышением дозы число погибающих клеток увеличивается. Различают *две основные формы гибели клеток:* ***репродуктивную***(митотическую, постмитотическую), связанную с процессом клеточного деления, и ***интерфазную***— не зависящую от фаз клеточного цикла и наблюдаемую как в делящихся, так и в неделящихся клетках.

Нерепарированные повреждения ядерной ДНК и неправильно воссоединенные разрывы цепей этого биополимера при формировании хромосом в процессе клеточного деления могут проявиться в качестве **хромосомных аберраций.** Наибольшее значение для возникновения аберраций придают двойным разрывам ДНК, повреждениям ДНК-мембранного комплекса, а также сшивкам между противоположными цепочками. При некоторых аберрациях пролиферирующая клетка длительно существовать не может, так как в митозе не происходит равномерного распределения генетического материала между дочерними клетками

(летальные аберрации). Если клетка имеет нерепарированные летальные повреждения ДНК, она может пройти через предшествующие митозу фазы клеточного цикла, завершить подгонку к делению, но в процессе самого митоза погибает. Чаще гибель клетки происходит при первом после облучения делении, реже - в одном из последующих. Такая форма гибели клетки получила наименование ***репродуктивной,***и она, естественно, характерна лишь для делящихся клеток. Наступление гибели по репродуктивному типу во времени связано с прохождением клетки через фазу митоза. При этой форме гибели именно во время самого митоза наличие хромосомных аберраций не дает возможности осуществить равномерное распределение генетического материала между дочерними клетками, в результате чего клетки погибают. Погибающие клетки и облученной популяции появляются вслед за возобновлением митотической активности. Если наступление этой фазы отодвинуть (даже таким повреждающим клетки фактором, как дополнительное облучение), отодвигается и время появления погибающих клеток.

Проявлением повреждения генетических структур клетки является также образование гигантских клеток, содержащих полиплоидные ядра. Их появление может быть связано с многократным прохождением клеткой S-фазы цикла без митоза или явиться результатом слияния дочерних клеток. Гигантские клетки в большинстве случаев погибают при последующих делениях.

При цитологическом исследовании репродуктивно погибающие клетки выявляются путем обнаружения в них хромосомных аберраций.

Вторым типом гибели клеток при облучении является ***интерфазная форма****.* Различают три варианта интерфазной формы лучевой

*Три основных типа реакции клетки на облучение:*

А) **Радиационный блок митозов** (временная задержка деления) — наиболее универсальная реакция клетки на воздействие ионизирующих излучений, ее длительность зависит от дозы: На каждый Грей дозы клетка отвечает задержкой митоза в 1 час. Проявляется данный эффект независимо от того, выживет ли клетка в дальнейшем, причем с увеличением дозы облучения увеличивается не число реагирующих клеток, а именно время задержки деления каждой облученной клетки. Эта реакция имеет огромное приспособительное значение: увеличивается длительность интерфазы, оттягивается вступление клетки в митоз, создаются Благоприятные условия для нормальной работы системы репарации ДНК.

Б) **Митотическая (репродуктивная) гибель клетки** — полная потеря клеткой способности к размножению; развивается при больших дозах ионизирующего излучения. Данный тип реакции не относится к клеткам, не делящимся или делящимся редко. В клетке не выражены дегенеративные процессы. Основная причина митотической гибели клетки — Повреждение хромосомного аппарата клетки, приводящее к дефициту синтеза ДНК.

*Показателем* ***выживаемости клетки*** *является ее способность проходить 5 и более делений.*

**Варианты митотической гибели:**

1) клетка гибнет в процессе одного из первых четырех пострадиационных митозов, невзирая на отсутствие видимых изменений;

2) облученные клетки после первого пострадиационного митоза формируют так называемые ***"гигантские" клетки*** (чаще в результате слияния "дочерних" клеток), которые способны делиться не более 2-3 раз, после чего погибают.

В) **Интерфазная гибель клетки** — гибель клетки, которая наступает до ее вступления в митоз. Для большинства соматических клеток человека она регистрируется после облучения в ***дозах в десятки и сотни Гр*** (лимфоциты, как радиочувствительные клетки, гибнут по этому механизму даже при небольших дозах). В клетке наблюдаются различные дегенеративные процессы вплоть до её лизиса.

***Механизм интерфазной гибели*** (последовательность реакций, приводящих к лизису клетки):

**1.** За счёт разрывов в молекуле ДНК нарушается структура хроматина. В свою очередь, в мембранах идёт процесс перекисного окисления липидов.

**2.** Изменения ДНК-мембранного комплекса вызывают остановку синтеза ДНК.

**3.** Повреждение мембраны лизосом приводит к выходу из них ферментов — протеаз и ДНК-аз

**4.** ДНК-азы разрушают ДНК, что ведет к пикнозу ядра. Повреждение мембран митохондрий ведёт к выходу из них кальция, который активирует протеазы.

Вышеперечисленные процессы приводят к гибели **(аутолизу)** клетки.

Радиационная биохимия нуклеиновых кислот. Основные типы репарации ДНК

На ядерную ДНК приходится около 7% поглощенной дозы.

**1. Интерфазная гибель неделящихся клеток** или клеток с ограниченной способностью к делению после облучения малыми дозами, порядка десятых долей — единиц грей. Так погибают малые лимфоциты, тимоциты, ооциты.

**2. Интерфазная гибель после облучения** в дозах порядка десятков и сотен ф ей неделящихся (нейроны, миоциты) или редко делящихся (гепатоциты) клеток.

**3. Интерфазная гибель делящихся клеток после облучения** высокими дозами до вступления в митоз. Интерфазная гибель клеток после облучения может развиваться по двум основным типам: некроза и апоптоза. *Некрозу* предшествует ряд изменений в клетках: нарушение синтеза АТФ, нарушение ядерного фосфорилирования, повышение проницаемости плазматической и внутриклеточных мембран, нарушение ионных градиентов в клетке, угнетение дыхания, активация протеолитических ферментов, нарушения ядерных структур, проявляющиеся вторичной деградацией дезоксирибонуклеопротеидного комплекса, лизисом или (реже) пикнозом ядра, выбросом содержимого клеток во внеклеточную среду. То есть это как бы пассивная гибель клетки, когда в результате возникшего повреждения подавляются метаболические процессы, утрачивается способность сохранять ионный гомеостаз.

При *апоптозе* (который наиболее характерен для клеток лимфоидной и кроветворной тканей) гибель облученных клеток сопровождается деградацией ДНК по межнуклеосомным линкерным участкам на фрагменты, размер которых кратен 180 парам нуклеотидов. Фрагменты распада ДНК - полидезоксинуклеотиды частично поступают во внеклеточную среду. В клеточных мембранах появляются поперечные сшивки, в результате чего образуются окруженные фрагментами плазматической мембраны мелкие пузырьки, содержащие фрагменты конденсированной ДНК и цитоплазмы. Эти пузырьки получили наименование ≪апоптотических телец≫. Апоптотические тельца могут быть фагоцитированы макрофагами и эпителиальными клетками. Процесс апоптоза запускается в ответ на различные (в том числе, на

повреждающие ДНК или клеточные мембраны) стимулы, сигналы от которых реализуются активацией определенных участков генома, например опухолевого супрессорного гена р53. Активация генома, в свою очередь, приводит к усиленному синтезу ферментов, функционирование которых и приводит клетку к самоуничтожению. Таким образом, апоптоз —это генетически опосредуемая программированная форма клеточной гибели.

*Клетки, гибнущие интерфазным путем,* удается выявить различными способами *по морфологическим признакам некроза и апоптоза*: по особенностям окраски при воздействии специальными красителями (эозин, эритрозин, акридин оранжевый), по поглощению радиоактивного хрома, по потреблению кислорода или подсчитывая количество клеточных ядер в органе (например, в тимусе). Частота клеток с пикнотическими ядрами в костном мозге в ранние сроки после облучения хорошо коррелирует с дозой облучения. Если в возникновении репродуктивной формы клеточной гибели первопричиной представляется повреждение уникальных структур ядерной ДНК, при интерфазной гибели в начальных проявлениях существенна роль повреждений множественных структур —внутриклеточных мембран, нарушений клеточного метаболизма. Но и при интерфазной форме непосредственной причиной гибели клеток является деградация ядерного хроматинн, т. е. повреждение генетического материала. Однако не все повреждения ядерной ДНК, вызванные облучением,

несовместимы с жизнеспособностью клетки. Если клетки не делится, а поврежденный участок не связан с кодированием какого-либо необходимого для нормального функционирования клетки процесса, возникшее нарушение структуры ДНК может остаться сначала как бы ≪незамеченным≫. Однако это не исключает возможности развития в последующем на основе этих нарушений дефектов структуры и функции клетки. Некоторые повреждения, например изменения структуры азотистых оснований или неточно репарированные разрывы, могут не привести к гибели и пролиферирующую клетку. Клетка может осуществить процесс деления и передать генетический дефект по наследству потомству. Такие нарушения структуры ДНК ***(нелетальные мутации)***в соматических клетках могут принести к нарушениям процессов клеточного деления, проявляющимся, например, уменьшение пролиферативного потенциала,

или явиться в последующем причиной ***злокачественной трансформации***. Если ***мутации возникли в зародышевых клетках, то они могут вызвать дефекты развития у потомства (генетические эффекты).***

Большое значение среди причин злокачественного перерождения клеток после облучения придают в настоящее время повышению нестабильности генома, связанному с репарацией ДНК. В процессе репарации возникают условия для ***внедрения в геном клетки онкогенов или активации онкогенов,*** уже предсуществовавших в составе клеточного генома в репрессированном состоянии.

К ***функциональным нарушениям***в клетках могут быть отнесены такие проявления, как *снижение фагоцитарной активности нейтрофилов* после облучения, *изменения активности некоторых ферментов* в этих клетках. При дозах облучения, превышающих *несколько десятков грей*, важным послелучевым эффектом является нарушение *функциональной активности нервных клеток,* связанное с дефицитом макроэргов, в результате расходования их предшественников в процессе репарации разрывов ДНК.

***Повреждение и гибель клеток, нарушение их пролиферации лежат в основе лучевого поражения тканей, органов, организма в целом.***

***Митоз* –** способ деления клеток, обеспечивающий тождественное распределение генетического материала между дочерними клетками и преемственность хромосом в ряду клеточных поколений. Обычно подразделяется на несколько стадий: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза. Часто митозом называется процесс деления не только ядра, но и всей клетки, т.е. включают в него цитотомию.

Однако многие клетки погибают после облучения еще до вступления в митоз, а следовательно, и до появления хромосомных аберраций.

Другая мишень действия радиации на клетки - **внутриклеточные мембраны**. Активация под влиянием облучения реакций свободнорадикального перекисного окисления липидов может привести к деструктивным изменениям мембран, к поражению мембраносвязанных ферментов, к нарушениям проницаемости мембран, нарушениям активного транспорта веществ через мембраны, снижению ионных градиентов в клетке, нарушениям процесса синтеза АТФ, к выходу ферментов из мест их специфической локализации, поступлению их в ядро и как следствие этого к дезорганизации ядерных структур и гибели клетки. Такой тип гибели клеток называется ***интерфазной гибелью***. По этому типу могут погибать как неделящиеся, так и делящиеся клетки. Другой причиной интерфазной гибели клеток после облучения является активация процессов ***апоптоза*,** в ходе которого происходит межнуклеосомная деградация хроматина, проявляющаяся позднее фрагментацией ядра. ***Радиационно-индуцированный апоптоз*** *часто рассматривается как результат включения программы клеточной гибели.* Процессы апоптоза наблюдаются в большинстве погибающих после облучения лимфоидных клеток. Продукты активирующегося под влиянием облучения перекисного окисления липидов являются «*радиотоксинами*», способными сами по себе оказывать эффекты, сходные с облучением. Их возникновение играет важную роль в механизмах развития лучевого поражения при с их образованием дистанционные эффекты облучения.

В результате облучения могут наблюдаться следующие ***основные виды клеточных реакций:*** *угнетение деления, разные типы хромосомных аберраций и различные летальные эффекты.* Угнетение клеточного деления носит временный, обратимый характер и может наблюдаться как у одноклеточных организмов, так и у клеток, составляющих ткани высших организмов. *Как правило, угнетение клеточного деления является результатом воздействия малых доз излучения.*

*При воздействии больших доз клеточное деление полностью прекращается и приводит к бесплодию.* При воздействии разных видов излучений длительность угнетения клеточного деления и процент клеток, у которых деление полностью прекратилось, возрастают по мере увеличения дозы излучения. *С увеличением дозы излучений все большее число клеток теряет способность к размножению или у них временно прекращается процесс деления.* Одним из показателей нарушения этой способности клеток к размножению как у одноклеточных, так и у клеток тканей высших организмов является ***возникновение гигантских форм клеток.***

*Под действием энергии радиоактивных частиц может происходить разрыв хромосом. В абсолютном большинстве случаев при этом клетки погибают, но в очень редких случаях, при наличии особых биохимических условий, клетки с поврежденными хромосомами делятся и дают начало новой ткани, не свойственной облученному органу (опухоли).*

*При этом вероятность развития опухоли тем больше, чем больше доза облучения на клетку и чем больше клеток подвергалось облучению одинаковой дозой. В результате гибели клеток при прямом действии ткань не справляется со своими функциональными нагрузками и наступает декомпенсация ее функции с клиническими нарушениями, свойственными потери функции облученного органа при других заболеваниях. Следует иметь ввиду, что все ткани обладают регенеративной способностью, т.е. способностью к восстановлению клеток на пораженном участке. Скорость регенерации клеток у различных тканей различна. На действие радиации ткани реагируют так же как на любой другой раздражитель: механический, термический, химический и др.*

Итак, в основе патогенного действия излучений на многоклеточные организмы, включая человека, ***лежит непосредственное лучевое поражение клеток.*** *Наиболее существенным является повреждение ядерного хроматина (хромосом), которое часто приводит к гибели клетки (летальный эффект), либо к возникновению в ней передающейся по наследству мутации. Результатом последней может явиться, например,* ***злокачественное перерождение клетки*** *и развитие через несколько лет* ***наследственных дефектов (генетический эффект).***

**РЕАКЦИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ НА ОБЛУЧЕНИЕ**

***Радиочувствительность***

Клетки разных типов и, соответственно, ткани, в состав которых они входят, весьма ***различаются по радиочувствительности.***

Если *гибель лимфоцитов или костномозговых клеток* удается зарегистрировать после облучения в ***десятых долях грея,*** то *мышечные и нервные клетки* *выдерживают нередко дозы в* ***десятки грей****.*

**Определенная закономерность** в распределении тканей по радиочувствительности была отмечена еще в самом начале изучения биологического действия излучений, и сформулирована в 1906 году французскими учеными **Бергонье и Трибондо** в виде правила, согласно которому ткани тем радиочувствительнее чем больше пролиферативная акивность составяющих их

клеток, и тем радиорезстентнее чем выше степень их дифференциовки

Высокую радиочувствительность именно активно пролиферирующих клеток связывают с особой ролью при облучении повреждения уникальных структур ядерной ДНК. Эти повреждения наиболее фатальны для делящихся клеток, когда, если не произошло репарации, они проявляются в процессе митоза как хромосомные аберрации, несовместимые с дальнейшей жизнедеятельностью.В этом и видят основную причину особой радиочувствительности пролиферирующих клеток.

Ткани и системы организма можно разделить на следующие группы:

♦высоко радичувствиельные лимфоидная ткань, костный мозг, эпителий желудочно-кишечного тракта, гонады, эмбрион;

♦средне радиочувствитеьные кожные покровы, эндотелий сосудов, легкие, почки, печень, орган зрения;

♦низко радиочувствительные: центральная нервная система, мышцы, костная ткань, соединительная ткань.

На тканевом уровне острое радиационное поражение проявляется нарушениями структуры и функции, зависящими прежде всего от клеточного опустошения. Вследствие этого радиочувствительность тканей определяется главным образом радиочувствительностью составляющих эту ткань клеток. Однако при рассмотрении

механизмов поражения тканей нельзя сбрасывать со счетов и опосредованные влияния со стороны других пораженных радиацией тканей, и нарушения функций регулирующих

систем —нервной, эндокринной.

Радиочувствительность органа зависит также от его функциональной активности: обычно она повышается при усилении функции органа. Это показано для молочной железы в период

нактации, щитовидной железы в состоянии гипертиреоза и пр.

Во взрослом организме, в соответствии с правилом Бергонье и Трибондо, непролиферирующие высокодифференцированные нервные клетки высокорадиорезистентны. Однако это относится лишь к морфологическим проявлениям повреждения и гибели нейронов после облучения. Функциональные же реакции обнаруживаются в ответ на облучение в ничтожных дозах. Так, ранние изменения электроэнцефалограммы появляются после облучения в дозе 0,5 мГр, а облучение в дозе 1 мГр вызывает заметное удлинение времени рефлекса в ответ на электрораздражение.

Спящие крысы просыпаются в результате облучения в дозе 0,01-0,02 Гр. Волны электрической активности в пережимающих in vitro нервных клетках вызывает облучение в дозе 0,01 Гр. Все это говорит о высокой реактивности элементов нервной системы по отношению к радиационным воздействиям.

**РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ**

*Радиобиологическими эффектами называются изменения, возникающие в биологических системах при действии на них ионизирующих излучений.* Сложность организма как биологической системы предопределяет многообразие радиобиологических эффектов.

Критериями их классификации служат уровень формирования, сроки появления, локализация, характер связи с дозой облучения, значение для судьбы облученного организма, возможность

передачи по наследству последующим поколениям и др. (табл. 4). Радиобиологические эффекты можно классифицировать, прежде всего, по уровню их формирвания.

Таблица 4

**Классификация радиобиологических эффектов**

|  |  |
| --- | --- |
| **Критерий** | **Эффекты** |
| **По уровню формирования** | **Молекулярные**  **Клеточные**  **Тканевые**  **Организменные**  **Популяционные** |
| **По значению для судьбы облученного организма** | **Патологические**  **Горметические** |
| **По возможности наследования** | **Соматические**  **Генетические** |
| **По локализации** | **Общие (тотальные)**  **Местные (локальные)** |
| **По срокам проявления** | **Ближайшие**  **Отдаленные** |
| **По характеру связи с дозой облучения** | **Детерминированные**  **Стохастические** |

***На клеточном уровне воздействие ионизирующих излучений вызывает интерфазную или репродуктивную гибель клеток, временный блок митозов, нелетальные мутации и нарушения функциональной активности клеток.***

На у ро вн е т ка не й, о рг ан овис ис те м действие радиации характеризуется

**цитопеническим эффектом,** в основе которого лежат преимущественно гибель клеток и радиационный блок митозов.

Радиобиологические эффекты, возникающие н а у ро вн е о рг ан из ма проявляются в формировании различных заболеваний, а н а у ро вн е п оп ул яц ии—в изменении демографических характеристик и пр.

По з на че ни ю д ляс уд ьб ы о бл уч ен но гоо рг ан из марадиобиологические эффекты можно разделить на патологические и герметические.

Как правило, радиобиологические эффекты неблагоприятным образом сказываются на биологическом объекте.

Исключением из этого правила является ***эффект гормезиса*** который проявляется повышением жизнеспособности организмов под влиянием облучения в малых дозах. Этот эффект используют в медицине: прием радоновых ванн, сопровождающийся облучением организма в малых дозах, обладает положительным влиянием на функциональное состояние и резистентность организма.

По возможности передачи по наследству последующим поколениям **радиобиологические эффекты делятся на соматические и генетические**. Изменения в генетическом аппарате клеток человеческого организма могут быть унаследованы потомством лишь при условии, что эти изменения возникают в половых клетках. Мутаци'и соматических клеток в естественных условиях не наследуются (такая возможность создается лишь при клонировании организма). Поэтому практически важно разграничивать с ом ат ич ес ки е (возникающие в соматических клетках) и г ен ет ич ес ки е (индуцируемые

при воздействии радиации на половые клетки) радиобиологические эффекты. При общем облучении организма можно ожидать появления как соматических, так и генетических эффектов.

Следует подчеркнуть, что все генетические эффекты облучения проявляются в виде врожденных признаков. В то же время далеко не все врожденные признаки являются проявлением генетических эффектов облучения. Наблюдения за лицами, родители

которых были облучены до зачатия во время атомных бомбардировок Японии, не выявили значимого возрастания частоты врожденных дефектов. В то же время риск таких дефектов чрезвычайно высок при равном по дозе лучевом воздействии на эмбрион или плод —особенно при облучении беременной женщины в сроки с 8-й по 15-ю неделю беременности. В последнем

случае врожденными являются изменения, обусловленные не генетическими, а соматическими эффектами облучения плода.

Радиобиологические эффекты можно также классифицировать в зависимости от локализации т. е. от органа или части тела, в которых они регистрируются. Весьма актуальна такая классификация в практике лечения онкологических заболеваний, когда пораженный опухолью участок тела облучается в высокой дозе при тщательном экранировании здоровых тканей. При локальном облучении органа или сегмента тела наиболее сильное поражающее действие радиации проявляется именно в нем (такой эффект называют местным действием). Однако изменения возникают и в необлученных тканях, тогда говорят о дистанционном

действии излучений. Его примером может служить уменьшение числа миелокариоцитов в костном мозге экранированной конечности после облучения животных.

**Реакция клеток на облучение**

*Три основных типа реакции клетки на облучение:*

А) **Радиационный блок митозов** (временная задержка деления) — наиболее универсальная реакция клетки на воздействие ионизирующих излучений, ее длительность зависит от дозы: На каждый Грей дозы клетка отвечает задержкой митоза в 1 час. Проявляется данный эффект независимо от того, выживет ли клетка в дальнейшем, причем с увеличением дозы облучения увеличивается не число реагирующих клеток, а именно время задержки деления каждой облученной клетки. Эта реакция имеет огромное приспособительное значение: увеличивается длительность интерфазы, оттягивается вступление клетки в митоз, создаются Благоприятные условия для нормальной работы системы репарации ДНК.

Б) **Митотическая (репродуктивная) гибель клетки** — полная потеря клеткой способности к размножению; развивается при больших дозах ионизирующего излучения. Данный тип реакции не относится к клеткам, не делящимся или делящимся редко. В клетке не выражены дегенеративные процессы. Основная причина митотической гибели клетки — Повреждение хромосомного аппарата клетки, приводящее к дефициту синтеза ДНК.

*Показателем* ***выживаемости клетки*** *является ее способность проходить 5 и более делений.*

**Варианты митотической гибели:**

1) клетка гибнет в процессе одного из первых четырех пострадиационных митозов, невзирая на отсутствие видимых изменений;

2) облученные клетки после первого пострадиационного митоза формируют так называемые ***"гигантские" клетки*** (чаще в результате слияния "дочерних" клеток), которые способны делиться не более 2-3 раз, после чего погибают.

В) **Интерфазная гибель клетки** — гибель клетки, которая наступает до ее вступления в митоз. Для большинства соматических клеток человека она регистрируется после облучения в ***дозах в десятки и сотни Гр*** (лимфоциты, как радиочувствительные клетки, гибнут по этому механизму даже при небольших дозах). В клетке наблюдаются различные дегенеративные процессы вплоть до её лизиса.

***Механизм интерфазной гибели*** (последовательность реакций, приводящих к лизису клетки):

**1.** За счёт разрывов в молекуле ДНК нарушается структура хроматина. В свою очередь, в мембранах идёт процесс перекисного окисления липидов.

**2.** Изменения ДНК-мембранного комплекса вызывают остановку синтеза ДНК.

**3.** Повреждение мембраны лизосом приводит к выходу из них ферментов — протеаз и ДНК-аз

**4.** ДНК-азы разрушают ДНК, что ведет к пикнозу ядра. Повреждение мембран митохондрий ведёт к выходу из них кальция, который активирует протеазы.

Вышеперечисленные процессы приводят к гибели **(аутолизу)** клетки.

Радиационная биохимия нуклеиновых кислот. Основные типы репарации ДНК

На ядерную ДНК приходится около 7% поглощенной дозы.

Механизм повреждения нуклеиновых кислот:

А) ***При прямом действии*** ионизирующих излучений на нуклеиновые кислоты: выбивание электрона и последующая миграция дефектного участка по полинуклеотидной цепи (несколько сотен азотистых оснований) до участка с повышенными электрон-донорными свойствами (чаще всего до участка локализации тимина или цитозина, где и образуются свободные радикалы этих оснований).

Б) *При косвенном действии* ионизирующих излучений на нуклеиновые кислоты: взаимодействие с продуктами радиолиза воды приводит к образованию свободных радикалов, что ведет к нарушению структуры ДНК, в основе которого лежат следующие механизмы:

— одно — и двунитевые разрывы

— модификация азотистых оснований;

— образование тиминовых димеров;

— сшивки ДНК–ДНК, ДНК-белок.

*При дозе 1 Гр в каждой клетке человека повреждаются около 5000 азотистых оснований, возникают примерно 1000 одиночных и от 10 до 100 двойных разрывов.* Определенное число одиночных разрывов образуется даже при малых дозах излучения, но они не приводят к поломкам молекулы ДНК, т. к. куски поврежденной молекулы прочно удерживаются на месте водородными связями с комплементарной нитью ДНК и хорошо поддаются восстановлению.

Репарация повреждений в ДНК.

Все механизмы репарации в клетке многократно продублированы и могут идти разными путями, находящимися под генетическим контролем. Репарация может быть как практически *безошибочной* (фотореактивация и эксцизионная репарация коротких участков), так и зачастую *ошибочной* (SOS-репарация, т. к. она является попыткой восстановить структуру ДНК любой ценой при серьезных массивных повреждениях).

Репарация генетических повреждений обеспечивается *десятками ферментов*, многие из которых участвуют также в процессах репликации и рекомбинации.

Основные группы ферментов репарации:

1. *нуклеозидазы* — производят выщепление оснований по N-гликозидной связи с образованием АП-сайтов — апуриновых или апиримидиновых участков;

2. *инсертазы* — производят встраивание оснований в АП-сайты;

3. *лиазы* — производят расщепление пиримидиновых димеров;

4. *эндонуклеазы* — проводят инцизию — разрез ДНК возле повреждения;

5. *экзонуклеазы* — проводят эксцизию — удаление поврежденного участка;

6. *ДНК-полимеразы* — проводят синтез ДНК по комплементарной матрице;

7. *ДНК-лигазы* — производят сшивку нуклеотидов.

**Основные типы репарации ДНК:**

I. Прямая репарация:

А) Фотореверсия — происходит за счет работы фотолиаз, причем начальный этап — образование фермент-субстратного комплекса — может идти и в темноте: E + S « ES + hn ® E + P, где Е – фермент (энзим), S – субстрат, P — продукт реакции. Для работы фотолиазы требуется свет с длиной волны » 350 нм.

Этапы фотореверсии:

1. Повреждение ДНК с образованием димера под действием УФ-излучения

2. Образование фермент-субстратного комплекса с фотолиазой:

**3. Восстановление структуры ДНК:**

б) восстановление одиночных разрывов — происходит с участием ДНК-лигаз, характерна при действии ионизирующих излучений, вызывающих образование большого числа однонитевых разрывов ДНК.

Этапы восстановления одиночных разрывов:

1. Повреждение ДНК с образованием одиночного разрыва:

2. Образование фермент-субстратного комплекса с ДНК-лигазой:

3. Восстановление структуры ДНК:

В) Восстановление структуры азотистых оснований — удаление лишних метильных групп, восстановление разрывов циклических структур;

Г) Замена азотистых оснований — протекает с участием ДНК-гликозидаз.

II. **Репарация с использованием комплементарной цепи** (эксцизионная репарация).

Наиболее изученный вид эксцизионной репарации — “Темновая репарация”. Ее основные этапы:

1. *Incisio* (разрезание) — эндонуклеаза "узнает" поврежденный участок и производит разрез:

2. *Excisio* (вычленение) — экзонуклеаза удаляет поврежденный участок:

3. *Sintesis* — репаративный синтез с помощью ДНК-полимеразы:

4*. Сшивка* восстановленных участков ДНК-лигазой:

III. **Репарация с использованием межмолекулярной информации:**

А) *восстановление двойных разрывов* — возможно в том случае, когда имеется копия генетической информации (например, при диплоидном наборе хромосом). В основе данной репарации — сложный процесс рекомбинации с реципрокным обменом нитей ДНК и последующим восстановлением повреждений. При этом образуются так называемые "Структуры Холидея", которые в дальнейшем подвергаются разделению с образованием 2 нормальных нитей ДНК.

Б) *репарация поперечных сшивок внутри ДНК* — происходит по схеме “выщепление-рекомбинация-синтез”. Ее основные этапы:

IV. **Индуцибельная репарация.**

А) *SOS-репарация* — запускается в клетке при наличии сигнала бедствия — появления свободных фрагментов полинуклеотидной цепи, что указывает на серьезные повреждения ДНК. При этом клетка пытается восстановить структуру ДНК, невзирая на степень ее повреждения. Достигается это снижением 3’-5’ — корректорской функции ДНК-полимеразы, что помогает быстро, но не всегда безошибочно восстанавливать структуру.

б) *Постадаптационная репарация* — механизм до конца не известен; впервые описана при исследовании культуры лимфоцитов, которые обладают повышенной чувствительностью к воздействию ионизирующих излучений: после предварительного облучения культуры лимфоцитов при суммарной дозе около 30 сГр с низкой интенсивностью в течение 4 часов развивалась повышенная устойчивость к повреждению ДНК, длившаяся около 66 часов (3 клеточных цикла).

Механизмы репарации генетических повреждений — Сложная продублированная система защиты генетической информации клетки, основа обеспечения надежности биологических систем. Большинство Одиночных разрывов репарируются даже в летально облученных клетках и не являются причиной, определяющей гибель клетки. Однако нерепарированные одиночные разрывы могут в последующем привести к образованию Двойных разрывов, плохо поддающихся восстановлению. Двойные разрывы могут возникнуть в результате единичного акта ионизации либо при совпадении одиночных разрывов на комплементарных нитях, они опасны для клетки, т. к. они не всегда поддаются репарации и служат непосредственной причиной возникновения хромосомных аберраций.

**Виды хромосомных аберраций:**

1. фрагментация хромосом

2. образование хромосомных мостов, дицентриков, кольцевых хромосом

3. появление внутри — и межхромосомных обменов

Часть *аберраций (хромосомные мосты и др.)* механически препятствуют делению клетки, некоторые аберрации (внутри- и межхромосомные обмены, ацентрические фрагменты) приводят к неравномерному разделению хромосом и утрате генетического материала, что вызывает гибель клеток из-за недостатка метаболитов, синтез которых кодировался утраченной частью ДНК.

**Механизмы репарации генетических повреждений**

- сложная продублированная система защиты генетической информации клетки, основа обеспечения надежности биологических систем. Большинство одиночных разрывов репарируются даже в летально облученных клетках и не являются причиной, определяющей гибель клетки. Однако нерепарированные одиночные разрывы могут в последующем привести к образованию двойных разрывов, плохо поддающихся восстановлению. Двойные разрывы могут возникнуть в результате единичного акта ионизации либо при совпадении одиночных разрывов на комплементарных нитях, они опасны для клетки, т.к. они не всегда поддаются репарации и служат непосредственной причиной возникновения хромосомных аберраций.

**Виды хромосомных аберраций:**

1. фрагментация хромосом

2. образование хромосомных мостов, дицентриков, кольцевых хромосом

3. появление внутри- и межхромосомных обменов.

Часть аберраций (хромосомные мосты и др.) механически препятствуют делению клетки, некоторые аберрации (внутри- и межхромосомные обмены, ацентрические фрагменты) приводят к неравномерному разделению хромосом и утрате генетического материала, что вызывает гибель клеток из-за недостатка метаболитов, синтез которых кодировался утраченной частью. До 20% поглощенной энергии связано с повреждением белков.

**Механизм повреждения белков:**

а) при прямом действии ионизирующих излучений: из молекулы белка выбивается электрон и образуется дефектный участок, который мигрирует по полипептидной цепи за счет переброски соседних электронов до тех пор, пока не достигнет участка с повышенными электрон-донорными свойствами. В этом месте в боковых цепях аминокислот возникают свободные радикалы.

б) при косвенном действии ионизирующих излучений: образование свободных радикалов происходит при взаимодействии белковых молекул с продуктами радиолиза воды, что влечет за собой изменение структуры белка:

- разрыв водородных, гидрофобных, дисульфидных связей;

- модификация аминокислот в цепи;

- образование сшивок и агрегатов;

- нарушение вторичной и третичной структуры белка.

Такие нарушения в структуре белка приводят к нарушению его функций (ферментативной, гормональной, рецепторной и др.).

**Биологическое действие разовых эффективных доз**

