

## ОТДЕЛЕНИЕ РАДИАЦИОННЫХ И РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Научная программа ОРРИ определяется темой первой категории Проблемно-тематического плана научно-исследовательских работ и международного научно-технического сотрудничества ОИЯИ, в рамках которой ведутся исследования по двум основным направлениям. Радиационное направление традиционно связано с исследованиями в области физики защиты, дозиметрии, спектрометрии и радиационного мониторинга в полях ионизирующих излучений. Основу научной программы по радиобиологии в на-

стоящее время составляют исследования закономерностей и механизмов мутагенного действия ионизирующих излучений разного вида на клетки про- и эукариот. Помимо этого, в рамках темы успешно реализуется проект МИТРА по созданию новых высокоэффективных препаратов для мишенной радиотерапии меланомы человека.

### РАДИАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Важной проблемой физики защиты при проектировании новых ядерно-физических установок является минимизация возможного радиационного воздействия на окружающую среду и население близлежащих районов. Наиболее достоверные оценки с высокой степенью детализации могут быть получены при расчете дозы на больших расстояниях от установки методами статистического моделирования. Другой важной задачей является оценка возможных выбросов в атмосферу радиоактивных нуклидов, образующихся в воздухе помещений ядерно-физических установок за счет активации высокоинтенсивными источниками излучения. Для решения этих проблем были разработаны методики, позволяющие прогнозировать дозу нейтронов и  $\gamma$ -квантов за защитой за счет многократного рассеяния излучения в воздухе и грунте (эффект skyshine), а также определить динамику накопления и выброса образующихся на установках радионуклидов. Результаты использованы при проектировании циклотронного центра в Братиславе (Словакия).

Результаты экспериментальных исследований характеристик полей адронов вокруг толстой свинцо-

вой мишени, облучаемой протонами с энергией 650 МэВ (в рамках проекта SAD), были сравнены с расчетами методом Монте-Карло по программам MCNP4B + LANET и MCNPX. Получено хорошее согласие между расчетными и экспериментальными данными.

С помощью модифицированной программы SCINFUL проведен расчет матрицы эффективностей спектрометра нейтронов на основе сцинтиллятора NE 213. Выполнены точные расчеты эффективностей регистрации  $\gamma$ -квантов сцинтилляционным спектрометром в различных геометриях источник–детектор. Исследованы отклики трековых детекторов на основе CR 39 и PADC (в том числе с радиаторами из делящихся материалов) при их облучении ядрами  $^{12}\text{C}$  с энергией 0,5 и 1,0 ГэВ/нуклон и протонами с энергиями 0,5 и 1,0 ГэВ [1].

Для физического обеспечения радиобиологических экспериментов были проведены измерения и градуировка системы пучковой дозиметрии на пучке ядер  $^{12}\text{C}$  нуклотрона с энергией 0,5 и 1,0 ГэВ/нуклон.

В экспериментах на бактериях изучены закономерности индукции делеционных и генных мутаций в *tonB*-локусе бактериальной хромосомы, формирующихся при действии излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ). Работа выполнена на штаммах *E. coli*. С использованием  $\gamma$ -лучей  $^{137}\text{Cs}$ , ускоренных ионов гелия (ЛПЭ 20, 50 и 78 кэВ/мкм) и углерода (ЛПЭ 200 кэВ/мкм) изучены закономерности индукции *tonB*<sup>-</sup>-точковых мутаций и *tonBtrp*<sup>-</sup>-делеций. Частота образования делеционных мутаций изучалась путем определения мутационных изменений в двух фланкирующих генах: *tonB* и *trp*. Показано (рис. 1), что в изучаемом диапазоне доз частота образования делеционных мутаций, как при  $\gamma$ -облучении, так и при действии ускоренных ионов линейно возрастает с дозой облучения. Линейный характер зависимости образования делеций обусловлен тем, что, в отличие от точковых мутаций, для реализации предмутационных повреждений в делеционную мутацию не требуется индукция системы SOS-репарации, играющей ключевую роль в формировании генных мутаций. Полученные результаты свидетельствуют о различии механизмов, вовлеченных в формирование точковых и структурных мутаций у бактерий, что находит отражение в характере зависимости ОБЭ (относительной биологической эффективности) от ЛПЭ (рис. 2).

В последние годы становится более видимой взаимосвязь различных компонентов интегрального клеточного ответа на повреждения ДНК, обеспечивающего стабильность и целостность генома. Показана связь механизмов контроля клеточного цикла и механизма репарации повреждений ДНК. Предполагает-

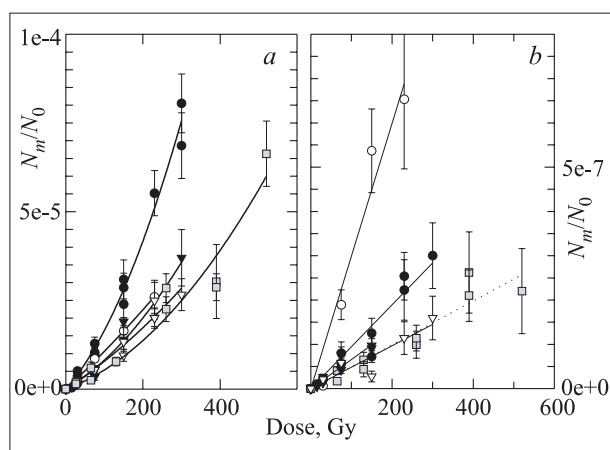


Рис. 1. Частота образования *tonB*-точковых (а) и *tonB-trp*-делецийных (б) мутаций у клеток *E. coli* при действии излучений с разной ЛПЭ: ○ — ионы гелия (20 кэВ/мкм); ● — ионы гелия (50 кэВ/мкм); ▼ — ионы гелия (78 кэВ/мкм); ▽ — ионы углерода (200 кэВ/мкм); ■ —  $\gamma$ -облучение ( $^{137}\text{Cs}$ )

ся, что гены *RAD9*, *RAD17* и *RAD24* принимают участие на первых этапах в распознавании повреждения ДНК. Белковый комплекс RFC-Rad24, по-видимому, осуществляет загрузку белкового комплекса Rad17-Mec3-Ddc1 или репарационных ферментов на место повреждения ДНК. Киназы, в частности *RAD53*, участвуют в передаче сигнала, а киназа *CDC28* функционирует на завершающих этапах регуляции остановки клеточного цикла, необходимой для осуществления репарации повреждений. Предполагается, что нарушение остановки клеточного цикла приводит к повышению чувствительности к повреждающим агентам и генетической нестабильности.

Разветвленная схема генетического контроля регуляции прохождения и остановки клеточного цикла нуждается в интенсивных исследованиях. Для изучения взаимодействия генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* и *CDC28* были сконструированы одиночные и двойные мутанты и изучалась их чувствительность к  $\gamma$ -излучению. Показано, что гены *RAD9*, *RAD17* и *RAD24* относятся к одной ветви пути, определяющей радиочувствительность, хотя гены *RAD9* и *RAD24* относятся к различным ветвям, определяющим чувствительность к УФ-лучам и *MMS* и регуляции остановки клеточного цикла. Протеинкиназы *RAD53* и *CDC28* эпистатичны по отношению к гену *RAD9*, но, скорее всего, относятся к различным ветвям, определяющим радиочувствительность. По литературным данным гены *CDC28* и *RAD53* относятся к одной ветви, определяющей остановку клеточного цикла. Полученные данные указывают на несоответствие схем регуляции остановки клеточного цикла и радиочувствительности. По-видимому, гены многофункциональны и их участие в интегральном ответе не сводится к остановке клеточного цикла. Возможно, некоторые из них принимают участие и в репарационных процессах.

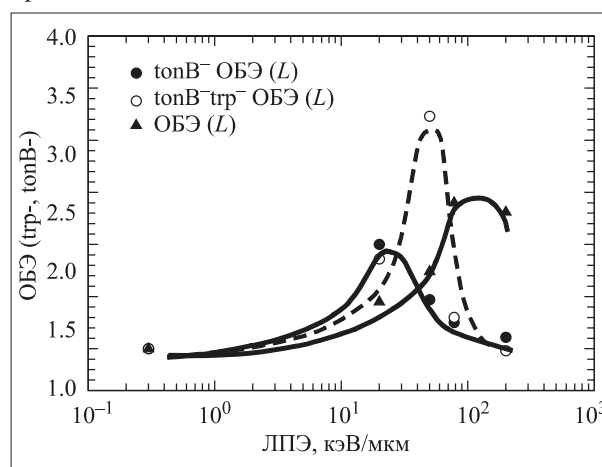


Рис. 2. Зависимость ОБЭ образования *tonB*- и *tonB-trp*-мутаций в клетках *E. coli* X7026 от ЛПЭ излучений

Продолжены исследования закономерностей индукции мутаций различной природы при действии ионизирующей радиации. Завершен анализ индукции мутаций сдвига рамки считывания, как спонтанный, так и при действии  $\gamma$ -излучения. Продолжено исследование индукции замен пар оснований на примере трансверсии АТ-ТА под действием тяжелых ионов гелия (ЛПЭ 80 и 20 кэВ/мкм) и углерода. Показано, что эффективность индукции замен пар оснований падает с увеличением энергии частиц. Наиболее эффективны частицы гелия (ЛПЭ 20 кэВ/мкм), менее эффективны частицы гелия (ЛПЭ 80 кэВ/мкм) и наименее эффективны частицы углерода.

Продолжено изучение эффектов малых доз облучения на клетки млекопитающих. На клетках китайского хомячка и меланомы человека с использованием анафазного и метафазного методов анализа aberrаций хромосом и микроядерного теста изучена зависимость доза–эффект в диапазоне 1–200 сГр [2–4]. По всем цитогенетическим критериям показаны гиперчувствительность (ГЧ) клеток обеих линий при дозах ниже 20 сГр и повышение радиорезистентности (ИР) при более высоких дозах. Феномен ГЧ/ИР воспроизводится как на асинхронной, так и на синхронизированной популяциях клеток китайского хомячка. Это свидетельствует о том, что ГЧ обусловлена высокой радиочувствительностью всей популяции и не связана с гибелью фракции клеток в радиочувствительной фазе клеточного цикла, а повышение радиорезистентности, по-видимому, является следствием индукции процессов репарации также во всех клетках. Данный вывод подтверждается тем, что на фоне индуцированных предоблучением малыми дозами (1 и 20 сГр) процессов репарации ГЧ на кривой доза–эффект не выявляется и имеет место восстановление некоторой части предсуществующих (спонтанных или индуцированных предоблучением) хромосомных нарушений. Предполагается, что в основе феномена ГЧ/ИР и адаптивного ответа лежат аналогичные по своей природе процессы индуцибельной репарации [5].

Изучена относительная биологическая эффективность (ОБЭ) немодулированного протонного пучка с энергией 150 МэВ в области плато и пика Брэгга. Получены кривые выживаемости клеток по критерию клоногенной способности *in vitro*. По сравнению с  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ , которые были использованы в качестве стандартного вида излучения, при уровне выживаемости 0,1 ОБЭ протонов в пике Брэгга и на плато составляет 1,17 и 1,03 соответственно. Таким образом, для создания определенного биологического эффекта в мишенном объеме необходимо строго учитывать глубину пучка в области пика и дозу облучения.

Как продолжение предыдущих исследований по генотоксическому эффекту малых доз облучения и изучению индукции стабильных и нестабильных хро-

мосомных aberrаций, проведен эксперимент на ну-клотроне. Клетки млекопитающих и лимфоциты человека были облучены ионами углерода с энергией 480 МэВ/нуклон.

Обширные исследования временных характеристик образования хромосомных aberrаций, индуцированных в клетках млекопитающих ускоренными тяжелыми ионами в широком диапазоне ЛПЭ, завершены в GSI (Дармштадт) в коллаборации с отделом биофизики этого института [6]. В этих экспериментах временная зависимость появления хромосомных aberrаций, индуцированных ускоренными частицами, изучалась на трех линиях клеток китайского хомячка: V79, CHO и xrs5 [7–10]. Клетки, синхронизированные в стадии G1 клеточного цикла, облучали рентгеновскими лучами и ускоренными ионами Ne, Ar, Kr Au с ЛПЭ от 380 до 3980 кэВ/мкм, полученными на ускорителях тяжелых ионов UNILAC и SIS в GSI. Хромосомные нарушения в облученных клетках изучали в широком временном диапазоне от 10 до 34 ч после облучения, в 5–12 последовательных точках, предваряемых двухчасовой обработкой коллечином для накопления делящихся клеток. Это соответствует времени трех клеточных циклов интактных клеток, так что все клетки, включая тяжело поврежденные и задержавшиеся в продвижении по циклу, были проанализированы. Использование дифференциальной окраски сестринских хроматид, позволяющей идентифицировать делящиеся клетки первого, второго и последующих пострадиационных циклов, дало возможность просчитать хромосомные aberrации в клетках первого и второго пострадиационных митозов раздельно [10].

Показано, что облучение приводит к нарушениям в продвижении клеток по циклу и задержке митоза и таким образом сильно влияет на экспрессию (появление) aberrантных клеток и хромосомных aberrаций, так как их анализ возможен лишь при достижении клеткой стадии митоза. Число aberrантных клеток и aberrаций значительно увеличивалось в поздние сроки после облучения, и этот эффект зависел от ЛПЭ излучений: наиболее значительно это число возросло после облучения ионами Ar и Kr (ЛПЭ 1840 и 3980 кэВ/мкм), достигая 100 % aberrантных клеток и 10–15 aberrаций на клетку. Число aberrаций за период эксперимента увеличивалось при этом в 20 раз, тогда как рентгеновское облучение приводило всего к 2–3-кратному его увеличению. Эти различия в задержке митоза и экспрессии хромосомных повреждений, индуцированных редко и плотно ионизирующим излучением, связаны с разным пространственным распределением энергии обоих видов излучений, гомогенно распределенной по клеткам при рентгеновском облучении и вызывающей лишь небольшие различия в задержке митоза отдельных клеток облученной популяции и небольшие вариации числа aberrаций на клетку. Напротив, облучение частицами

с высокой ЛПЭ приводит к неравномерному распределению энергии как внутри трека каждой частицы, так и в распределении треков по клеткам облучаемой популяции. Одним из биологических последствий такой неравномерности является широкий спектр задержек митоза отдельных клеток и зависящий от него растянутый во времени характер появления aberrантных клеток в митозе: клетки с малым количеством попаданий частиц или неповрежденные вообще, с соответственно низким уровнем хромосомных повреждений, достигают митоза гораздо раньше, чем тяжело поврежденные клетки, несущие большое число хромосомных нарушений. Это было ярко продемонстрировано фитированием распределения числа aberrаций между клетками распределением Неймана типа А, которое учитывает как распределение попадания частиц между клетками, так и число aberrаций хромосом, индуцированное попаданием одной частицы. Полученные параметры прямо указывают на зависимость от хромосомных повреждений задержку митоза: число попаданий частиц на клетку возрастает со временем фиксации, то есть тяжело поврежденные клетки, несущие соответственно большое число aberrаций, достигают митоза позже, чем мало поврежденные и интактные клетки с небольшим грузом хромосомных нарушений. Таким образом, тяжело поврежденные клетки полностью выпадают из цитогенетического анализа, традиционно проводимого только в один, обычно ранний (14 ч в данном случае) срок фиксации. Как следствие, значения ОБЭ по цитогенетическим показателям излучений с высокими ЛПЭ, опубликованные до сих пор и полученные традиционным методом, как правило, недооценивают биологическую эффективность этих излучений. Такая вероятность хорошо иллюстрируется данными по облучению ионами Ag (ЛПЭ 1840 кэВ/мкм), когда коэффициенты ОБЭ, рассчитанные отдельно для каждого срока фиксации, варьировались от 0 через 14 ч после облучения (стандартный срок анализа) до 4,0 через 22 ч.

Становится очевидным, что для корректного определения значимых величин ОБЭ тяжелых ионов с высокими ЛПЭ должен применяться режим множественных фиксаций. В связи с этим разработан новый математический подход для учета времязависимого появления хромосомных нарушений [7–10]. Было показано, что примененный метод более адекватен для сравнения экспериментальных данных с использованием излучений разного качества, вызывающих различные пертурбации клеточного цикла. Для ионов, использованных в этой работе, значения ОБЭ по интегрированному полному числу aberrаций составили для ионов Ne (ЛПЭ 460 кэВ/мкм), Ag (ЛПЭ 1226 и 1840 кэВ/мкм) и Kг (ЛПЭ 3980 кэВ/мкм) 3,2; 1,9; 1,4; 1,3, соответственно, что гораздо выше, чем все ранее опубликованные значения ОБЭ, полученные тради-

ционным методом с одним сроком фиксации в этом диапазоне значений ЛПЭ [9].

Использованный математический подход оказался также полезным для реконструкции кривых роста популяции облученных клеток и определения количества клеток, которые были способны достичь первого пострadiaционного митоза за время эксперимента, а также количества клеток, выпавших из анализа из-за интерфазной гибели или неполного сбора. В случае клеток китайского хомячка (в отличие, например, от фибробластов человека) было показано, что подавляющее большинство клеток способно достичь пострadiaционного митоза даже после облучения ионами с очень высокими ЛПЭ, несмотря на продолжительную задержку митоза поврежденных клеток. Кроме того, обнаружены изменения в спектре хромосомных aberrаций, индуцированных плотно ионизирующим излучением по сравнению с редко ионизирующим: с ростом ЛПЭ частиц возрастал процент разрывных aberrаций, составлявший 40 % после X-облучения, где доминантным видом aberrаций были хромосомные обмены, до 55–65% после частиц с ЛПЭ 1000–4000 кэВ/мкм. Другая особенность цитогенетического действия плотно ионизирующей радиации проявилась в увеличении частоты aberrаций хроматидного типа, несмотря на облучение клеток в стадии G<sub>1</sub> клеточного цикла: X-облучение индуцировало 10–15 % aberrаций этого типа, тогда как количество их возрастало с ростом ЛПЭ частиц до 30 % для ионов Ne (ЛПЭ 460 кэВ/мкм), 35–40 % для Ag (ЛПЭ 1226 и 1840 кэВ/мкм) и до 45 % для ионов Kг (3980 кэВ/мкм). Эти данные согласуются с общепризнанными представлениями о большей сложности и меньшей репарбельности повреждений ДНК, вызываемых излучениями с высокой ЛПЭ. В настоящее время в продолжение этих исследований изучаются временные зависимости появления хромосомных aberrаций в нормальных здоровых клетках человека, в частности, фибробластах кожи и лимфоцитах периферической крови [11].

Продолжены исследования возможностей мишенной радиотерапии пигментной меланомы с помощью радиоактивных соединений на основе метиленового синего (МС). Проведены эксперименты с МС, меченным <sup>131</sup>I или <sup>211</sup>At, *in vitro* и *in vivo*.

Накопление <sup>131</sup>I-МС *in vitro* клетками пигментной меланомы человека в 4–5 раз выше по сравнению с непигментированными клетками (рис. 3). Максимум накопления достигается через 2 ч после введения соединения [12]. Полученные результаты находятся в соответствии с данными, полученными ранее по накоплению <sup>211</sup>At-МС *in vitro*. В экспериментах *in vivo* наблюдалось быстрое выведение <sup>131</sup>I-МС из всех нормальных органов мышей с привитой меланомой в течение 24 ч после введения препарата. Накопление соединения в опухоли достигало максимума (5 %/г от введенной активности) через 24 ч после введения и



оставалось на высоком уровне, по крайней мере, в течение двух дней после инъекции. К 24 ч после введения соотношение накопленной активности в опухоли по отношению к нормальным тканям составило: опухоль/кровь — 36, опухоль/мышцы — 47, опухоль/кожа — 7,8 [13, 14].

Предварительные результаты исследования накопления  $^{211}\text{At}$ -МС *in vivo* свидетельствуют о высокой степени накопления данного соединения в опухоли (6 %/г от введенной активности) через 5 ч после введения и медленное выведение соединения из остальных тканей и органов.

Выполнен анализ и проведено сравнение различных моделей для описания радиобиологических эффектов при малых дозах облучения [15]. Все модели представлены линейной беспороговой составляющей выхода повреждений, которая для линейной беспороговой модели является и результирующей. Этот факт отражает закономерность того, что первопричина всех стохастических радиобиологических эффектов (в основном разрывов ДНК) линейно и беспорогово зависят от дозы. Однако линейная составляющая эффекта необходима, но не достаточна для адекватности модели, в общем случае, результатам наблюдения. Линейно-квадратичная модель может быть адекватна результатам наблюдений на клеточном уровне при дозах более 1 Гр, однако при меньших дозах адекватность часто нарушается. Модель индуцибельных ре-

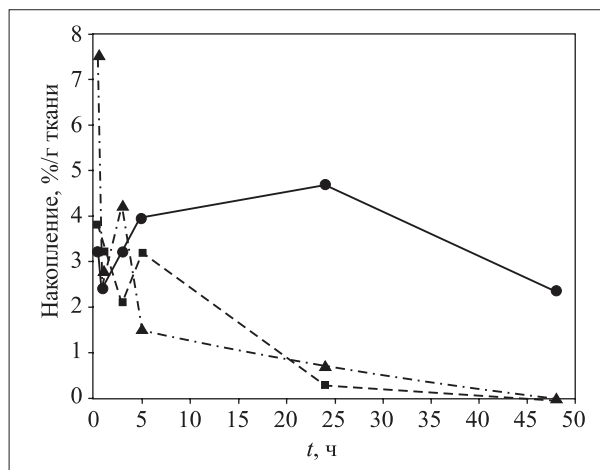


Рис. 3. Накопление  $^{131}\text{I}$ -МТВ в тканях животных с привитой меланомой: ● — опухоль; ■ — мышцы; ▲ — кожа

параций адекватна результатам наблюдений на клеточном уровне. Доверительный уровень модели двух популяций клеток избирательно адекватен данным экспериментов. Доверительный уровень модели двух защитных реакций по совокупности результатов — наибольший из сравненных и пригоден для всех уровней организации организма. На основе этой модели выполнены оценки радиационного риска жителей наиболее загрязненных районов Белоруссии [16].

## РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

Радиационный контроль за облучением персонала на ядерно-физических установках ОИЯИ и при работе с радиоактивными источниками осуществлялся в 2001 г. с помощью автоматизированных систем радиационного контроля (АСРК) и переносными приборами.

В 2001 г. в ЛНФ персоналом ОРБ проводился дозиметрический контроль при выполнении следующих работ с оборудованием, имеющим высокую наведенную активность:

- разборка и перемещение в каньон-хранилище очередного отработавшего подвижного отражателя реактора ИБР-2;
- отправка на исследование в спецпредприятие двух ТВС, отработавших свой срок в активной зоне реактора ИБР-2.

Принятые организационно-технические меры и специальный дозиметрический контроль позволили не превысить планируемые дозы облучения персонала.

Завершена в соответствии с соглашением ОИЯИ–НИКННФ (Нидерланды) транспортировка из

Амстердама в Дубну оборудования ускорителя НИКННФ, имеющего наведенную активность.

В 2001 г. на индивидуальном дозиметрическом контроле в ОИЯИ состояло 1795 чел., включая 82 прикомандированных специалиста. Средняя годовая доза по ОИЯИ составила 1,43 мЗв. Наибольшее значение средней индивидуальной дозы персонала (2,2 мЗв) наблюдается в ОРРИ. Имел место один случай превышения контрольного уровня годовой индивидуальной дозы, превышений основных дозовых пределов не было зарегистрировано.

Регулярный мониторинг окружающей среды по образцам почвы, растений, воды из водоемов в окрестностях Дубны, водопроводной воды и воды на сбросе очистных сооружений подтвердил тот факт, что радиоактивность окружающей ОИЯИ среды остается постоянной в течение длительного времени и обусловлена лишь естественной радиоактивностью и продуктами глобальных выпадений. Какой-либо вклад в радиоактивность окружающей среды от ядерно-физических установок ОИЯИ не обнаружен.

## НАУЧНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО

С 29 мая по 1 июня в Москве (Институт биохимии им. А. Н. Баха) и Дубне проведены под эгидой ЮНЕСКО II Сисакьяновские чтения и II Международный симпозиум «Проблемы биохимии, космической и радиационной биологии». В работе симпозиума приняло участие более 120 специалистов из ведущих институтов России и стран Европы. На симпозиуме

было представлено 16 пленарных докладов и более 80 докладов, распределенных по трем секциям: проблемы биохимии; космическая биология и медицина, общая и космическая радиобиология. В рамках симпозиума прошел конкурс работ молодых ученых, победители которого были награждены дипломами и денежными премиями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spurný F. et al.* // Radiat. Measur. 2001. V. 34. P. 527.
2. *Shmakova N. L. et al.* // Proc. Intern. Conf. «Biological Affects of Low Dose Irradiation and Radioactive Pollution on Environment», Syktyvkar, 2001 (in press).
3. *Шмакова Н. Л. и др.* // Тр. 4 Съезда по радиационным исследованиям (радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность), Москва, 2001 (в печати).
4. *Шмакова Н. Л. и др.* Препринт ОИЯИ Р19-2001-184. Дубна, 2001.
5. *Шмакова Н. Л. и др.* // Тр. II Междунар. симп. «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна–Москва, 2001 (в печати).
6. *Ritter S. et al.* GSI Scientific Report 2000. GSI-2001-1. P. 154.
7. *Gudowska-Novak E. et al.* // Physica Medica. 2001. V. XVII, Suppl. 1. P. 161.
8. *Nasonova E. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 2001. V. 77. P. 59.
9. *Nasonova E. et al.* // Physica Medica, XVII. 2001, Suppl. 1. P. 198.
10. *Ritter S., Nasonova E., Gudowska-Novak E.* // Int. J. Radiat. Biol. (in press).
11. *Catournikova A. et al.* // Int. J. Radiat. Biol. 2001. V. 77. No. 4. P. 419–429.
12. *Шмакова Н. Л. и др.* Сообщение ОИЯИ Р19-2001-236. Дубна, 2001.
13. *Шмакова Н. Л. и др.* // Мед. физ. 2001. № 11. С. 61.
14. *Шмакова Н. Л. и др.* // Тр. II Междунар. симп. «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна–Москва, 2001 (в печати).
15. *Комочков М. М.* // Тр. II Междунар. симп. «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна–Москва, 2001 (в печати).
16. *Кнатъко В. А., Комочков М. М., Януш А. Э.* // Тр. II Междунар. симп. «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна–Москва, 2001 (в печати).