

ИНСТИТУТ РАДИОБИОЛОГИИ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

На правах рукописи

АЛЬФЕРОВИЧ Андрей Анатольевич

**ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ
КЛЕТОК HELA В МАЛЫХ ДОЗАХ**

03.00.01 - радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск - 1993

Работа выполнена в Институте радиобиологии АН Беларуси и в Институте химической физики РАН им. академика Н. Н. Семенова

Научные руководители:

доктор медицинских наук, академик АН Беларуси Е. Ф. Конопля;
доктор биологических наук, профессор И. И. Пелевина

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник А. Ф. Маленченко;
доктор биологических наук, старший научный сотрудник И. Б. Моссе

Ведущая организация - лаборатория радиационной биофизики кафедры биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Защита состоится _____ 1993 г. в ____ часов на заседании специализированного совета Д 006.00.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук в Институте радиобиологии АН Беларуси по адресу:
220600, г. Минск, ул. Жодинская, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института радиобиологии АН Беларуси

Автореферат разослан _____ 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета к.б.н.

А. М. Ходосовская

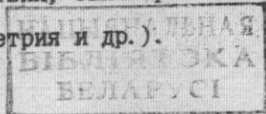
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

После аварии на ЧАЭС представляется важным дать оценку биологических эффектов сложившейся радиационной обстановки и определить их прогноз с целью разработки способов снижения возможных отдаленных последствий. Важно предложить для использования в практике методы диагностики радиационных нарушений и расширить знания в области механизма действия малых доз ионизирующих излучений в острых и хронических опытах (Конопля, 1989).

Чернобыльская авария поставила перед радиобиологами ряд новых задач. Поэтому сейчас возникает много вопросов, ответ на которые могут дать только фундаментальные исследования. К весьма актуальным вопросам можно отнести следующие: зависимость доза-эффект в условиях пролонгированного облучения в малых дозах; молекулярно-клеточные механизмы возникновения отдаленных последствий облучения; и, наконец, чрезвычайно важной является проблема совместного действия пролонгированного облучения с факторами окружающей среды. Для ответа на эти вопросы необходимо проведение детальных экспериментальных исследований, которые позволили бы оценить риск возникновения отдаленных последствий при пролонгированном облучении в малых дозах в зоне аварии и в лабораторных условиях.

Неопределенность характера дозовой зависимости биологических эффектов в области низких уровней радиации затрудняет решение целого ряда фундаментальных проблем (радиационный мутагенез и канцерогенез) и проблем прикладного характера (оценка и прогноз риска отдаленных последствий, санитарно-гигиеническое нормирование, биологическая дозиметрия и др.).



На всех этапах развития радиобиологии представлялась важной проблема радиационного канцерогенеза, но особую актуальность она приобретает в связи с аварией на ЧАЭС. По данным ВОЗ, 90% возникающих у человека злокачественных опухолей обусловлено воздействием факторов внешней среды. По современным представлениям, определяющую роль в инициации канцерогенеза играют нарушения в ДНК. Поэтому представляется важным выяснение механизмов возникновения изменений в ДНК и природы наследуемых повреждений генома, совместимых с жизнедеятельностью клетки.

Проблема малых доз по-новому предстала и в связи с постоянно наблюдающимся совместным воздействием радиации и химических агентов. Характерной особенностью некоторых химических агентов (например, свинца, загрязняющего зону аварии на ЧАЭС, и комплексов платины, используемых в качестве радиосенсибилизаторов при лечении рака) является их способность взаимодействовать с ДНК. Существует поэтому большая вероятность синергических эффектов радиации и химических агентов - появились сведения, что даже нитраты, не являющиеся сами по себе мутагенами, способны в 4-6 раз усиливать мутагенное действие радиации. Поэтому встает проблема расширения исследований совместного действия радиации и различных химических агентов, закономерностей их взаимодействия, расчета риска отдаленных последствий для населения, проживающего на загрязненных территориях с различными уровнями радиационного и химического фона (Севанькаев, Деденков, 1990; Барабой, 1991; Кудряшов, 1991).

Цель и задачи исследования

Основная цель исследования состояла в изучении отдаленных

эффектов облучения в малых дозах, выявлении повреждений у отдаленных потомков облученных клеток при остром и пролонгированном облучении, при совместном действии радиации и химических соединений.

Задачи работы:

1. В культивируемых клетках человека изучить отдаленные эффекты воздействия острого и пролонгированного гамма-облучения в малых дозах в модельных экспериментах и при нахождении клеток в 10-км зоне аварии на ЧАЭС; исследовать репродуктивную способность, пролиферативную активность и выход клеток с цитогенетическими повреждениями.

2. С использованием ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК выявить в молекуле ДНК малый уровень повреждений в облученных клетках и у их потомков.

3. Определить чувствительность облученных в малых дозах клеток и их потомков к последующему острому облучению в больших дозах.

4. Изучить эффекты совместного действия радиации в малых дозах и химических соединений, способных реагировать с ДНК (цис- и транс-платины и ацетата свинца).

Научная новизна работы

Впервые показано, что:

1) после острого и пролонгированного гамма-облучения в малых дозах и экспонирования клеток в зоне аварии на ЧАЭС у их потомков падает численность клеток в клонах, повышается доля клеток с микроядрами и уровень повреждений в ДНК;

2) после пролонгированного гамма-облучения и после нахожде-

ния клеток в зоне аварии на ЧАЭС повышается их чувствительность к последующему острому облучению, регистрируемая по уменьшению эффективности клонирования клеток и росту частоты клеток с цитогенетическими повреждениями; повышенной радиочувствительностью обладают и потомки облученных клеток;

3) при совместном действии облучения в малых дозах и соединений платины и свинца в малотоксичных концентрациях обнаружен синергический эффект, возрастающий при пролонгировании воздействия и проявляющийся в снижении выживаемости и более высоком выходе клеток с цитогенетическими повреждениями.

Практическая ценность работы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при длительном нахождении в загрязненных радионуклидами районах у клеток может наблюдаться повышенная чувствительность к разным агентам; это ставит вопрос разработки рекомендаций по мерам предосторожности проживающему на этих территориях населению.

Наличие цитогенетических нарушений у потомков облученных в малых дозах клеток говорит о небезопасности проживания на загрязненных радионуклидами территориях.

Результаты работы говорят также о возможности клинического использования совместного воздействия облучения в малых дозах и цис-платины в малотоксичных концентрациях в течение длительного времени.

Положения, выносимые на защиту:

1. На протяжении нескольких поколений после острого и пролонгированного облучения клеток в малых дозах или их нахождения

в зоне аварии на ЧАЭС у них снижается пролиферативная активность, репродуктивная способность, повышается уровень цитогенетических повреждений.

2. После пролонгированного облучения в малых дозах в лабораторных условиях и в зоне аварии на ЧАЭС радиочувствительность нескольких поколений клеток повышена.

3. При совместном воздействии радиации в малых дозах и химических соединений, способных реагировать с ДНК, могут наблюдаться аддитивные и синергические эффекты.

Публикации и апробация работы

Результаты исследований содержатся в 5 публикациях, доложены и обсуждены на конкурсах научных работ Института химической физики РАН (1989, 1990, 1991 гг.), Международном рабочем совещании по исследованию механизма радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК (1990 г.), Рабочем совещании по изучению слабых химических и физических воздействий на биосистемы (1990 г.), I Международной конференции "Биологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской АЭС" (1990 г.), II Республиканской научно-практической конференции по проблемам ликвидации последствий аварии на ЧАЭС (1990 г.), I Всесоюзной конференции по проблемам ликвидации последствий аварии на ЧАЭС (1991 г.), III Научно-технической конференции по основным результатам ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС (1992 г.).

Диссертация апробирована на семинаре Отдела кинетики химических и биологических процессов Института химической физики РАН (1992г.) и на расширенном заседании лабораторий Института радиобиологии АН Беларуси (1993 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных экспериментальных результатов, обсуждения результатов, выводов и указателя цитированной литературы, содержащего 215 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 рисунками и 13 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила асинхронная популяция клеток HeLa. Клеточный цикл длится 17-22 ч (Kampinga et al., 1989). Клетки культивировали в пластиковых флаконах (25 см², Flow Laboratories Ltd.), чашках Петри диаметром 6 см (Sterilin Ltd.) и в слайдовых камерах (Nunc Inc.) с 5,0, 5,0 и 1,5 мл питательной среды, соответственно. Использовали питательную среду Игла (сывороткой крупного рогатого скота (10%), бензилпенициллином (натриевая соль, 100 ед./мл) и сульфатом стрептомицина (100 мкг стрептомицина основания/мл). Высевали 50000-100000 клеток в флакон (чашку) и 30000 - в камеру. Культуральные сосуды помещали в термостат NAPCO 6100. Клетки культивировали в атмосфере 5 % углекислого газа при 37 градусах С. Через каждые 3-4 суток (длительность пассажа) их субкультивировали (пассировали) - после обработки монослоя раствором Версена клетки пересеивали в другой флакон.

Все эксперименты проводили с монослоем клеток в стадии экспоненциального роста. Клетки облучали на гамма- и рентгеновс-

кой установках, а также экспонировали в 10-км зоне аварии на ЧАЭС. Монослой подвергали облучению при комнатной температуре: а) острому - на гамма-установке ГУТ Со60 - 400 в чашках Петри в дозах 10-150 сГр при мощности дозы 75 сГр/мин и на рентгеновской установке РУТ 200-20-3 во флаконах в дозах 1-5 Гр (44 сГр/мин); б) пролонгированному - во флаконах на гамма-установках ГУТ Со60 - 400 в дозе 3 сГр (3 сГр/сут) и ЭЦУ-100 Cs137 в дозах 10 и 20 сГр при мощности дозы 3 сГр/сут и в дозе 40 сГр - 12 сГр/сут. Экспонирование на почве в 10-км зоне аварии на ЧАЭС осуществляли во флаконах (на границе "рыжего" леса) в течение 2-4 сут при мощности дозы гамма-облучения 1-100 мр/ч. Контрольные флаконы находились в тех же условиях в "чистом" регионе (мощность дозы гамма-облучения - 20 мкр/ч). Через сутки после прекращения экспонирования клетки начинали пассировать.

В работе использовали комплексы платины и ацетат свинца. Препараты растворяли в среде Игла непосредственно перед употреблением. Обработку монослоя клеток в стадии экспоненциального роста препаратами проводили в чашках Петри (при 37 градусах С в атмосфере 5% углекислого газа) и во флаконах (при комнатной температуре в обычной атмосфере). Клетки обрабатывали в чашках цис-платиной (7,5 мкМ) и транс-платиной (75 мкМ) в течение 1 ч. Облучение монослоя проводили через 30 мин после начала обработки клеток препаратами. Клеточный монослой обрабатывали ацетатом свинца: а) в концентрациях 1-100 мкМ в течение 90 мин (облучение - через 30 мин после начала обработки); б) в концентрации 1 мкМ в течение 80 ч (облучение - через 2 ч после начала обработки).

Клонировали клетки по стандартной методике (Конки и др., 1989). Клоны выращивали 8-9 сут. Подсчитывали жизнеспособные

(содержащие не менее 50 клеток) клоны; клоны с меньшим количеством клеток считали abortивными. Определяли выжившую фракцию клеток как отношение числа жизнеспособных клонов в опыте к числу жизнеспособных клонов в контроле.

Пролиферативную активность клеток оценивали по отношению численности выросших во флаконе за 3-4 суток (за один пассаж) клеток к числу посеянных (Тапонайнен, 1986), по численности клеток в клонах и диаметру клонов (Конки и др., 1989).

Для выявления повреждений ДНК использовали смесь ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК (арабинозидцитозина (араЦ) и оксимочевины (ОМ)), которые позволяют накапливать эти повреждения (Filatov, Noscin, 1983). Препараты растворяли в среде Игла непосредственно перед употреблением. Клеточный монослой (на 3-4 сут после посева клеток в чашки Петри) обрабатывали смесью араЦ (Sigma, 250 мкМ) и ОМ (Seva, 1 мМ) в течение 6 ч в атмосфере 5% углекислого газа при 37 градусах С. Обработку препаратами начинали сразу после облучения клеток. О степени поврежденности ДНК судили по выжившей фракции клеток.

Клетки с микроядрами подсчитывали по стандартной методике (Ikushima, 1987).

При статистической обработке использовали критерии хи-квадрат, Стьюдента и знаков (Мюллер и др., 1982); достоверность эффектов определяли при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При облучении в дозах 10-40 сГр изменения численности клеток в монослое и эффективности клонирования клеток на протяжении 13 пассажей не обнаружено (табл. 1).

Таблица 1.

Прирост численности клеток в монослое и их выживаемость после острого облучения (Собо, 75 сГр/мин)

Номер пассажа	Прирост численности клеток, % от контрольного*			Выжившая фракция, % *		
	Доза облучения, сГр					
	10	20	40	10	20	40
0				98	100	95
1	93	103	92	97	99	97
2	101	95	95	99	101	96
3	102	104	97	101	101	101
4	99	95	94	100	98	98
5	101	99	99			100
6	101		108			99
7	96		91			102
8	101		105			97
9	94		95			101
10	103		104			99
11	98		101			100
12	97		97			
13	104					

Примечание: * - эффект облучения недостоверен (критерий знаков).

Далее при использовании араЦ и Ом исследован уровень радиационных повреждений ДНК. АраЦ с Ом добавляли в культуру сразу после облучения, когда репарация повреждений еще не была завершена, и на протяжении последующих четырнадцати поколений. Пс-видимому, облучение даже в дозах, при которых не наблюдается сни-

жения эффективности клонирования, индуцирует повреждения, возможно, дестабилизирующие геном; эта нестабильность у потомков облученных клеток может вызывать нарушения, которые при ингибировании репарации снижают пролиферативную активность и выживаемость клеток. Исследование закономерностей этого эффекта от дозы облучения показало, что с дозой растет степень и длительность его проявления (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют, что в популяции доля поврежденных клеток уменьшается с дозой облучения и с каждым делением.

Эти же результаты могут объяснить данные более тщательного исследования пролиферативной активности, репродуктивной способности клеток и выхода цитогенетических повреждений. Выбор микроядерного теста, характеризующего радиочувствительность клеток в течение всего клеточного цикла (Заичкина, Ганасси, 1984), для выявления цитогенетических повреждений не случаен, так как облучали асинхронную популяцию клеток. Клетки с такими хромосомными aberrациями, как ацентрики, дающими начало микроядрам, не могут непрерывно делиться и формировать жизнеспособные колонии. Повышение доли клеток с микроядрами может свидетельствовать о росте не только доли репродуктивно погибших клеток, но и риска возникновения фокусов трансформации в популяции клеток человека (Edwards et al., 1989).

При исследовании клонов обнаружено, что при воздействии облучения в дозах 10-40 сГр диаметр клонов растет, а число клеток в них, и, следовательно, пролиферативная активность, снижается; этот эффект растет с дозой и сохраняется в течение 4-10 генераций (табл. 3).

Ранее (Puck, Steffen, 1963) обнаружено, что после α -облуче-

Таблица 2.

Выживаемость и прирост численности клеток после острого облучения и обработки араЦ (250 мкМ) и ОМ (1 мМ) в течение 6 ч

Опыт с дозой	Номер пассажа	Выжившая фракция, %			Прирост численности клеток, % от контрольного		
		Облу- чение	АраЦ+ОМ	Облучение + араЦ+ОМ	Облу- чение	АраЦ+ОМ	Облучение + араЦ+ОМ
10сГр	0	98	74	63*			
	1	97	89	79*	93	62	53
	2	99	85	81	101	66	59
	3	101	81	80	102	66	61
	4	100	88	86	99	82	76
	5				100	80	77
20сГр	0	100	64	55*			
	1	99	85	73*	103	72	60
	2	101	74	70*	95	63	55
	3	101	72	71	104	69	68
	4	98	66	63	95	79	72
	5				99	68	64
40сГр	0	98	69	29*			
	1	99	83	55*	93	68	30
	2	100	75	42*	96	67	45
	3	100	77	54*	99	71	55
	4	100	84	66*	105	62	53
	5				99	67	55

Примечание: * - достоверное (критерий хи-квадрат) различие между эффектом препаратов и эффектом облучения и препаратов.

Таблица 3.

Численность клеток в клонах, диаметр клонов и доля гигантских клеток в них после острого облучения (Собо, 75 сГр/мин)

N	Численность клеток в колонии				Диаметр клона, мкм				Доля гигантских клеток, промилле			
	Доза облучения, сГр											
пас-сажа	0	10	20	40	0	10	20	40	0	10	20	40
0	155	114*	84*	64*	552	608*	653*	793*	13	16#	18#	39#
1	130	91*	90*	97*	439	460	467	550*	12	16#	15#	16#
3	231	212	227	171*	407	416	436	416				

Примечание: * - достоверный (критерий Стьюдента) эффект облучения; # - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект облучения.

ния клеток HeLa уже в дозе 10 сГр увеличивается выход хромосомных аберраций и происходит задержка митоза (блок в G2-фазе). Можно полагать поэтому, что снижение пролиферативной активности облученных в малых дозах клеток и их потомков объясняется удлинением времени генерации и/или отдаленной гибелью потомков облученных клеток, вызванной мутациями. Полученные нами и другими исследователями данные подтверждают эти предположения.

В наших экспериментах было обнаружено увеличение доли гигантских клеток в клонах на протяжении трех генераций после острого облучения (Собо) даже в дозе 10 сГр (табл. 3); в то же время, при исследовании монослоя изменение этого показателя выявлено лишь после облучения в дозе 40 сГр (табл. 4).

При пролонгированном гамма-облучении в дозе 10 сГр частота гигантских клеток и клеток с микродрами не изменялась, а в дозах 20-40 сГр - увеличивалась. У потомков (до 14 генерации) об-

Таблица 4.

Доля гигантских клеток и клеток с микроядрами после острого облучения (Со 60, 75 сГр/мин)

Номер пассажа	Доля (промилле) клеток в монослое							
	гигантских				с микроядрами			
	Доза облучения, сГр							
	0	10	20	40	0	10	20	40
1	30	31	33	49*	10	11	12	14
2	31	30	32	39*	10	11	10	10
3	32	30	30	32	11	11	10	11
4	34	31	34	31	11	10	10	11

Примечание: * - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект облучения.

лученных в дозах 10-40 сГр клеток частота клеток с микроядрами не изменялась, в отличие от частоты гигантских клеток - ее повышение регистрировали в трех поколениях после облучения в дозе 40 сГр (табл. 5).

Доля гигантских клеток и клеток с микроядрами возрастает и после экспонирования в зоне аварии на ЧАЭС (при наибольшей дозе гамма-облучения, которая составляла 10 сГр); изменения этих показателей у потомков облученных клеток не выявлено (табл. 6).

Увеличение числа гигантских клеток и клеток с микроядрами в отдаленных поколениях может свидетельствовать о том, что они возникают у потомков облученных клеток, так как при пассировании культуры эти клетки элиминируются - они не прикрепляются к субстрату при пересеве. Вероятно, облучение вызывает серьезные наследуемые нарушения, приводящие клетки к репродуктивной гибели.

Таблица 5.

Доля гигантских клеток и клеток с микроядрами в монослое после пролонгированного облучения (Cs 137)

Опыт с довой	Номер пассажа	Доля (промилле) клеток			
		гигантских		с микроядрами	
		Контроль	Облучение	Контроль	Облучение
10 сГр	1	31	33	12	14
	2	23	25	10	10
	3	31	27	12	12
	4	27	27	10	11
	5	29	28	10	11
20 сГр	1	32	43*	10	23*
	2	24	29	12	12
	3	26	23	12	12
	4	23	30	12	10
	5	35	28	12	10
40 сГр	1	26	42*	12	29*
	2	26	34*	11	10
	3	26	22	12	10
	4	23	26	11	12
	5	35	22	10	10

Примечание: * - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект облучения.

Кроме того, возникновение de novo у отдаленных потомков облученных клеток микроядер может свидетельствовать о том, что в молекуле ДНК длительное время существуют нарушения, которые в определенный момент могут привести к поломкам хромосом. Это поднима-

Таблица 6.

Доля гигантских клеток и клеток с микроядрами после экспонирования в зоне аварии на ЧАЭС и х-облучения в дозах 1-5 Гр

До- ва, Гр	N пас- сажа	Доля (промилле) клеток									
		гигантских					с микроядрами				
		Длительность экспонирования, сут									
		2		4			2		4		
		Доза гамма-облучения, мГр									
		0	0,5	50	0	100	0	0,5	50	0	100
0	1	23		29	25	36*	10		13	12	19*
	2	22	22	24			10	10	11		
	3	20		19	22	24	9		9	10	11
	4	18		21	19	20	9		10	9	10
	5	19	19	18	20	19	8	7		8	9
	9	19	16	19	19	18					
1	5	60	56	58	67	69	50	49	44	54	56
	9	55	50	57	56	53					
3	1	101		132*	107	167*	106		142*	109	185*
	2	95		111*			104	110	122*		
	3	90		95	95	109*	103		106	106	127*
	4	93		88	94	99	101		105	101	123*
	5	85	81	91	90	88	90	91	92	94	105
	9	82	76	87	87	83					
5	5	156	158	165	161	193*	202	176	222*	212	243*
	7				151	163				203	216
	9	147	142	143	140	146					

Примечание: * - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект экспонирования.

ет серьезную проблему более детального изучения не только объектов, находившихся в зоне радиоактивного загрязнения, но и их близких и далеких потомков.

Была проведена отдельная серия опытов для определения радиочувствительности клеток на протяжении нескольких поколений после пролонгированного облучения в малых дозах. Это облучение проводили в зоне аварии на ЧАЭС (при температуре почвы) или в лабораторных условиях (при комнатной температуре).

Изучение радиочувствительности клеток после экспонирования в полевых условиях в 10-километровой зоне аварии обнаружило интересные закономерности. После пролонгированного облучения в малых дозах в зоне аварии и последующего острого облучения в высоких дозах (1-5 Гр) через 2 сут адаптивная реакция не развивается. Более того, по всем использованным критериям отмечается противоположный эффект - повышение чувствительности клеток к последующему острому облучению.

Феномен повышения радиочувствительности наблюдается в течение многих поколений клеток после их удаления из зоны аварии; этот эффект увеличивался с дозой предварительного пролонгированного облучения и дозой повторного острого α -облучения (от 3 до 5 Гр; при 1 Гр вообще не проявлялся).

Пролонгированное гамма-облучение даже в дозе 3 сГр не проходит для клеток бесследно: при повторном остром α -облучении в дозе 3 Гр наблюдается (как и в экспериментах в зоне аварии на ЧАЭС) повышение радиочувствительности клеток - реакция адаптивного ответа не обнаруживается (табл. 7). Острое облучение в этой ситуации является инструментом для обнаружения повреждений, возникших при пролонгированном облучении в малой дозе. Эффект повышения

Таблица 7.

Выживаемость клеток, доля гигантских клеток и клеток с микроядрами после пролонгированного гамма-облучения в дозе 3 сГр и острого х-облучения в дозе 3 Гр

Доза, сГр	Интервал между об- лучениями, ч	Выжившая фракция, %	Доля (промилле) клеток	
			гигантских	с микроядрами
0		100	24	12
3		99	22	12
300		26	94	111
3+300	4	16*	132*	131*
3+300	24	18*	106	118
3+300	48	25	81	119
3+300	72	18*	79	101

Примечание: * - достоверное (критерий хи-квадрат) различие между эффектом х- и гамма-облучения и эффектом х-облучения.

радиочувствительности был максимальным при повторном облучении через 4 ч и регистрировался даже в третьей генерации после предварительного облучения в малой дозе.

Приведенные данные показывают, что в клетках, подвергшихся пролонгированному облучению, и у их потомков не наблюдается адаптивного ответа (повышения радиорезистентности) - наоборот, популяция становится даже более радиочувствительной; эти результаты имеют большое теоретическое значение для понимания эффектов пролонгированного облучения в малых дозах и практическое значение, т.к. у лиц, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, может наблюдаться повышенная чувствительность к облу-

чению и, возможно, другим агентам - например, неблагоприятным экологическим факторам, лекарственным препаратам и т. д. В этой ситуации важной проблемой является изучение совместного действия ионизирующей радиации в низких дозах и химических соединений. Проведенные нами исследования совместного действия радиации с комплексами платины и солями свинца обнаружили интересные закономерности.

Комплексы платины и острое гамма-облучение могут приводить к синергическим и аддитивным эффектам. Цис-платина оказалась эффективнее транс-платины. Наши результаты свидетельствуют о синергическом действии цис-платины и радиации в дозе 150 сГр (табл. 8).

Наибольший интерес представляют результаты исследования совместного действия ацетата свинца и радиации в дозе, которая сама по себе не вызывает видимых эффектов; оказалось, что облучение усиливает цитотоксическое действие ацетата свинца - эффект обнаруживается по увеличению гибели клеток, росту долей гигантских клеток и клеток с микроядрами. При совместном остром воздействии радиации и ацетата свинца в концентрации 1 мкМ усиления эффекта препарата не наблюдается (табл. 9). Однако, при пролонгированном облучении и длительной обработке ацетатом свинца в той же концентрации отмечается усиление действия препарата. Эффект отмечается только в первой генерации клеток - по-видимому, происходит быстрая элиминация поврежденных клеток (табл. 10).

Приведенные данные позволяют сделать весьма важный вывод: пролонгированное облучение в малых дозах, не вызывая само по себе заметных эффектов, может значительно увеличить риск возникновения нежелательных последствий при совместном действии с други-

Таблица 8.

Выживаемость клеток после обработки комплексами платины и острого облучения (Со60)

Обработка препаратом	Выжившая фракция		
	Доза облучения, сГр		
	0	50	150
-	100	87*	70*
7,5 мкМ цис-платина	87"	79	78!
75 мкМ транс-платина	86"	56	59

Примечание: достоверный (критерий хи-квадрат) эффект: " - препарата; * - облучения; ! - синергический.

Таблица 9.

Выживаемость клеток, доли гигантских клеток и клеток с микроядрами после обработки ацетатом свинца и острого облучения

Ацетат свинца, мкМ	Выжившая фракция, %		Доля (промилле) клеток			
			гигантских		с микроядрами	
	Доза облучения, сГр					
	0	10	0	10	0	10
0	100	98	28	28	10 ⁰	11
1	96	96	37"	39	11	12
10	75"	66!	48"	73!	17"	22!
100	66"	44!	53"	94!	21"	32!

Примечание: " - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект препарата; ! - достоверное (критерий хи-квадрат) усиление эффекта препарата.

ми вредными экологическими факторами (в частности, со



Таблица 10.

Доля гигантских клеток и клеток с микроядрами после обработки ацетатом свинца и пролонгированного облучения

Ацетат свинца, мкм	Номер пассажи	Доля (промилле) клеток			
		гигантских		с микроядрами	
		Доза облучения, сГр			
		0	10	0	10
0	1	20	26	11	14
	2	22	22	9	11
	3	23	22	10	12
	4	23	26	9	10
1	1	62"	93!	30"	48!"
	2	24	30	10	10
	3	27	25	11	10
	4	27	27	11	11

Примечание: " - достоверный (критерий хи-квадрат) эффект препарата; ! - достоверное (критерий хи-квадрат) усиление эффекта препарата.

свинца).

Итак, повышенная чувствительность облученных клеток может проявляться не только к действию повторного острого облучения, но и к действию химических агентов; эти данные позволяют полагать, что проживание людей на загрязненных радионуклидами территориях может вызывать повышенный риск возникновения отдаленных последствий в результате совместного действия облучения в малых дозах и вредных экологических факторов.

Анализ всех полученных нами данных позволяет предположить,

что после облучения в малых дозах возникает нестабильность генома, которая может вызвать равного рода повреждения даже у потомков облученных клеток. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что сохраняющиеся нерепарированные или репарированные с ошибками повреждения ДНК могут приводить к хромосомным повреждениям, мутациям и онкогенной трансформации (Kihlman, 1971; Terzaghi, Little, 1975; Nagasawa et al., 1983).

ВЫВОДЫ

1. Острое гамма-облучение в дозах 10-40 сГр, не изменяющее эффективности клонирования клеток, снижает их пролиферативную активность (уменьшается численность клеток в клонах) и повышает частоту гигантских клеток; эти изменения регистрируются на протяжении 4-10 поколений.

2. С помощью ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК (араЦ и ОМ) выявлено повышение уровня повреждений ДНК после острого гамма-облучения в дозах 10-40 сГр на протяжении 14 генераций.

3. Пролонгированное гамма-облучение в лабораторных условиях в дозах 20-40 сГр, как и нахождение клеток в 10-км зоне аварии на Чернобыльской АЭС (доза гамма-облучения 10 сГр), повышает частоту гигантских клеток и клеток с микроядрами; эффект регистрируется в 4 поколениях.

4. После пролонгированного облучения в лабораторных условиях в дозе 3 сГр повышается чувствительность клеток к последующему острому х-облучению в дозе 3 Гр, что выражается в снижении эффективности клонирования клеток, повышении частоты гигантских

клеток и клеток с микроядрами; эффект регистрируется в течение трех генераций. Предварительное нахождение клеток в зоне аварии (дозы гамма-облучения 5-10 сГр) также повышает их чувствительность к последующему облучению (в дозах 3-5 Гр); эффект регистрируется на протяжении 14 поколений и увеличивается с дозой облучения.

5. При совместном действии острого гамма-облучения в дозах 50-150 сГр с комплексами платины обнаружен синергический (с цис-платиной) и аддитивный эффекты, выявляемые по снижению выживаемости клеток.

6. При совместном действии ацетата свинца и гамма-облучения в дозе 10 сГр отмечено усиление цитотоксического действия свинца (повышается репродуктивная гибель клеток и выход цитогенетических повреждений); эффект регистрируется только в первой генерации клеток и усиливается при пролонгировании воздействия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Альферович А. А., Готлиб В. Я., Конрадов А. А., Конопля Е. Ф., Пелевина И. И. Эффект малых доз радиации на клетки млекопитающих // Биологические и радиозоологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской атомной станции: Тез. докл. Междунар. конф. - М., 1990. - С. 197.

2. Альферович А. А., Готлиб В. Я., Конрадов А. А., Конопля Е. Ф., Пелевина И. И. Влияние ионизирующего излучения в малых дозах на жизнеспособность клеток в культуре // Республ. научно-практ. конф. по радиобиологии и радиозоологии: Тез. докл. - Минск, 1990. - С. 9.

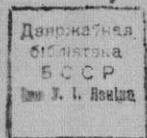
3. Альферович А. А., Готлиб В. Я., Конрадов А. А., Горбунова Н. В., Конопля Е. Ф., Пелевина И. И. Отдаленные эффекты малых доз облучения // Радиобиологические последствия аварии на Чернобыльской АЭС: Тез. докл. Всесоюз. конф. - Минск, 1991. - С. 6-7.

4. Альферович А. А., Готлиб В. Я., Конрадов А. А., Конопля Е. Ф., Пелевина И. И. Воздействие малых доз гамма-излучения на клетки млекопитающих // Изв. АН СССР. Сер. биол. - 1992. - № 1. - С. 127-130.

5. Готлиб В. Я., Пелевина И. И., Конопля Е. Ф., Альферович А. А., Конрадов А. А. Некоторые аспекты биологического действия малых доз радиации // Радиобиология. - 1992. - Т. 31, вып. 3. - С. 318-325.



Подписано к печати 19.02.93 г. Формат 60/84 ¹/₁₆
 Бумага офсетная. Усл. печ. л. 1,4. Уч. изд. л. 2,3.
 Тир. 100 экз. Зак. № 57. Ротапринт Ассоциации Бухгалтеров Р.Б. НИЭИ Госэкономплана Р.Б. 220045, Минск, ул. Славинского, 1, кор. 1.



2AΔ 1104



B000000555396 1