DOI: 10.21870/0131-3878-2021-30-4-156-167

УДК 576.3:575.224.23:612.014.482.4:546.26:

Эффекты гиперчувствительности и индуцированной радиорезистентности в клетках СНО-K1 после воздействия гамма-излучения и ускоренных ионов углерода

Корякина Е.В.¹, Потетня В.И.¹, Трошина М.В.¹, Байкузина Р.М.¹, Корякин С.Н.¹, Каприн А.Д.²

¹ МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

² ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва

В работе изучены закономерности индукции аббераций хромосом в клетках китайского хомячка СНО-K1 при низкодозовом (до 1 Гр) воздействии γ -излучения ^{60}Co и облучении ускоренными ионами углерода (455 МэВ/нуклон) на участках немодифицированной кривой Брэгга, в которых при проведении радиотерапии обычно оказываются здоровые нормальные ткани: в области плато кривой Брэгга и за пиком Брэгга. Начальные участки дозовых кривых суммарной частоты аббераций хромосом и частоты фрагментов при действии γ -излучения отличались от линейно-квадратичной зависимости, проявляя область плато в диапазоне доз 0,1-0,6 Гр. Аналогичные закономерности получены при воздействии пучком ионов, однако область плато на дозовых кривых проявлялась в меньшем диапазоне доз (0,15-0,35 Гр). Несмотря на однотипный ход дозовых кривых выхода аббераций хромосом, наблюдается зависимость цитогенетического эффекта от линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения: частота аббераций возрастала с увеличением ЛПЭ излучения в порядке: γ -излучение ^{60}Co (0,2 кэВ/мкм), облучение на плато кривой Брэгга (10-12 кэВ/мкм), облучение за пиком Брэгга (25-27 кэВ/мкм); за пределами этого диапазона выход аббераций хромосом также возрастал с увеличением ЛПЭ в том же порядке. Полученные результаты подтвердили, что феномен гиперчувствительности и индуцированной радиорезистентности проявляется при радиационном воздействии в дозах менее 1 Гр излучений с низкими и средними ЛПЭ (0,2-27 кэВ/мкм) при использовании теста образования аббераций хромосом.

Ключевые слова: ионы углерода, абберации хромосом, клетки китайского хомячка, гиперчувствительность, индуцированная радиорезистентность, ЛПЭ.

Введение

Перспективность использования ускоренных ионов углерода в лучевой терапии онкологических больных обусловлена их конечным пробегом в ткани и увеличением локального выделения энергии в конце пробега, что снижает дозовую нагрузку на здоровые ткани по ходу пучка и после остановки ионов. Кроме того, пучки ускоренных ионов углерода дают возможность как высоко-конформного облучения, так и успешного воздействия на радиорезистентные опухоли благодаря их высокой биологической эффективности.

Распределение поглощённой дозы вдоль оси пучка ионов по глубине облучаемого вещества (кривая Брэгга) имеет три характерные области: плато – медленное изменение дозы, начиная от входа пучка в вещество, пик Брэгга – дозовый максимум, и область за пиком Брэгга. Следует подчеркнуть, что образующиеся при взаимодействии ионов углерода с тканью вторичные частицы – фрагменты ядер, обладающие высокой энергией и большими пробегами в ткани, приводят к дополнительному облучению здоровых тканей как в пределах плато кривой Брэгга, так и за дистальным краем пика Брэгга. За дистальной границей пика Брэгга поглощённая доза обусловлена только вторичными частицами [1]. Важность учёта биологических эффектов,

Корякина Е.В.* – ст. науч. сотр., к.б.н.; Потетня В.И. – ст. науч. сотр. к.б.н.; Трошина М.В. – науч. сотр.; Байкузина Р.М. – вед. инж.; Корякин С.Н. – зав. отд., к.б.н. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Каприн А.Д. – ген. директор, акад. РАН, д.м.н., проф. ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249035, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: (484) 399-72-76; e-mail: ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru.

обусловленных фрагментами ядер, образующихся при использовании ускоренных протонов и ионов углерода в терапии, отмечается, например, в работе [2].

Средние величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения углеродного пучка, действующего на нормальные ткани до опухоли и за ней, в диапазоне 10-30 кэВ/мкм, позволяют предполагать, что при дозах меньше 1 Гр могут проявляться радиобиологические эффекты низкодозового радиационного воздействия, в частности гиперчувствительности и индуцированной резистентности (ГЧ/ИР) [3]. Этот эффект проявляется по тесту клоногенной активности на многих клетках млекопитающих, но не всех, при дозах редкоионизирующего излучения, отрицательных π -мезонов и протонов ниже 1 Гр, характеризуется наличием области ГЧ, которая переходит в область ИР и затем в регулярную линейно-квадратичную зависимость. Исследования с использованием цитогенетического теста менее многочисленны, особенно при действии быстрых нейтронов и ускоренных ионов. Согласно предположению первооткрывателей этого эффекта существует верхний порог его проявления при ЛПЭ 35-50 кэВ/мкм [4].

В настоящей работе исследовали цитогенетические нарушения в клетках китайского хомячка СНО-К1, индуцированные стандартным γ -излучением и ускоренными ионами углерода и образованными ими вторичными частицами, в том числе в области доз, характерных для проявления феномена ГЧ/ИР, в зависимости от ЛПЭ излучения на разных участках кривой Брэгга.

Материалы и методы

Цитогенетическую эффективность ионов углерода (ускоритель У-70, ГНЦ РФ ИФВЭ – НИЦ «Курчатовский институт», г. Протвино) исследовали на клетках китайского хомячка линии СНО-К1 в стационарной фазе роста (5-6 сут после пересева в количестве $3-5 \times 10^5$ клеток на флакон). Монослои клеток на дне полистироловых флаконов (25 см^2 , Corning) облучали немодифицированным пучком ионов ^{12}C в водном фантоме в области плато кривой Брэгга на глубине 7-12 см (средняя мощность дозы 0,05-0,1 Гр/мин) или за пиком Брэгга на расстоянии 4-7 мм от него (средняя мощность дозы 0,03-0,06 Гр/мин) в диапазоне поглощённых доз 0,07-2,5 Гр. Облучение проводили в двух повторах, после облучения до посева клетки выдерживали при температуре тающего льда. Подробнее схема облучения и дозиметрия на углеродном ускорителе были описаны ранее [5].

Биологический эффект ионов углерода сравнивали с действием стандартного γ -излучения. Для этого флаконы с монослоями клеток облучали на установке с источником ^{60}Co в условиях электронного равновесия в дозах 0,08-3,19 Гр (мощность дозы 0,05 Гр/мин). Дозиметрию в данном случае осуществляли с помощью дозиметра Unidos с тканеэквивалентной ионизационной камерой ТМ30010.

Культивирование клеток до и после облучения, фиксацию и приготовление препаратов хромосом первого митоза проводили по стандартным протоколам рутинного метода [6]. При анализе аберраций хромосом учитывали весь спектр повреждений, видимых при обычном окрашивании по методу Гимза. При фиксации через 24-26 ч после посева облучённых клеток в свежую среду наибольший вклад в общее число аберраций хромосом (АХ) дают аберрации хромосомного типа (терминальные делеции, дицентрики, центрические кольца, интерстициальные делеции), что характерно для клеток, облучённых в стадии G_1 [7]. На каждую дозовую точку анализировали 1200-1800 метафаз на световом микроскопе.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных методов, реализованных в программных средствах Microsoft Excel, OriginLab. Регрессионный анализ

дозовых кривых проводили с использованием стандартной (1) и модифицированной (2) [3] линейно-квадратичной модели:

$$Y = \alpha D + \beta D^2, \quad (1)$$

$$Y = \alpha' D + \beta D^2, \quad (2)$$

$$\alpha' = \alpha[1 + (\alpha_s/\alpha - 1)\exp(-D/D_c)], \quad (3)$$

где Y – частота aberrаций хромосом; D – поглощённая доза, Гр; α , Гр⁻¹, α' , Гр⁻¹ и β , Гр⁻² – линейный, линейный модифицированный и квадратичный регрессионные коэффициенты соответственно; α_s – начальный наклон дозовой кривой при малых дозах (область ГЧ); D_c – константа, представляющая дозу, при которой индуцирование радиорезистентности составляет 63% от максимального значения.

Формулы (2), (3) получены из исходной модели [3], разработанной для выживаемости клеток млекопитающих, исходя из соотношения:

$$- \ln S = Y_{tot}, \quad (4)$$

которое связывает суммарную частоту видимых в световой микроскоп нестабильных АХ, Y_{tot} , и выживаемость S [8, 9].

Также применяли кусочно-линейную модель [10], в которой отдельные участки дозовой зависимости описывали отрезками прямых.

Результаты и обсуждение

На рис. 1а-в представлены экспериментальные данные по выходу АХ в клетках китайского хомячка СНО-K1, облучённых стандартным γ -излучением ⁶⁰Со и пучком ускоренных ионов углерода. Для ионов углерода показаны только начальные участки дозовых кривых в диапазоне доз <1,25 Гр.

Вначале была изучена дозовая кривая выхода АХ при действии γ -излучения в дозах до 3,2 Гр (рис. 1а). В этом диапазоне она удовлетворительно описывается стандартной линейно-квадратичной зависимостью ($P < 0,0001$). Однако на начальном участке до 1 Гр она характеризуется наличием квазиплато в диапазоне 0,07-0,6 Гр с незначительным ростом числа АХ. Этот отрезок дозовой кривой описывается уравнением линейной регрессии $Y = a + bD = (3,55 \pm 0,25) + (3,96 \pm 0,68)D$ ($P = 0,00216$). За областью квазиплато наблюдается более быстрый рост АХ. Следует отметить, что в отличие от стандартной линейно-квадратичной модели (1), её модифицированный вариант, разработанный для описания эффекта ГЧ/ИР (2), хорошо аппроксимирует форму начального участка дозовой кривой до 1 Гр и дальнейшую дозовую зависимость ($P < 0,0001$). Значение начального наклона модифицированной дозовой кривой значительно выше наклона линейно-квадратичной ($\alpha_s \approx 10\alpha$). Однако отсутствие экспериментальных точек при дозах <0,1 Гр требует рассматривать это соотношение лишь как указание на наличие участка гиперчувствительности в диапазоне <0,1 Гр. Следует при этом учитывать, что в межлабораторных исследованиях [11] не была установлена ГЧ по выходу дицентриков в лимфоцитах человека в диапазоне доз <0,05 Гр. Это может свидетельствовать о наличии порога эффекта ГЧ при дозах 0,05-0,07 Гр, который не учитывается в модифицированной модели [3]. Тем не менее, использование модели (2) подчёркивает характерные особенности начального участка дозовой кривой: наличие квазиплато (область ИР), которому должна предшествовать область ГЧ, и переход к регулярной линейно-квадратичной зависимости за областью квазиплато.

Рис. 1. Выход aberrаций хромосом в клетках китайского хомячка в зависимости от дозы излучения: а) при действии γ -излучения ^{60}Co ; б) при облучении ускоренными ионами углерода в области плато кривой Брэгга; в) за пиком Брэгга (пунктирные линии – линейно-квадратичная зависимость, сплошные линии – аппроксимации по модифицированной модели (2)); г) нормированный на дозу исследуемого излучения (1 – за пиком Брэгга, 2 – плато кривой Брэгга, 3 – γ -излучение ^{60}Co).

Описанные особенности формы дозовой кривой выхода АХ в клетках китайского хомячка линии СНО-К1 при действии γ -излучения в дозах <1 Гр, соответствующие проявлению эффекта ГЧ/ИР, проявляются и при облучении этих клеток на пучке ионов углерода в области плато кривой Брэгга (рис. 1б) и за пиком Брэгга (рис. 1в). Область квазиплато на дозовых кривых по сравнению с таковой для γ -излучения несколько уменьшена, до 0,3-0,4 Гр.

Наличие описанных выше особенностей на начальном участке дозовых кривых более выражено при нормировании выхода АХ на дозу исследуемого излучения (рис. 1г). Как видно, выход АХ на 1 Гр (радиочувствительность) в области квазиплато ($>0,07$ - $0,06$ Гр) начинает снижаться от значений, в 1,4-2 раза превышающих его уровень на начальном участке регулярных зависимостей (обозначены пунктиром), до значений почти в 2 раза ниже этого уровня.

Указанные выше закономерности наблюдались и для общей частоты АХ, и для наиболее часто встречаемого типа АХ в клетках СНО-К1 – терминальных делеций (парных фрагментов).

Для количественного сопоставления экспериментальных данных применили кусочно-линейную модель [10], в которой отдельные участки дозовой зависимости (ГЧ, ИР, регулярная) описывали отрезками прямых (рис. 2а,б). За пределами области ИР дозовые участки регулярной

зависимости удовлетворительно описывались линейной моделью ($P < 0,0001$ для ионов углерода и $P < 0,005$ для γ -излучения). На участке ИР зависимость суммарной частоты АХ от дозы соответствовала линейной регрессии только для γ -излучения ($P = 0,00216$), а для ионов углерода – нет ($P = 0,25$ на плато кривой Брэгга, $P = 0,66$ за пиком Брэгга).

Рис. 2. Дозовые зависимости суммарной частоты aberrаций хромосом (а) и частоты парных фрагментов (б) в клетках китайского хомячка: 1 – при облучении на пучке ионов углерода в области за пиком Брэгга; 2 – в области плато кривой Брэгга; 3 – при действии γ -излучения ^{60}Co .

Поэтому были определены средние значения суммарной частоты АХ в этой области, которые составили для ионов углерода $5,6 \pm 0,5$ (плато кривой Брэгга), $11,4 \pm 0,6$ (за пиком Брэгга) и $4,4 \pm 0,3$ для γ -излучения (в диапазоне доз до 0,4 Гр для сопоставимости с данными для ионов углерода). Соответствующие данные для частоты фрагментов – $3,5 \pm 0,2$; $7,0 \pm 0,5$; $2,5 \pm 0,2$. Количество АХ на дозозависимом участке (область ИР, рис. 2а) при облучении клеток за пиком Брэгга значительно отличается от их числа при облучении как на плато кривой Брэгга, так и γ -квантами ^{60}Co (критерий Стьюдента $t > t_{99}$), для двух последних вариантов облучения $t > t_{95}$, но $t < t_{99}$. Различия уровней плато ИР для частоты фрагментов значимы ($t > t_{99}$) для всех вариантов облучения клеток.

Несмотря на однотипный ход дозовых зависимостей выхода АХ для γ -излучения и двух условий облучения на пучке ионов, наблюдается зависимость цитогенетического эффекта от ЛПЭ излучения. В диапазоне ГЧ/ИР это проявляется в повышении уровня плато с увеличением ЛПЭ в порядке γ -излучение, область плато кривой Брэгга и область за пиком Брэгга. За пределами этого диапазона выход АХ также возрастает с увеличением ЛПЭ (в том же порядке), что соответствует известным радиобиологическим закономерностям о зависимости ОБЭ от ЛПЭ.

Представленные цитогенетические эффекты в клетках СНО-K1 наблюдали по выходу АХ хромосомного типа, которые образуются при облучении в стадии G_1 . При выбранных режимах культивирования и фиксации клеток большинство анализируемых клеток находились в этой стадии. На это указывает количество клеток с АХ хромосомного типа (87, 80 и 74%), хромосомного и хроматидного типов одновременно (стадия S, 0, 4, 8%) и только хроматидного типа (стадия G_2 , 13, 16, 18%) при облучении γ -квантами ^{60}Co , пучком ионов углерода на плато кривой Брэгга и за её пиком соответственно. Процент АХ хромосомного типа при этом составил 87, 85 и 82%.

Результаты расчётов спектров частиц, формирующихся в водном фантоме при облучении пучком ускоренных ионов с начальной энергией 455 МэВ/нуклон (энергия на входе в фантом –

424 МэВ/нуклон), показали, что в области плато кривой Брэгга основная часть поглощённой дозы (100-70%) обусловлена первичными ионами ^{12}C с высокой энергией (4-5 ГэВ, или 300-400 МэВ/нуклон) и с низкой ЛПЭ (10-12 кэВ/мкм) (рис. 3а,б). При этом в результате взаимодействия первичных ионов углерода с ядрами атомов облучаемой среды образуются фрагменты ионов и ядер. Фрагменты первичного иона движутся с энергией, близкой к его энергии (300-400 МэВ/нуклон), и имеют ЛПЭ от 0,3 кэВ/мкм (^1H) до 7,3 кэВ/мкм (^{11}B). Наибольший вклад в суммарную дозу излучения пучка дают фрагменты – ядра водорода, гелия, лития, бериллия, бора (рис. 4). В области за пиком Брэгга спектр излучения представлен лишь фрагментами, в основном тех же 5 элементов. Вторичными частицами обусловлено от долей до 40% дозы в области плато кривой Брэгга и 100% за пиком Брэгга.

Рис. 3. Глубинные распределения потока, дозы и среднедозовой ЛПЭ пучка ионов углерода (≈ 420 МэВ/н) в водном фантоме: а) 1 – поток первичных ионов, 2 – среднедозовая ЛПЭ; б) 1 – суммарная поглощённая доза, 2 – доза первичных ионов, 3 – доза вторичных частиц.

Средняя ЛПЭ вторичного излучения за пиком составляет около 25 кэВ/мкм на расстояниях 0,5-1 см от пика (рис. 3а). Следует отметить, что состав и дополнительный вклад вторичного излучения при использовании ускоренных ионов зависит от материала облучаемого объёма. При облучении биологической ткани в результате ядерных взаимодействий образуются нейтроны и ядра атомов с зарядом от +1 (водород) до +19 (калий), но основной вклад в дозу дают ядра 5 элементов – H, He, Li, B, Be, и изотоп углерода ^{11}C (рис. 4).

Рис. 4. Глубинные дозовые кривые основных частиц, формирующих дозу при облучении ускоренными ионами углерода: 1 – суммарная доза; 2 – первичные частицы; 3 – все вторичные частицы; 4 – изотопы углерода (в основном ^{11}C); 5 – α -частицы; 6 – протоны; 7 – ядра бора; 8 – ядра бериллия; 9 – ядра лития.

Своеобразный вид дозовой зависимости, обнаруженный по выживаемости клеток млекопитающих в диапазоне низких доз γ -излучения (<1 Гр) и давший название радиобиологическому эффекту ГЧ/ИР [3], наблюдался до этого на клетках пыльцы кукурузы по индукции мутаций и выживаемости, лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* по выходу АХ. В последнем случае описание дозовых кривых выживаемости [3] и выхода дицентриков совпадает в деталях: «количество дицентриков было незначительно при облучении в дозах до 0,05 Гр, затем следовал быстрый рост их числа между дозами 0,075 и 0,10 Гр, после чего их выход замедлялся, и в диапазоне доз 0,1-0,3 Гр дозовая кривая переходила в плато, за которым вновь происходило закономерное повышение количества дицентриков с увеличением дозы» [12]. Позже дозовые кривые аналогичного вида в области низких доз были обнаружены на других растительных клетках [10], а также на разных линиях клеток млекопитающих, в том числе опухолевого происхождения, с использованием теста выживаемости [3].

Полученные в настоящей работе результаты по индукции АХ показали, что для клеток китайского хомячка, облучённых на разных участках кривой Брэгга ионов углерода, проявляются аналогичные описанным выше закономерности формирования дозовых кривых.

Относительно механизмов, лежащих в основе ГЧ/ИР, существуют различные гипотезы. Так, если при объяснении эффекта ИР преобладают представления об активации систем(ы) репарации радиационных повреждений ДНК при достижении их количества некоторого порогового уровня (индуцибельная репарация [13]), то в случае ГЧ рассматривают разные механизмы и факторы: апоптоз (в том числе р53 опосредованный), гетерогенность клеточной популяции по стадиям цикла, активные формы кислорода, пороговый характер индуцирования некоторых путей системы репарации повреждений ДНК и др. [14]. Предполагается также возможная общность механизмов эффектов ГЧ/ИР и адаптивного ответа [3, 13, 15]. Однако отсутствие общепринятого механизма рассматриваемого эффекта указывает на необходимость дополнительных детальных исследований закономерностей его проявления при действии разнообразных факторов, включая излучения с различной ЛПЭ, индуцирующие повреждения разной степени сложности.

Зависимость эффекта ГЧ/ИР от ЛПЭ излучения в основном исследовали с помощью теста выживаемости клеток млекопитающих. Так, эффект был выявлен при действии протонов с ЛПЭ 12 и 26 кэВ/мкм [16], π^- -мезонов на плато кривой Брэгга (10-20 кэВ/мкм) [3], быстрых нейтронов с энергией 14,1-14,5 МэВ [17, 18], ускоренных ионов углерода с ЛПЭ 70 кэВ/мкм [19]. Однако эффект не был обнаружен при действии π^- -мезонов в пике Брэгга (35 кэВ/мкм) [4], быстрых нейтронов со средней энергией 2,26 МэВ (50-70 кэВ/мкм) [20]. Разноречивость данных отражает, на наш взгляд, методические сложности проведения экспериментов в диапазоне низких доз (в частности, необходимость достаточной статистической нагруженности экспериментальных точек для получения достоверных результатов, сложность точного попадания в достаточно узкие дозовые интервалы проявления эффектов, особенно в случае ГЧ), а также возможную зависимость проявления эффекта от типа клеток.

Основные выявленные закономерности зависимости эффекта ГЧ/ИР от ЛПЭ, как отмечается в работе [4], сводятся к тому, что ГЧ является универсальным ответом клеток на низкие уровни радиационного воздействия независимо от его ЛПЭ, тогда как область плато проявляется в компетентных по репарации клетках при действии излучений с низкой ЛПЭ.

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что верхняя граница области ГЧ, определяемая как начало области плато, наблюдается при дозах 0,07-0,1-0,12 Гр (ЛПЭ 0,2,

10-12 и 25-27 кэВ/мкм соответственно), т.е. увеличивается с ростом ЛПЭ. Дозовый диапазон проявления ИР в зависимости от ЛПЭ уменьшается от 0,5 Гр для γ -излучения до 0,3-0,35 Гр для ионов углерода. Таким образом, область плато тем меньше, чем выше ЛПЭ. В проведённых ранее экспериментах с быстрыми нейтронами ($E_n=14,5$ МэВ) область плато наблюдалась примерно в этом же дозовом диапазоне 0,15-0,35 Гр [17].

Ранее было высказано предположение, что область ИР является результатом запуска системы репарации радиационных клеточных повреждений, преобладающих после действия излучения с низкой, а не высокой ЛПЭ [20]. Этим, в частности, объясняли отсутствие проявления феномена ГЧ/ИР после действия π -мезонов (ЛПЭ=35-55 кэВ/мкм) и быстрых нейтронов (50-70 кэВ/мкм), что и привело к выводу о наличии верхнего предела ЛПЭ для этого эффекта. Однако эти же два вида излучения достоверно вызывали адаптивную реакцию в клетках V-79, обусловленную именно запуском системы репарации в том же диапазоне доз адаптирующей дозы, что и в эффекте ГЧ/ИР. Следует отметить, что указанные значения ЛПЭ являются средними величинами. При облучении π -мезонами и нейтронами на клетки действует целый спектр вторичных частиц с ЛПЭ от 0,22 до 800-1000 кэВ/мкм. Редкоионизирующая составляющая дозы от частиц с ЛПЭ (или её микродозиметрического аналога линейной энергии, y) ≤ 10 кэВ/мкм составляет $\approx 55\%$ дозы в пике Брэгга π -мезонов и $\approx 17\%$ дозы нейтронов, и, по-видимому, инициировала адаптивный эффект.

В экспериментах на пучке ионов углерода в области плато кривой Брэгга основная часть дозы (70%) и соответственно радиационных повреждений обусловлена первичными ионами ^{12}C с низкой ЛПЭ (10-12 кэВ/мкм), а также фрагментами с ещё более низкими величинами ЛПЭ (см. выше). Кроме того, ионы углерода образуют δ -электроны с максимальной энергией до 1,1 МэВ (сравнимой с энергией вторичных электронов для стандартного излучения ^{60}Co , примерно 1 МэВ), которыми обусловлено 40-50% дозы иона. В области за пиком Брэгга спектр излучения представлен лишь фрагментами: высокоэнергетическими лёгкими ядрами водорода, гелия, лития, бериллия, бора с низкими ЛПЭ. Фрагменты вследствие высокой энергии проявляют радиобиологические характеристики редкоионизирующего излучения, хотя средняя ЛПЭ (около 25 кэВ/мкм) вторичного излучения за пиком выше, чем на плато. Таким образом, можно предположить, что в проведённых экспериментах наблюдаемый эффект ГЧ/ИР обусловлен компонентами дозы с низкой ЛПЭ.

При облучении нейтронами с энергией 14-15 МэВ около 70% дозы обусловлено протонами (среднедозовая ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм), что благоприятствовало проявлению эффекта [21]. Наблюдавшийся эффект ГЧ/ИР немодифицированного пучка ускоренных ионов углерода со средней ЛПЭ 70 кэВ/мкм [19] также, вероятно, связан со сложным составом действующего спектра излучения в области пика Брэгга. Ионы первичного пучка распределены по ЛПЭ в диапазоне от ≈ 45 до 110 кэВ/мкм, вторичные частицы, дающие вклад в суммарную дозу 25-30%, имеют ЛПЭ от 0,2 до 40-45 кэВ/мкм. Кроме того, вклад в суммарную дозу дают δ -электроны с максимальной энергией до 40-110 кэВ и ЛПЭ $> 0,4-0,8$ кэВ/мкм, образованные первичными ионами.

Рассмотренные результаты по действию отрицательных π -мезонов, нейтронов, ускоренных ионов углерода на выживаемость и выход АХ в клетках млекопитающих в диапазоне низких доз (< 1 Гр) в целом согласуются с предположением, что эффект ГЧ/ИР может быть обусловлен вкладом компонентов с низкими значениями ЛПЭ в поглощённую дозу (от 25-30 до 70-90%), которые инициируют репарацию повреждений ДНК. Однако предположение о наличии и, тем

более, величине верхнего порога ЛПЭ для проявления эффекта ГЧ/ИР требует дополнительных исследований, поскольку его обоснование было сделано, исходя из средних значений ЛПЭ излучений сложного состава, а также не подтверждается экспериментальными данными для ионов углерода (70 кэВ/мкм). Кроме того, недостаточно изученным остаётся вопрос о наличии нижнего дозового порога для проявления эффекта ГЧ, на возможное существование которого указывают данные по выходу дицентриков в лимфоцитах человека при действии низких доз γ -излучения в цитированной работе А.В. Севаньяева [12].

Заключение

Результаты цитогенетических исследований с использованием стандартного γ -излучения показали, что культура клеток китайского хомячка СНО-K1 характеризуется отличием начальных участков дозовых кривых суммарной частоты АХ и парных фрагментов от линейно-квадратичной зависимости. Это проявляется наличием квазиплато в диапазоне доз 0,07-0,6 Гр, более высоким выходом АХ в его начале по сравнению с линейно-квадратичной экстраполяцией из области высоких доз. Начальный участок и дозовые кривые в целом удовлетворительно описывает модифицированная линейно-квадратичная модель, разработанная для описания эффекта ГЧ/ИР.

Исходя из описанных выше результатов, был исследован начальный дозовый диапазон до 1-1,5 Гр при облучении ионами углерода на участках кривой Брэгга с низкими ЛПЭ – плато кривой Брэгга (10-12 кэВ/мкм) и за пиком Брэгга (25-27 кэВ/мкм). При действии пучка ионов углерода также проявлялся эффект ГЧ/ИР. Его особенностью являлось, с одной стороны, уменьшение области квазиплато до 0,3-0,35 Гр, и, с другой стороны, увеличение количества АХ с ростом ЛПЭ в дозовом диапазоне области ИР, как и во всём исследуемом диапазоне доз. Зависимость эффекта от ЛПЭ излучения, как свидетельствуют результаты расчётов, обусловлена спектром и физическими характеристиками действующего излучения: первичных ионов ^{12}C и вторичных частиц. Поэтому при проведении углеродной терапии необходимо принимать во внимание наряду с биологической эквивалентной дозой также и физические дозы, поглощённые здоровыми тканями по ходу пучка перед и за пределами расширенного пика Брэгга. Обусловлено это нерегулярной формой дозовых зависимостей при дозах до 0,3-0,4 Гр, что делает как оценку ОБЭ по выживаемости, так и оценку мутагенных рисков (поскольку с определёнными типами АХ, например, симметричными меж- и внутрихромосомными обменами и микроделециями, могут быть связаны мутации), затруднительной и неоднозначной.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам НИЦ «Курчатовский институт» – ИФВЭ за предоставление возможности и содействие в проведении экспериментов на ускорителе У-70.

Литература

1. **Ou H.F., Zhang B., Zhao S.J.** Monte Carlo simulation for calculation of fragments produced by 400 MeV/u carbon ion beam in water //Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 2017. V. 396. P. 18-25.
2. **Tommasino F., Durante M.** Proton radiobiology //Cancers. 2015. V. 7, N 1. P. 353-381.
3. **Marples B., Joiner M.C.** The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population //Radiat. Res. 1993. V. 133, N 1. P. 41-51.
4. **Marples B., Lam G.K.Y., Zhou H., Skov K.A.** The response of Chinese hamster V79-379A cells exposed to negative pi-mesons: evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer //Radiat. Res. 1994. V. 138, N 1 Suppl. P. S81-S84.
5. **Корякина Е.В., Потетня В.И., Трошина М.В., Ефимова М.Н., Байкузина Р.М., Корякин С.Н., Лычагин А.А., Пикалов В.А., Ульяненко С.Е.** Сравнение биологической эффективности ускоренных ионов углерода и тяжелых ядер отдачи на клетках китайского хомячка //Радиация и риск. 2019. Т. 28, № 3. С. 96-106.
6. **Фрешни Р.Я.** Культура животных клеток. Практическое руководство /Пер. с англ. под ред. Ю.Н. Хомякова. М.: Бином, 2010. 691 с.
7. **Matsuya Y., McMahon S.J., Tsutsumi K., Sasaki K., Okuyama G., Yoshii Y., Mori R., Oikawa J., Prise K.M., Date H.** Investigation of dose-rate effects and cell-cycle distribution under protracted exposure to ionizing radiation for various dose-rates //Sci. Rep. 2018. V. 8. N 1. P. 1-14.
8. **Обатуров Г.М., Потетня В.И.** Хромосомные aberrации и репродуктивная гибель клеток млекопитающих. Количественные соотношения между этими эффектами //Радиобиология. 1986. Т. 26, № 4. С. 465-472.
9. **Conforth M.N., Bedford J.S.** A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts //Radiat. Res. 1987. V. 111, N 3. P. 385-405.
10. **Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Kim J.K., Dikarev V.G., Dikareva N.S.** Cytogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship //Radiat. Environ. Biophys. 2007. V. 46, N 1. P. 31-41.
11. **Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A., Deknudt G.L., Verschaeve L., Natarajan A.T., Darroudi F., Obe G., Palitti F., Tanzarellae C., Tawn E.J.** Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays //Int. J. Radiat. Biol. 1992. V. 61, N 3. P. 335-343.
12. **Севанькаев А.В., Лучник Н.В.** Влияние гамма-облучения на хромосомы человека. Сообщение VIII. Цитогенетический эффект низких доз при облучении in vitro //Генетика. 1977. Т. XIII, № 3. С. 524-532.
13. **Севанькаев А.В., Хвостунов И.К., Потетня В.И.** Цитогенетические эффекты малых доз и мощностей доз при γ -облучении лимфоцитов крови человека in vitro. II. Результаты цитогенетических исследований //Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 1. С. 11-24.
14. **Martin L.M., Marples B., Lynch T.H., Hollywood D., Marignol L.** Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences //Cancer Lett. 2014. V. 349, N 1. P. 98-106.
15. **Seth I., Joiner M.C., Tucker J.D.** Cytogenetic low-dose hyper-radiosensitivity is observed in human peripheral blood lymphocytes // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2015. V. 91, N 1. P. 82-90.
16. **Schettino G., Folkard M., Prise K.M., Vojnovic B., Bowey A.G., Michael B.D.** Low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79 cells targeted with counted protons using a charged-particle microbeam //Radiat. Res. 2001. V. 156. P. 526-534.
17. **Корякина Е.В., Потетня В.И.** Цитогенетические эффекты низких доз нейтронов в клетках млекопитающих //Альманах клинической медицины. 2015. № 41. С. 72-78.

18. **Dionet C., Tchirkov A., Alard J.P., Arnold J., Dhermain J., Rapp M., Bodez V., Tamain J.C., Monbel I., Malet P., Kwiatkowski F., Donnarieix D., Veyre A., Verrelle P.** Effects of low-dose neutrons applied at reduced dose rate on human melanoma cells // *Radiat. Res.* 2000. V. 154, N 4. P. 406-411.
19. **Xue L., Yu D., Furusawa Y., Cao J., Okayasu R., Fan S.** ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009. V. 75, N 1. P. 235-243.
20. **Marples B., Skov K.A.** Small doses of high-linear energy transfer radiation increase the radioresistance of Chinese hamster V79 cells to subsequent X irradiation // *Radiat. Res.* 1996. V. 146, N 4. P. 382-387.
21. **Корякина Е.В., Потетня В.И., Клыков С.А., Пугачев Р.М.** Биологическая эффективность нейтронов и альфа-излучения с близкой ЛПЭ // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* 2013. Т. 12, № 59, Ч. III. С. 39-40.

Effects of hypersensitivity and induced radioresistance in CHO-K1 cells following exposure to gamma-rays and accelerated carbon ions

Koryakina E.V.¹, Potetnya V.I.¹, Troshina M.V.¹, Baykuzina R.M.¹, Koryakin S.N.¹, Kaprin A.D.²

¹ A. Tsyb MRRC, Obninsk;

² NMRRRC, Moscow

The study presents results of investigations on chromosome aberrations (CA) yield in Chinese hamster ovary cells after exposure to γ -rays and accelerated carbon ions (455 MeV/amu) at doses less than 1 Gy in the pristine Bragg curve plateau and behind the Bragg peak, where normal tissues are situated in the course of radiotherapy. Initial parts of dose curves for total CA and terminal deletions frequencies differed from linear-quadratic dependence and the region of induced radioresistance were observed at 0.1-0.6 Gy for γ -rays. The similar curve shapes were detected for carbon ions, but plateau region was shorter (0.15-0.35 Gy). Despite the uniform shape of the dose curves for the CA yield, a definite dependence of the cytogenetic effect on the linear energy transfer (LET) is observed. The CA frequency increased with LET rising in the order: γ -irradiation (0.2 keV/ μ m), carbon ions at the Bragg curve plateau (10-12 keV/ μ m) and at the «tail» of Bragg peak (25-27 keV/ μ m). Outside this range, the yield of chromosome aberrations also enhanced with increasing LET in the same order. The results obtained confirm that the hypersensitivity and induced radioresistance phenomena are characteristic for low level exposure to low-LET and middle-LET radiations when chromosome aberration test is used.

Key words: *accelerated carbon ions, chromosome aberrations, Chinese Hamster Ovary cells, hypersensitivity, induced radioresistance, linear energy transfer.*

References

1. **Ou H.F., Zhang B., Zhao S.J.** Monte Carlo simulation for calculation of fragments produced by 400 MeV/u carbon ion beam in water. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, 2017, vol. 396, pp. 18-25.
2. **Tommasino F., Durante M.** Proton radiobiology. *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 353-381.
3. **Marples B., Joiner M.C.** The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat. Res.* 1993, vol. 133, no. 1, pp. 41-51.
4. **Marples B., Lam G.K.Y., Zhou H., Skov K.A.** The response of Chinese hamster V79-379A cells exposed to negative pi-mesons: evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer. *Radiat. Res.*, 1994, vol. 138, no. 1 Suppl., pp. S81-S84.
5. **Koryakina E.V., Potetnya V.I., Troshina M.V., Efimova M.N., Baykuzina R.M., Koryakin S.N., Lychagin A.A., Pikalov V.A., Ulyanenko S.E.** Comparison of the biological efficiency of accelerated carbon ions and

Koryakina E.V.* – Sen. Res., C. Sc., Biol.; **Potetnya V.I.** – Sen. Res., C. Sc., Biol.; **Troshina M.V.** – Researcher; **Baykuzina R.M.** – Lead. Engineer; **Koryakin S.N.** – Head of Dep., C. Sc., Biol. A. Tsyb MRRC. **Kaprin A.D.** – Director General, Academician of RAS, MD, Prof. NMRRC.
*Contacts: 4 Korolev Str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249035. Tel.: (484) 399-72-76; e-mail: ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru.

- heavy recoils in Chinese hamster cells. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2019, vol. 28, no. 3, pp. 96-106. (In Russian).
6. **Freshney R.J.** Kul'tura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo [Culture of animal cells. A manual of basic technique. Fifth Edition]. Moscow, BINOM, 2010. 691 p.
 7. **Matsuya Y., McMahon S.J., Tsutsumi K., Sasaki K., Okuyama G., Yoshii Y., Mori R., Oikawa J., Prise K.M., Date H.** Investigation of dose-rate effects and cell-cycle distribution under protracted exposure to ionizing radiation for various dose-rates. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 1-14.
 8. **Obaturov G.M., Potetnya V.I.** Chromosome aberrations and reproductive death of mammalian cells: quantitative correlation between these effects. *Radiobiologiya – Radiobiology*, 1986, vol. 26, no. 4, pp. 465-472. (In Russian).
 9. **Conforth M.N., Bedford J.S.** A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat. Res.*, 1987, vol. 111, no. 3, pp. 385-405.
 10. **Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Kim J.K., Dikarev V.G., Dikareva N.S.** Cytogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2007, vol. 46, no. 1, pp. 31-41.
 11. **Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A., Deknudt G.L., Verschaeve L., Natarajan A.T., Darroudi F., Obe G., Palitti F., Tanzarellae C., Tawn E.J.** Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, vol. 61, no. 3, pp. 335-343.
 12. **Sevan'kaev A.V., Luchnik N.V.** Effect of gamma-irradiation on human chromosomes. VIII. Cytogenetic effect of low doses during in vitro irradiation. *Genetika – Genetics*, 1977, vol. 13, no. 3, pp. 524-532. (In Russian).
 13. **Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Potetnya V.I.** The low dose and low dose rate cytogenetic effects induced by γ -radiation in human blood lymphocytes in vitro. II. The results of cytogenetic study. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2012, vol. 52, no. 1, pp. 11-24. (In Russian).
 14. **Martin L.M., Marples B., Lynch T.H., Hollywood D., Marignol L.** Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences. *Cancer Lett.*, 2014, vol. 349, no. 1, pp. 98-106.
 15. **Seth I., Joiner M.C., Tucker J.D.** Cytogenetic low-dose hyper-radiosensitivity is observed in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2015, vol. 91, no. 1, pp. 82-90.
 16. **Schettino G., Folkard M., Prise K.M., Vojnovic B., Bowey A.G., Michael B.D.** Low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79 cells targeted with counted protons using a charged-particle microbeam. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 156, pp. 526-534.
 17. **Koryakina E.V., Potetnya V.I.** Neutron low doses cytogenetic effects in mammalian cells. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny – Almanac of Clinical Medicine*, 2015, vol. 41, pp. 72-78. (In Russian).
 18. **Dionet C., Tchirkov A., Alard J.P., Arnold J., Dhermain J., Rapp M., Bodez V., Tamain J.C., Monbel I., Malet P., Kwiatkowski F., Donnarieix D., Veyre A., Verrelle P.** Effects of low-dose neutrons applied at reduced dose rate on human melanoma cells. *Radiat. Res.*, 2000, vol. 154, no. 4, pp. 406-411.
 19. **Xue L., Yu D., Furusawa Y., Cao J., Okayasu R., Fan S.** ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2009, vol. 75, no. 1, pp. 235-243.
 20. **Marples B., Skov K.A.** Small doses of high-linear energy transfer radiation increase the radioresistance of Chinese hamster V79 cells to subsequent X irradiation. *Radiat. Res.*, 1996, vol. 146, no. 4, pp. 382-387.
 21. **Koryakina E.V., Potetnya V.I., Klykov S.A., Pugachev R.M.** Biological efficiency of neutrons and alpha radiation with a comparable LET. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk – Actual Problems of the Humanities and Natural Sciences*, 2013, vol. 12, no. 59, part III, pp. 39-40. (In Russian).