

# ЛАБОРАТОРИЯ РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ

В июне 2005 г. Отделение радиационных и радиобиологических исследований было преобразовано в Лабораторию радиационной биологии. Научная программа ЛРБ реализовывалась в соответствии с темой первой категории Проблемно-тематического плана научно-исследовательских работ и международного научно-технического сотрудничества ОИЯИ в следующих направлениях:

- радиационная генетика и радиобиология;
- фоторадиобиологические исследования;
- молекулярное моделирование биофизических систем;
- физика защиты от излучений;
- радиационный мониторинг на ядерно-физических установках Института.

## РАДИАЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА И РАДИОБИОЛОГИЯ

На дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* продолжались исследования закономерностей индукции мутаций различной природы под действием ионизирующей радиации с использованием четырех генетических систем, позволяющих тестировать определенные типы повреждений [1].

Прямые мутации, т.е. любые внутригенные повреждения, нарушающие ген аргининпермиазы *CAN1*, детектируются по возникновению мутаций канаванин-резистентности *Can<sup>r</sup>*. Обратные мутации к *Lys<sup>+</sup>* и *Hom<sup>+</sup>* в гене *LYS2*, имеющем вставку четырех нуклеотидов, и гене *HOM3*, имеющем вставку одного нуклеотида, используются для тестирования мутаций сдвига рамки считывания в результате выпадения одного нуклеотида. Ранее были изучены закономерности индукции этих мутаций  $\gamma$ -квантами. В настоящее время эти системы используются для изучения закономерностей индукции мутаций УФ-светом и тяжелыми ионами. Облучение ионами  ${}^7\text{Li}$  с ЛПЭ 17 кэВ/мкм показало, что эффективность индукции мутаций *Can<sup>r</sup>*, *Lys<sup>+</sup>*, *Hom<sup>+</sup>* не высока и наблюдается нелинейная зависимость образования делеционных мутантов от дозы облучения.

Кривая доза–эффект при облучении УФ-светом также имеет нелинейный характер. Для тестиро-

вания протяженных делеций размером несколько тысяч нуклеотидных пар использовалась плазмидная система, позволяющая генетическими методами определять выпадение нескольких генов. Электрофоретический и рестрикционный анализ плазмидной ДНК позволил определить размер и локализацию делеции. Была обнаружена экспоненциальная зависимость частоты делеционных мутантов от дозы облучения, причем доля более протяженных делеций возрастает с увеличением дозы.

Продолжаются исследования генетического контроля генетической стабильности и остановки клеточного цикла при получении повреждений ДНК, так называемого checkpoint-контроля. Ранее были выделены мутации в генах *SRM*, некоторые из которых были локализованы (*SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HF11*). Проводятся работы по клонированию и картированию гена *SRM2*. Изучается влияние генов *SRM* на стабильность рекомбинантных генетических структур. Показано влияние мутации *srm2* на стабильность центромерной (YCp50) и бесцентромерной (YRp12) ARS-содержащих плазмид.

Клонирование мутации *srm5/cdc28-srm* совместно с Институтом Макса Планка (Берлин) выявило единичную замену G20S в консервативном

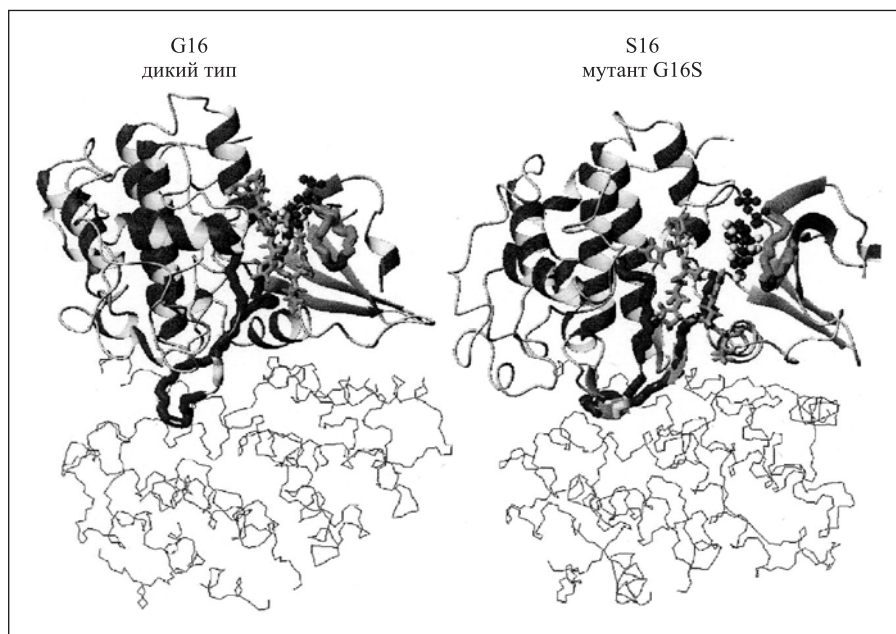


Рис. 1. Расчет структуры протеинкиназы методом молекулярной динамики (МД)

участке G-богатой петли протеинкиназы *CDC28*. Совместно с группой МД-моделирования изучалось влияние мутации *cdc28-srm* на пространственную структуру протеинкиназы (рис. 1) и на ее взаимодействие с субстратами и регуляторными белками на базе кристаллической решетки гомологичной протеинкиназы человека CDK2 [2]. МД-анализ показал, что замена CDK2-G16S вызывает сильную деформацию G-петли, она удлиняет ее на 2,5 Å. При этом происходит изменение ориентации АТФ, структуры всей киназной субъединицы, а также циклина. В результате расстояние между фосфорилируемым серином субстрата и  $\gamma$ -фосфатом АТФ увеличивается на 3 Å. Кроме того, сильно деформируется поверхность узнавания циклином (спираль  $\alpha 1$ , L4 и T-петля). Эти изменения, по-видимому, приводят к различным последствиям, в частности влияют на связывание с циклинами, субстратами, киназную активность и регуляторное фосфорилирование. Известно, что замена глицинов в G-петле, в частности первого и второго глицина (GxGxxG), на аланин или серин приводит к резкому снижению активности цАПК.

Продолжалось изучение индукции хромосомных повреждений малыми дозами излучения с разной ЛПЭ в лимфоцитах периферической крови человека. Полученные ранее результаты подтверждены на образцах крови шести доноров (рис. 2). Показана гиперчувствительность (ГЧ) клеток при дозах 1–5 сГр, обусловленная в основном индукцией хроматидных aberrаций, которые характерны главным образом для спонтанно индуцированных нарушений и по классическим представлениям не индуцируются ионизирующим излучением. С ростом дозы наблюдается увеличение радиорезистентности и снижение числа aberrаций практически до контрольного уровня.

При дозах свыше 50–70 сГр зависимость доза–эффект приобретает линейный характер за счет aberrаций хромосомного типа [3].

Несмотря на некоторую вариабельность в амплитуде и положении пика ГЧ у разных доноров, регрессионный анализ всего объема экспериментальных данных свидетельствует о достоверности пика ГЧ и нелинейном характере зависимости эффекта от дозы. Указанные закономерности имеют место в диапазоне ЛПЭ 0,3–16 кэВ/мкм.

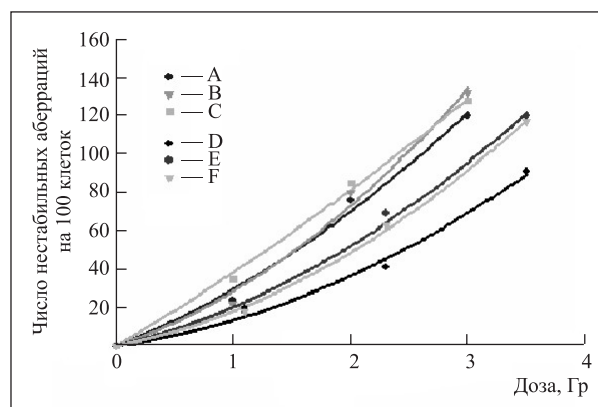


Рис. 2. Хромосомные aberrации в лимфоцитах человеческой крови шести доноров после облучения ядрами углерода с энергией 480 МэВ/нуклон

В коллаборации с биофизической группой GSI (Дармштадт, Германия) была проведена серия экспериментов на нормальных фибробластах человека с целью изучения зависимости между клеточной пролиферацией и экспрессией хромосомных повреждений после облучения рентгеновскими лучами и заря-

женными частицами (195 и 10 МэВ/нуклон — ионы С и 11 МэВ/нуклон — ионы Ni). Показано, что облучение культуры фибробластов плотно- и редко-ионизирующей радиацией вызывает сильный, иногда постоянный арест в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла, зависящий от дозы и ЛПЭ излучения. В результате только небольшое число облученных клеток достигает первого митоза. Исследование хромосомных повреждений в первом цикле деления в разное время после облучения показало двукратное увеличение выхода аберраций со временем для низких доз излучения с низкой ЛПЭ. При более высоких дозах и высоких ЛПЭ этот эффект выражен слабее или вообще отсутствует вследствие хронического ареста тяжело поврежденных клеток и, как результат, их неспособности достичь митоза. Это наблюдение согласуется с другими исследованиями, которые показали, что этот ответ является специфической стратегией фибробластов для сохранения генетической целостности популяции и предотвращения расширения генетической изменчивости.

В коллаборации с польскими исследователями (Институт биологии, Кельце, Польша) проведена серия экспериментов по исследованию индивидуальных отклонений распределения повреждений ДНК в хромосомах-2, 8, 14 (лимфоциты периферической крови человека) в зависимости от ЛПЭ излучений. Это первые исследования в этой области, проведенные на лимфоцитах периферической крови человека *in-vitro* при высоких ЛПЭ излучений. Во всех известных исследованиях на лимфоцитах использовались излучения с малыми значениями ЛПЭ. Вместе с тем при проведении космических полетов возрастает вероятность облучения частицами с большими значениями ЛПЭ, что определяет актуальность исследований. Результаты экспериментов показали, что междонорные отличия могут быть причиной ошибки в биодозиметрии при определении полученной дозы облучения. Данную ошибку можно минимизировать по определению повреждений хромосомы-2, так как наши исследования показали наименьшую вариабельность отклонения показателей ее повреждений между донорами (девять доноров). Это наблюдение согласуется с данными других исследовате-

лей, которые получили аналогичные результаты, но при меньшем количестве обследуемых доноров (два-три донора). Более того, результаты наших исследований показали, что отношение между центрическими кольцами и дицентриками в хромосоме-2 может являться реперной точкой для оценки дозы облучения частицами с большими значениями ЛПЭ.

Проведена оценка воздействия терапевтического протонного пучка (фазотрон ОИЯИ) на клетки человека по цитогенетическим нарушениям в лимфоцитах периферической крови. Исследованы хромосомные аберрации в клетках человека (на модели лимфоцитов крови) при облучении на входе в объект исходного пучка протонов с энергией 170 МэВ и в области пика Брэгга, что соответствует облучению нормальных тканей на пути пучка и непосредственно тканей опухоли. Более высокая эффективность протонов в пике Брэгга наблюдается по числу возникающих в клетках аберраций хромосом: при облучении в дозе 3 Гр доля клеток со множественными аберрациями (три и более) почти в три раза превышала их число при облучении протонами 170 МэВ (27 и 10 % соответственно). При более высоких дозах эти отличия становятся менее выраженными (при дозе 5 Гр — 89 и 81 % таких клеток соответственно) [4].

Поскольку формирование терапевтической дозы протонов в опухоли осуществляется облучением пациентов с нескольких направлений (до семи), уровень цитогенетических повреждений клеток нормальных тканей оказывается сниженным примерно на порядок. Так, при дозе 3 Гр в опухоли получают повреждения до 80 % клеток, в то время как в нормальных тканях на пути пучков их уровень не превышает 10 %. Различие может быть даже большим, если учесть, что: 1) облучение приводит к задержке вступления в деление клеток (особенно тяжело поврежденных), так что часть из них вообще не достигает митоза и поэтому не могла быть учтена нами при микроскопировании; 2) в силу асинхронности популяции клеток опухолей большинство из них более радиочувствительны, чем клетки нормальных тканей и лимфоциты, облученные нами в G<sub>0</sub>-стадии. Результаты исследования подтверждают высокую эффективность протонных пучков при лучевой терапии.

## ФОТОРАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены измерения малоуглового рассеяния нейтронов растворами альфа-кристаллина (концентрация 8 мг/мл) с варьированием контраста в четырех буферах: в буфере 100 % H<sub>2</sub>O, в буфере 77 % H<sub>2</sub>O — 23 % D<sub>2</sub>O, в буфере 32 % H<sub>2</sub>O — 68 % D<sub>2</sub>O, в буфере 10 % H<sub>2</sub>O — 90 % D<sub>2</sub>O. Выполнена предварительная обработка результатов эксперимента, позволившая

определить радиус инерции, размер и объем альфа-кристаллина в буферах с разным содержанием D<sub>2</sub>O. Значения этих структурных параметров практически не зависят от содержания D<sub>2</sub>O в буфере и близки к значениям, полученным методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Независимость радиуса инерции альфа-кристаллина от содержания D<sub>2</sub>O в буфере

показывает, что молекула альфа-кристаллина имеет однородную плотность (новый экспериментальный факт).

Выполнены измерения малоуглового рассеяния нейтронов растворами альфа-кристаллина в буфере, содержащем 90 % D<sub>2</sub>O, при температурах 20, 50, 60, 65, 75, 85 и 95 °C в процессе нагревания и в процессе охлаждения, а также в буфере 100 % H<sub>2</sub>O при 20 °C до и после нагревания до 95 °C. В результате этих экспериментов впервые методом малоуглового

рассеяния получены структурные данные об альфа-кристаллине в широком диапазоне повышенных температур (измерения проводились непосредственно при повышенных температурах). Эти данные будут использованы для анализа структурных перестроек альфа-кристаллина при нагревании. Знание этих перестроек важно для понимания механизмов шапероноподобной активности альфа-кристаллина, которая зависит от температурной предыстории этого белка.

## КОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Методом компьютерного моделирования проведено исследование молекулярной динамики зрительного пигмента родопсина. Этот пигмент — белковый комплекс — является типичным представителем огромного семейства G-белок-связывающих рецепторов (GPCR), играющих ключевую роль во всех регуляторных процессах живых организмов. Сигнальные пути, регулируемые этими белками-рецепторами, определяют множество важнейших биологических процессов, включая процессы сенсорной рецепции, эндокринной регуляции и синаптической передачи. Функциональные свойства этих белков-рецепторов делают их наиболее привлекательными для фармакологии. В настоящее время уже более 50 % используемых лекарств имеют своей главной мишенью G-белок-связывающие рецепторы. Однако остается еще много невыясненных вопросов, касающихся функциональных свойств этих белков. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования этих белковых рецепторов, может дать возможность управлять многими биохимическими процессами, происходящими в организме.

Известно, что любой G-белок-связывающий рецептор представляет собой интегральный мембранный белок, образованный семью трансмембранными альфа-спиральными участками («тяжами»), связанными между собой шестью экстра-мембранными фрагментами «петлями», а общий принцип работы G-белкового каскада является универсальным. К сожалению, до настоящего времени, за исключением зрительного пигмента родопсина, детальная трехмерная структура этих белков-рецепторов остается невыясненной. Родопсин — первый и пока единственный G-белок-связывающий рецептор, чья трехмерная структура была изучена с помощью метода рентгеноструктурного анализа в 2000 г. Поэтому молекула родопсина является прекрасной моделью не только для изучения молекулярных механизмов процесса зрения, но и для выяснения функциональных осо-

бенностей всего семейства G-белок-связывающих рецепторов.

Основной целью работы было изучение молекулярных механизмов взаимодействия хромофора с опсином в процессе физиологической регенерации зрительного пигмента, а также попытка найти ответ, какие конформационные перестройки в родопсине в процессе его темновой адаптации приводят молекулу в состояние высокоэффективного биосенсора. С помощью метода компьютерного моделирования молекулярной динамики было исследовано темно-адаптированное состояние родопсина с 11-цис ретиналем.

Результаты по молекулярному моделированию родопсина [5, 6] показывают, что его хромофор, 11-цис ретиналь, после встраивания в хромофорный участок опсина меняет свою пространственную конфигурацию. Примерно через 0,4 нс после начала моделирования  $\beta$ -иононовое кольцо хромофора поворачивается относительно плоскости полиеновой цепи на 60°. Прослеживается четкая корреляция между поворотом  $\beta$ -иононового кольца и подвижностью цитоплазматического домена, ответственного за связывание G-белка, а также стабилизацией N-VI  $\alpha$ -спирали, что является характеристикой темно-адаптированного состояния родопсина. Изменения в поведении аминокислотных остатков, окружающих хромофор, также хорошо коррелируют с поворотом  $\beta$ -иононового кольца. Таким образом, продемонстрировано, что присутствие хромофорной группы в хромофорном центре опсина оказывает существенное влияние на ближайшее белковое окружение хромофора и на конформационное состояние цитоплазматического домена. На основании результатов моделирования обсуждается возможный внутримолекулярный механизм поддержания родопсина как G-белок-связывающего рецептора в неактивном состоянии, т. е. функция хромофора как эффективного лиганда-антагониста.

На основе результатов по молекулярному моделированию можно заключить, что процесс адаптации хромофора в родопсине в ходе регенерации зрительного пигмента инициирует важные конформацион-

ные перестройки в белковой части молекулы, что приводит молекулу родопсина в состояние не только высокоэффективного фотосенсибилизатора, но и стабилизирует его темное неактивное состояние.

## **ФИЗИКА ЗАЩИТЫ И РАДИАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Завершились работы над проектом создания установки SAD, в разработке защиты которого в части радиационной безопасности принимали участие специалисты ЛРБ. Был выполнен большой объем расчетов радиационной обстановки в помещениях здания подкритической сборки с учетом различных радиационных источников — потерь пучка протонов с энергией 660 МэВ в канале транспортировки пучка и в элементах магнитной оптики, нейтронов утечки из защиты активной зоны сборки и нейтронов утечки из сплошной защиты фазотрона ЛЯП. На основании полученных данных были распределены зоны радиационного воздействия в здании сборки при различных режимах работы. Выполнен расчет мощности дозы нейтронов в окружающей среде вблизи фазотрона ЛЯП, оценены уровни активации материалов и воздуха внутри помещения магнитов, а также активность выбросов в атмосферу. Проведены измерения пространственного распределения мощности дозы нейтронов утечки из защиты фазотрона в районе строительства установки и исследования наведенной активности грунта обваловки здания фазотрона.

Выполнены расчеты и разработана конструкция радиационной защиты от нейтронного излучения для

передвижной и стационарной установок таможенного контроля, предназначенных для идентификации скрытых наркотических или взрывчатых веществ.

Продолжались исследования функций отклика различных радиационных детекторов. Завершен расчет чувствительностей многосферного спектрометра нейтронов до энергии 20 МэВ [7]. Выполнены расчеты эффективности регистрации рентгеновского излучения кремниевыми и сцинтилляционными детекторами.

В рамках сотрудничества ОИЯИ и Института космических исследований (Москва) по программе исследования планет методами ядерной спектроскопии были сделаны предварительные оценки характеристик прибора LEND для сканирования лунной поверхности.

В 2005 г. были проведены три радиобиологических эксперимента на нуклотроне (на пучке ядер углерода с энергией 480 МэВ/нуклон и протонов с энергией 1 ГэВ) и эксперимент на МЦ-400 (пучок ядер В-11 с энергией 37 МэВ/нуклон), в ходе которых облучались лимфоциты человеческой крови и белки глаза.

## **РАДИАЦИОННЫЙ МОНИТОРИНГ НА ЯДЕРНЫХ УСТАНОВКАХ И РАДИАЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ ПЕРСОНАЛА**

Контроль радиационной обстановки на радиационно-опасных объектах ОИЯИ осуществлялся с помощью автоматизированных систем радиационного контроля и переносными радиометрическими и дозиметрическими приборами.

В 2005 г. на индивидуальном дозиметрическом контроле в Объединенном институте ядерных исследований состояло 1606 человек, включая 54 прикомандированных специалиста. Средняя годовая доза облучения персонала в целом по ОИЯИ составила 1,4 мЗв. Наибольшее значение индивидуальной годовой дозы персонала наблюдается в ЛНФ — 7,9 мЗв.

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 среды вокруг ОИЯИ 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.

В 2005 г. был выполнен большой объем работ по обеспечению радиационной безопасности

при демонтаже ИБР-30. Принятые организационно-технические меры и специальный дозиметрический контроль позволили не превысить планируемые дозы облучения персонала. В целом, обеспечение ради-

ационной безопасности в Объединенном институте ядерных исследований соответствует требованиям законов, норм и правил в области использования атомной энергии.

## КОНФЕРЕНЦИИ И ОБРАЗОВАНИЕ

В октябре 2005 г. в ОИЯИ была проведена III Международная конференция «Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций» и скоординированный с нею семинар «Актуальные проблемы космической радиобиологии применительно к длительным орбитальным и межпланетным пилотируемым полетам». Мероприятия были организованы Научным советом по радиобиологии РАН, ГНЦ РФ — Институтом медико-биологических проблем РАН, Институтом биохимической физики РАН, Институтом общей генетики РАН и ОИЯИ. Главной темой конференции стало рассмотрение фундаментальных проблем радиационной генетики человека, животных и растений, подвергшихся облучению в результате радиационных аварий, и анализ современных подходов к оценке генетического риска облучения человека в поколениях. Семинар был организован в соответствии с решениями второго меж-

дународного colloквиума КОСПАР «Радиационная безопасность пилотируемых полетов к Марсу», который проводился в Дубне в 2003 г. Основная задача семинара состояла в оценке радиобиологического риска астронавтов при длительных полетах в космосе. Научные программы конференции и семинара включали 52 пленарных, секционных и стендовых доклада. В работе конференции и семинара приняли участие более 85 физиков и радиобиологов из России, Украины, Белоруссии, Франции, Германии, Польши, Болгарии и ОИЯИ.

На кафедре «Биофизика» университета «Дубна» по специальностям «Радиационная безопасность человека и окружающей среды» и «Биофизика фотобиологических процессов» обучается в настоящее время 65 студентов. В 2005 г. на кафедру было принято 22 студента, а 7 студентов успешно завершили образование (первый выпуск).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Любимова К.А., Шванева Н.В., Колтовая Р.А. Мутации различной природы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием  $\gamma$ -излучения // Письма в ЭЧАЯ. 2005. №6(129). С. 98–108.
2. Koltovaya N. A. et al. Sequencing analysis of mutant allele *cdc28-srm* of protein kinase CDC28 and molecular dynamics study of glycine-rich loop in wild type and mutant allele G16S of CDK2 as model // FEBS J. 2005. V. 272(s1). P. E1-037P.
3. Shmakova N. L. et al. Cytogenetic effects of low dose radiation in mammalian cells: the analysis of the phenomenon of hypersensitivity and induced radioresistance // The Effects of Low Dose Radiation. New Aspects of Radiobiology Promote by Chernobyl Nuclear Disaster / Ed. M. W. S. Wahes. V. S. P. Intern. Sci. publicity, 2004. P. 233–243.
4. Говорун Р.Д. и др. Оценка воздействия терапевтического протонного пучка на клетки человека по цитогенетическим нарушениям в лимфоцитах периферической крови // Тр. Всерос. конф. «Радиобиологические основы лучевой терапии», Москва, 19–20 апреля 2005 г. С. 40.
5. Kholmurodov Kh. T. Molecular dynamics simulations of rhodopsin and prion proteins: The effect of disease-related amino acid mutations on their structural conformations // Part. Nucl. 2005. V. 36, No. 2. P. 291–318.
6. Kholmurodov Kh. T., Feldman T. B., Ostrovsky M. A. Molecular dynamics simulation and spectral studies of visual pigment rhodopsin: Multiple conformational states and structural changes. JINR Preprint E19-2005-20. Dubna, 2005.
7. Мартинкович Й., Тимошенко Г.Н. Расчет функций чувствительности многосферного спектрометра нейтронов в области энергий до 20 МэВ. Препринт ОИЯИ P16-2005-105. Дубна, 2005.