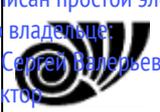


Документ подписан простой электронной подписью  
Информация о владельце:  
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич  
Должность: Ректор  
Дата подписания: 17.09.2025 11:02:17  
Уникальный программный ключ:  
04c19ed8bfb98f3b6cb77a486b9a8788b8322523



МИНОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)	Фонд оценочных средств по дисциплине «Молекулярная радиобиология» по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»	стр. 1
---	--	--------

**Фонд оценочных средств  
для промежуточной аттестации  
по дисциплине (модулю)**

**Молекулярная радиобиология**

Направление подготовки (специальность)  
**06.03.01 Биология**

Направленность (профиль)  
**Биофизика**

Присваиваемая квалификация  
**Бакалавр**

Форма обучения  
**очная**

Год (ы) набора: 2023

Челябинск, 2025 г.

## 1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: **06.03.01 Биология**

Направленность (профили): Биофизика

Дисциплина: **Молекулярная радиобиология**

Семестры изучения: 7

Форма промежуточной аттестации: экзамен

## 2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

### 2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «Молекулярная радиобиология» направлено на формирование следующих компетенций:

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
1	2	3	4
ПК-1	Способен применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов	ПК-1.1. Применяет принципы анализа информации, принципы работы современной аппаратуры и вычислительных средств. ПК-1.2. Использует теоретические знания в лабораторной работе. ПК-1.4. Использует теоретические знания об основных биологических закономерностях. ПК-1.5. Использует методы работы с современной аппаратурой и вычислительными средствами; методы статистической обработки полученных экспериментальных данных.	<b>Знать:</b> Для достижения ПК-1.2. знать: основные правила и требования при работе с ионизирующим излучением (включая вопросы техники безопасности). Для достижения ПК-1.4. знать: реакции клеток, тканей, органов и систем органов на воздействие ионизирующего излучения. <b>Уметь:</b> Для достижения ПК-1.1. уметь: работать с периодическими изданиями (журналами, сборниками) по радиобиологии. Для достижения ПК-1.5. уметь: пользоваться инструкциями к лабораторным приборам, протоколами методик. Для достижения ПК-1.2. уметь: выполнять экспериментальные исследования по оценке радиационного воздействия на живые организмы. <b>Владеть:</b> Для достижения ПК-1.1. владеть: навыками поиска необходимой информации по радиобиологии в литературных источниках и сети интернет.

ПК-2	Способен применять знания по биофизике для решения задач медицинской, ветеринарной биофизики, радиобиологии и генетики	ПК-2.1. Применяет базовые представления о фундаментальных основах биофизики, современных математических методах моделирования биологических процессов. ПК-2.2. Использует современные методы обработки данных.	<p><b>Знать:</b> Для достижения ПК-2.1. знать: применение источников ионизирующих излучений в деятельности человека; основы взаимодействия ионизирующих излучений с биологическими системами, основные реакции биологических объектов на радиационное воздействие на молекулярном уровне.</p> <p><b>Уметь:</b> Для достижения ПК-2.1. уметь: анализировать современную научную литературу, использовать знания основ радиационной безопасности.</p> <p><b>Владеть:</b> Для достижения ПК-2.2. владеть: технологией создания мультимедийных презентаций.</p>
------	--	---	---

### 3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

#### 3.1 Виды оценочных средств

№ п/п	Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые темы/разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации № задания
1	<p>ПК-1</p> <p><b>Знать:</b> Для достижения ПК-1.2. знать: основные правила и требования при работе с ионизирующим излучением (включая вопросы техники безопасности). Для достижения ПК-1.4. знать: реакции клеток, тканей, органов и систем органов на воздействие ионизирующего излучения.</p> <p><b>Уметь:</b> Для достижения ПК-1.1. уметь: работать с периодическими изданиями</p>	<p>1. Перекисное окисление липидов. Эндогенный фон радиорезистентности.</p> <p>2. Повреждения различных уровней организации генетического материала клетки.</p> <p>3. Основные механизмы репарации повреждений генома.</p> <p>4. Однонуклеотидные полиморфизмы и их роль в индивидуальной радиочувствительности и человека.</p>	Устный опрос, письменный опрос, реферат	Вопросы к экзамену №1-28

	<p>(журналами, сборниками) по радиобиологии. Для достижения ПК-1.5. уметь: пользоваться инструкциями к лабораторным приборам, протоколами методик. Для достижения ПК-1.2. уметь: выполнять экспериментальные исследования по оценке радиационного воздействия на живые организмы. <b>Владеть:</b> Для достижения ПК-1.1. владеть: навыками поиска необходимой информации по радиобиологии в литературных источниках и сети интернет.</p>	<p>5. Эпигенотип клетки и механизмы его регуляции. 6. Механизмы формирования нестабильности генома. Значение РИНСГ для функционирования клеток. 7. Адаптивный ответ и эффект свидетеля: проявления и значение. 8. Летальные и нелетальные реакции клеток на облучение.</p>		
2	<p>ПК-2 <b>Знать:</b> Для достижения ПК-2.1. знать: применение источников ионизирующих излучений в деятельности человека; основы взаимодействия ионизирующих излучений с биологическими системами, основные реакции биологических объектов на радиационное воздействие на молекулярном уровне. <b>Уметь:</b> Для достижения ПК-2.1. уметь: анализировать современную научную литературу, использовать знания основ радиационной безопасности. <b>Владеть:</b> Для достижения ПК-2.2. владеть: технологией создания мультимедийных презентаций.</p>	<p>1. Перекисное окисление липидов. Эндогенный фон радиорезистентности. 2. Повреждения различных уровней организации генетического материала клетки. 3. Основные механизмы репарации повреждений генома. 4. Однонуклеотидные полиморфизмы и их роль в индивидуальной радиочувствительности человека. 5. Эпигенотип клетки и механизмы его регуляции. 6. Механизмы формирования нестабильности генома. Значение РИНСГ для функционирования клеток. 7. Адаптивный ответ и эффект свидетеля: проявления и</p>	Устный опрос, письменный опрос, реферат	Вопросы к экзамену №1-28

		значение. 8. Летальные и нелетальные реакции клеток на облучение.		
--	--	--	--	--

*Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.*

### 3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации» представлены перечнем вопросов для экзамена.

#### 3.2.1 Теоретические вопросы к экзамену

##### 1. Основные принципы молекулярной радиобиологии.

Ответ: 1. Принцип попадания. Принцип исходит из физических свойств ИИ (дискретности, квантованности и вероятностного распределения энергии в пространстве). Ионизирующие излучения обладая малой объемной плотностью переносят энергию в дискретном виде "концентрированными порциями". При этом, фотоны рентгеновского или  $\gamma$ -излучения, ускоренные электроны или тяжелые заряженные частицы обладают энергией, величина которой значительно превосходит энергию любой химической связи. Во время физической стадии происходят процессы поглощения, перераспределения и деградации энергии. Энергия поглощенных живой системой фотонов или заряженных частиц полностью прямо или косвенно растрачивается на возбуждение и ионизацию атомов и молекул. При этом вероятность переноса энергии к молекуле зависит не от ее химической структуры, а от суммарной электронной плотности. При действии ИИ во время ионизации высвобождаются электроны, которые вызывают поляризацию молекул воды и стабилизируются до состояния гидратированных электронов, способных диффундировать на значительные молекулярные расстояния и эффективно взаимодействовать с молекулярным кислородом и другими молекулами. Важную роль в лучевом поражении клетки играет кислород, который определяет после облучения клетки образование избыточных концентраций активных форм кислорода, оксида азота, пероксинитрита, первичных продуктов перекисного окисления липидов, токсических окислительных аддуктов ДНК и других. 2. Принцип мишени. Основывается не только на гетерогенности структуры, функции и ответов клеточных элементов на попадание ИИ в клетку, но и значимости этих событий для судьбы клетки. Важно отметить, что при облучении клетки ИИ может вызвать изменение любой молекулы различных клеточных структур. Возбужденными и ионизированными оказываются белки и нуклеиновые кислоты, липиды и углеводы, молекулы воды и другие вещества. Однако биологическая значимость этих изменений для клетки различна. Ядерная ДНК является основной клеточной мишенью для ионизирующих излучений. С использованием микролучей, способных облучать отдельные компоненты клетки, получены прямые доказательства, что именно хромосомная ДНК является основной клеточной мишенью для ИИ. Во-вторых, на линиях клеток и животных, генетически дефицитных по ответу на повреждение ДНК, подтверждена ключевая важность повреждений ядерной ДНК для развития радиобиологических эффектов. В-третьих, получены доказательства в отношении большей радиобиологической эффективности радионуклидов, инкорпорированных в ядерную ДНК. 3. Принцип восстановления повреждения мишеней. Первичные повреждения ДНК сами по себе не

представляют опасности для клетки, так как в большинстве случаев репарируются. У человека обнаружено более 130 генов, участвующих в репарации повреждений ДНК. Восстановление ДНК начинается практически мгновенно после возникновения повреждения. Различные изменения оснований восстанавливаются в течение 10 мин. - 1 часа. Период полувосстановления ОНР составляет менее 10 мин., а ДНР более 0,5 часа. Несмотря на высокую эффективность систем репарации, некоторые первичные повреждения избегают восстановления и вызывают стойкие повреждения ДНК. Неполная репарация (репарация с ошибкой) двунитовых разрывов наилучшим образом объясняет реакции клетки на облучение. Активность реакции ДНК на повреждение и процесс ее репарации являются главными детерминантами эффектов дозы/мощности дозы и качества излучения на уровне клетки. 4. Принцип усиления первичных радиационных повреждений в мишенях. Если первичные радиационные повреждения не репарированы и локализованы в структурной части гена (мутации), то в результате его экспрессии синтезируются сотни и тысячи молекул мутантных белков, нарушающих функционирование клетки или вызывающих изменения, несовместимые с ее жизнью. Последующий этап усиления первичных повреждений ДНК может быть связан с их передачей (наследованием) потомкам материнских клеток, т.е. увеличения числа несущих повреждения клеток. Так же развитие окислительного процесса в мембранах, цепных реакций окисления представляет собой механизм усиления первичных повреждений, завершающийся необратимой окислительной деградацией мембранных структур клетки. Мембраны наиболее подвержены окислительной деградации, так как содержат ненасыщенные жирные кислоты (такие, как линоленовая, арахидоновая и др.) фосфолипидов, чрезвычайно чувствительных к окислению. Большое содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах определяет высокую способность БМ к цепным реакциям окисления и образованию новых инициаторов окисления, обладающих оксидантной активностью.

## 2. Теория мишени и лучевые реакции усиления повреждений.

Ответ: Теория мишени. Основывается не только на гетерогенности структуры, функции и ответов клеточных элементов на попадание ИИ в клетку, но и значимости этих событий для судьбы клетки. Важно отметить, что при облучении клетки ИИ может вызвать изменение любой молекулы различных клеточных структур. Возбужденными и ионизированными оказываются белки и нуклеиновые кислоты, липиды и углеводы, молекулы воды и другие вещества. Однако биологическая значимость этих изменений для клетки различна. Ядерная ДНК является основной клеточной мишенью для ионизирующих излучений. С использованием микролучей, способных облучать отдельные компоненты клетки, получены прямые доказательства, что именно хромосомная ДНК является основной клеточной мишенью для ИИ. Во-вторых, на линиях клеток и животных, генетически дефицитных по ответу на повреждение ДНК, подтверждена ключевая важность повреждений ядерной ДНК для развития радиобиологических эффектов. В-третьих, получены доказательства в отношении большей радиобиологической эффективности радионуклидов, инкорпорированных в ядерную ДНК.

Реакция усиления первичных радиационных повреждений в мишенях. Если первичные радиационные повреждения не репарированы и локализованы в структурной части гена (мутации), то в результате его экспрессии синтезируются сотни и тысячи молекул мутантных белков, нарушающих функционирование клетки или вызывающих изменения, несовместимые с ее жизнью. Последующий этап усиления первичных повреждений ДНК может быть связан с их передачей (наследованием) потомкам материнских клеток, т.е. увеличения числа несущих повреждения клеток. Так же развитие окислительного процесса в мембранах, цепных реакций окисления представляет собой механизм усиления первичных повреждений, завершающийся необратимой окислительной деградацией мембранных структур клетки. Мембраны наиболее подвержены окислительной деградации, так как содержат

ненасыщенные жирные кислоты (такие, как линоленовая, арахидоновая и др.) фосфолипидов, чрезвычайно чувствительных к окислению. Большое содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах определяет высокую способность БМ к цепным реакциям окисления и образованию новых инициаторов окисления, обладающих оксидазной активностью

### **3. Реакция цепного окисления липидов, инициируемая ионизирующими излучениями. Значение для жизнедеятельности клетки.**

Ответ: Реакция цепного окисления липидов, инициируемая ионизирующими излучениями, играет важную роль в патологии и гибели клетки. Она способствует массовому накоплению избытка токсических продуктов окисления в связи с их многократным воспроизведением. Реакция окисления повторяется многократно, но протекает уже без участия поглощения кванта энергии. Цепная реакция — это каталитическая циклическая реакция самоускорения, в которой катализатором являются свободные радикалы. Иницирование цепной реакции начинается с того, что в липидный слой БМ проникают активные радикалы, например  $\text{OH}\cdot$ . В процессе облучения происходит активация взаимодействия активных радикалов с полиненасыщенными жирными кислотами (ЛН) и образование липидных радикалов  $\text{L}\cdot$ . Последние вступают в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом (более эффективно реакция протекает с активными формами кислорода - АФК и пероксинитритом). При этом образуются прооксиданты свободные радикалы липидов: алкоксил -  $\text{LO}\cdot$  или пероксил -  $\text{LO}_2\cdot$ , радикалы, которые в свою очередь взаимодействуют с соседними молекулами полиненасыщенных фосфолипидов БМ и образуют гидроперекись липида  $\text{LOOH}$  и вновь (стадии "продолжения" и "развития" цепи) липидный радикал  $\text{L}\cdot$ . Гидроперекись -  $\text{LOOH}$  и образованные ею конечные продукты перекисного окисления липидов ППОЛ содержатся в клетке в норме на стационарном уровне, не превышающем 1 мкМ. При действии ионизирующих излучений этот уровень возрастает и вследствие многократного накопления образуется избыток ППОЛ, которые оказывают генотоксическое действие на хромосомы и ДНК, вызывает задержку клеточного деления и гибель клетки. Оксидативная деградация БМ и ДНК не ограничивается действием липидных радиотоксинов. Так же и другие клеточные компоненты, радиационные мишени могут быть непосредственно атакованы различными водо- и жирорастворимыми прооксидантами.

### **4. Эндогенный фон радиорезистентности. Прооксиданты ( $\text{OH}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{NO}$ ) и антиоксиданты.**

Ответ: В интактной клетке оксидативные процессы находятся под строгим и чрезвычайно разнообразным контролем ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем, поэтому скорость оксидазных реакций невелика и природные прооксиданты находятся на низком стационарном уровне. После облучения в клетках и тканях происходит изменение соотношения между стационарными уровнями антиоксидантов (АО) и прооксидантов (ПО). В радиобиологии соотношение АО и ПО получило название эндогенного фона радиорезистентности. Наиболее активными компонентами таких систем являются ферментативные и низкомолекулярные антиоксиданты. Антиоксиданты регулируют уровень АФК, активных форм азота (АФА) и ППОЛ. Антиоксиданты способны восстанавливать друг друга. Они же выступают в качестве эндогенных "перехватчиков" свободных радикалов в облученных клетках, снижая уровень радиационных повреждений ДНК и других макромолекул. Введение антиоксидантов в клетки до воздействия ИИ помогает существенно снизить уровень радиационного окислительного стресса и количество повреждений ДНК, а также устранить последствия, связанные с этими повреждениями. К антиоксидантам относят группу ферментов, образующих единую метаболическую цепь, которая превращает кислородные радикалы и перекиси в нетоксичные метаболиты (вода, спирты и др.). Основными АО являются ферменты: каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, фосфолипид-

глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза. Наиболее важными внутриклеточными АО, регулирующими метаболизм АФК, являются Mn- и Cu-Zn-зависимые супероксиддисмутаза и глутатион. Наиболее активные низкомолекулярные антиоксиданты, составляют так называемый антиокислительный буфер. Главные антиоксидантные субстраты клеток это тиоловые соединения: глутатион, цистеин. Другими наиболее активными низкомолекулярными антиоксидантами, составляющими так называемый антиокислительный буфер, являются биогенные амины (серотонин, гистамин, катехоламины, кортикостероиды); витамины (аскорбиновая кислота - в цитозоле клетки; токоферол,  $\beta$ -каротин и другие каротиноиды, локализованные в липидах биологических мембран) и другие антиоксиданты (фосфолипиды, убихинон, ураты, билирубин, фенолы, микроэлементы, ионы металлов переменной валентности). В случае, когда исчерпываются резервы защитной антиокислительной активности и клетка не может справиться с развивающимся токсическим эффектом, включаются механизмы оксидзависимого апоптоза.

## 5. Классификация повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением. Окислительная модификация оснований.

Ответ: Условно все повреждения ДНК, индуцируемые ионизирующей радиацией, можно разделить на две группы. К первой группе можно отнести одиночные (односайтовые) повреждения: модификация оснований, однонитевые разрывы, "щелочно-лабильные" сайты (включая места, лишённые оснований). Вторую группу составляют локальные множественные повреждения, которые включают скопление (кластеры) одиночных повреждений в локальном участке ДНК, двунитевые разрывы, межмолекулярные сшивки. Радиационный выход повреждений второй группы увеличивается с повышением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения, и эти повреждения играют доминирующую роль в радиационной гибели, возникновении хромосомных и генных мутаций, трансформации клеток. Эффекты взаимодействия ДНК с излучением можно классифицировать в соответствии с вероятностью индукции повреждений в одной нити ДНК (например, однонитевой разрыв или замена основания), в двух нитях молекулы ДНК на близком расстоянии друг к другу (например, двунитевой разрыв) или индукции нарушений структуры еще более сложного типа (например, двунитевого разрыва с близко расположенным смежным повреждением).

Модификация оснований. Главный компонент радиационных повреждений ДНК в количественном отношении – химическая модификация оснований. Примерно до 70–85% этих модификаций, являются результатом действия активных форм кислорода, генерируемых радиацией в среде окружения ДНК. В водном окружении основания ДНК более подвержены действию радикалов, чем сахар, и поэтому в облученной ДНК количество поврежденных оснований гораздо больше, чем повреждений сахара. Радиационный выход поврежденных оснований ДНК обусловлен степенью оксигенации и температурой среды, наличием в клеточной среде радиозащитных компонентов и пролиферативной активностью облучаемых клеток. В ДНК клеток млекопитающих,  $\gamma$ -облученных в аэробных условиях, образуются около 12 различных остатков деструкции тимина, значительная часть которых высвобождается в результате разрыва N-гликозидной связи. Существенную долю составляют тиминового гликоли. Из других модификаций тимина можно указать - гидроксиметилурацил, 5-гидрокси-5-метилгидантион, N<sub>1</sub>-формаид-мочевину и мочевину. Многие аддукты цитозина, так же как и тимина, высвобождаются из облученной ДНК. Однако с клеточной ДНК остаются стабильно связанными такие модификации, как урациловые гликоли (*cis*- и *trans*-), 5,6-дигидрокси-5,6-дигидроурацил, 5-гидроксицитозин) и 3-карбамил-4-гидроксигидантоин а, также остатки мочевины. Наиболее стабильными радиационными модификациями пуринов являются 8-оксо-7,8-дигидроаденин и 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-гидроксигуанин). К стабильным радиационным модификациям пуринов, формируемым в результате внутримолекулярной циклизации 2'-дезоксирибозо-пуринов, можно отнести также 8,5'-

цикло 2'-дезоксаденозин и 8,5'-цикло-2'-дезоксигуанозин.

Радиационно-модифицированные основания в ДНК клеток в пострадиационный период эффективно репарируются в основном с помощью системы эксцизионной репарации оснований.

## **6. Классификация повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением. Однонитевые и двунитевые разрывы.**

Ответ: Условно все повреждения ДНК, индуцируемые ионизирующей радиацией, можно разделить на две группы. К первой группе можно отнести одиночные (односайтовые) повреждения: модификация оснований, однонитевые разрывы, "щелочно-лабильные" сайты (включая места, лишённые оснований). Вторую группу составляют локальные множественные повреждения, которые включают скопление (кластеры) одиночных повреждений в локальном участке ДНК, двунитевые разрывы, межмолекулярные сшивки. Радиационный выход повреждений второй группы увеличивается с повышением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения, и эти повреждения играют доминирующую роль в радиационной гибели, возникновении хромосомных и генных мутаций, трансформации клеток. Эффекты взаимодействия ДНК с излучением можно классифицировать в соответствии с вероятностью индукции повреждений в одной нити ДНК (например, однонитевой разрыв или замена основания), в двух нитях молекулы ДНК на близком расстоянии друг к другу (например, двунитевой разрыв) или индукции нарушений структуры еще более сложного типа (например, двунитевого разрыва с близко расположенным смежным повреждением). Однонитевые разрывы в ДНК - один из главных структурных повреждений ДНК, индуцируемых ИИ. Они довольно гетерогенны, как по концевым группам, так и по скорости пострадиационной репарации. Разная скорость репарации разрывов обусловлена не только различной химической природой их концевых групп, но и доступностью этих повреждений в составе хроматина для ферментов репарации. Большинство ОНР ДНК возникают в результате повреждения фосфодиэфирного остова оснований и в значительной мере после окисления углеродных атомов (С1' и С4') дезоксирибозы свободными радикалами. В формировании разрывов и их пострадиационной репарации важна природа концевых групп разрывов. Некоторая часть ОНР, хотя имеет те же самые концевые группы, формируется с нуклеотидными брешами. Регистрируется также незначительное количество разрывов, несущих на 5'-концах фосфатные группы, а на 3'-конце – дезоксирибозу без основания. В ряде случаев при ионизации или окислении свободными радикалами дезоксирибозы в составе ДНК происходит формирование малондиальдегида, который может высвободиться из ДНК с формированием разрыва полинуклеотидной цепи. Формирование значительной части ЛМП ДНК, включая ДНР, происходит за счет прямого действия радиации. ДНР могут возникать и в результате двух и более локальных одиночных повреждений на двойной спирали. Если даже нет сформировавшегося ДНР, он может быть спровоцирован в процессе репарации участков с множественными повреждениями в ДНК. Но ДНР не возникают в результате накопления случайных ОНР. Формирование ДНР за счет накопления ОНР может происходить только, если ОНР появляются на противоположных нитях на расстоянии друг от друга от 2 до 20 нуклеотидов. ДНР репарируются с наименьшей скоростью. Период 50%-ного восстановления ДНР ДНК в разных клетках составляет от 2 до 4 ч пострадиационного времени. Однако процесс полного восстановления этих повреждений может продолжаться и до 24 ч. Ошибочная репарация ДНР в кодируемых последовательностях является источником хромосомных и генных мутаций. Однако ошибочная репарация ДНР, как и других повреждений, в некодируемых последовательностях ДНК диплоидных соматических клеток многоклеточных организмов, в большинстве случаев является безвредной. Соотношение количества ОНР и ДНР ДНК при действии ИИ может соответствовать значениям 10-50 в зависимости от

условий облучения клеток и типа излучения. При действии радиации с большой плотностью ионизации значение этого соотношения существенно уменьшается за счет увеличения доли ДНР.

#### **7. Классификация повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением. Щелочно-лабильные сайты.**

радиационной гибели, возникновении хромосомных и генных мутаций, трансформации клеток. Эффекты взаимодействия ДНК с излучением можно классифицировать в соответствии с вероятностью индукции повреждений в одной нити ДНК (например, одонитевой разрыв или замена основания), в двух нитях молекулы ДНК на близком расстоянии друг к другу (например, двунитевой разрыв) или индукции нарушений структуры еще более сложного типа (например, двунитевого разрыва с близко расположенным смежным повреждением).

*Щелочно-лабильными сайтами* (поврежденными местами) принято называть такие структурные изменения в молекуле ДНК, которые при увеличении рН среды до щелочных значений превращаются в разрывы полинуклеотидных цепей. Щелочно-лабильные сайты формируются в результате радиолиза или свободнорадикального окисления молекулы дезоксирибозы в С1', С2' и С4'-положениях атомов углерода или деструкции и отщепления основания. Так, атака свободными радикалами дезоксирибозы может приводить к отщеплению неповрежденного основания и к превращению сахара в дезоксирибоновую кислоту. Вытеснение основания происходит и при окислении С4' с образованием 4-кетодезоксирибоната. При обоих этих повреждениях полинуклеотидные цепи не разрываются, однако в случае последующего увеличения рН среды до щелочных значений по местам этих повреждений возникают разрывы цепей. Большую часть щелочно-лабильных повреждений составляют места депуринизации и депиримидинизации (АП-сайты), которые возникают в результате разрыва М-гликозидной связи между основанием и дезоксирибозой. Щелочно-лабильные сайты или АП-сайты в ДНК также могут формироваться в результате спонтанного гидролитического отщепления оснований, так и удаления химически модифицированных оснований N-гликозилазами (ферменты начальной ступени репарации).

#### **8. Классификация повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением. Локальные множественные повреждения.**

Ответ: Условно все повреждения ДНК, индуцируемые ионизирующей радиацией, можно разделить на две группы. К первой группе можно отнести одиночные (односайтовые) повреждения: модификация оснований, одонитевые разрывы, "щелочно-лабильные" сайты (включая места, лишённые оснований). Вторую группу составляют локальные множественные повреждения, которые включают скопление (кластеры) одиночных повреждений в локальном участке ДНК, двунитевые разрывы, межмолекулярные сшивки. Радиационный выход повреждений второй группы увеличивается с повышением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения, и эти повреждения играют доминирующую роль в радиационной гибели, возникновении хромосомных и генных мутаций, трансформации клеток. Эффекты взаимодействия ДНК с излучением можно классифицировать в соответствии с вероятностью индукции повреждений в одной нити ДНК (например, одонитевой разрыв или замена основания), в двух нитях молекулы ДНК на близком расстоянии друг к другу (например, двунитевой разрыв) или индукции нарушений структуры еще более сложного типа (например, двунитевого разрыва с близко расположенным смежным повреждением).

Образование локальных множественных повреждений (ЛМП) на участках ДНК играет доминирующую роль в радиационной гибели, возникновении хромосомных, генных мутаций и неопластической трансформации клеток. Формирование значительной части ЛМП ДНК, включая ДНР, происходит за счет прямого действия радиации. ЛМП ДНК в пострадиационный период подвергаются репарации в клетках более сложными путями,

чем односайтовые повреждения. В их репарацию могут быть вовлечены различные системы в зависимости от типа и сложности повреждения: системы негомологичной рекомбинации, эксцизионной репарации нуклеотидов или оснований. В основе механизмов, ведущих к образованию большинства ЛМП, лежит возникновение кластеров повреждений в результате прохождения трека ионизации в пределах локального объема или атаки менее защищенных белками хроматина участков клеточной ДНК множеством свободных радикалов. Прохождение высокоэнергетической частицы или трека ионизации  $\gamma$ -кванта через нити хроматина может вызвать ЛМП в двойной спирали ДНК, которые включают ДНР, ОНР, модификации оснований, межмолекулярные сшивки (ДНК – ДНК, ДНК – белок) и другие повреждения. Таким образом, ЛМП ДНК можно рассматривать как комплексные повреждения, которые охватывают участки меньшей или большей длины двойной спирали. В составе ЛМП могут формироваться и одноцепочечные участки с нарушением вторичной структуры ДНК. Появление таких участков обусловлено не только повреждениями нескольких оснований, но и потерями олигонуклеотидов из одной нити при сохранении целостности второй.

#### **9. Цитогенетические эффекты малых доз ионизирующего излучения.**

Ответ: цитогенетические эффекты проявляются как хромосомные и хроматидные aberrации и микроядра. Спонтанный выход aberrаций в необлученных стимулированных лимфоцитах составляет 1,93 %, из которых 1,45 % представляли собой хромосомные, а 0,48 % – хроматидные aberrации. Хроническое воздействие в дозе 100 сГр приводило к появлению 12 %, а острое облучение в той же дозе – от 15 до 25 % клеток с aberrациями. Выход дицентриков возрастает после острого облучения лимфоцитов только в дозе свыше 3-5 сГр. Таким образом, внешнее облучение (острое или хроническое) редкоизирующим излучением способно приводить к слабо выявляемому накоплению цитогенетических повреждений в радиочувствительных клетках только начиная с дозы свыше 2 сГр. Значимые изменения наблюдаются при дозе – 10-30 сГр и более. При воздействии инкорпорированных радионуклидов (в особенности, с высокой плотностью ионизации) повышение частоты aberrаций хромосом можно, по-видимому, зарегистрировать и при меньшей дозе.

Микроядра возникают из хромосомных и хроматидных фрагментов или из целых хромосом, которые отстают в анафазе и не включаются в дочерние ядра во время деления. Признается и апоптотическое происхождение микроядер. Спонтанный уровень микроядер в лимфоцитах людей составляет 2,1-3,6 микроядра на 1000 бинуклеарных клеток (микроядерный тест предполагает использование цитокинетического блока, индуцированного цитохалазином). Между дозой редкоизирующего облучения и выходом микроядер в лимфоцитах существует линейно-квадратичная зависимость. Так, облучение лимфоцитов взрослых людей в дозе 50 сГр увеличивало уровень микроядер в 1,5 раза, а при 100 сГр – в 1,4-1,8 раза. Острое облучение культур клеток млекопитающих в дозе 100 сГр повышало частоту клеток с микроядрами в два раза.

Несколько более выраженные изменения получены на клетках костного мозга. Острое облучение мышей в дозе 50 сГр увеличивало уровень микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга в 4,3 раза (недостаточно), а при 200 сГр – в 12,8 раз (достаточно). Полагают, что нижний предел определения дозы с помощью микроядерного теста для острого радиационного воздействия лежит в диапазоне 4-16 сГр.

#### **10. Модуляция процессов репарации при малых дозах ионизирующего излучения.**

Ответ: одним из механизмов формирования радиоадаптивного ответа клеток является стимуляция репарации ДНК после предварительного облучения в малых (1-5 сГр) дозах. Существует значительное количество косвенных и, меньшее, прямых данных о том, что малые дозы излучения активируют репарацию ДНК.

1. Снижение радиоадаптивного ответа при генетически обусловленных дефектах в репарации ДНК. Обнаружено для лимфоцитов человека при некоторых наследственных заболеваниях и для штаммов ооцитов *Drosophila*, характеризующихся сниженной интенсивностью репарации. В то же время связь между способностью к адаптивному ответу и наследственными дефектами в репарации ДНК не является абсолютной.
2. Подавление адаптации к радиации ингибиторами репарации ДНК.
3. Стимуляция репаративного синтеза ДНК. Так, профессиональное облучение людей (интенсивность экспозиции 0,14-0,98 сГр/мес) повышало уровень УФ-индуцированного репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах. Хроническое воздействие излучения на кроликов (50 сГр/день) активировало в лимфоцитах синтез ДНК. Дробное облучение мышей в течение четырех дней (5 сГр/сут) обладало таким же эффектом. С другой стороны, когда лимфоциты человека подвергали острому облучению (1,6-13,7 сГр/мин), то при дозе 2-3 сГр и 15-20 сГр снижался УФ-индуцированный синтез. Отсутствовала стимуляция репаративного синтеза ДНК в спленоцитах мышей после острого облучения в малых дозах *in vivo* и *in vitro*.
4. Стимуляция белковых факторов репарации ДНК. При действии излучения в малых дозах, вследствие экспрессии генов индуцируется синтез десятков новых белков. Однако почти все из них не идентифицированы и не ясно, входят ли в эту группу белки репарации. Острое облучение лимфоцитов в дозе 1 сГр приводит к синтезу двух белков, которые имеют сродство к радиационным повреждениям ДНК. Продемонстрирована активация фермента репарации – ДНК-полимеразы  $\beta$ , после хронического (0,13 сГр/сут) облучения *in vivo*. Ферментом, поставляющим субстраты для полимеразной реакции, является рибонуклеотидредуктаза. Она катализирует восстановление рибонуклеотидов до их дезоксианалогов. Обнаружено, что острое облучение (7,5 сГр) мышей активирует рибонуклеотидредуктазу. При дозе 1-10 сГр снижается тимидинкиназная активность в клетках костного мозга, что сопровождается блоком репликации ДНК. Это может приводить к увеличению продолжительности времени репарации.

### **11. Эффекты малых доз. Молекулярно-клеточные механизмы (апоптоз, модуляция процессов репарации, экспрессия генов).**

Ответ: Апоптоз: причинами пострадиационного летального события не всегда являются исключительно повреждения первичной структуры ДНК. Возможна и апоптотическая гибель после активации излучением системы передачи нейрогуморального сигнала. Апоптоз может быть результатом не только генотоксического, но и триггерного действия облучения. Существует несколько механизмов апоптоза, один из которых инициируется на плазматической мембране, а другой – в ядре при участии повреждений ДНК. Показано также, что постлучевое увеличение уровня сАМР может служить сигналом к быстрой фрагментации ДНК и гибели клеток. Характер ответа клеток на сигналы, приводящие к индукции апоптоза, зависит и от особенностей самих клеток (стадия дифференцировки, состояние системы репарации ДНК и т. д.). Цитотоксическое действие малых доз излучения на лимфоциты проявляется, в основном, в виде апоптоза, наблюдаемого также в клетках миелоидного типа. Увеличение частоты апоптотических клеток отмечалось только после острого облучения лимфоцитов и других клеток в дозе от 50 сГр и выше. Для культур клеток опухолей двукратное увеличение апоптотической гибели наблюдалось после воздействия в дозе 100 сГр. Однако, излучение в дозе от 1 до 20 сГр подавляет как спонтанный, так и индуцируемый при последующем облучении в большой дозе апоптоз. На лимфоцитах человека и клетках опухолей продемонстрировано, что излучение в дозе 1 сГр увеличивает резистентность к апоптозу, индуцированному последующим облучением в большей дозе. Возможные механизмы ингибирующего действия излучения в малых дозах (1 – 20 сГр) на апоптоз могут быть обусловлены пострадиационной активацией поли

(ADP-рибозо) полимеразы, ферментов фосфорилирования / дефосфорилирования белков – протеинфосфатазы 2А (подавляющей фосфорилирование супрессора апоптоза белка Bcl-2, что повышает активность последнего), протеинкиназы С и блокированием сигнального пути, связанного с сАМР.

Стимуляция репарации ДНК - один из механизмов формирования радиоадаптивного ответа клеток после предварительного облучения в малых (1 – 5 сГр) дозах. Существует значительное количество косвенных и, меньшее, прямых данных о том, что малые дозы излучения активируют репарацию ДНК.

1. Снижение радиоадаптивного ответа при генетически обусловленных дефектах в репарации ДНК. Обнаружено для лимфоцитов человека при некоторых наследственных заболеваниях и для штаммов ооцитов *Drosophila*, характеризующихся сниженной интенсивностью репарации. 2. Подавление адаптации к радиации ингибиторами репарации ДНК. 3. Стимуляция репаративного синтеза ДНК. Так, профессиональное облучение людей (интенсивность экспозиции 0,14 – 0,98 сГр/мес) повышало уровень УФ-индуцированного репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах. Хроническое воздействие излучения на кроликов (50 сГр/день) активировало в лимфоцитах синтез ДНК. 4. Стимуляция белковых факторов репарации ДНК. При действии излучения в малых дозах, вследствие экспрессии генов индуцируется синтез десятков новых белков.

Индукция экспрессии генов. Показано, что излучение в малых дозах индуцирует экспрессию генов, что приводит к синтезу специфических белков. Экспрессию генов под действием излучения объясняют эффектом свободных радикалов. Так, обнаружено, что свободные радикалы активируют в некоторых клетках протоонкогены – *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, которые участвуют в пролиферации, дифференцировке и злокачественной трансформации. Одни из эффектов экспрессии генов являются благоприятными (синтез белков-протекторов), в то время как другие однозначно неблагоприятны (экспрессия онкогенов). Имеются сведения об индукции излучением синтеза конкретных специфических белков. Так, хроническое облучение мышей (суммарная доза 21–48 сГр) увеличивало в клетках легких содержание мРНК белка теплового шока (*hsp70*) и, позже, повышало уровень самого белка. Сходным эффектом применительно к спленоцитам мышей обладало хроническое (в течение четырех недель) воздействие излучения *in vivo* (суммарная доза 80-200 сГр). Индукция синтеза белка *hsp70* связана с уровнем клеточных повреждений после стрессорных воздействий, а механизм его защитного эффекта обусловлен дезагрегацией аномальных белков - белковых взаимодействий.

## **12. Эффекты малых доз. Молекулярно-клеточные механизмы (модификация структуры хромосом, модификации систем антиоксидантной защиты).**

Ответ: модификация структуры хромосом. ДНК в хромосоме эукариот упакована не менее чем в 10 раз, что обеспечивается включением ее в состав хроматина (дезоксирибонуклеопротеидного комплекса). Имеется четыре уровня организации хроматина, на каждом из которых достигается определенная степень упаковки. Функционирование генома сопровождается структурной реорганизацией хроматина: в локусах неактивных генов хроматин представляет собой компактную структуру (гетерохроматин), а транскрипция и репликация происходят на релаксированных клубкообразных петлях (эухроматине), закрепленных на матриксе. Структура хроматина чувствительна к излучению в относительно малых дозах. Так, после облучения лимфоцитов (1 сГр; 0,32 Гр/мин), отмечалось повышение седиментационной подвижности нуклеоида. Полагают, что указанный феномен обусловлен большей конденсацией хроматина. По-видимому, слабое облучение приводит к активации генной экспрессии (декомпактизации хроматина), затем репликации ДНК и делению клеток (конденсация

хроматина). Структурная перестройка хроматина и изменение параметров ядер, которые могут сопровождаться модификацией генной экспрессии, обнаружены при воздействии малых доз излучения (2–3 сГр) на лимфоциты. Через 40–60 мин после острого облучения в дозе 0,5–4 сГр отмечено снижение вязкости ДНК (декомпактизация хроматина) в фибробластах человека, спленocyтaх мышей и тимocyтaх крыс. Большая доза излучения (10–50 сГр) обладала противоположным действием. Эти эффекты излучения могут быть признаны как "благоприятные" (за исключением повышения вероятности экспрессии, например, онкогенов). Так, повышение степени конденсации хроматина приводит к меньшей поражаемости этой структуры.

Модификации систем антиоксидантной защиты. Низкая доза излучения снижает уровень перекисного окисления липидов. Это обусловлено активацией систем антиоксидантной защиты путем синтеза соответствующих факторов. Существует корреляция между антиоксидантной активностью липидов в органах и радиорезистентностью животных после облучения в низких дозах. Излучение в дозе от 50 сГр приводит к повышению содержания мощных эндогенных антиоксидантов – металлотионеинов. В фибробластах после фракционированного облучения увеличивается концентрация глутатиона. Полагают, что данный эффект обусловлен действием свободных радикалов. Однако повышение уровня глутатиона, наблюдалось после воздействия в значительной суммарной дозе (18 Гр). При меньшей дозе (хроническое облучение крыс до суммарной дозы 10–50 сГр) отмечена обратная картина – уровень глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы в тканях снижались. Компенсаторной стимуляцией систем противорадикальной защиты малыми дозами излучения отчасти объясняется, по-видимому, повышение резистентности облученных клеток не только к излучению, но и к различным токсическим и генотоксическим агентам.

### **13. Механизмы формирования радиационно-индуцированных повреждений ДНК.**

Ответ: Радиационные треки могут высвобождать энергию непосредственно в ДНК (прямой эффект), или же ионизации подвергаются молекулы, находящиеся в непосредственной близости от ДНК, особенно молекулы воды. В результате образуются свободные радикалы, повреждающие ДНК (косвенный эффект). В клетке косвенный эффект реализуется на очень коротких дистанциях, порядка нескольких нанометров, так как путь диффузии радикалов ограничен их высокой реакционной способностью. Около 35% эффекта относятся к прямому, а 65% - к косвенному эффекту излучения. В результате ионизации повреждаются химические связи в молекулах ДНК. Если большинство актов ионизации являются единичными, не связанными друг с другом событиями (в случае излучения с низкой ЛПЭ), то образовавшиеся разрывы будут легко репарированы клеточными ферментами. Однако плотность ионизации излучением с высокой ЛПЭ такова, что при пересечении частицей двойной спирали ДНК имеется вероятность возникновения нескольких актов ионизации. Поэтому большое количество повреждений от излучений с высокой ЛПЭ и малое от излучений с низкой ЛПЭ, обусловлены локализованными кластерами ионизации, которые могут значительно нарушать структуру ДНК. Треки от излучения с высокой ЛПЭ значительно эффективнее индуцируют более крупные кластеры ионизации. Кроме того, если клетка повреждена излучением с высокой ЛПЭ, каждый трек представлен большим числом актов ионизации, так что клетка получает относительно большую дозу. Отсюда следует большая вероятность того, что повреждение окажется связано с единичной молекулой ДНК (или хромосомой) или же будет локализовано в отдельных хромосомах. Напротив, эффект излучения с низкой ЛПЭ более равномерно распределен по клеточной популяции. Так, при дозах излучения с низкой ЛПЭ выше приблизительно 1 мГр (для среднего диаметра ядра клетки в 8 мкм), каждое ядро клетки, вероятно, окажется пересеченным более чем одним редкоионизирующим треком.

В настоящее время известно более 100 продуктов радиолиза ДНК и структурных нарушений в составе ДНК облученных клеток. С биологической точки зрения, наибольший интерес представляют структурные нарушения полинуклеотидных цепей, модификация оснований и дезоксирибозы, возникающие в составе ДНК облученных клеток. В настоящей лекции мы ограничимся рассмотрением повреждений ДНК, индуцируемых *in vivo*.

Большинство свободных радикалов, взаимодействующих с ДНК в облученной клетке, возникают в результате радиолиза воды. В клетке имеется вода двух типов: связанная с макромолекулами, в том числе с ДНК (гидратная), и не связанная. Примерно пять молекул связанной воды приходится на один нуклеотид ДНК. Перенос энергии ИИ на молекулы воды приводит к возбуждению их атомов, к ионизации этих молекул и развитию целого каскада реакций с образованием чрезвычайно реакционно-активных частиц. К ним в первую очередь можно отнести такие, как ионизованная молекула  $\text{H}_2\text{O}^+$ , гидроксильный радикал  $\cdot\text{OH}$ , гидратированный электрон  $e^-$ , перекись водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ , супероксидный анион  $\text{O}_2^-$ , синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , радикалы атомов водорода  $\text{H}$  и кислорода  $\cdot\text{O}$ , несущие неспаренные электроны. С ДНК могут взаимодействовать в основном частицы, возникающие из связанных молекул воды.

Повреждения ДНК существенно различаются как количественно, так и по качественному составу в зависимости от условий облучения. На радиационный выход повреждений ДНК могут влиять различные клеточные факторы: степень взаимодействия ДНК с белками и геометрия ее укладки в клеточных органеллах, уровни оксигенации (или гипоксии) и эндогенных антиоксидантов, активность ферментативных систем репарации ДНК в клетке. Кроме того, клетки организмов эволюционно наделены молекулярными системами защиты от оксидантов. Антиоксиданты могут снижать также начальный уровень повреждений, восстанавливая ион-радикальные состояния в локальных участках ДНК, вызванные прямой ионизацией. Поэтому в формировании радиационных повреждений ДНК чрезвычайно важную роль играет баланс внутриклеточного содержания кислорода и антиоксидантов-"перехватчиков" свободных радикалов.

Расчеты показывают, что радиационный выход повреждений ДНК линейно зависит от дозы облучения. Значительная часть этих повреждений ДНК в облученной клетке подвергается быстрой ферментативной репарации, и поэтому уровень регистрируемых повреждений сразу после завершения облучения зависит еще от мощности дозы. Таким образом, окончательное формирование структурных радиационных нарушений ДНК, значимых для мутагенеза, трансформации и гибели клеток, зависит не только от дозы и физических характеристик излучения, но и от способности клеток препятствовать химической фиксации первичных повреждений и восстанавливать репаративными системами. При действии  $\gamma$ -лучей в дозе 1 Гр на клетки человека регистрируется (из расчета на диплоидный геном) образование примерно 3–6 разрывов хромосом (определяемых методом преждевременной конденсации интерфазного хроматина), 20–60 двунитевых разрывов, около 200–400 локальных множественных (кластерных) повреждений, 800 – 1000 однопитевых разрывов, 150 ДНК-белковых сшивков и более 2500 повреждений оснований ДНК (включая модификацию оснований и их отщепление из ДНК). Спонтанные повреждения, обусловленные тепловой нестабильностью ДНК, а также эндогенными окислительными и ферментативными процессами.

#### **14. Репарация ДНК. Этапы и значение репарации. Факторы, оказывающие влияние на эффективность репарации.**

Ответ: Механизмы репарации ДНК можно подразделить на несколько категорий. Упрощенная классификация может быть основана на способности ферментов использовать комплементарность

оснований в структуре ДНК для облегчения репарации поврежденного участка. Так, повреждения только одной цепи (измененные основания, однонитевые разрывы) могут быть устранены или модифицированы путем повторного синтеза с использованием неповрежденной цепи в качестве матрицы. Если повреждены обе нити молекулы ДНК, причем на близком расстоянии друг от друга (двунитевые разрывы, сшивки), то подобные нарушения структуры репарируются значительно труднее, с использованием различных ферментативных процессов. Для успешной репарации сложных повреждений могут потребоваться ферменты, действующие по нескольким направлениям. Ферменты репарации ДНК можно охарактеризовать как клеточные белки, непосредственно воздействующие на поврежденную ДНК с целью восстановления ее правильной последовательности и структуры. На начальных этапах распознавания и репарации специфических форм повреждения ДНК функционируют относительно специализированные ферменты. Так, ДНК-гликозилазы катализируют расщепление связей между сахарными остатками ДНК и ее основаниями, причем только в случае изменения или повреждения последних. Кроме того, имеется несколько разных видов гликозилаз, которые распознают химически различные формы повреждений оснований. Ферменты, которые осуществляют нормальный метаболизм ДНК, тоже участвуют в процессах репарации многих типов повреждений. Это, например, ДНК-полимеразы, участвующие в синтезе новых цепей ДНК, и ферменты, сшивающие фрагменты ДНК в единую цепь (ДНК-лигазы). Идентифицировано несколько типов ДНК-полимераз и лигаз. Полагают, что они играют различную роль в нормальном метаболизме ДНК и что только некоторые из них активны при ее репарации.

Простейшие процессы репарации напрямую ликвидируют повреждение. Например, у многих организмов (но не у млекопитающих), имеется фермент, который непосредственно фотореактивирует димеризацию пиримидиновых оснований, вызванную УФ. Сходным образом, фермент O<sup>6</sup>-метилгуанин-метилтрансфераза прямо удаляет метильные группы, образованные в ДНК канцерогенными алкилирующими веществами. Однако большинство типов повреждений требует совместного действия ряда ферментов, формирующих совокупность репаративных путей.

### **15. Репарация ДНК. Эксцизионная репарация оснований.**

Ответ: ЭРО восстанавливает большинство однонитевых разрывов ДНК и удаляет повреждения оснований ДНК, не вызывающие сильного нарушения вторичной структуры, которые возникают в результате дезаминирования, метилирования или потери оснований, атаки свободных радикалов кислорода или ионизации. Повреждение индивидуальных оснований ДНК может быть исправлено просто путем их удаления, зачисткой сайта, и повторным синтезом. В этом процессе, называемом эксцизионной репарацией оснований, ДНК-гликозилаза удаляет поврежденное основание, ДНК-эндонуклеаза "надрезает" нить ДНК, сахаро-фосфатные остатки удаляются фосфодиэстеразой, а полимеразы заполняют брешь, используя основания противоположной нити в качестве матрицы. Поэтому для обеспечения корректной репарации даже единственного поврежденного основания требуется несколько различных ферментов. Последний этап рассмотренных процессов может также использоваться для восстановления однонитевых разрывов ДНК.

ЭРО начинается с разрезания N-гликозидной связи между поврежденным основанием и дезоксирибозой ферментом ДНК-гликозилазой, что приводит к высвобождению поврежденного основания и оставляет апуриновый/апиримидиновый сайт (АП). АП-лиаза разрезает 3'-конец АП-сайта (иногда эту функцию выполняет так называемая бифункциональная ДНК гликозилаза), а АП-эндонуклеаза (АПЕ) разрезает 5'-конец АП-сайта, что приводит к удалению дезоксирибозо-фосфатного остатка.

В случае функционирования бифункциональной ДНК-гликозилазы или монофункциональной, после которой остается немодифицированный АП-сайт, имеет место

так называемая "короткая" ЭРО. В этом случае ДНК полимеразы  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) и ДНК лигаза III (Lig III) восстанавливают пробел одного нуклеотида. Если же после действия монофункциональной ДНК гликозилазы остается модифицированный АП-сайт, имеет место так называемая "длинная" ЭРО. Удаление одонитевого участка длиной 2-8 нуклеотидов с 5'-конца АП-сайта осуществляется эндонуклеазой FEN-1. Индуцированные излучением разрывы в ДНК, как правило, не воссоединяются путем простого сшивания ДНК-лигазой, поскольку в месте разрыва имеется повреждение сахарного остатка и, часто, потеря основания. Эксцизионная репарация оснований, вообще говоря, ограничена единичным основанием ДНК и протекает очень быстро; однако в клетках млекопитающих обнаружено относительно небольшое количество более длинных участков (patches) репарации, включающих до шести оснований, что указывает на наличие и второго пути - репарации "длинными участками". Многие ДНК-гликозилазы удаляют из ДНК измененные основания одного типа; например, урацил-специфичная ДНК-гликозилаза удаляет только урацил и продукты его окисления. Однако некоторые ферменты эксцизионной репарации оснований обнаруживают меньшую специфику к субстрату.

#### **16. Репарация ДНК. Эксцизионная репарация нуклеотидов.**

Ответ: ЭРН начинается с узнавания повреждений ДНК. В узнавании повреждений ДНК принимает участие белок ХРА, который в несколько сотен раз более эффективно связывается с поврежденной дуплексной ДНК и с одонитевыми фрагментами, чем с неповрежденной ДНК. На этапе узнавания повреждений может участвовать и транскрипционный фактор AP-1, который способствует репарации. Эндонуклеазы разрезают поврежденную нить ДНК на расстоянии 25-30 нуклеотидов друг от друга. Далее белки и эндонуклеазы открепляются от ДНК, а вместо них прикрепляются ДНК-полимеразы, репликативный фактор и др., которые осуществляют репаративный синтез ДНК. Завершается ЭРН лигазным зашиванием синтезированной нити ДНК. Лица, наследующие мутантные гены эксцизионной репарации нуклеотидов, как правило, чувствительны к солнечному свету и химическим агентам, которые вызывают значительные повреждения в ДНК; при этом относительно небольшое количество индивидуумов обнаруживают перекрестную чувствительность и к ионизирующему излучению.

Неожиданным оказалось недавнее открытие, что некоторые ферменты эксцизионной репарации нуклеотидов участвуют и в процессе нормальной экспрессии генов (транскрипции). Таким образом, когда гены находятся в состоянии активной экспрессии, для них требуется выполнение некоторых функций, характерных и для репарации: например, расплетание двойной спирали ДНК. При этом, по-видимому, используются те же самые белки.

ЭРН происходит в различных частях генома с разной скоростью. Активно экспрессируемые гены репарируются намного быстрее, чем остальная часть генома. В настоящее время выяснены детали этого процесса. Полагают, что если повреждение возникает в активно экспрессируемом гене, то белки, участвующие в этом процессе (комплекс транскрипции, содержащий РНК-полимеразу II) прекращают функционировать, в результате чего "застопоренный" комплекс действует как сигнал для перехода белков репарации к участку повреждения. Подобная двустадийная система репарации обнаружена в различных организмах - от бактерий до человека, причем для бактерий идентифицирован белок, отвечающий за передачу сигнала о направлении репаративной системы к сайту повреждения

#### **17. Репарация ДНК. Гомологичная рекомбинационная репарация.**

Ответ: Гомологичная рекомбинационная репарация осуществляет точное восстановление двунитевых разрывов и сшивков ДНК, используя находящиеся в сестринских хроматидах или в гомологичных хромосомах участки гомологии длиной более 200 п.о.. Восстановление

повреждения с помощью гомологичной рекомбинации основано на факте идентичности последовательностей в некоторых участках ДНК. Такие участки существуют, например, в материнских и отцовских копиях хромосом и в продублированной хромосоме (сестринские хроматиды) после репликации ДНК. Последовательность в ДНК, из которой извлекается информация для репарации поврежденной копии, должна быть идентична на сравнительно протяженном участке (более 200 пар оснований). При рекомбинации свободный ("обломанный") 3'-конец нити ДНК встраивается в неповрежденный двунитевой гомолог, и повторный синтез на этой матрице восстанавливает поврежденную нить. Разделение объединенного продукта этой реакции требует действия ферментов, разрезающих и воссоединяющих вновь синтезированные нити ДНК. В зависимости от того, какие нити разрезаны и воссоединены, эта реакция может также кончатся кроссинговером (обменом генетической информацией между двумя нитями ДНК). В ГРР участвует два комплекса: комплекс белков RAD51, RAD52, RAD54, RP-A, BRCA1, BRCA2 и комплекс белков RAD50, MRE11, XRS2. Первый функционирует в течение фазы S, а второй - преимущественно в поздней фазе S и фазе G<sub>2</sub>. Неизвестно, работают ли эти комплексы вместе или независимо друг от друга.

Поиск гомологии и обмен нитей ДНК во время ГРР происходит следующим образом. Сначала участок ДНК, содержащий ДР, подвергается деградации с помощью эндонуклеазы и геликазы, что приводит к образованию однонитевых участков со свисающими 3'-концами. Затем RAD51 вместе с однонитевой ДНК образует нуклеопотеиновый филамент, который ищет гомологичную ДНК, после чего происходит процесс слияния молекул гомологичной ДНК и обмен нитей. При этом белок RAD52 катализирует захват комплементарной однонитевой ДНК и выступает в качестве медиатора между RAD51 и репликативным белком А (RP-A усиливает эффективность ГРР в несколько раз) во время обмена нитей ДНК. ГРР требует функционирования ДНК-полимеразы  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) и так называемой резолвазы, разъединяющей слившиеся гомологичные молекулы и образующей интактные двунитевые молекулы ДНК.

### **18. Репарация ДНК. Негомологичное соединение концов нитей ДНК.**

Ответ: "Незаконная" рекомбинация - обычный механизм воссоединения разорванных последовательностей ДНК в клетках млекопитающих. Когда в геноме интегрируются посторонние молекулы ДНК, или же когда анализируются точки разрывов генома, ведущие к образованию делеций и перестроек, то оказывается, что для подобных геномных сайтов характерна невысокая степень гомологии последовательностей. В таком случае, по-видимому, включается более чем один путь репарации. Следует отметить, что "незаконная" рекомбинация является механизмом быстрого воссоединения концов разорванной ДНК, при котором нет необходимости в комплексных механизмах гомологичной рекомбинации. Возможно, что при большом количестве повторяющихся последовательностей в ДНК клеток млекопитающих процессы гомологичной рекомбинации, проходящие с обычной частотой, приводили бы к губельному для клетки уровню перестройки генома. В то время как репарация ДНК путем гомологичной рекомбинации восстанавливает структуру этой молекулы с малым количеством ошибок, "незаконная" рекомбинация с весьма высокой вероятностью приводит к заменам и/или потерям последовательности оснований ДНК.

Известно несколько вариантов НСКН, один из которых является точным и не приводит к потере информации, свойственной последовательностям оснований, другие сопровождаются утратой части генетического материала в результате включения микрогомологий в места соединений нитей ДНК. Механизм НСКН более зависим от состояния концов нитей, поскольку многие двунитевые разрывы ДНК имеют несовместимые или поврежденные основания, которые потенциально могут блокировать соединение.

В НСКН участвуют комплекс DNA-ПК и комплекс RAD50, которые работают во время фазы

$G_1$  и ранней фазы  $S$  клеточного цикла. В состав комплекса DNA-ПК входит по крайней мере четыре белка: серин-треониновая протеинкиназа (DNA-ПК<sub>CS</sub>), белки Ku70 и Ku80, а также белок KARP-1. Количество белков Ku70, Ku80 и DNA-ПК<sub>CS</sub> в клетке остается практически неизменным в течение цикла, и активность комплекса зависит от его посттрансляционной модификации. Для индукции экспрессии субъединицы комплекса KARP-1 требуется p53. Поэтому, когда облучение клеток индуцирует  $G_1$ -задержку клеточного цикла, происходит индукция НСКН и ингибирование ГРР в неподходящей для нее фазе клеточного цикла. Белки Ku70 и Ku80 связываются с разорванными концами ДНК, защищают их от нуклеазной деградаци и удерживают рядом друг с другом, способствуя эффективному воссоединению. Комплекс белков Ku70/Ku80 прикрепляет к месту воссоединения DNA-ПК<sub>CS</sub> и активирует ее киназную активность. При этом молекула DNA-ПК<sub>CS</sub>, находящаяся на одном конце разрыва, фосфорилирует DNA-ПК<sub>CS</sub>, находящуюся на другом конце, что инактивирует киназную активность DNA-ПК<sub>CS</sub>. Поскольку DNA-ПК является активатором p53, то по мере прохождения НСКН уровень p53 будет снижаться, что будет инактивировать НСКН и активировать гомологичную рекомбинацию.

### 19. Гены репарации ДНК.

Ответ: на репарацию повреждений ДНК у низших эукариот, например, у дрожжей, влияют более 50 генов, в число которых входят и гены, участвующие в контроле клеточного цикла. Кроме того, при поиске гомологов уже известных генов эксцизионной репарации, а также в экспериментах по картированию генома обнаруживают все новые и новые гены. В свете установленной многочисленности типов повреждений, требующих репарации, и учитывая недавно показанный сложный характер указанного процесса, неудивительно, если общее число таких генов у человека составит несколько сотен. Таким образом, существенная часть генома предназначена для поддержания целостности ДНК. Так как повреждения ДНК ионизирующим излучением тоже весьма разнообразны, многие из указанных генов должны играть роль и в постлучевой репарации.

Для успешной репарации сложных повреждений могут потребоваться ферменты, действующие по нескольким направлениям. Ферменты репарации ДНК можно охарактеризовать как клеточные белки, непосредственно воздействующие на поврежденную ДНК с целью восстановления ее правильной последовательности и структуры. На начальных этапах распознавания и репарации специфических форм повреждения ДНК функционируют относительно специализированные ферменты. Так, ДНК-гликозилазы катализируют расщепление связей между сахарными остатками ДНК и ее основаниями, причем только в случае изменения или повреждения последних. Кроме того, имеется несколько разных видов гликозилаз, которые распознают химически различные формы повреждений оснований. Ферменты, которые осуществляют нормальный метаболизм ДНК, тоже участвуют в процессах репарации многих типов повреждений. Это, например, ДНК-полимеразы, участвующие в синтезе новых цепей ДНК, и ферменты, сшивающие фрагменты ДНК в единую цепь (ДНК-лигазы). Идентифицировано несколько типов ДНК-полимераз и лигаз. Полагают, что они играют различную роль в нормальном метаболизме ДНК и что только некоторые из них активны при ее репарации.

### 20. Механизмы формирования и передачи по наследству эпигеномных изменений.

Ответ: В радиобиологии в настоящее время доминирует идея, что действие ионизирующей радиации в широком диапазоне доз проявляется преимущественно по генотоксическому механизму. Однако множество экспериментальных результатов указывает на существенную роль эпигенетических механизмов. Так, ионизирующая радиация способна индуцировать или стимулировать генную экспрессию, детерминировать апоптозный механизм гибели клеток, модифицировать межклеточные взаимодействия, вызывать

опухолевую трансформацию *in vitro* и канцерогенез *in vivo* без заметного генотоксического эффекта.

1. Метилирование ДНК - Наиболее хорошо изученный эпигенетический механизм. Процесс метилирования ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилирование ДНК, в основном, присуще эукариотам. У человека метилировано около 1 % геномной ДНК. За процесс метилирования ДНК отвечают три фермента, называемые ДНК-метилтрансферазами. Функция метилирования заключается в активации/инактивации гена. В большинстве случаев метилирование промоторных областей гена приводит к подавлению активности гена. Показано, что даже незначительные изменения в степени метилирования ДНК могут существенно изменять уровень экспрессии генов. Существуют по крайней мере два пути, по которым может происходить метилирование ДНК *de novo*. Первый – ферментативное метилирование ДНК, которая исходно была неметилированной. Второй – метилирование ДНК случайным включением 5-метил дЦТФ.

2. Модификация гистонов. Хотя модификации аминокислот в гистонах происходят на всей молекуле белка, модификации N-хвостов происходят значительно чаще. Эти модификации включают: фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование, метилирование, сумоилирование. Ацетилирование является наиболее изученной модификацией гистонов. Так, ацетилирование ацетилтрансферазой 14-го и 9-го лизинов гистона H3 коррелирует с транскрипционной активностью в данном районе хромосомы. Гистоны способны поддерживать своё модифицированное состояние и выступать матрицей для модификации новых гистонов, которые связываются с ДНК после репликации.

3. Ремоделирование хроматина. Гистоны формируют нуклеосому, вокруг которой накручивается ДНК, в результате чего обеспечивается её компактизация в ядре. От густоты расположения нуклеосом в активно экспрессирующихся участках генома зависит интенсивность экспрессии генов. Один из наиболее эффективных механизмов передачи дочерним клеткам профиля генной активности материнской клетки – передача посредством структур ядерного матрикса, которые обеспечивают компартиментализацию внутриядерного пространства и структурно-функциональную организацию генома. С матриксными структурами ассоциированы активные гены и там же локализованы все необходимые для протекания многоэтапного процесса их экспрессии ферменты.

4. Прионные белки обладают аномальной трёхмерной структурой и способны катализировать структурное превращение гомологичных им нормальных белков в себе подобный (прионный) белок, присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию. Таким образом, эпигенетические изменения, прямо или косвенно индуцированные ионизирующей радиацией, – важное звено в общей цепи радиобиологических реакций, приводящих в конечном итоге к формированию разнообразных видов лучевых эффектов на разных уровнях биологической интеграции. Имеются достаточные основания считать, что реакция клеток на действие радиационного стрессора по типу адаптивного ответа, повышение спонтанного уровня генетической нестабильности под влиянием ионизирующей радиации, радиогенный апоптоз и другие важные радиобиологические реакции обусловлены модификацией эпигенетического уровня регуляции генной активности.

## **21. Эпигенетические механизмы радиационно-индуцированной нестабильности генома.**

Ответ: Изменение свойственной необлученной клетке модели генной экспрессии, передача измененной модели дочерним клеткам и воспроизведение ее в последующих поколениях на эпигенетическом уровне имеет существенное значение в механизмах

РИНСГ. Возможно, процесс сопряжен с конформационными перестройками хроматина. Такие изменения в структуре хроматина могут возникать после воздействия радиации, например при формировании радиационно-индуцированных обменных aberrаций хромосомного типа в АТ-сайтах хроматина, связанных с ядерным матриксом, сохраняться в клетках и передаваться их потомству, несмотря на завершение процессов репарации ДНК. Наряду с этим может наследоваться измененная экспрессия генов. Последствия ее в отношении V(D)J-рекомбинации рассмотрены выше.

Другое возможное событие эпигенетического наследования экспрессии - передача "спящего" состояния гена после его метилирования. Хотя метилирование ДНК не является главным в контроле над регуляцией экспрессии тканеспецифичных генов в дифференцирующихся клетках, изменение продуктов его реакций в регуляторно важных местах ДНК может иметь важные последствия, в том числе и при формировании РИНСГ. Известно, что семейство генов MAGE (melanoma antigen-encoding gene family), локализованных у человека и животных в X-хромосоме, в клетках всех тканей (кроме семенников) находится в наследуемом "спящем" ("молчащем") состоянии из-за метилирования CpG динуклеотидов в промоторной части. При действии ионизирующей радиации возможны изменения в метилировании промоторной части генов как в результате ошибок репарации ДНК (включение 5-метил-дЦТФ), так и при ферментативном метилировании, катализируемом ДНК-метилтрансферазой, а также из-за возможного деметилирования. В результате "молчащие" до облучения гены становятся активными и это их состояние в случае выживания клеток передается потомству.

Эпигенетическое наследование активного состояния генов в митозе осуществляется посредством структур ядерного матрикса, с которыми ассоциированы активные гены и необходимые ферменты. Предполагается, что релаксированные (активные) монорепликонные петли хроматина передаются в таком состоянии от родительской к дочерним клеткам и сохраняются в последних в этом состоянии. Механизм эпигенетического наследования обеспечивается также благодаря получению потомством при делении родительской клетки информации - готовых структур синтеза белков, участвующих в воспроизведении наследуемого эпигенотипа.

## **22. Понятие и основные признаки радиационно-индуцированной нестабильности генома.**

Ответ: Для понимания природы стохастических радиационных эффектов крайне важной является проблема радиационно-индуцируемой нестабильности генома (РИНСГ). Эта проблема непосредственно касается механизмов таких важных радиобиологических явлений как радиационный мутагенез, канцерогенез и старение, - главных отдаленных последствий действия ионизирующих излучений.

До недавнего времени главным проявлением геномной нестабильности считали хромосомные перестройки, в частности aberrации хромосом, а в качестве его ведущего механизма - фиксирование в потомстве клеток повреждений в первичной структуре ДНК, не устраненных системами репарации из-за их временной несостоятельности или свойственной им склонности к ошибкам. Структурные изменения в нескольких генах служат основой патологических процессов при таких наследственных заболеваниях, как атаксия-телеангиэктазия, анемия Фанкони, синдром Блюма и др., для которых характерны аномальный ответ на повреждение ДНК, нарушение контроля программируемой клеточной гибели (апоптоз) и повышенная вероятность опухолевой трансформации. В последние годы наряду с перманентной, генетически наследуемой выделяют специальную форму нестабильности генома — РИНСГ, возникающую в результате воздействия ионизирующей радиации. К ее проявлениям относят отсроченную репродуктивную

гибель клеток (отдаленные летальные мутации), дестабилизацию хромосом, соматические мутации, амплификацию генов и изменение радиочувствительности. Основные представления о РИНСГ основаны на результатах работ, выполненных на клетках в культуре ткани.

Выделены два признака РИНСГ как общие свойства пролиферирующих клеток. Один из них характеризует явление РИНСГ в целом как долговременное понижение вероятности роста и деления облученных клеток без возникновения мутаций в генетическом материале. Другой подчеркивает, что клетки, обладающие после воздействия радиации геномной нестабильностью, генерируются с высокой частотой, но не образуют однородного клона, а повреждения генома, которые в них обнаруживаются, случайны, непредсказуемы по частоте, времени проявления и выраженности.

РИНСГ передается многим поколениям клеток, образующимся путем репликации, причем генетические изменения, наблюдаемые в клетках дочерних поколений, отличаются от возникших в "родительской", т.е. в самой облученной клетке. Радиация в сущности увеличивает частоту, с которой в выживших облученных клетках точнее, в образуемых ими клеточных популяциях при нормальном функционировании возникают спонтанные генетические изменения.

### **23. Механизмы формирования радиационно-индуцированной нестабильности генома.**

Ответ: механизмы формирования РИНСГ до конца не изучены. Предложено цитологическое объяснение механизма возникновения РИНСГ. В организме животных и человека предполагается существование небольшой субпопуляции клеток с нестабильным геномом, названной клетками *эволюционного или/и онтогенетического резерва*. Геномная нестабильность индуцируется в этих клетках эпигенетической программой. Эта программа вызывает в ДНК повреждения главным образом в "горячих точках" хромосом. В результате возникают новые генетические варианты.

Однако существует множество молекулярных и генетических путей, способных приводить к различным проявлениям РИНСГ в большинстве любых клеток. Так, в опытах на гибридной линии клеток GM10115, содержащей человеческую хромосому 4 в окружении 20-24 хромосом хомячка, не обнаружено значимой корреляции между нестабильностью хромосом и сестринскими хроматидными обменами, отсроченными мутациями и репарацией нарушения спаривания оснований. В то же время проявления отсроченной амплификации генов и задержка репродуктивной гибели клеток коррелировали с нестабильностью хромосом.

На клеточном уровне известны три взаимосвязанные системы, обеспечивающие поддержание стабильности генома: 1) система окислительно-восстановительного гомеостаза, продуцирующая различные цитотоксические факторы, в том числе активные формы кислорода (перекись водорода, супероксидный анион-радикал  $O_2^-$ ,  $OH^\bullet$ -радикал), участвующие в элиминации генетически чужеродного материала; 2) система контроля клеточного цикла в сверхочных точках (checkpoints), которая обеспечивает экстренное удаление клетки с патологически измененной ДНК, способной нарушить постоянство генома; центральным компонентом этой системы является опухоль супрессорный белок p53; 3) механизмы репарации ДНК.

### **24. "Эффект свидетеля" при радиационно-индуцированной нестабильности генома.**

Ответ: Возможное объяснение механизма возникновения РИНСГ в последние годы пытаются найти путем выяснения причин так называемого эффекта "свидетеля". Впервые

феномен обнаружен в опытах, когда в культуральную среду облученных клеток, высевали интактные клетки, которые не подвергались воздействию ионизирующей радиации. Вскоре они и их потомство начинают проявлять все или многие из признаков, характерных для РИНСТ, как если бы сами возникли из облученной клетки.

"Эффект свидетеля", определяемый как индукция генетических изменений в необлученных ядрах клеток, может отражать проявление по крайней мере двух различных механизмов. Первый механизм предполагает, что эффект свидетеля осуществляется при помощи межклеточных контактов, которые включают р53-опосредуемый путь проведения сигнала повреждения. Согласно второму механизму, облученные клетки секретируют цитокины или другие факторы, которые в необлученных клетках повышают внутриклеточный уровень активных форм кислорода. Очевидно, что в иницировании РИНСТ могут играть роль оба механизма "эффекта свидетеля": как сигналы о повреждении, передаваемые через культуральную среду, так и сигналы через клеточные контакты от потомков облученных клеток к интактным. Первые из них могут осуществляться при посредстве цитокиноподобных факторов, а процесс передачи их для формирования РИНСТ как у потомства облученных клеток, так и у необлученных клеток независим от р53. В целом, генетическая нестабильность - это производная состояния регуляции сверхточных точек клеточного цикла и механизмов апоптоза, находящихся под контролем гена р53. Однако реальное взаимодействие и соотношение этих процессов при РИНСТ, когда состояние этого гена изменено, нуждаются в специальном изучении. Таким образом, сохраняющаяся геномная нестабильность может быть индуцирована через механизмы "эффекта свидетеля". Первоначальный профиль повреждения усиливается "эффектом свидетеля", и клетки, которые затронуты механизмом "свидетеля", могут оставаться в области повышенного риска генетического изменения в течение многих поколений.

## **25. Отсроченная репродуктивная гибель клеток как проявление радиационно-индуцированной нестабильности генома.**

Ответ: В 1986 г. впервые было отмечено понижение способности потомства облученных клеток к образованию колоний *in vitro* из-за возникновения отсроченных летальных мутаций. В последующем этот феномен и стали называть отсроченной репродуктивной гибелью. После облучения этот феномен проявляется во многих поколениях клеток млекопитающих, сопровождаясь у потомства проявлениями фенотипа, отличного от родительского. Так, потомство из 12-14-го циклов удвоения выживших клеток китайского хомячка имело различные аномалии, включая пониженную способность адгезии к субстрату и замедленное продвижение по клеточному циклу. При расщеплении единичных клеток наблюдали повышенное число abortивных колоний и колоний с гигантскими клетками. Все это позволило заключить, что "след" повреждения передается выжившему потомству облученных клеток через многие митотические циклы, а также повреждения могут возникать *de novo*.

Фенотип отсроченной репродуктивной гибели клеток можно индуцировать в клетках при действии других ДНК-повреждающих факторов, таких как этилметансульфонат и эндонуклеаза *Hinfl*, вызывающая образование одностранных разрывов в ДНК. УФ-излучение к появлению клеток с фенотипом отсроченной гибели не приводило. В то же время клетки мутантные по репарации двунитевых разрывов ДНК, после воздействия ионизирующей радиации не давали потомства с проявлениями отсроченной репродуктивной гибели, вероятно, вследствие более быстрой элиминации. Это указывает на причастность разрывов ДНК и механизмов репарации двунитевых разрывов к формированию РИНСТ.

Дестабилизация хромосом рассматривается как первый и прямой признак общей нестабильности генома. Все хромосомы в выживших после облучения клетках

включаются в образование дицентрических aberrаций приблизительно с равной вероятностью. В силу разных причин общее число клеток с aberrациями хромосом с каждым митозом убывает. При этом клоны с хромосомной нестабильностью могут восстанавливать стабильность в следующей клеточной популяции, сохраняя тот же уровень нестабильности либо становиться еще более нестабильными. В клетках, претерпевших опухолевую трансформацию, нестабильность хромосом оказывается устойчивым признаком. После облучения в малых дозах не отмечено прямой корреляции и простых соотношений между двумя такими проявлениями РИНСГ, как отсроченная репродуктивная гибель и aberrации хромосом. Однако отмечается корреляция между отсроченной репродуктивной гибелью и возрастом числа клеток с микроядрами при РИНСГ.

В 1990 г. было показано, что в десятках поколений клеток после радиационного воздействия обнаруживается повышенное число мутаций. Важно отметить, что механизмы образования мутаций при РИНСГ в отличие от возникающих в непосредственно облученных клетках иные. Если при непосредственном радиационном воздействии более 70% мутаций относятся к делециям, то мутации, служащие проявлением РИНСГ, имеют характер точковых, затрагивая многие гены. При этом в мутационный процесс вовлекаются не только собственно кодирующие, но и минисателлитные области генома. Нестабильность в GC(гуанин-цитозин)-богатых минисателлитах включается в мутационные процессы в соматических и половых клетках. В половых клетках человека комплекс изменений происходит во время мейоза, а AT(аденин-тимин)-богатые минисателлиты включаются в развитие интрааллельных процессов в ходе репликации.

## **26. Адаптивный ответ. Критерии и методы изучения. Объекты исследования. Дозо-временные параметры, необходимые для его экспрессии.**

Ответ: АО представляет собой активную реакцию клеток на низкоинтенсивное, не вызывающее заметных повреждений воздействие, в результате которого приобретает устойчивость к поражающему эффекту этого же или другого агента в значительной дозе. Первую, иницирующую АО дозу (или концентрацию) принято обозначать как адаптирующую Д1, а вторую (обычно на 1 – 2 порядка выше) – как повреждающую – Д2. По мнению некоторых авторов, АО феноменологически близок к индуцированной радиорезистентности. АО был обнаружен на бактериях, дрожжах, простейших, водорослях, у высших растений, на клетках насекомых, рыб, млекопитающих и человека, а также в экспериментах *in vivo*. Не было отмечено АО в тканях преимплантированных эмбрионов мышей на ранних стадиях развития.

Наиболее распространенным способом оценки радиационного поражения клеток является подсчет хромосомных aberrаций (ХА). Большинство ХА обусловлено повреждением первичной структуры ДНК или ошибочной репарацией таких повреждений. При изучении АО учитываются ХА хромосомного и хроматидного/изохроматидного типов. Первые преобладают, когда клетки облучаются в Д2 на стадиях G0 и G1 клеточного цикла, а вторые, – если Д2 приходится на фазу G2. При АО главным образом увеличивается восстановление клеток, содержащих одиночные ХА, и в меньшей степени – мультиабберрантных клеток. Поэтому, несмотря на уменьшение общего количества ХА в облученной популяции, остается повышенной доля клеток с большим числом ХА.

В последнее время все более широко применяется микроядерный тест. Его использование обуславливается простотой и стабильностью результатов, полученных этим методом, по сравнению с методами хромосомного анализа. Микроядра (МЯ) возникают из ацентрических хромосом, хроматидных фрагментов или из целых хромосом, которые

отстают в анафазе и не включаются в дочерние ядра во время деления. Кроме того, признается и апоптотическое происхождение МЯ.

Весьма перспективный метод оценки АО с помощью определения апоптоза. Он основывается на подсчете апоптотических, то есть фактически погибших клеток, а поскольку подобная форма гибели является преобладающей в интервале дозы Д<sub>2</sub>, используемой для изучения АО, подобный тест может стать универсальным для оценки конечного радиобиологического эффекта.

АО проявляется только тогда, когда все летальные повреждения в клетках репарированы. Это происходит при дозе излучения, генерирующей главным образом одиночные ХА, то есть Д<sub>2</sub> не должна быть чрезмерно большой. Абсолютные значения Д<sub>1</sub> для разных типов клеток находятся в пределах 1-5 сГр. Увеличение Д<sub>1</sub> от 1 до 10 сГр не приводит к изменению выраженности АО. Увеличение Д<sub>1</sub> более 10 сГр приводит, как правило, к устранению АО. Оптимальный интервал времени, необходимый для наибольшей эффективности АО, колеблется для разных клеток от 40 мин. до нескольких часов. Значения Д<sub>2</sub> существенного влияния на выраженность АО. При изменении мощности Д<sub>2</sub> от 1 сГр/мин до 1 Гр/мин изменений эффекта не обнаружено.

#### **27. Адаптивный ответ. Возможные молекулярные механизмы.**

Ответ: Малая доза радиации (Д<sub>1</sub>) индуцирует молекулярные процессы, приводящие к усилению репарации повреждений ДНК, вызванных последующей высокой дозой Д<sub>2</sub>. Адаптирующее воздействие в дозе Д<sub>1</sub> способна активировать антиоксидантную защитную систему, направленную на удаление токсических радикалов, приводит к изменению конформации хроматина, вызывает увеличение скорости седиментации нуклеоида в лимфоцитах человека. Эффект не сопровождается изменением суперспиральности ДНК и, по-видимому, был связан с экспрессией генов, посттрансляционной модификацией белков, более высоким содержанием белков, связанных с ДНК, меньшим размером петель в этой нуклеиновой кислоте и увеличением количества РНК в нуклеоиде. Для экспрессии АО требуется синтез *de novo* белков и транскриптов. В лимфоцитах человека в первые часы после Д<sub>1</sub> обнаруживается несколько вновь синтезированных белков, некоторые из них обладали способностью связываться с облученной ДНК. В развитии АО играет роль индуцибельная репарация ДНК. Д<sub>1</sub> может продуцировать факторы, которые репарируют повреждения, возникшие после первого воздействия и эффективно устраняют последствия облучения в Д<sub>2</sub>. АО инициируется ОН-радикалом, генерируемым радиолизом Н<sub>2</sub>О. Включение программы АО осуществляется путем продукции повреждений ДНК и/или непосредственным взаимодействием гидроксильного радикала с клеточными структурами и молекулами. Малые дозы излучения вызывают увеличенную экспрессию протеинкиназы С, запускающую развитие ОА. Ионы Са<sup>2+</sup> являются внутриклеточными активаторами ПКС. В адаптивную реакцию вовлекается и сАМР-зависимая протеинкиназа. Активация протеинкиназ инициирует каскад фосфорилирования, приводящий к экспрессии ядерных генов-преобразователей, продукты этих генов включают транскрипционные факторы. Модификация белков и мультибелковых комплексов включают изменение скорости или точности репарации ДНК, связывание транскрипционных факторов гистонами и другими белками, индукцию синтеза стресс-белков и регуляцию клеточного цикла. Все эти события завершаются после Д<sub>2</sub> и направлены на ликвидацию последствий облучения в высокой дозе.

#### **28. Индивидуальная вариабельность адаптивного ответа.**

Ответ: Одним из осложнений, возникающих при работе с лимфоцитами человека, является то, что среди доноров встречаются индивидуумы, лимфоциты которых не проявляют

реакции АО. Анализ литературного материала позволяет считать, что количество таких лиц составляет приблизительно 1/3 общего числа обследованных.

Выраженность АО в лимфоцитах разных доноров имела значительные вариации в зависимости от сроков облучения, стимуляции ФГА и времени фиксации. Однако по другим данным отсутствие АО в клетках здоровых доноров не зависело от условий эксперимента и сохранялось длительное время.

Считается, что причинами вариабильности индукции АО в лимфоцитах человека могут быть индивидуальные различия в уровнях цитокинов в клетках, в скорости эксцизионной репарации ДНК после облучения, в способности лимфоцитов стимулироваться митогенами. Многие авторы поддерживают предположение о генетической обусловленности существования АО, хотя и не исключают влияния на его экспрессию временного физиологического состояния доноров. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопрос, является ли неспособность лимфоцитов некоторых практически здоровых лиц к АО следствием генетической дефицитности, как это наблюдается в клетках больных синдромом Дауна и при атаксии – телангиэктазии.

Значительный интерес представляет изучение АО в лимфоцитах людей, подвергавшихся хроническому радиационному воздействию в результате аварии на ЧАЭС. Отмечена значительно меньшая степень выраженности АО и частота его выявления в клетках доноров, проживающих на загрязненных территориях. Одно из предположений, объясняющих подобные результаты, заключается в том, что хроническое облучение само по себе является адаптирующим, и дополнительная доза излучения Д1 не приводит к усилению эффекта вследствие "насыщения" в системах, формирующих АО. Однако в данном случае не выявлено изменений радиорезистентности лимфоцитов после их экспозиции в Д2, как это было показано в ранее упоминавшихся работах. Поэтому более справедливым кажется другое объяснение – хроническое лучевое воздействие приводит к изменениям в геноме, препятствующим реализации АО, экологическая ситуация привела к возникновению популяции, отличающейся по реакциям на многие генотоксические факторы внешней среды

#### **4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ**

##### **4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации**

В рамках **текущего контроля** в течение семестра для оценки знаний, умений, навыков, получаемых в ходе изучения дисциплины, учитываются результаты устных ответов при фронтальном опросе, письменных ответов при фронтальном поименном опросе, реферативные сообщения.

Критерием успешности освоения учебного материала **по окончанию учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (устный опрос, письменный опрос, реферативные сообщения), ответы на экзаменационные вопросы. Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

Промежуточная аттестация проводится в форме экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

##### **4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств**

#### 4.2.1 Критерии оценивания ответов на теоретические вопросы

##### **Неудовлетворительно:**

Полнота ответа – Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствуют межпредметные связи.

Структурированность – Нет.

Логика изложения – Отсутствует логика в изложении материала. Ответы на дополнительные вопросы – Нет.

##### **Удовлетворительно:**

Полнота ответа – Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, ответ отличается низким уровнем самостоятельности.

Структурированность – Не всегда прослеживается четкость и структурированность.

Логика изложения – Не всегда прослеживается логика изложения материала. Ответы на дополнительные вопросы – Затрудняется с ответами, ответ отличается низкой самостоятельностью.

##### **Хорошо:**

Полнота ответа – Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью.

Структурированность – Ответ структурирован, грамотен, обстоятелен. Логика изложения – Корректно и логически стройно его излагает ответ.

Ответы на дополнительные вопросы – Не затрудняется с ответом при видоизменении задания, не всегда ответы на дополнительные вопросы отличаются полнотой, структурированностью.

##### **Отлично:**

Полнота ответа – Студент полно излагает учебный материал на основе лекций и дополнительной литературы, осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.

Структурированность – Ответ структурирован, грамотен, обстоятелен. Логика изложения – Корректно и логически стройно его излагает ответ.

Ответы на дополнительные вопросы – Не затрудняется с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, ответы на дополнительные вопросы характеризуются полнотой, структурированностью.

#### 4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;

«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

## Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Оценка	Критерии оценки знаний студентов
Отлично	Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.
Хорошо	Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач.
Удовлетворительно	Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности.
Неудовлетворительно	Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, с большими затруднениями выполняет практические задания, отсутствуют межпредметные связи

**06.03.01 Биология, направленность Биофизика ФОС РПД  
Молекулярная радиобиология, форма обучения очная**

Проректор по учебной работе      утверждено 24.02.2025      А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета      согласовано      Д.С. Сташкевич

**Заседанием кафедры радиационной биологии**

Протокол заседания № 7 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой      согласовано      А.В. Аклеев

Автор (составитель)      Е.В. Стяжкина

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ  
ВО «ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**