

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА
РОССИИ Б.Н. ЕЛЬЦИНА
(УрФУ)

Физико-технологический институт
Кафедра экспериментальной физики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Зав. кафедрой ЭФ

_____ В.Ю. Иванов
(подпись)

«_____» _____ 2020 г.

**ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ**

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Пояснительная записка

12.04.04 72.19.29 804 ПЗ

Руководитель _____ А.А. Баранова
доцент, к.т.н.

Консультант _____ Р.А. Вазиров

Нормоконтролер _____ 28.05.2020 Ю.Г. Лазарев
вед. инж.

Студент гр. ФтМ-280304 _____ О.И. Коротовских
Екатеринбург

2020

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Институт физико-технологический _____
Кафедра экспериментальной физики _____
Направление подготовки 12.04.04. Биотехнические системы и технологии _____
Образовательная программа _____

УТВЕРЖДАЮ

Зав. кафедрой _____
« ____ » _____ 201__ г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

студента Коротовских Ольги Игоревны _____ группы ФТМ-280304
(фамилия, имя, отчество)

1. Тема выпускной квалификационной работы влияние малых доз ионизирующего излучения на биологические объекты

Утверждена распоряжением по институту от «29» февраля _____ 2020 г. № 233-06-06

2. Руководитель Баранова Анна Александровна, доцент, к.т.н
(Ф.И.О., должность, ученое звание, ученая степень)

3. Исходные данные к работе биологические объекты (дрожжевая культура, инкубационные куриные яйца), источники ионизирующего излучения (^{137}Cs , ^{241}Am , линейный ускоритель электронов, ускоритель УРТ 0,5), литературные источники

4. Перечень демонстрационных материалов презентация, пояснительная записка

5. Календарный план

№ п/п	Наименование этапов выполнения работы	Срок выполнения этапов работы	Отметка о выполнении
1.	<i>1 раздел (глава)</i>	до 31.05. 2019_ г.	
2.	<i>2 раздел (глава)</i>	до 25.12. 2020_ г.	
3.	<i>ВКР в целом</i>	до 20.05. 2020_ г.	

Руководитель _____ Баранова А.А.
(подпись) Ф.И.О.

Задание принял к исполнению 15.09.18.
дата _____ (подпись)

6. Выпускная квалификационная работа закончена «28» мая _____ 2020 г. считаю возможным допустить Коротовских Ольгу Игоревну к защите выпускной квалификационной работы закончена в Государственной экзаменационной комиссии.

Руководитель _____ Баранова А.А.
(подпись) Ф.И.О.

7. Допустить Коротовских Ольгу Игоревну к защите магистерской диссертации в Государственной экзаменационной комиссии (протокол заседания кафедры № ____ от «04» июня 2020 г.).

Зав. кафедрой _____ Иванов В.Ю.
(подпись) Ф.И.О.

РЕФЕРАТ

Пояснительная записка: 62 с., 24 рис., 7 табл., 35 источников.

ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, РАДИОБИОЛОГИЯ, МАЛЫЕ ДОЗЫ, АДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ, ГОРМЕЗИС

Выпускная квалифицированная работа выполнена на тему «Влияние малых доз ионизирующего излучения на биологические объекты». Работа выполнялась совместно с ГАУЗ Свердловской области «Свердловский областной онкологический диспансер» и федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт электрофизики Уральского отделения Российской академии наук».

Целью данной работы было изучение действия малых доз ионизирующего излучения на биологические объекты.

В работе использовали дрожжи штамма *Saccharomyces cerevisiae* и эмбрионы инкубационных куриных яиц. Было проведено моделирование радиационно-индуцированного адаптивного ответа и сделаны предположения относительно роли коэффициентов в модели. Дальнейший анализ модели позволит более детально рассмотреть биологические процессы, протекающие при РАО.

Также были проведены опыты на выявление стимулирующего действия малых доз, разработана методика проведения колонообразующего анализа на кафедре экспериментальной физики физико-технологического института Уральского Федерального университета.

Результаты работы свидетельствуют об увеличении количества жизнеспособных клеток, сокращении времени выведения птенцов и стимулирующем действии ИИ.

Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку могут найти применение в винодельной промышленности и промышленном птицеводстве.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 Ионизирующее излучение и его биологическое действие.....	8
1.1 Ионизирующее излучение.....	8
1.2 Реакции организмов на облучение	9
1.3 Зависимость «Доза-эффект»	11
1.4 «Большие» и «малые» дозы	11
1.5 Подходы к малым дозам	12
1.6 Модели в радиобиологии	13
1.6.1 Таргетная теория и её главные модели	14
1.6.1.1 Базовые баллистические модели	14
1.6.1.2 LQ-модели.....	16
1.6.2 Модели, основанные на сублетальных гипотезах	18
1.6.3 Современные подходы	20
1.7 Гормезис и радиационно-индуцированный адаптивный ответ	21
1.8 Рассмотрение теорий, описывающих механизмы адаптивного ответа ...	22
1.9 Модели РАО. Модель Чернавского Д.С.	29
2 Используемые объекты и методы	31
2.1 Источники ионизирующего излучения.....	31
2.1.1 Аппарат рентгенотерапии Xstrahl 300	31
2.1.2 Америций-241	33
2.1.3 Цезий-137	35
2.1.4 Линейный ускоритель электронов модели УЭЛР–10–10С	35
2.2 Биологический объект и методы исследования.....	36
2.2.1 Биологические объекты.....	36
2.2.2 Вспомогательные материалы	37
2.2.3 Метод колониеобразующего анализа	41
3 Экспериментальная оценка действия малых доз на биологические объекты	44
3.1 Закономерности воздействия ИИ на БО	44

3.2 Моделирование РАО	45
3.3 Стимулирующее действие малых доз	49
3.4 Изучение влияния малых доз на эмбрионы инкубационных куриных яиц	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	59

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

БО – Биологический объект

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – Ионизирующее излучение

КОЕ – Колониеобразующая единица

КЦ – Клеточный цикл

РАО – Радиационно-индуцированный адаптивный ответ

УрФУ – Уральский федеральный университет

ФИД – Фактор изменения дозы

ФТИ – Физико-технологический институт

ЭФ – Экспериментальная физика

ВВЕДЕНИЕ

В современной радиобиологии и радиэкологии все более актуальным становится исследование действия «малых» доз ионизирующего излучения (ИИ): радиационно-индуцированный адаптивный ответ, эффект гормезиса, эффект гиперрадиочувствительности и другие. Этот интерес связан с тем, что нет единого понимания процессов, происходящих в биологических объектах (БО) при действии ИИ в области малых доз, тогда как процессы, протекающие после воздействия больших доз, в основном, изучены.

При этом воздействию больших доз подвергаются только пациенты, проходящие лучевую терапию, а также отдельные группы лиц на авариях атомной промышленности. Воздействию малых доз подвергается персонал атомных станций, работающих в штатном режиме, медицинский персонал, пилоты и бортпроводники, космонавты. Радиационный фон Земли находится в области малых доз (до сих пор нет единого определения «малых» доз, но принято считать, что это дозы, не превышающие порог равный 200 мкЗв).

Целью данной работы является изучение стимулирующего действия малых доз ионизирующего излучения.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие задачи:

- изучить литературные источники по выбранной тематике;
- выбрать объект исследования, экспериментальное изучение которого имело бы не только научную, но и практическую значимость;
- выбрать источники ионизирующего излучения;
- изучить колонообразующий метод анализа, его основные особенности;
- разработать и опробовать методику проведения колонообразующего анализа на кафедре экспериментальной физики физико-технологического института;

- исследовать действие ионизирующего излучения на биологические объекты.
- Выполнить моделирование радиационно-индуцированного адаптивного ответа;
- Оценка влияния малых доз ионизирующего излучения на эмбрионы птенцов бройлеров.

Практическая значимость.

На сегодняшний день многие биологические объекты используются в производстве и сельском хозяйстве. Например, пивные и винные дрожжи используются в пововарении и виноделии. Создание и поддержание определенных условий культивирования дрожжей позволяет управлять ходом ферментационного процесса и, таким образом изменять свойства конечного продукта по усмотрению производителя.

Также стимулирующее действие малых доз может найти применение в сельском хозяйстве, путем уменьшения времени выведения птенцов.

Таким образом, изучение стимулирующего действия малых доз имеет не только значимые научные результаты, но и полезное практическое применение.

Результаты работы имеют большое практическое значение, т.к. изучение стимулирующего действия малых доз имеет не только значимое научное достижение, но и увеличивают эффективность применения облучения при обработке различных видов сельскохозяйственной и пищевой продукции.

1 Ионизирующее излучение и его биологическое действие

1.1 Ионизирующее излучение

Ионизирующее излучение является частью широкого электромагнитного спектра излучений, встречающихся в природе или генерируемых искусственными источниками, созданными в результате деятельности человека.

Ионизирующее излучение – это излучение, прохождение которого через вещество приводит к возбуждению его атомов и к выбиванию электронов с их внешних оболочек.

К ИИ относят электромагнитные и корпускулярные излучения.

Классификация ионизирующего излучения.

- По энергетической составляющей:
 - моноэнергетическое (излучение, состоящее из частиц одного вида одинаковой энергии);
 - немоноэнергетическое (излучение, состоящее из частиц одного вида разных энергий).
- По характеру распространения:
 - направленное;
 - ненаправленное.
- По виду ионизации:
 - непосредственно ионизирующее (состоит из заряженных частиц, кинетическая энергия которых достаточна для ионизации при столкновении с атомами вещества. Примером этому могут быть α - и β -излучения радионуклидов, протонное излучение ускорителей);
 - косвенно ионизирующее (состоит из незаряженных частиц, взаимодействие которых со средой приводит к возникновению заряженных частиц, способных непосредственно вызывать ионизацию. Примерами могут

служить нейтронное и фотонное излучения, представляющие собой электромагнитное ионизирующее излучение)[1, 2]

1.2 Реакции организмов на облучение

Действие ионизирующего излучения на организм зависит от ряда факторов, определяющими из которых являются вид излучения, полученная доза, размеры облучаемой поверхности, продолжительность облучения. В зависимости от возможных негативных последствий эффекты от полученной дозы излучения могут быть детерминированными и стохастическими.

Инактивация молекулы может произойти в результате прямого или опосредованного действия ИИ.

Прямое действие состоит в том, что инактивированными оказываются те молекулы, которые непосредственно поглотили энергию излучения.

Если же молекула была поражена активными реакционноспособными продуктами, возникшими в результате поглощения энергии излучения ее микроокружением, то говорят о непрямом (косвенном) действии ИИ.

В процессе повреждающего действия ИИ на организм условно можно выделить три этапа:

- первичное действие ионизирующего излучения;
- влияние радиации на клетки;
- действие радиации на целый организм.

Оценивая биологические последствия облучения организмов, удобно делить их на летальные, возникающие в результате действия излучений в больших дозах, и сублетальные (нелетальные), инициируемые воздействием ИИ в малых и средних дозах.

На уровне клетки и субклеточных структур ИИ вызывают различные реакции: от временной задержки деления клеток до их гибели.

В клетках функционируют сложный комплекс ферментных систем, поддерживающих структурную целостность генома. К одной из них относят

разнообразные ферменты репарации ДНК, распознающие дефекты ее структуры, «ремонтующие» ее при лучевых повреждениях путем специфического устранения различных повреждений и восстановления структуры и функции ДНК, а вместе с тем и нормального клеточного деления[3].

Радиационные повреждения клеток приводят к необратимым нарушениям ультраструктуры органелл, которые вызывают, в том числе, изменения обмена веществ.

Повреждения ИИ цитоплазматических структур проявляются в нарушении энергетического обогащения клеток и проницаемости мембраны клеток, что ведёт их гибели.

При воздействии ИИ на ядро клетки наблюдается замедление синтеза ДНК, возникают одностранные и двустранные разрывы ДНК, приводящие к хромосомным абберациям, появляются генные мутации. Повреждение ядра приводит к синтезу изменённых белков. Опасными, с точки зрения последствий, являются повреждения генома клетки и хромосомного аппарата, которые приводят к нарушению механизма митоза [4].

При воздействии на клетку «большими» дозами ИИ в них наступают необратимые изменения, приводящие либо к их гибели до вступления в митоз, либо к интерфазной гибели, либо, в момент митотического деления, к митотической репродуктивной гибели.

Главной причиной репродуктивной гибели клеток являются структурные повреждения ДНК, которые возникают под влиянием облучения. Гибель клеток ведёт к нарушению структуры тканей, опустошению и нарушению функции.

Полное подавление митоза наступает после воздействия большими дозами ИИ, когда клетка значительное время продолжает жить, но необратимо утрачивает способность к делению. В результате облучения образуются патологические формы клеток. Например, клетки огромных размеров, в которых содержатся несколько наборов хромосом [4].

1.3 Зависимость «Доза-эффект»

Уже в первых радиобиологических исследованиях отмечалась важная закономерность – вероятностная природа проявления реакции клеток на облучение. При оценке зависимости доли погибших клеток выяснилось, что с ростом дозы увеличивается число погибших клеток, однако даже при облучении в очень высоких дозах сохранялось некоторое количество жизнеспособных клеток, а некоторые объекты погибали даже при очень низких дозах[5].

Для построения кривых «доза-эффект» определенное количество объектов облучали в широком диапазоне доз, после облучения в каждой дозе определяли долю объектов, сохранивших исходные свойства по отношению к их общему числу до облучения.

1.4 «Большие» и «малые» дозы

Гибель многоклеточных организмов при остром лучевом облучении в больших дозах вызывается гибелью значительной части клеток критического органа (клеточным опустошением). Облучение в меньших дозах уже не приводит к гибели, однако наличие патологий, вызванных воздействием ИИ, могут быть обнаружены по ряду биологических и медицинских показателей [5].

Характерным признаком динамики эффекта облучения в малых дозах является нелинейная зависимость радиобиологических изменений от величины дозы облучения и времени облучения [5].

Предлагались различные гипотезы для объяснения и описания нелинейности кривых «доза-эффект» и «время-эффект» при воздействии малых доз ИИ.

Объяснение наблюдаемого вида кривых зависимости эффекта от дозы следует искать в особенностях воздействия ИИ, в способе сообщения ими энергии биологическому объекту, т.е. в биофизической трактовке кривых

«доза-эффект». Она основывается на основополагающих принципах – представлении о дискретной природе ИИ и вероятностном характере передачи энергии внутриклеточным молекулярным структурам [5].

Одно из мнений говорит о том, что у клеточных популяций, на которых проводились исследования, наблюдались различия в радиочувствительности. Эта гипотеза утверждает, что при облучении малыми дозами, радиочувствительные клетки не погибают, но повреждения в них все-таки присутствуют. Тогда как при больших дозах основная часть радиочувствительных объектов инактивируется, забирая с собой неучтенные повреждения. Это приводит к недооценке действия больших доз на биообъекты.

Вторая концепция заключается в том, что при воздействии «малых» доз системы репарации ДНК в клетке не запускаются и избыток возникающих повреждений не репарируется. Но при достижении некоторой пороговой дозы системы репарации ДНК запускаются, что делает клетку радиоустойчивой в некотором интервале доз. Данная концепция называется репарационной и позволяет объяснить природу таких явлений, как гиперрадиочувствительность и индуцированная радиоустойчивость [6].

1.5 Подходы к малым дозам

В современной науке существуют три точки зрения относительно воздействия малых доз на биологические объекты:

- опасность малых доз по сравнению с большими дозами;
- отсутствие отличий в сравнении с воздействием в области больших доз;
- благоприятное влияние малых доз, такое как радиационно-индуцированный адаптивный ответ или эффект гормезиса.

Об отсутствии особенностей в действии излучений в малых дозах свидетельствует признание линейной беспороговой концепции в качестве

основы для нормирования радиационного фактора. Следует иметь в виду, что линейная беспороговая концепция является лишь гипотезой, так как в области минимальных дозных значений отсутствуют как экспериментальные, так и эпидемиологические данные. Тем не менее, МКРЗ использует её как удобную модель для регламентации гигиенических нормативов [7].

Однако беспороговая линейная концепция не выдержала проверки временем, и уже в 1980 году вышла монография, в которой были обобщены данные экспериментов о благоприятном действии малых доз ионизирующего излучения [5].

1.6 Модели в радиобиологии

Для описания воздействия ИИ на БО и, в том числе, малых доз ИИ в радиобиологии существует ряд моделей.

Клеточная радиочувствительность традиционно определялась, как неспособность облученных клеток продуцировать дочерние клетки (т. е. колонии). Она количественно определяется с помощью клоногенных анализов, которые заключаются в определении количества колоний, образующихся в результате данного количества клеток, облученных в данной дозе.

Хронология возникновения моделей в радиобиологии [8].

1. В период между 1920-ми и 1950-ми годами наиболее широко используемые модели выживаемости клеток были непосредственно выведены из таргетной теории.

2. Между 1950-ми и 1980-ми годами интенсивно использовалась модель (n , D_0). Однако доказательства того, что первоначальный наклон кривой выживаемости не был нулевым, значительно снизили интерес к этой модели.

3. В начале 1980-х годов предпочтение отдавалось линейно-квадратичной модели (LQ) из-за ее очень близкого описания к эксперименту,

но эмпирическая природа ее параметров, α и β , побудила авторов разработать другие модели

4. Между 1980-ми и 1990-ми годами были предложены более сложные модели, вводящие понятие репарации повреждений ДНК, но не приводящие к формулам, более простым, чем модель LQ, и не дающие четкого механистического объяснения вызванных излучением явлениям.

5. Начиная с 1990-х годов радиобиологи начали сосредотачиваться на описании кинетики репарации повреждений ДНК, связанной с выживанием клеток.

1.6.1 Таргетная теория и её главные модели

Таргетная теория опирается на два основных принципа:

- 1) ИИ рассматривается как последовательность случайных «снарядов»;
- 2) компоненты клетки рассматриваются как мишени, бомбардируемые этими «снарядами».

В результате первых экспериментов в этой области были получены три важных замечания относительно бомбардирующих частиц и мишеней.

1. Функция плотности вероятности, которая систематически применялась для описания попаданий в чувствительные клеточные мишени, была законом Пуассона.

2. Природа чувствительных клеток – мишеней – не была согласованной: мишенями могут быть субпопуляции определенных клеток или некоторая часть ядра.

3. Выживаемость облученных клеток рассматривалась как результат отсутствия попаданий в чувствительные области клеток [8].

1.6.1.1 Базовые баллистические модели

- Модель «одна мишень – одно попадание»

Это наипростейшее применение таргетной теории. Эта модель имеет ряд преимуществ и по своей простоте и по своей надежности в описании

процессов выживаемости клеток. Она основана на гипотезе, что одного удара в чувствительную часть достаточно, чтобы убить клетку. Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 1.

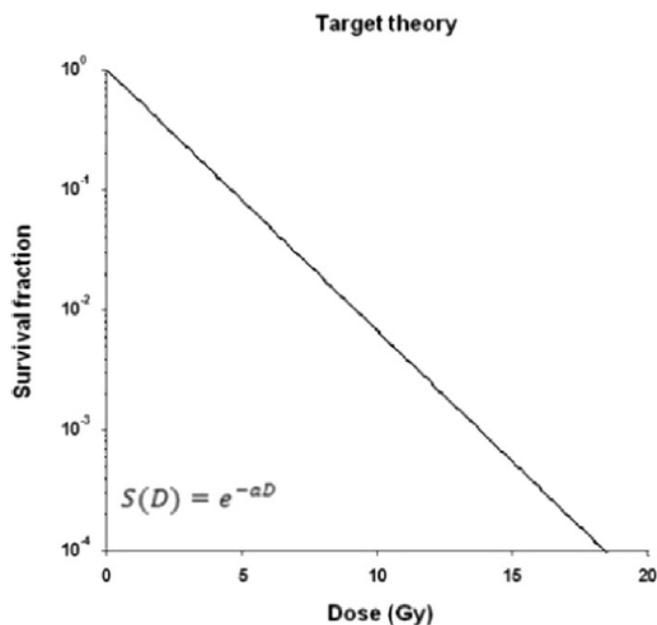


Рисунок 1 – Иллюстрация модели «одна мишень – одно попадание» [8]

- Модель «одно попадание – несколько мишеней»

Эта модель основана на предположении, что одна клетка содержит n идентичных мишеней. Инактивация одной мишени считалась сублетальным событием, и накопление этих сублетальных событий приводит к гибели клеток.

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 2.

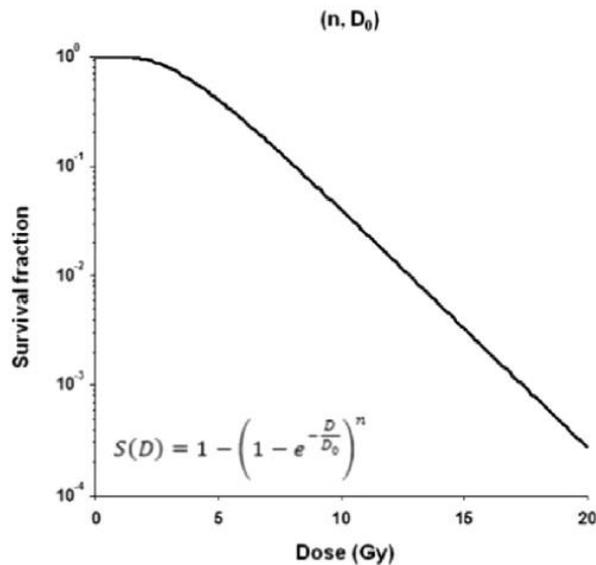


Рисунок 2 – Иллюстрация модели «одно попадание – несколько мишеней»

[8]

Подавляющее большинство кривых выживаемости клеток, являющимися разновидностями клеток млекопитающих, не подчиняются ни одноударной модели, ни моделям (n, D₀) (за исключением гиперрадиочувствительных клеток, которые демонстрируют экспоненциальную зависимость). Все остальные случаи клеток млекопитающих характеризуются плечом и начальной частью, которая не равна нулю. Таким образом, модели данного типа лишь приблизительно описывают экспериментальные данные.

1.6.1.2 LQ-модели

- LQ-модель

В 1972 году Келлерер и Росси ввели линейно-квадратичную модель, в которой смертельное событие должно быть вызвано одним попаданием (линейная составляющая αD) или двумя попаданиями (квадратичная составляющая βD^2).

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 3

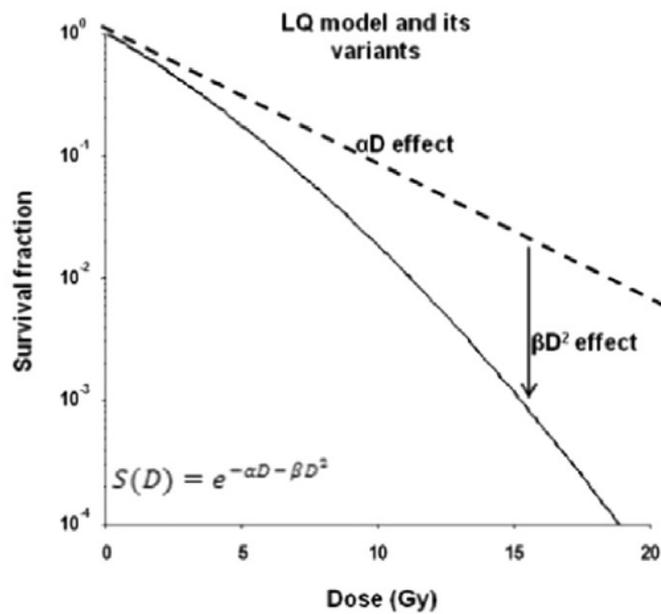


Рисунок 3 – Иллюстрация LQ-модели [8]

- Вариант LQ-модели для описания высокодозных эффектов

LQ модель достоверно описывает кривые выживаемости при биологически значимых дозах, тогда как точность описания выживаемости в области малых доз или подводимых частями была ограничена.

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 4.

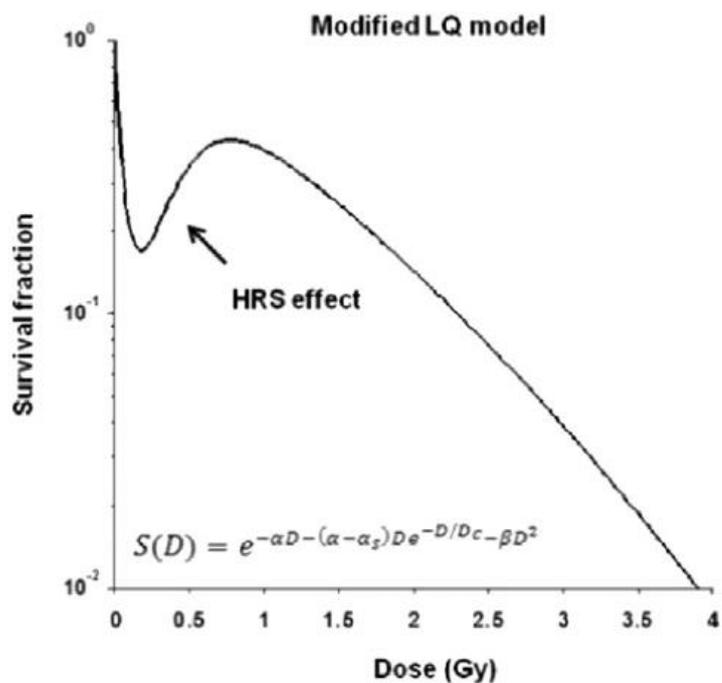


Рисунок 4 – Иллюстрация LQ-модели для описания высокодозных эффектов [8]

1.6.2 Модели, основанные на сублетальных гипотезах

- Модель восстановления/невосстановления [8]

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 5.

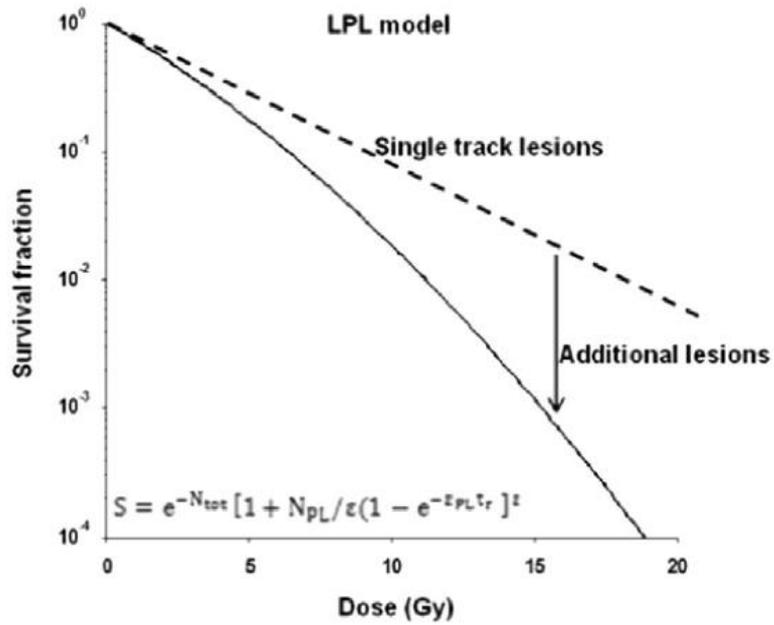


Рисунок 5 – Иллюстрация модели восстановления/невосстановления [8]

- Модель летальных и возможно-летальных повреждений [8]

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 6.

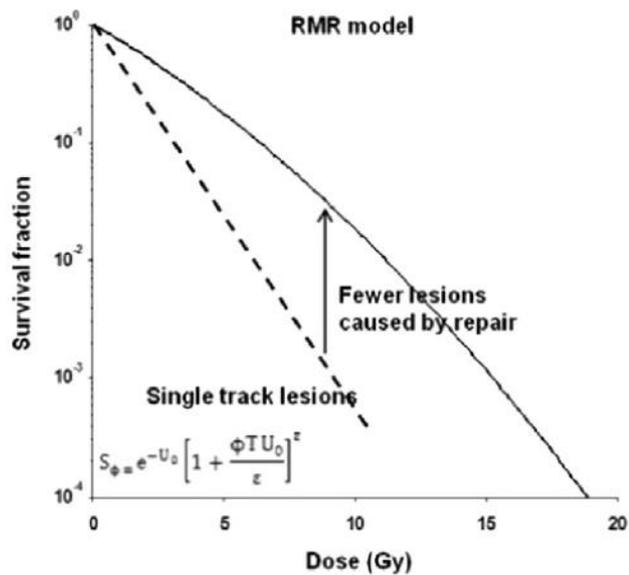


Рисунок 6 – Иллюстрация моделивозможно летальных повреждений [8]

- Модель восстановительной насыщаемости

Зависимость «Доза-эффект» согласно данной модели представлена на рисунке 7.

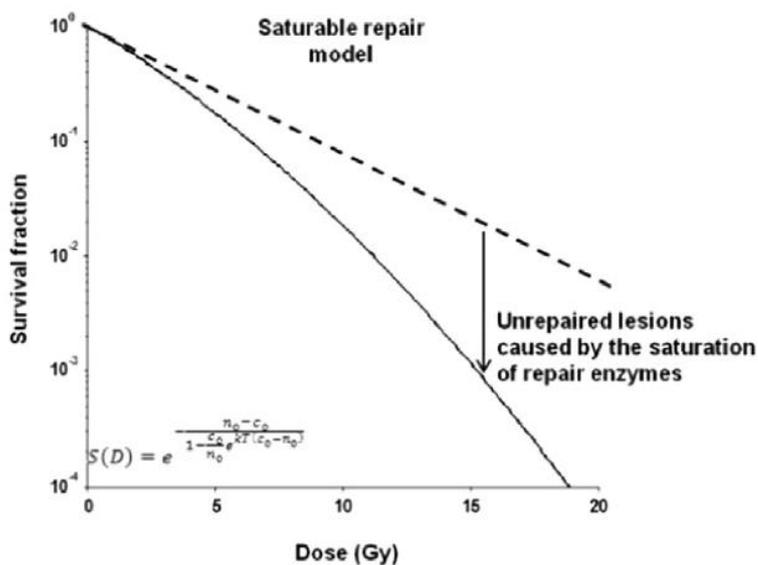


Рисунок 7 – Иллюстрация модели восстановительной насыщаемости [8]

1.6.3 Современные подходы

Таргетная теория не достаточно точно описывает радиочувствительность млекопитающих и должна быть пересмотрена [8].

Модели, вытекающие из таргетной теории, как правило, основаны на следующих принципах.

1. Попадания подчиняются распределению Пуассона.
2. Выживаемость клеток обусловлена отсутствием попаданий в чувствительные участки облученных клеток.
3. Поскольку все количество попаданий пропорционально дозе и поскольку все попадания смертельны, выживание является простой экспоненциальной функцией дозы.

Гипотезы 2 и 3 должны быть пересмотрены для клеток млекопитающих: клетки, вероятно, выживают, потому что все повреждения ДНК восстанавливаются, а не потому, что клетки не повреждаются ИИ.

Все рассмотренные выше модели не описывают специфику воздействия ИИ в малых дозах, и, следовательно, имеется необходимость в моделях, учитывающих эту специфику.

1.7 Гормезис и радиационно-индуцированный адаптивный ответ

К настоящему времени опубликовано много работ [9, 10] о том, что малые дозы ионизирующего излучения оказывают положительный эффект и даже необходимы для нормальной жизнедеятельности живых систем. T.D. Luskey назвал этот эффект радиационным гормезисом (от греческого слова *hormo* – гормон, стимулятор, и *Genesis* – происхождение; буквально это определение можно перевести как «вызывающий стимуляцию»)[9].

Термин «радиационный гормезис» объединяет благоприятные ответные реакции организма на облучение в малых дозах ИИ.

Интересно, что радиационный гормезис характеризуется такими же параметрами графика, что и химический гормезис и аналогичен стадии адаптации стрессовой реакции. Таким образом, радиационный гормезис можно отнести к неспецифической защитной реакции организма[5].

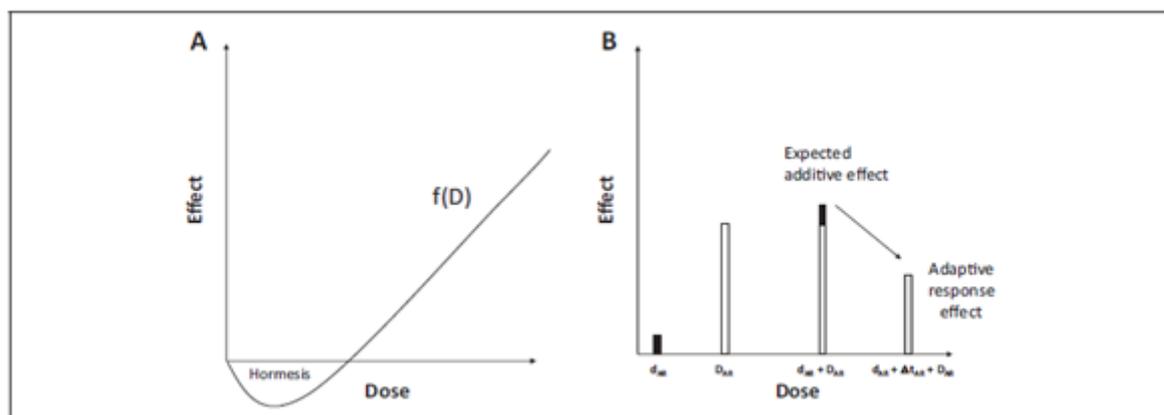
Ещё одним положительным проявлением воздействия малых доз ИИ является радиационно-индуцированный адаптивный ответ (РАО).

РАО – это реакция биологических объектов, которая заключается в том, что после действия излучения в малых, адаптирующих дозах при повторном облучении через определенный интервал времени в больших повреждающих дозах радиобиологический эффект от повреждающей дозы понижается.

Эффект гормезиса и РАО не обязательно возникают в одном и том же диапазоне доз: адаптирующая доза обычно эквивалентна нескольким Гр, в то

время как эффект гормезиса обычно наблюдается при гораздо более низких дозах, варьирующихся от мГр до сГр [11].

Иллюстрация данных процессов представлена на рисунке 8.



А – Эффект гормезиса

В – Радиационно-индуцированный адаптивный ответ

Рисунок 8 – Иллюстрация эффекта гормезиса и радиационно-индуцированного адаптивного ответа

1.8 Рассмотрение теорий, описывающих механизмы адаптивного ответа

При рассмотрении механизмов РАО некоторые авторы [12] полагают, что в результате облучения в малых дозах происходит активация и индукция синтеза репаративных ферментов, функционирование которых обеспечивает устойчивость объекта к последующему воздействию высоких доз.

Другой моделью является модель М.Полякова и Л.Е.Фининдегана. По мнению этих авторов при воздействии ИИ наблюдается повреждение ДНК с немедленным запуском репаративных систем, и в то же время возникает сигнал о стимуляции физиологических процессов, нейтрализующих повреждения ДНК [7].

В статье [13] было обнаружено, что РАО лимфоцитов крови человека является совокупностью нескольких процессов. Это активация репарации, а также популяционные процессы, выражающиеся в изменении доли неповрежденных клеток и, возможно, их апоптотическая гибель.

Авторы [14] подробно рассматривают как молекулярные, так и клеточные процессы, протекающие в облученных клетках, при этом они также выделяют 3 системы клеточной защиты:

- защита от активных форм кислорода антиоксидантами и детоксицирующими ферментами;
- репарация ДНК, особенно при двунитевом разрыве, вследствие индукции репарационных ферментов;
- элиминация поврежденных клеток иммунными защитными механизмами и апоптозом.

Иллюстрация данного подхода представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Механизмы адаптивного ответа

Уровень	Механизм/феномен
Молекулярный	Повышение антиоксидантной функции - Индукция антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза . - Повышение уровня глутатиона и тиоредоксина
	Увеличение репаративных способностей - Увеличение количества ферментов репарации ДНК - Активация Поли(АДФ-рибозы) полимеразы
	Индукция синтеза белка - Экспрессия гена опухолевого супрессора p53 - Индукция белков стресса, таких как HSP70
	Интенсификация структуры и функции клеточных мембран - Снижение уровня перекисей липидов - Увеличение текучести мембран - Повышение активности Na ⁺ / K ⁺ - АТФазы

Продолжение таблицы 1

Уровень	Механизм/феномен
Клеточный	Индукция адаптивного ответа - Увеличение клеточной пролиферации - Уменьшение хромосомных aberrаций
	Повышение иммунологической активности - Увеличение бласттрансформации и продукции цитокинов ; - Элиминация поврежденных клеток путем апоптоза - Апоптоз лимфоцитов
	Радиозащитные эффекты посторонних лиц - Передача сигнальных молекул через зазорный переход - Взаимодействие факторов, выделяемых из облученных клеток; - Ассоциация протеинкиназы с, фосфолипазы с, оксида азота, активных форм кислорода и др.
	Эндокринная реакция - Высвобождение глюкокортикоидов

Способность к репарации ДНК повышается при облучении за счет индукции ферментов репарации ДНК. При воздействии малых доз повышенная способность к репарации ДНК может превышать повреждения ДНК, вызванные ИИ. Ферменты не только восстанавливают вызванное ИИ повреждение ДНК, но и восстанавливают повреждения ДНК, вызванные другими токсинами.

Авторы [15] рассматривают два аспекта возникновения адаптивного ответа.

Они объясняют возможную роль апоптоза, как защитного и благотворного явления, поскольку он может специфически убивать нестабильные клетки и снижать риск развития рака. При этом они подчеркивают, что с такой гипотезой следует быть осторожным, поскольку апоптоз - это очень специфический путь гибели клеток, сильно зависящий от статуса p53 и типа клеток.

Вторым путем является окислительный стресс. В устойчивых к ИИ клетках такое количество повреждений ДНК не может существенно повлиять на выживаемость клеток или геномную нестабильность. В отличие от этого, в

радиочувствительных клетках окислительный стресс, вызванный спонтанной нестабильностью генома, вызывает небольшое, но значительное повреждение ДНК, большее, чем наблюдаемое в радиорезистентных клетках. Таким образом, только в радиочувствительных клетках спонтанный окислительный стресс, добавленный к вызванному адаптирующей дозой, может привести к значительному повреждению ДНК.

По мнению Бондарчука И.А. [16] важнейшим аспектом в интерпретации адаптивного ответа является первичное усиление процессов перекисного окисления липидов в мембране с последующей активацией рецепторов факторов роста. Они вызывают включение процессов, в которых участвуют компоненты передачи митогенного сигнала, которая начинается с прикрепления митогенов к активированным рецепторам и проявляется последующей каскадной активацией различных белков. Так же автор подчеркивает, что для реализации РАО необходим кислород, поскольку при облучении клеток млекопитающих адаптирующей дозой в условиях гипоксии, РАО не наблюдается.

Инициация РАО возникает за счет мембранных механизмов, а реализуется этот ответ за счет каскадов регуляторных реакций, активирующих транскрипционные факторы c-Jun/AP-1 и p53. С их помощью в результате процессов апоптоза обеспечивается элиминация наиболее радиочувствительной части популяции [16].

Спитковским Д.М. была сформулирована селекционная гипотеза, согласно которой РАО возникает за счет включения механизмов апоптоза уже при низких уровнях нерепарируемых повреждений [5].

Авторы работы [15] сообщают, что адаптирующая доза в 90% случаев находится в диапазоне от 0,001 Гр до 0,5 Гр, а РАО развивается по сценарию «адаптирующая доза + интервал времени + повреждающая доза».

Интегральным критерием РАО является изменение выживаемости после повторного действия ИИ. Особенностями РАО являются многократные различия в величинах адаптирующей и повреждающей доз облучения и

фиксированные интервалы времени между воздействиями. Обязательное соблюдение интервала времени между облучениями указывает, что переключение клеток на адаптивный ответ требует сравнительно продолжительной перестройки радиорезистентности, которая может сохраняться в течение многих клеточных циклов. Например, при возникновении РАО на клеточном уровне достаточно 4-6 часов, а сохраняться РАО может до нескольких месяцев [5].

Показано, что РАО наблюдается не только при однократных воздействиях адаптирующей дозой, но и при хронических [17]. Таким образом, для прогнозирования эффекта РАО необходимо учитывать длительность воздействия или мощность дозы излучения.

Представим упрощенно схему возникновения РАО на рисунке 9.

Пусковой механизм РАО – Активация рецепторов факторов роста

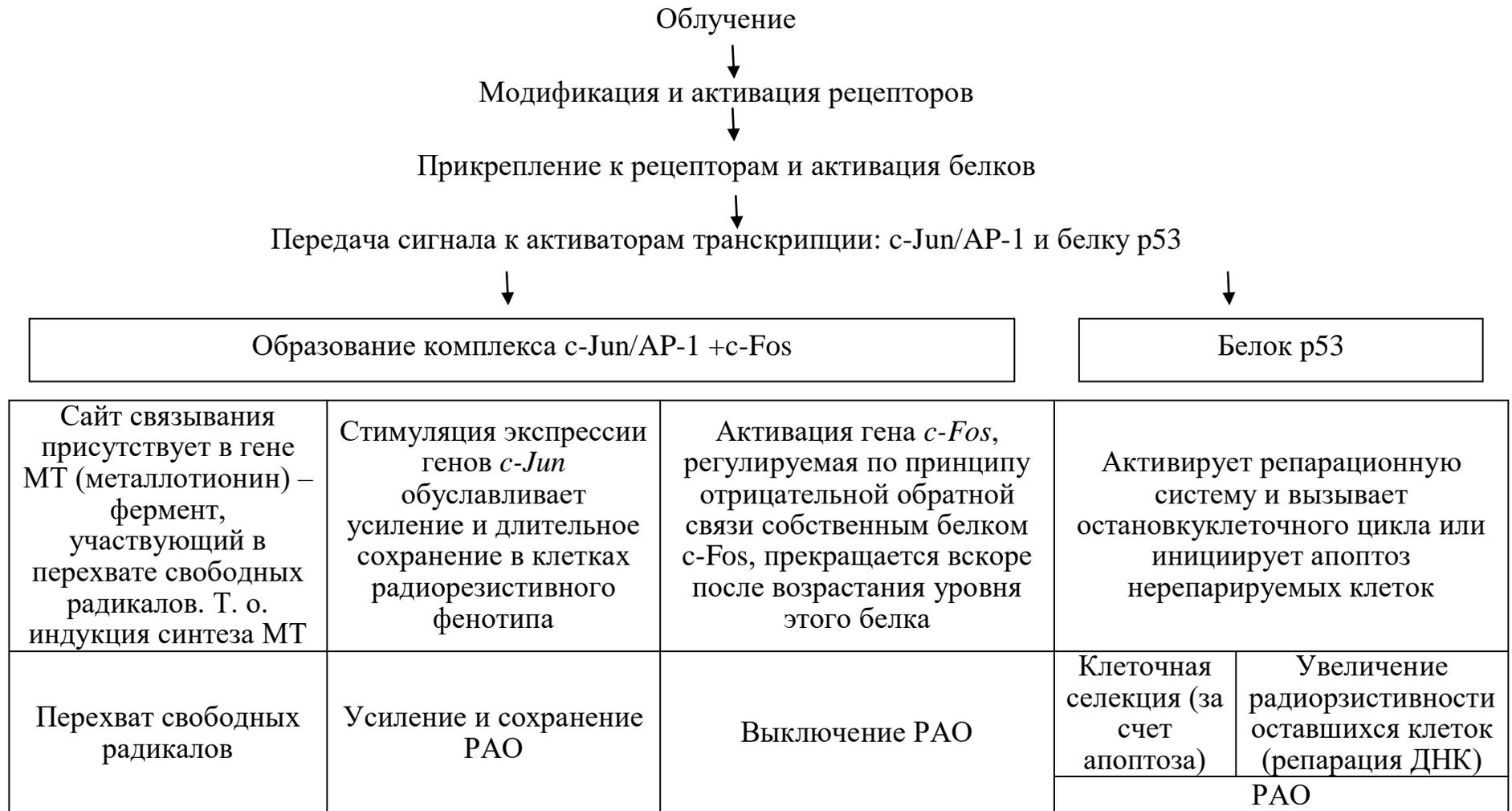


Рисунок 9 – Упрощенная схема РАО

AP-1 транскрипционный фактор: общие сведения

Транскрипционный фактор AP-1 (активирующий протеин-1) состоит из белков Fos- и Jun-семейств, был изначально открыт в клетках млекопитающих по способности специфически связываться с энхансером обезьяньего вируса SV40 и промоторами позвоночных, которые содержат AP-1-сайт.

Общей структурой Fos- и Jun-белков является область, отвечающая за связывание с ДНК и димеризацию

Jun-белки (c-Jun, JunB и JunD) образуют димеры друг с другом и в димеризованной форме связываются с различной афинностью с AP-1-сайтом в зависимости от полипептидного состава димера. Fos-белки (c-Fos, FosB, Fra-1 и Fra-2) не могут димеризоваться друг с другом, но образуют гетеродимеры с белками Jun-семейства, значительно повышая эффективность связывания с ДНК и транскрипционную активность последних. Таким образом, Fos-белки являются модуляторами транскрипционной активности AP-1 фактора

p53(белок p53) – это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген *TP53* является антионкогеном. Мутации гена *TP53* обнаруживаются в клетках около 50 % раковых опухолей.

Ген человека, кодирующий белок p53, расположен на хромосоме 17 (17p13.1).

Локализация гена в геноме других организмов:

- Мышь — хромосома 11
- Крыса — хромосома 10
- Собака — хромосома 5
- Свинья — хромосома 12

За некоторыми исключениями, в тканях высших млекопитающих белковый продукт гена p53 практически не детектируется, однако может активироваться в ходе клеточных стрессов различного происхождения. Приводящие к аминокислотным заменам мутации в гене p53 находят более чем в 50% всех случаев злокачественных опухолей. Эти мутации нарушают конформационную структуру p53, в результате чего он становится неспособным к трансактивации p53-зависимых генов, что ведет к нарушению репарации ДНК и появлению генетически нестабильных клеток с "выключенным" механизмом p53-индуцированного апоптоза [5,18].

1.9 Модели РАО. Модель Чернавского Д.С.

С одной стороны ИИ в малых дозах имеет стимулирующее действие, с другой, известно, что при превышении некоторой величины дозы – порога ингибирования – ИИ вызывает процессы торможения метаболизма. Таким образом, можно сказать, о существовании двух типов реакций клеток на внешние воздействия.

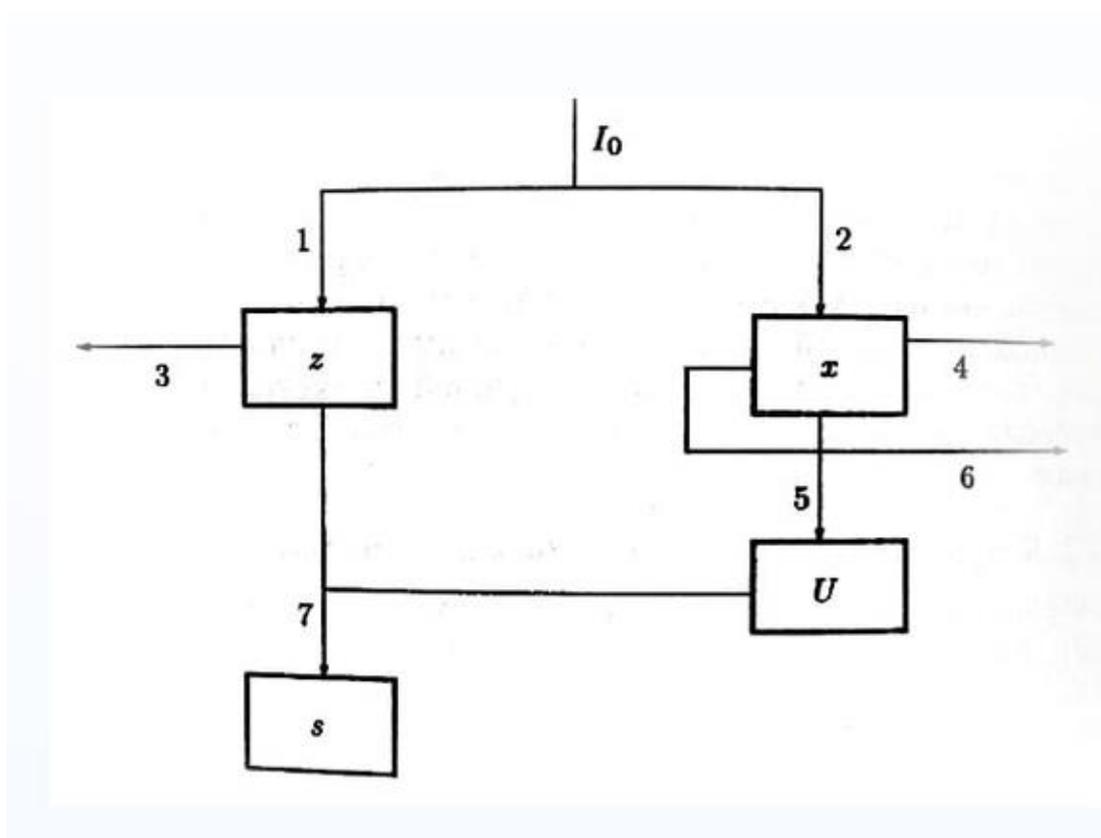
Чернавский Д. С. предложил феноменологическую модель для описания воздействия ИИ на биологический объект. Он предлагает учитывать повреждения генетического аппарата, вызванные воздействием ИИ, а также ускорение и замедление метаболизма клеток, и репарацию первичных повреждений.

В модели Чернавского были сформулированы исходные положения, согласно которым реализация радиационных повреждений зависит от повреждений ДНК и скорости процессов транскрипции и редупликации. Также одним из параметров модели является фактор X, который при действии ИИ в малых дозах ускоряет процессы метаболизма, а в больших замедляет. Третье положение, вводимое авторами, учитывает два механизма репарации, один из которых зависит от метаболизма, а другой не зависит, и оба имеют свойство насыщения при некоторых параметрах.

Данная модель достаточно точно описывает экспериментальные данные, при этом не учитывает межклеточные взаимодействия, следовательно, может использоваться только для описания одного из процессов.

Достоинством данной модели является тот факт, что она позволяет предсказывать различный характер кривых «доза-эффект», при различных мощностях источника и при различных дозах. При этом модель довольно сложно использовать в практических целях, ввиду большого количества параметров и сложность их экспериментального определения [19].

Иллюстрация модели Чернавского Д.С. в виде блок-схемы приведена на рисунке 10.



z – радиационные повреждения

x – активный фактор (например, промежуточные продукты распада)

U – интенсивность метаблизма

s – доля выживших клеток

Рисунок 10 – Блок-схема модели Чернавского Д.С.

2 Используемые объекты и методы

Работа выполнена кафедрой Экспериментальной физики Физико-технологического института на базе Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина совместно с ГАУЗ Свердловской области «Свердловский областной онкологический диспансер» и федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт электрофизики Уральского отделения Российской академии наук».

Объектами экспериментальных исследований служили образцы дрожжей культуры штамма *Saccharomyces cerevisiae*, а также инкубационные куриные яйца. Для проведения исследований использовались микробиологические и биохимические методы анализа.

Для воздействия на образцы ИИ использовалась установка рентгенотерапии Xstrahl 300, линейный ускоритель электронов модели УЭЛР–10–10С, бочка с источником ^{241}Am и ^{137}Cs и ускоритель УРТ-05.

2.1 Источники ионизирующего излучения

2.1.1 Аппарат рентгенотерапии Xstrahl 300

Аппарат для рентгенотерапии Xstrahl 300 (Великобритания) обладает следующими основными техническими характеристиками

- напряжение на рентгеновской трубке 40 — 300 кВ
- ток трубки от 0 — 30 мА
- максимальная выходная мощность излучения 3 кВт
- мощность дозы в патологическом очаге до 300 сГр/мин.

Аппарат для рентгенотерапии Xstrahl 300 является самым мощным из всей линейки Xstrahl, сочетает в себе возможности близкофокусной и ортовольтной терапии. Успешно применяется для лечения поверхностного рака кожи, доброкачественных кожных заболеваний, саркомы Капоши,

различных дегенеративных, воспалительных, гипертрофических заболеваний кожи, а также для паллиативного лечения костных метастазов. Стандартный набор фильтров представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Стандартный набор фильтров [20]

Фильтр	КВ	СПО (мм)
1	60	1,5 Al
2	80	2,5 Al
3	100	3,0 Al
4	120	5,0 Al
5	150	6,0 Al
6	180	0,5 Cu
7	200	1,0 Cu
8	250	2,0 Cu
9	300	3,0 Cu

Стандартный набор аппликаторов для Xstrahl 300 [20]

Открытые аппликаторы КФР 30 см:

- диаметр 3см;
- диаметр 4см;
- диаметр 5см;
- диаметр 10см.

Закрытые аппликаторы КФР 50 см:

- диаметр 4х4 см;
- диаметр 6х6 см;
- диаметр 8х8 см;
- диаметр 10х10 см;
- диаметр 15х15 см;
- диаметр 20х20 см.

Аппарат для рентгенотерапии Xstrahl 300 состоит из рентгеновской трубки непрерывного действия MXR с энергией фотонов 200 кэВ, которая располагается над кушеткой пациента. На выходное окно могут быть

установлены аппликаторы и фильтры для фокусировки ИИ и выделения фотонов в выбранном диапазоне энергий. Пример установки представлен на рисунке 11.



Рисунок 11 – Пример установки Xstrahl 300

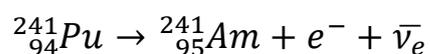
Установка для рентгенотерапии Xstrahl 300 находится в отделении радиологии Свердловского областного онкологического диспансера.

Система включает в себя сам аппарат, программное обеспечение и рабочее место врача (оператора), где задается время облучения пациента и параметры для установленных фильтров и аппликаторов

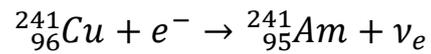
2.1.2 Америций-241

Америций-241 является дочерним продуктом:

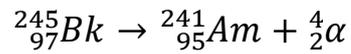
- β^- -распада изотопа плутония-241



- электронного захвата ядром кюрия-241



- α -распада берклия-245



Америций-241 имеет период полураспада 432,8 года. При распаде америций-241 испускает альфа-частицы и мягкое (60 кэВ) гамма-излучение. [22, 23]

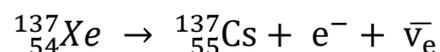
Внешний вид бочки с источником Америций-241 представлен на рисунке 12.



Рисунок 12 – Бочка с источником Америций-241

2.1.3 Цезий-137

^{137}Cs является дочерним продуктом β^- -распада нуклида ^{137}Xe (период полураспада составляет 3,8 мин):



^{137}Cs претерпевает бета-распад (период полураспада 30,17 лет), в результате которого образуется стабильный изотоп бария ^{137}Ba :



2.1.4 Линейный ускоритель электронов модели УЭЛР–10–10С

На кафедре экспериментальной физики ФТИ УрФУ установлен линейный ускоритель электронов модели УЭЛР–10–10С (изготовитель ООО «НПП «КОРАД»). Он является источником электронов. Управление ускорителем, установка режима облучения и параметров облучения осуществляется дистанционно с пульта, расположенного в комнате управления [35].



Рисунок 13 – Установка центра радиационной стерилизации УрФУ

2.2 Биологический объект и методы исследования

2.2.1 Биологические объекты

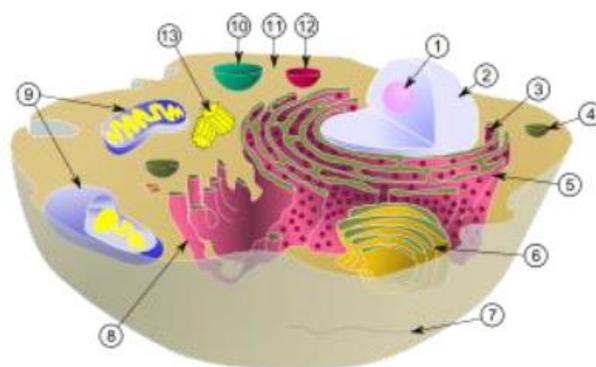
В данной работе в качестве объекта исследования были использованы винные дрожжи штамма *Saccharomyces cerevisiae*, относящиеся к классу грибы [24].

Дрожжи представляют собой одноклеточные организмы, которые размножаются почкованием. При этом дочерняя клетка возникает в виде маленькой почки, которая растет в течение большей части клеточного цикла. По достижении почкой размера материнской клетки между ними появляется перегородка сложного состава.

Время, за которое клетка образует себе подобную, составляет клеточный цикл (КЦ). Он включает в себя четыре основных фазы, длительность которых примерно одинакова.

Вообще, биосинтетические процессы, протекающие в дрожжевой клетке, достаточно легко поддаются регуляции. Поэтому, зная зависимость между конкретными условиями окружающей среды и теми или иными сторонами жизнедеятельности дрожжевой культуры, можно целенаправленно изменять ее рост, развитие и обмен веществ. Создание и поддержание определенных условий культивирования дрожжей позволяет управлять ходом ферментационного процесса [25].

Строение дрожжевой клетки представлено на рисунке 14.



1 – ядрышко; 2 – ядро; 3 – рибосома (маленькие точки); 4 – везикула;
5 – шероховатый эндоплазматический ретикулум (ER); 6 – аппарат Гольджи;
7 – цитоскелет; 8 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 9 – митохондрия;
10 – вакуоль; 11 – цитоплазма; 12 – лизосома; 13 – центриоль и centrosома

Рисунок 14 – Строение дрожжевой клетки [25]

2.2.2 Вспомогательные материалы

Культивирование и выращивание колоний осуществлялось на чашках Петри. Чашка Петри – это прозрачная стеклянная посуда в виде цилиндра невысокого размера. Он закрывается крышкой таких же размеров.

Чашка Петри обычно изготавливается из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол). Наиболее часто используемые

варианты имеют диаметр порядка 50—100 мм и высоту около 15 мм. Микроорганизмы, получаемые в таких сосудах, хорошо видны. [26, 27].

Внешний вид чашек Петри представлен на рисунке 15.



Рисунок 15 – Внешний вид чашки Петри

В качестве питательной среды в работе использовался агар. Агар – это смесь полисахаридов агарозы и агаропектина, получаемая путём экстрагирования из красных и бурых водорослей образующая в водных растворах плотный студень.

Молекулы агар длинные и именно этим обусловлена высокая прочность на разрыв сделанного из него студня. Агар не растворим в холодной воде. Он полностью растворяется только при температурах от 95 до 100 °С. При охлаждении до температур 35—40°С он становится гелем, который является термообратимым.

Разведение культуры и высаживание на питательную среду осуществлялось в ламинарном боксе.

Конструктивно ламинарные боксы представляет собой лабораторный шкаф с принудительной вентиляцией, обеспечивающей прокачку чистого воздуха через специальные фильтры, а также специальными лампами и ультрафиолетовым освещением. После обезвреживания и очистки воздух

поступает внутрь шкафа равномерным ламинарным потоком, который защищает лабораторный продукт от контакта с окружающей средой.

В зависимости от типа распределения воздуха ламинарный бокс может быть с вертикальным или горизонтальным воздушным потоком [28].

В зависимости от требуемого уровня чистоты он комплектуется фильтрами, обшивкой и компрессорами, может иметь повышенную защиту от химических веществ.

Пример ламинарного бокса приведен на рисунке 16.



Рисунок 16 – Пример ламинарного бокса

Для поддержания температуры использовался термостат ТС-1/80 СПУ. Термостат предназначен для получения и поддержания внутри рабочей камеры стабильной температуры, необходимой для проведения бактериологических и серологических исследований в клинко-диагностических и санитарно-бактериологических службах институтов, больниц, поликлиниках и других учреждениях здравоохранения. Внешний вид термостата ТС-1/80 СПУ представлен на рисунке 17.



Рисунок 17 – Внешний вид термостата ТС-1/80 СПУ[29]

Основные технические характеристики термостата ТС-1/80 СПУ приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Основные технические характеристики термостата

Наименование параметра	Значение параметра
Максимальный температурный диапазон термостатирования, °С	от $T_{\text{оф}}+5$ до +60
Максимальное отклонение средней температуры любой точки рабочего объема от заданной при установившемся тепловом режиме, °С, не более: до +45° включительно от +45° до +60°	от -1 до +1 от -1 до +2
Максимальное отклонение температуры в любой точке рабочей камеры от средней, °С	$\pm 0,4$
Время установления рабочего режима при максимальной температуре в рабочей камере, мин, не более	120
Время непрерывной работы термостата в автоматическом режиме, ч., не менее	500
Потребляемая мощность термостата, Вт, не более	250

Продолжение таблицы 3

Наименование параметра	Значение параметра
Размеры рабочей камеры, мм, не менее:	
- длина	396
- ширина (глубина до дверцы)	393
- высота	496
Габаритные размеры термостата, мм, не более:	
- длина	525
- ширина	521
- высота	721
Масса термостата, кг, не более:	
- без принадлежностей	36
- с принадлежностями и ЗИП	40
Средний срок службы, лет, не менее	10

2.2.3 Метод колониеобразующего анализа

В работе использовался метод колониеобразующего анализа. Бактериологический посев (культуральное или микробиологическое исследование) – лабораторное исследование, при котором биоматериал, помещают в благоприятную для размножения бактерий среду при определенных температурных параметрах с последующей оценкой результатов.

Преимуществом культурального метода является относительно высокая специфичность исследования. Недостатками являются длительность исследования, высокие требования к забору материала, повышенные требования к квалификации персонала лабораторий, что ведет к значительному удорожанию стоимости исследования [30].

В основном, перенос материала на среду осуществляется с помощью приспособлений, применяемых еще в 19 веке Луи Пастером:

- бактериальной петлей;
- пастеровской пипеткой;
- стеклянной палочкой.

Современная микробиология использует следующие общие критерии для определения той или иной бактериальной совокупности, оценки ее структуры.

1. Величина. Крупные культуры могут иметь величину 6 мм и более, а мелкие – меньше, чем 1 мм.
2. Форма. Как правило, различают правильную, то есть круглую, форму, эллипсоидную, розеточную, ризоидную.
3. Окраска. Разные их виды могут быть белыми либо иметь всевозможную окраску.
4. Прозрачность.
5. Рельефность. Различают плоские, плосковыпуклые, куполообразные с возвышенной серединкой, с вдавлением формы.
6. Поверхность. Она может быть гладкой, с морщинками, сухой, слизистой, хрупкой, мучнистой.

Колониеобразующая единица (КОЕ) – одна живая микробная клетка, из которой вырастает колония. По другим определениям – видимая колония микроорганизмов, выросшая из одной клетки или из группы клеток. Определение КОЕ теоретически позволяет определить концентрацию (количество) микроорганизмов в единице объема.

Подсчет КОЕ проводится несколькими методами:

- Метод серийный разведений

Из транспортной среды, содержащей биоматериал берется 1 мл, который последовательно разбавляется в 10 раз с посевом в пронумерованные пробирки с питательной средой. Пробирка, в которой прекращается рост микроорганизмов, считается максимальной границей количества микроорганизмов в пробе.

Этот же метод серийных разведений применяется для определения чувствительности к антибиотикам (определяется минимальная ингибирующая концентрация).

- **Метод подсчета колоний под микроскопом**

Метод является ориентировочным и заключается в подсчете колоний под микроскопом под увеличение 10х в поле зрения с последующей интерпретацией по сравнительной таблице [31].

3 Экспериментальная оценка действия малых доз на биологические объекты

3.1 Закономерности воздействия ИИ на БО

В работах [32, 33] были проведены эксперименты с дрожжевой культурой *Saccharomyces cerevisiae*. В экспериментах были изучены закономерности выживаемости клеток в зависимости от дозы ИИ. Закономерности выживаемости обычно описываются кривыми «доза-эффект».

Пример такой кривой приведен на рисунке 18.

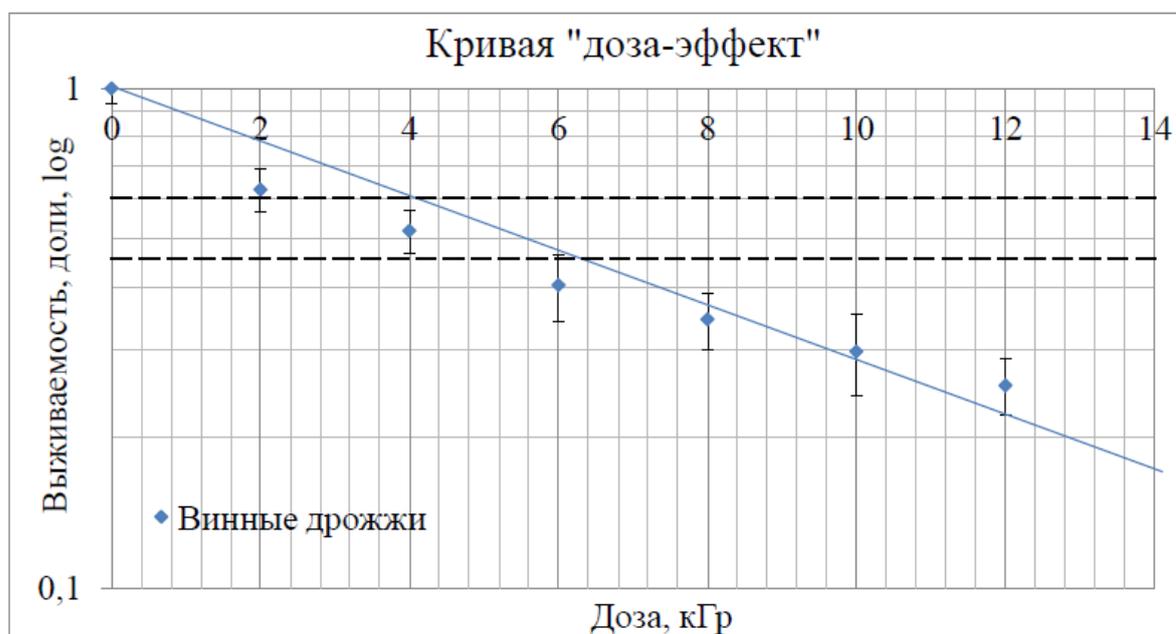


Рисунок 18 – Кривая «Доза-эффект»

Вертикальная ось данных кривых обычно представлена в логарифмическом масштабе для удобства зрительного восприятия.

Приведенная на рисунке 16 кривая «доза-эффект» позволяет экспериментально определить значения показателей LD50 и LD37.

3.2 Моделирование РАО

Поскольку существующие на сегодняшний день и рассмотренные в п. 1.6 модели не описывают специфику воздействия ИИ в малых дозах, имеется необходимость в моделях, учитывающих эту специфику.

Перед началом математического моделирования процессов РАО в биологических объектах необходимо сформулировать исходные положения. Принятые для моделирования положения:

1. Изменение радиорезистивности биологических объектов при РАО можно представить как изменение фактора изменения дозы (ФИД).

ФИД – это отношение равноэффективных доз в образце с предварительной адаптивной дозой и в образце без предварительного облучения, вызывающих падение уровня выживаемости на 50%.

При этом ФИД, как и РАО, зависит от множества переменных, среди которых: интервал времени между облучениями, мощность адаптирующей дозы, тип излучения. В работе было предложено описать РАО функцией ФИД от интервала времени между адаптирующей и повреждающей дозами, и мы пренебрегаем остальными параметрами.

2. В отсутствие адаптирующей дозы РАО нет, и биологический ответ не изменяется. Поэтому ФИД, равный единице, принимаем за отсутствие РАО. Соответственно, в начальный момент времени ФИД также равен единице.

3. В предложенной математической модели все процессы описываются параметрами, отвечающим за скорость возникновения и скорость затухания РАО, а также длительность сохранения. Предложенная модель не описывает молекулярные механизмы протекания РАО.

Моделирование осуществлялось в программном пакете «ORIGIN». В качестве исходной функции для математического моделирования РАО была выбрана асимметричная двойная сигмоидальная функция. Уравнение асимметричной двойной сигмоидальной функции:

$$y = y_0 + A \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{\frac{-(x-x_c + \frac{w1}{2})}{w2}}} \right) \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{-(x-x_c - \frac{w1}{2})}{w3}}} \right) \quad (1)$$

где y_0 – смещение относительно нуля;

A – амплитуда;

x_c – центр;

$w1$ – ширина на половине высоты;

$w2$ – дисперсия низкоэнергетической части кривой;

$w3$ – дисперсия высокоэнергетической части кривой.

Графически предложенная зависимость представлена на рисунке 19, а значения коэффициентов в таблице 4.

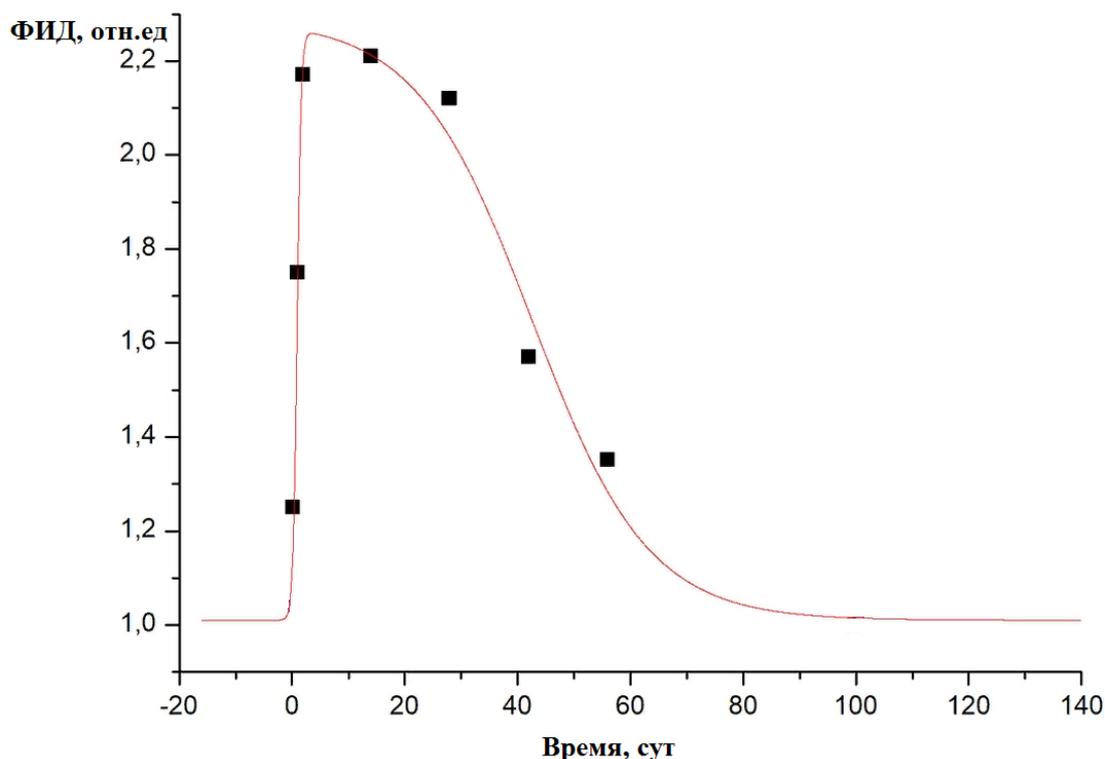


Рисунок 19 – Зависимость ФИД от интервала времени. Функция аппроксимации ФИД является асимметричной двойной сигмоидальной функцией

Таблица 4 – Значения полученных коэффициентов

	Коэффициент					
	y_0	A	x_c	w1	w2	w3
Значение	1,00	1,28	21,71	41,66	0,37	10,31

Полученная модель подтверждена экспериментально.

Дрожжевая культура *Saccharomyces cerevisiae* была облучена адаптирующей дозой 10 сГр источником ^{137}Cs . Мощность адаптирующей дозы составила 10^{-3} Гр/ч, облучение проводилось в течение 100 часов.

В ходе экспериментов был изучен адаптивный ответ на повторное облучение дрожжевых клеток ионизирующим излучением.

Подсчет клеток осуществлялся с использованием микроскопа «Микромед 3» и камеры Горяева [32].

Выживаемость в группах оценивалась по отношению к контрольным образцам, не получавшим повреждающее облучение, но находившимся в таких же условиях.

По результатам экспериментов был проведен расчет параметра ФИД (фактор изменения дозы).

Обработка результатов проводилась в программном пакете «MS Excel». При расчете погрешностей и определения статистической значимости результатов измерений использовалось распределение вероятностей Стьюдента. Погрешность рассчитывалась для доверительного интервала равного $p = 0,95$.

Обнаружено, что адаптивный ответ начинает проявляться при действии ИИ в повреждающей дозе 2-12 кГр через 5 часов после воздействия адаптирующей дозой и сохраняется в течение 6 недель.

Полученные в этих работах результаты, представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты исследования радиационно-индуцированной адаптации для разных интервалов времени между адаптирующим и повреждающим облучениями.

	Время между адаптирующим и повреждающим облучением, часов							
	2		5		24		48	
Группа	№1	№2	№1	№2	№1	№2	№1	№2
LD50, кГр	4,01	4,18	3,94	4,93	3,85	6,74	3,02	6,55
ФИД, от.ед,	1,04		1,25		1,75		2,17	
	Время между адаптирующим и повреждающим облучением, недель							
	2		4		6		8	
Группа	№1	№2	№1	№2	№1	№2	№1	№2
LD50, кГр	4,95	10,94	5,20	11,02	4,20	6,59	4,80	6,48
ФИД, от.ед,	2,21		2,12		1,57		1,35	

Из таблицы 5 можно видеть, что в эксперименте наблюдалась РАО. Пример полученной РАО приведен на рисунке 20.

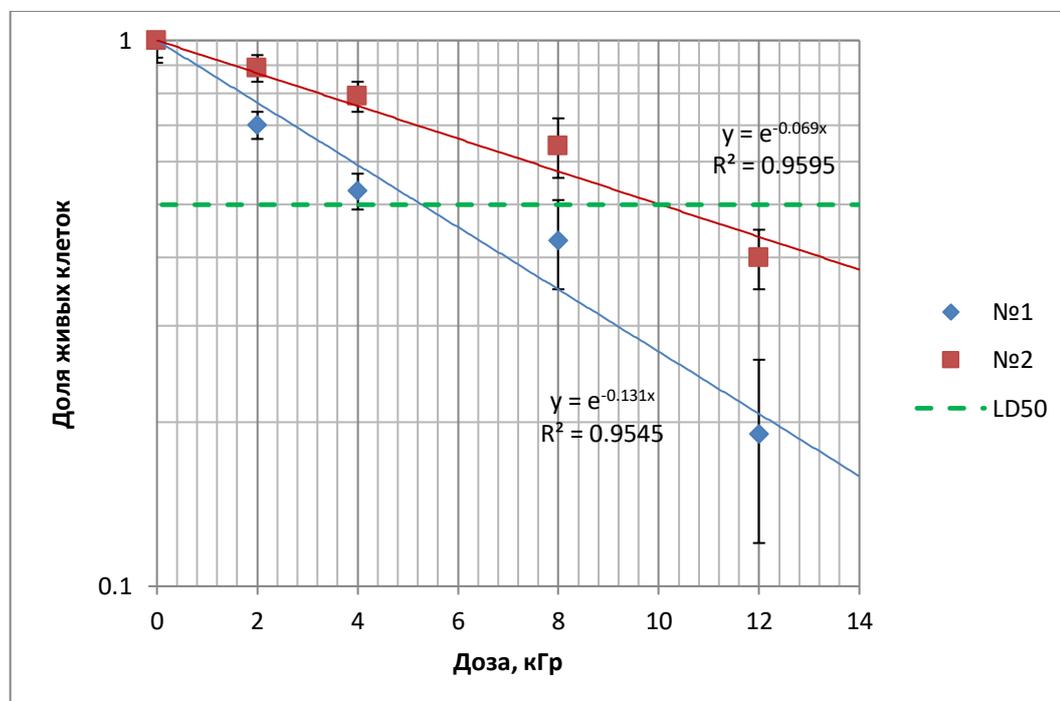


Рисунок 20 – РАО дрожжевых клеток с интервалом между адаптирующим и повреждающим облучением равным 4 недели

С учетом теорий, рассмотренных в п. 1.7 были сделаны предположения относительно интерпретации коэффициентов предложенной модели.

В условиях отсутствия адаптирующей дозы согласно положению 2 ФИД равен 1. Таким образом, смещение относительно нуля y_0 в априори равно 1.

A – параметр, учитывающий максимальное значение снижения биологического ответа – максимальное значение ФИД.

x_c – момент времени, при котором снижение биологического ответа максимально.

w_1 – параметр, учитывающий длительность сохранения адаптивного ответа к воздействию повреждающей дозой.

w_2 – параметр, учитывающий скорость реакции биологических объектов, на воздействие адаптирующей дозой.

w_3 – параметр, учитывающий скорость затухания адаптивного ответа к воздействию повреждающей дозой.

Таким образом, мы видим, что предложенная модель описывает полученные результаты РАО и позволяют делать предположения о параметре ФИД и, соответственно, РАО в любые промежутки времени от 5 часов до 56 суток после воздействия повреждающей дозой.

Предложенная интерпретация коэффициентов согласуется с литературными данными.

Дальнейший анализ модели позволит более детально рассмотреть биологические процессы, протекающие при РАО.

3.3 Стимулирующее действие малых доз

В работе [32] было определено наличие стимулирующего действия малых доз на дрожжевую культуру. Дрожжевая культура была облучена в дозе 10 сГр источником ИИ ^{137}Cs (мощность дозы составила 10^{-3} Гр/ч. Облучение проводилось в течение 100 часов).

Подсчет клеток осуществлялся в камере Горяева с помощью метода окрашивания [32]. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий, форменных элементов крови. Для того чтобы верно определить количество клеток в заданном объеме жидкости, необходимо исключить их повторный подсчет. Для этого необходимо использовать правило Егорова. Согласно этому правилу к данному квадрату относятся те элементы, которые находятся в его пределах, а также те элементы, которые располагаются на верхней и левой сторонах квадрата.

Обработка результатов проводилась в программном пакете «MS Excel». При расчете погрешностей и определения статистической значимости результатов измерений использовалось распределение вероятностей Стьюдента. Погрешность рассчитывалась для доверительного интервала равного $p = 0,95$.

Результаты представлены на рисунке 21.

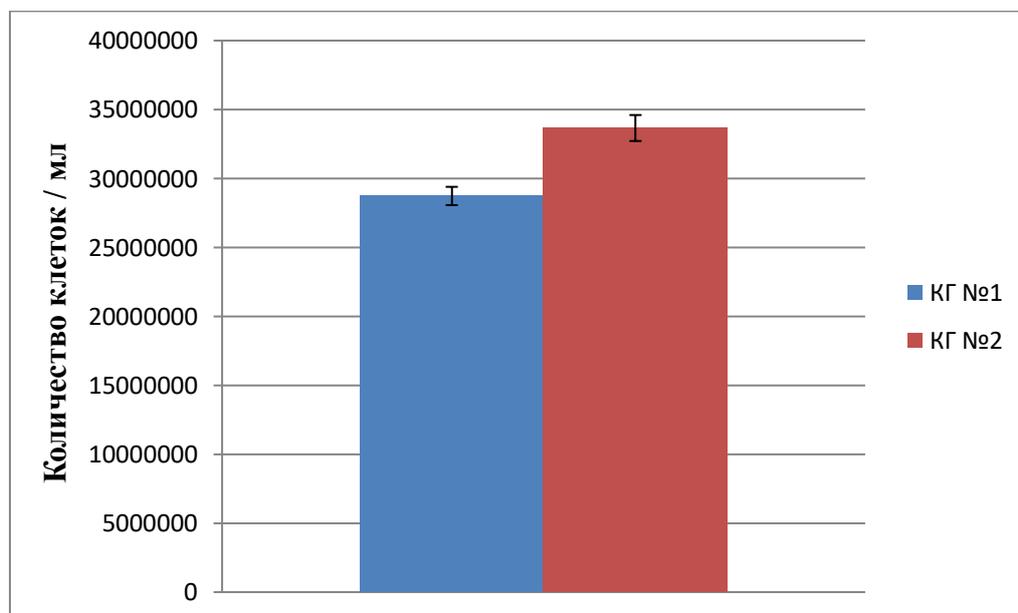


Рисунок 21 – Концентрация живых дрожжевых клеток, облученных в малой дозе через 48 часов после облучения [32]

Через 48 часов после облучения концентрация клеток в образце № 1 составила $(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^7$ клеток/мл, концентрация клеток в образце № 2 составила $(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^7$ клеток/мл (увеличение концентрации живых клеток в $\approx 1,17$ раз). Это свидетельствует о стимулирующем действии малых доз ионизирующего излучения на скорость деления дрожжевых культур [32].

В данной работе наличие стимулирующего действия малых доз было зафиксировано с использованием более современного научного метода – метода колоний.

Было выделено 2 группы: «контроль» и «облучение». Образцы в группе «облучение» были подвергнуты воздействию ионизирующего излучения в малой дозе 16 сГр от источника ^{241}Am .

Активность источника на момент облучения $A = 3,8$ ГБк.

Коэффициент пересчета $f(10) = 1,74$

Расстояние $r = 10$ см

Г-керма = 0,84

$$D = \frac{0,84 \cdot 3,8 \cdot 10^9 \cdot 1,74 \cdot 10^{-18}}{0,1^2} = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ Гр/с} = 4 \text{ сГр/сут} \quad (2)$$

Расчетная поглощенная доза за 4 суток составила 16 сГр, что входит в диапазон малых доз для дрожжей согласно литературным данным.

Образцы облучались в сухом виде. Для определения жизнеспособности клеток проводился колониеобразующий анализ.

Для проведения анализа образцы были разведены питательной средой состава 96% - дистиллированная вода и 4% - сахар и находились в ней до достижения стационарной фазы роста (что составило 6 часов [32]). После достижения стационарной фазы роста образцы были разведены водой до необходимой концентрации (1:1000 и 1:10000) методом серийных разведений. Из транспортной среды, содержащей биоматериал, берется 1 мл, который последовательно разбавляется в 10 раз с посевом в пронумерованные пробирки с питательной средой.

В ламинарном боксе образцы были высажены на питательную среду агар в большие и малые чашки Петри. Для этого питательная среда смешивалась с водой и доводилась до кипения. После этого дно чашек Петри заполнялось полученным раствором. Далее был выдержан интервал времени равный примерно 15 минутам, когда питательная среда остыла до температуры 35 °С.

Перенос биоматериала на среду осуществлялся с помощью бактериальной пипетки.

При посеве были выполнены следующие правила:

1. посев осуществляется над спиртовкой в боксе, предварительно обработанном дезинфектантами и кварцеванием, или в ламинарном шкафу, обеспечивающем стерильность в рабочей зоне;
2. одежда, перчатки и среда также должны быть стерильными;
3. работать в боксе нужно быстро, но аккуратно, нельзя разговаривать и отвлекаться.

После высаживания образцы в чашках были перемещены в термостат на 4 суток.

Образцы находились в термостате при температуре 38,5 °С. Образец культуры в чашке Петри спустя 4 суток представлен на рисунке 21.



Рисунок 22– Дрожжевая культура в чашке Петри

Подсчет колоний проводился через 4 суток после высаживания. Результаты представлены в таблицах 6-7.

Таблица 6 – Результаты эксперимента

Разведение	1:1000		1:10000			
	Малые чашки		Большие чашки	Малые чашки		Большие чашки
Контроль	20	11	30	2	5	6
Облучение	57	26	33	40	11	27

Таблица 7 – Средние значения в малых чашках:

Разведение	1:1000	1:10000
	Малые чашки	
Контроль	15,5±4,5	
Облучение	41,5±15,5	

Графически результаты эксперимента представлены на рисунках 23-24. Красным цветом обозначено число колоний дрожжевой культуры облученного образца.

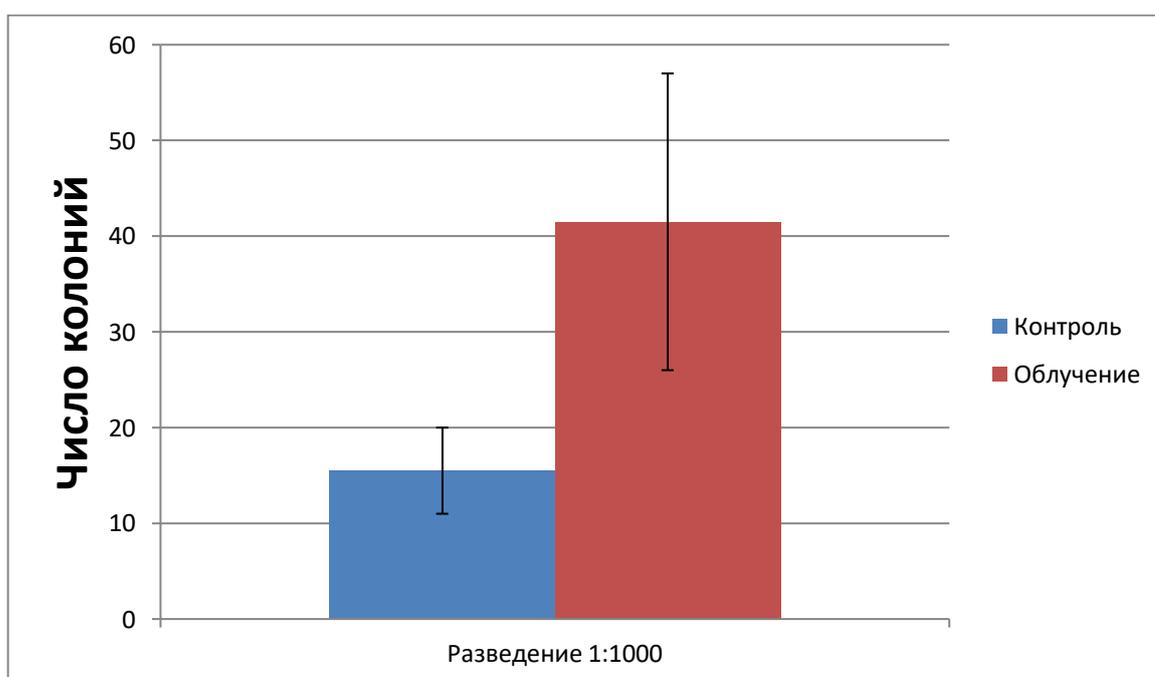


Рисунок 23 –Результаты для разведения 1:1000

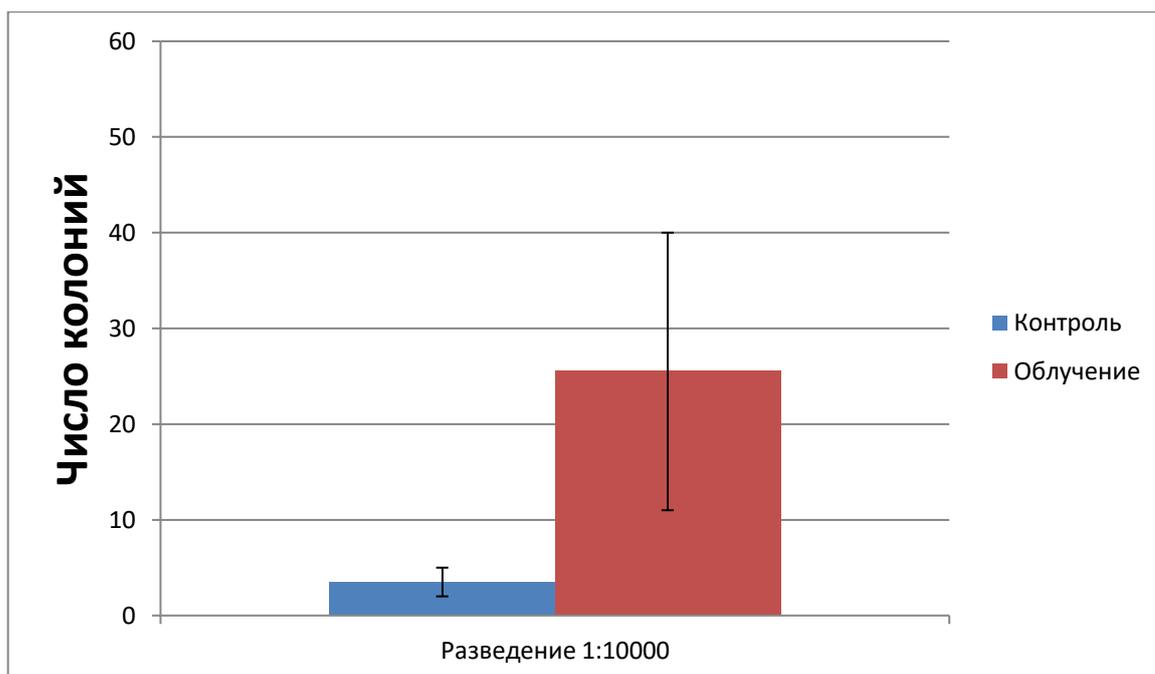


Рисунок 24 – Результаты для разведения 1:10 000

Через 4 суток после высаживания на питательную среду агар количество колоний в облученном образце при разведении 1:1000 составило $41,5 \pm 15,5$, а в контрольном $15,5 \pm 4,5$. При разведении 1:10 000 в облученном образце $25,5 \pm 14,5$, а в контрольном $3,5 \pm 1,5$. Мы можем говорить о статистически значимой разнице в числе образованных колоний в облученном и контрольном образцах. Данный результат свидетельствует об увеличении количества жизнеспособных клеток дрожжевой культуры и стимулирующем действии ИИ дозе 16 сГр.

3.4 Изучение влияния малых доз на эмбрионы инкубационных куриных яиц

В основе любой биотехнологии, основанной на использовании ионизирующих и неионизирующих излучений, лежат закономерности их биологического действия на семена, вегетирующие сельскохозяйственные растения и животных (компетенции стимуляции и подавления роста и

развития), а также паразитов и вредных микроорганизмов (компетенции дезинсекции и стерилизации продукции сельского хозяйства и пищевой промышленности).

Радиационная обработка является одним из способов обработки пищевых продуктов, которая осуществляется с целью достижения подавления микробиологического загрязнения и увеличения срока годности продуктов.

При радиационной обработке яиц проводится облучение скорлупы в дозе 40 кГр [36]. При этом на желток (или куриный эмбрион) так же оказывается воздействие. Доза в желтке составляет от 5 сГр до 40 сГр. Представляется интересным изучить наличие влияния на эмбрион в данной дозе, поскольку она находится в диапазоне малых доз.

Изучены биохимические, иммунологические и гематологические показатели крови цыплят-бройлеров с целью выявления возможных метаболических и физиологических нарушений. После убоя цыплят опытной и контрольной групп проводили их патологоанатомическое исследование.

В серии опытов процент вылупления в опытной группе, облученной наносекундным электронным пучком, генерируемым на ускорителях УРТ, составил 96%, в контрольной - 94%. Никаких морфологических признаков радиационного повреждения эмбрионов или его последствий обнаружено не было. Таким образом, было установлено, что процент цыплят в опытной и контрольной группах не имел статистически значимых различий. Следует отметить, что в опытной группе период разведения цыплят был в среднем меньше, чем в контрольной группе (16-18 часов и 22 - 24 часа) соответственно. Цыплята, вылупившиеся в опытной группе, более активные. Данный эксперимент свидетельствует о стимулирующем действии «малых» доз на биообъект.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии возникновения радиационно-индуцированных осложнений развития эмбриона или заболеваний цыплят. Кроме того, малые дозы оказывали

благоприятное влияние на скорость вылупления, что имеет большое значение в промышленном птицеводстве, поскольку сокращение сроков выращивания яиц очень важно для промышленного птицеводства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было рассмотрено влияние ионизирующего излучения на биологические объекты в диапазоне малых доз. Были изучены основные закономерности этого воздействия.

В ходе выполнения работы были выдвинуты положения для моделирования РАО, была предложена модель для описания РАО и полученные в модели коэффициенты были интерпретированы в приложении к радиобиологии. Предложенная модель была подтверждена экспериментально с использованием дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae*. Дальнейший анализ модели позволит более детально рассмотреть биологические процессы, протекающие при РАО.

Также, в данной работе было проведено исследование стимулирующего действия «малых» доз ионизирующего излучения на винную дрожжевую культуру штамма *Saccharomyces cerevisiae*. Результаты свидетельствуют о наличии стимулирующего действия, которое проявляется увеличении количества жизнеспособных дрожжевых клеток после воздействия в дозе 10 сГр и 16 сГр.

Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку могут найти применение в винодельной промышленности.

Кроме того, было обнаружено стимулирующее действие ИИ на эмбрионы инкубационных куриных яиц, которое проявилось в сокращении периода разведения цыплят.

Полученные результаты имеют практическую значимость в промышленном птицеводстве, поскольку позволяют сократить сроки выращивания яиц.

В ходе выполнения работы была разработана методика проведения колонообразующего анализа на кафедре ЭФ ФТИ УрФУ.

Результаты были представлены на V Международной молодежной научной конференции Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2018, VII

Международной молодежной научной конференция Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2020, на Международной молодежной конференции «Современные проблемы радиобиологии, радиозологии и агроэкологии» и всероссийской научной конференции студентов физиков «ВНКСФ-25», а также опубликованы в журнале «АНРИ» и «Вопросы радиационной безопасности», входящих в перечень ВАК.

Результаты были использованы при представлении заявки на проект в рамках конкурса «УМНИК», где был выигран грант на реализацию заявленного проекта.

Работа выполнялась совместно ГАУЗ Свердловской области «Свердловский областной онкологический диспансер» и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт электрофизики Уральского отделения Российской академии наук».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Черняев А. П. Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2004. 152 с.
- 2 Комочков М. М. Дозиметрия ионизирующих излучений: учебное пособие для студентов ВУЗа. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2006. 44 с.
- 3 Галицин Э. А, Радиобиология: Курс лекций. Гродно: ГрГУ, 201. 204 с.
- 4 Висмонт Ф.И. Патологическая физиология: Учебник для студентов высшего образования. Минск : Высшая школа, 2016. 640 с.
- 5 Кудряшов, Ю.Б. Радиационная биофизика. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2004.448 с.
- 6 Заичкина С.И. Особенности реализации цитогенетического повреждения при воздействии малыми дозами облучения на клетки млекопитающих и растений // Радиационная биология. Радиоэкология. 1992. Т. 32. № 21. С. 38-41
- 7 Ивановский Ю. А. Радиационный гормезис. Благоприятны ли малые дозы ионизирующей радиации? // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2006. – №. 6
- 8 Bodgi L. et al. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review //Journal of theoretical biology. – 2016. – Vol. 394. – P. 93-101.
- 9 Кострюкова Н. К., Карпин В. А. Биологические эффекты малых доз ионизирующего излучения // Сибирский медицинский журнал. 2005. Т. 50. № 1. С.17-22
- 10 Сафонова В. Ю., Сафонова В. А. Биологическое влияние малых доз радиации, аспекты безопасности // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 3. – №. 31-1
- 11 Obodovskiy I. Fundamentals of radiation and chemical safety. – Elsevier, 2015.

- 12 Серебряный А. М. и др. О реакции клеточной популяции на облучение в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47. – №. 1. – С. 93-99
- 13 Серебряный А. М. и др. О механизме адаптивного ответа. Оценка способности лимфоцитов крови человека к радиационному адаптивному ответу с помощью разных критериев // Цитология. – 2008. – Т. 50. – №. 5. – С. 462
- 14 Shibamoto Y., Nakamura H. Overview of biological, epidemiological, and clinical evidence of radiation hormesis // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – No. 8. – P. 2387.
- 15 Devic C., Ferlazzo M. L., Foray N. Influence of individual radiosensitivity on the adaptive response phenomenon: toward a mechanistic explanation based on the nucleo-shuttling of ATM Protein // Dose-Response. – 2018. – Vol. 16. – No. 3. – P. 1559325818789836
- 16 Бондарчук И. А. Гипотеза о механизме индукции адаптивного ответа при облучении клеток млекопитающих в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология, 2002. Т. 42, № 1. С. 36-43.
- 17 Котеров А.Н., Филипович И.Н. / Радиоадаптивный ответ *in vivo* не стимулированных лимфоцитов крыс по металлотионеиновому тесту // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42, №2. С.130-135
- 18 AP-1 транскрипционный фактор: общие сведения [Электронный ресурс] // База знаний по биологии человека. URL: <http://humbio.ru/humbio/oncogenetics/000b3f5f.htm>
- 19 Чернавский Д.С., Паламарчук Е.К., Календо Г.С., Календо Ю.И. Математическая модель одного из способов модификации радиочувствительности клеток. // Радиобиология. 1975. Т. 15, вып. 5. С. 662-670
- 20 Xstrahl300 [Электронные ресурсы] // Медицинское оборудование. URL: <https://www.tiamed.ru/catalog/onkologiya/xstrahl-300/> (дата обращения 20.05.2020).

21 Overview and history of X-rays [Электронный ресурс] // Xstrahl URL: <http://xstrahl-learning.com/xrad-learning-modules/overview-and-history-of-x-rays/> (дата обращения 20.05.2020).

22 Америций-241 [Электронный ресурс] // Википедия. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Америций-241>

23 Америций-241 [Электронный ресурс] // Зона отчуждения. URL: <http://chornobyl.ru/exclusion-zone/8-.html> (дата обращения 20.05.2020).

24 Особенности проявления адаптивной реакции дрожжевых клеток на действие ионизирующего излучения / Т. А. Горшкова, Л. Н. Комарова, Н. М. Кабакова, В. Г. Петин. // Пятый съезд по радиационным исследованиям : тез. докл. 2006. Т. 1. с. 144.

25 Пермякова Л. В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42. – №. 3.

26 Чаша Петри и ее история [Электронный ресурс] // OYLA URL: <https://oyla.xyz/article/caska-petri-i-ee-istoria> (дата обращения 20.05.2020).

27 Чашка Петри [Электронный ресурс] // Википедия URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Чашка_Петри (дата обращения 20.05.2020).

28 Устройство и применение ламинарных шкафов [Электронный ресурс] // Пуцинские лаборатории <https://www.laboratorii.com/stati/laminarnye-shkafy.html> (дата обращения 20.05.2020).

29 Термостат электрический суховоздушный [Электронный ресурс] // Смоленское СКТБ URL: http://www.sktb-spu.ru/katalog/starie_tovari/termostat-elektricheskij-suhovozdushyj-ts-1-80-spu/ (дата обращения 20.05.2020).

30 Госманов Р. Г., Галлиулин А. К., Волков А. Х., Ибрагимова А. И. Микробиология: Учебное пособие. — 2е изд., стер. — СПб.: Издательство «Лань», 2017. — 496 с.

- 31 Шевцова Н.В., Демидова П.Г. Микробиология и вирусология : учебно-методическое пособие / Ярославль : ЯрГУ, 2017. — 64 с.
- 32 Коротовских О.И. Исследование радиационно-индуцированной адаптации дрожжевых клеток на длительных интервалах времени // Выпускная квалификационная работа. Екатеринбург : УрФУ, каф. ЭФ. 2018. 39 с.
- 33 Агданцева Е.Н. Исследование адаптивной реакции популяции дрожжевых клеток на действии ионизирующего излучения // Выпускная квалификационная работа. Екатеринбург : УрФУ, каф. ЭФ. 2016. 36 с.
- 34 Коротовских О. И., Вазиров Р. А., Агданцева Е. Н., Баранова А.А. Математическое моделирование фактора изменения дозы при радиационно-индуцированной адаптации // АНРИ. – 2019. – №. 4. – С. 57-63.
- 35 Техническое описание линейного ускорителя электронов модели УЭЛР – 10 – 10С2 для ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна: устройство и работа ускорителя. СПб. : ООО «НПП «КОРАД». 2013. 65 с.
- 36 Способ поверхностной дезинфекции яйца : пат. 2 654 622 Рос. Федерация МПК А23L 3/26