

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО ХАРАКТЕРА НЕЙТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ЭНЕРГИЕЙ 14,5 МЭВ НА РЕАКЦИЮ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Е.В. Корякина, В.И. Потетня, С.Е. Ульяненко

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, Обнинск

Рассмотрено влияние импульсного излучения портативных нейтронных генераторов на клеточные реакции. Выживаемость клеток китайского хомячка линий СНО-К1 и V-79 и выход аберраций хромосом в лимфоцитах крови человека не различались при частотах следования импульсов 5 и 50 Гц и при облучении в непрерывном режиме.

Ключевые слова: нейтроны, непрерывное и импульсное излучение, клетки млекопитающих, выживаемость, хромосомные аберрации

Введение

Циклический характер многочисленных процессов клеточного метаболизма с характерными временами от 300 мкс до десятков суток позволяет в общем плане предположить, что эффективность периодического внешнего воздействия на клетку может усиливаться или снижаться в результате наложения на внутриклеточные процессы [7]. Широкое применение в исследованиях импульсных источников ионизирующих излучений и частиц высоких энергий делает задачу выявления закономерностей импульсно-периодического воздействия на биологические объекты актуальной. В последнее время в серии исследований на клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*, проведенных в работах [2, 6], показана амбивалентность биологического действия импульсного рентгеновского излучения. При этом степень выраженности и направленность разных тест-эффектов зависели от частоты следования импульсов, интенсивности и дозы облучения, в наибольшей степени проявляясь в диапазоне частот 10–25 Гц.

В настоящей работе исследовали влияние импульсного нейтронного излучения с энергией 14,5 МэВ, в том числе при разных частотах следования, на выживаемость и хромосомный мутагенез в клетках млекопитающих.

Материал и методы

Облучение и дозиметрия

Исследования проводили на портативных нейтронных генераторах (ПНГ) импульсного ИНГ-031 и непрерывного действия НГ-14 (ВНИИ автоматики им. Н.Л. Духова, Москва), источником нейтронов в которых служит тритиевая мишень, бомбардируемая потоком ускоренных дейтронов [21]. В результате реакции $T(d,n)^4He$ образуются нейтроны со средней энергией около 14,5 МэВ. Клеточные культуры *in vitro* облучали на генераторах в виде суспензии в стеклянных флаконах Карреля (20 см³). Толщина слоя среды во флаконах составляла не менее 2,5–3 мм для обеспечения условий протонного равновесия.

Поток частиц на нейтронных генераторах ИНГ-031 и НГ-14 измеряли активационным методом с применением алюминия в качестве активируемого элемента и трековыми детекторами деления со слюдяными регистраторами из набора ДКН-2 (ВНИИФТРИ, г. Менделеево) с делющимися изотопами-мишенями из ²³⁸U. Поглощенную дозу нейтронов в клетках определяли по величине кермы нейтронов с энергией 14,5 МэВ в крови или в воде, которая ближе по содержанию водорода к культуральной среде DMEM. Тре-

ковые детекторы, показания которых не зависят от вида нейтронного воздействия (импульсное или непрерывное) применяли также в качестве дозиметров-свидетелей.

Вклад гамма-излучения, измеренный методом пары ионизационных камер (дозиметр Unidos с наперстковыми ионизационными камерами со стенками из тканеэквивалентной пластмассы и магния), составлял не более 5 % дозы нейтронов и при построении дозовых кривых не учитывался. Результаты проведенных дозиметрических исследований подробно представлены в нашей предыдущей работе (Мед. физика, 2015, № 3(67), С. 15–23).

Культуры клеток

Биологические эффекты импульсного и непрерывного нейтронного излучения оценивали по клоногенной способности клеток китайского хомячка двух линий (СНО-К1 и V-79) методом макроколоний, влияние частоты следования импульсов (5 и 50 Пц) – по выходу aberrаций хромосом в лимфоцитах человека. Культивирование клеток до и после облучения проводили по стандартным методикам [11, 18]. Клетки китайского хомячка облучали в стационарной фазе роста на 3–5 день после посева, подсчет колоний осуществляли через 8–11 дней после облучения. Эксперименты с лимфоцитами периферической крови человека в стадии покоя (G_0) проводили с использованием полумикрометода культивирования, облучая цельную кровь. При анализе aberrаций хромосом учитывали весь спектр повреждений, визуализируемых при обычном окрашивании по методу Гимза.

Статистическую обработку результатов радиобиологических экспериментов проводили стандартными методами.

Результаты и обсуждение

Результаты сравнения биологической эффективности импульсного (50 Пц) и непрерывного нейтронных излучений генераторов ИНГ-031 и НГ-14 для двух клеточных линий китайского хомячка (V-79 и СНО-К1) представлены на рис. 1, 2. Дозовые кривые при действии импульсного и непрерывного нейтронного излучения в исследованном диапазоне доз имеют линейный характер ($-\ln S = \alpha D$), при этом летальное действие обоих видов излучения практически не зависит от линии клеток.

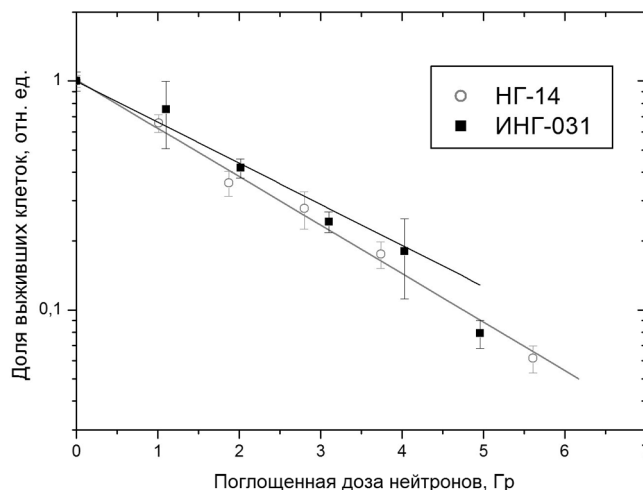


Рис. 1. Выживаемость клеток китайского хомячка линии СНО-К1 после воздействия нейтронов с энергией 14,5 МэВ (○ – непрерывное нейтронное излучение; ■ – импульсное нейтронное излучение)

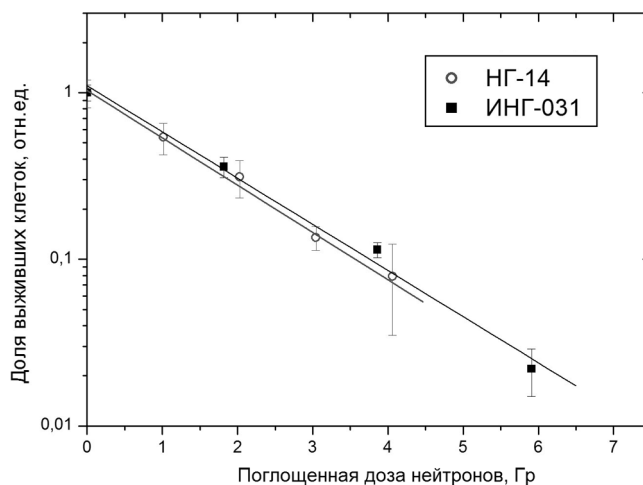


Рис. 2. Выживаемость клеток китайского хомячка линии V-79 после воздействия нейтронов с энергией 14,5 МэВ (○ – непрерывное нейтронное излучение; ■ – импульсное нейтронное излучение)

Различия в эффективности импульсного и непрерывного нейтронного излучения для обеих линий клеток не являются статистически значимыми ($p=0,05$). Значения линейных коэффициентов уравнений регрессии (α) составляют для клеточной линии СНО-К1 $0,22 \pm 0,01$ и $0,21 \pm 0,01$ для импульсного и непрерывного излучений соответственно, для линии клеток V-79 – $0,28 \pm 0,02$ и $0,30 \pm 0,01$. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными

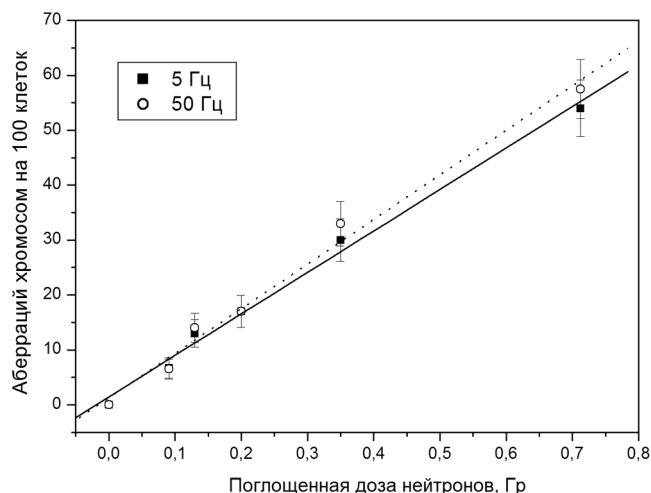


Рис. 3. Дозовые зависимости выхода аберраций хромосом при облучении импульсным нейтронным излучением с различной частотой следования импульсов (сплошная кривая – 5 Гц; пунктирная кривая – 50 Гц)

для этих же клеточных культур, облученных нейтронами близких энергий (13,6 МэВ и 15 МэВ) в непрерывном режиме [23, 24], а также с результатами работы [10], где оценивали выживаемость клеток меланомы В-16 после облучения на тех же установках, что и в настоящем исследовании.

При изучении влияния частоты следования импульсов на биологическое действие нейтронного излучения получены результаты, свидетельствующие, что в исследованном диапазоне доз данные по выходу аберраций хромосом (АХ) при 5 и 50 Гц не отличаются статистически значимо друг от друга (рис. 3). При этом дозовые кривые хорошо описываются линейной зависимостью ($p < 0,001$). Сравнение полученных данных показывает, что линейные коэффициенты дозовых кривых практически совпадают, составляя $75,6 \pm 3,2$ АХ/Гр при частоте следования импульсов 5 Гц и $81,2 \pm 4,3$ АХ/Гр – при частоте 50 Гц, а также согласуются с данными, полученными ранее на нейтронном генераторе непрерывного действия НГ-150М ($67,8 \pm 4,08$ АХ/Гр) [16]. Аналогичные результаты были получены и по выживаемости клеток меланомы В-16 на импульсном нейтронном генераторе ИНГ-031 [10].

Таким образом, проведенные эксперименты не выявили отличий действия импульсного излучения с частотой 50 Гц как от излучения с частотой 5 Гц, так и непрерывного.

Аналогичный вывод следует из результатов работы [15], в которой сравнивали цитогенетический эффект импульсного нейтронного реакторного излучения со средней энергией 0,7 МэВ при частоте следования импульсов 1, 5 и 100 Гц по индукции АХ в лимфоцитах крови человека. Показано, что как суммарный выход АХ, так и выход отдельных их типов при нейтронном облучении с частотой импульсов 1 и 5 Гц был практически одинаков, но при частоте импульсов нейтронов 100 Гц он был несколько выше, хотя отличия не были значимыми. Возможно, выявленные различия являются скорее следствием сложностей дозиметрии смешанных гамма-нейтронных полей реакторов и разным вкладом гамма-излучения, чем эффектом частоты следования импульсов.

Другие имеющиеся в литературе данные о действии низкочастотных (1–100 Гц) периодических импульсных излучений, как ионизирующих, так и неионизирующих, на клетки млекопитающих достаточно неоднозначны в вопросе о наличии или отсутствии частотной зависимости изученных тест-эффектов. В серии более чем десятилетних исследований *in vitro* и *in vivo* [1, 2, 4, 6, 18] закономерностей биологического действия импульсного излучения разной природы (рентгеновского, СВЧ, ультразвукового) с разной частотой следования импульсов был выявлен определенный диапазон дискретных частот, при которых заметно проявлялась повышенная эффективность излучений. Так, импульсное периодическое рентгеновское излучение (ИПРИ, длительность импульса 4 нс, доза в импульсе 0,1–200 мкГр, наиболее вероятная энергия спектра 90–100 кэВ) в дозах 28–100 мГр практически полностью (95–99 %) ингибировало включение ^3H -тимидина в ДНК опухолевых клеток мастоцитомы Р-815 и карциномы Эрлиха при частотах 13 и 16 Гц в одних экспериментах и 10, 16, 22, 25 Гц – в других [14]. В экспериментах *in vivo* на этих же клетках торможение роста опухоли составило 16–22 % при частоте 13 Гц. Облучение с частотой 13 и 16 Гц приводило к депопуляции клеток селезенки мышей на 30 %, с одной стороны, и одновременном росте включения ^3H -тимидина в ДНК на 50 %, с другой. В клетках костного мозга при отсутствии значимых различий в количестве клеток воздействие с частотой 10 Гц увеличивало на 36 % включение ^3H -тимидина в ДНК и снижало на 50 % при частотах 13 и 16 Гц [2].

Исследование индукции двойных разрывов (ДР) ДНК в лимфоцитах человека с использованием флуоресцентных фокусов белков γ H2AX не выявило значимых различий в дозовых кривых для частот 8, 13 и 25 Гц, за исключением, возможно, одной точки при дозе 36 мГр (13 Гц) [4]. Уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гепатоцитах облученных мышей (дозы до 160 мГр) не отличался от контроля при частотах 10 и 13 Гц, но значительно снижался при частотах 16 и 25 Гц [6]. В крови наблюдалась обратная картина – повышенный уровень продуктов ПОЛ при частотах 10 и 13 Гц, и контрольный уровень при 16 и 25 Гц.

В проведенных параллельно исследованиях с использованием электромагнитного излучения (ЭМИ, несущая частота 10 ГГц, длительность импульсов 100 нс, пиковая плотность потока мощности (ППМ) от 50 до 1700 Вт/см²) в диапазоне частот 4–50 Гц уровень продуктов ПОЛ в гепатоцитах мышей снижался при тех же частотах, что и при действии ИПРИ, 16 и 25 Гц, а также при 13 Гц. В то же время, в крови при действии ЭМИ наблюдались снижение уровня продуктов ПОЛ при частотах 16 и 25 Гц и наличие контрольного уровня при частотах 10 и 13 Гц. В целом, автор делает вывод, что наиболее эффективно способствует запуску и реализации окислительных процессов в органах и тканях облученных мышей воздействие ИПРИ с частотами повторения 10, 13, 16 и 25 Гц и импульсным ЭМИ с частотами 13 и 25 Гц. В работе [2] низкоинтенсивное микроволновое излучение повышало включение ³Н-тимидина в ДНК спленоцитов через 24 ч после воздействия *in vitro* при частотах 8, 10, 13, 16, 19 Гц (пиковая ППМ 1,1 кВт/см²), но снижало при частотах 19 и 22 Гц при более высокой мощности (3,5 кВт/см²). В опухолевых клетках мастоцитомы Р-815 наблюдали снижение включения ³Н-тимидина в ДНК на 20–40 % при частотах 3, 10, 13, 16, 19 и 22 Гц.

Ультразвуковое периодическое воздействие (резонансная частота 1,2 МГц, коэффициент скважности 50 %, удельная мощность 0,3 Вт/см²) снижало количество опухолевых клеток лейкоза человека U937 при всех исследованных частотах в диапазоне 0,5–100 Гц, а в наибольшей степени – при частотах 0,5 и 1 Гц (до 40 % от уровня контроля), а также при 3, 50 и 100 Гц (до 65–80 %). При частотах 5 и 10 Гц различия были статистически незначимыми. Следует отме-

тить, что наибольший эффект вызывало непрерывное ультразвуковое излучение (снижение числа клеток до 10 %) за счет гибели клеток в момент воздействия вследствие роста температуры и механического разрушения. При импульсном же воздействии наблюдалось увеличение числа клеток с признаками апоптоза (в среднем 15 % через 6 ч после воздействия). Фотодинамическое воздействие на эритроциты с использованием фотосенсибилизатора радахлорина и светодиодной матрицы ($\lambda=650$ нм) при интенсивности облучения, достаточной для гемолиза клеток, не выявило различий по числу погибших клеток между непрерывным режимом облучения и импульсным с частотами 1, 2, 5, 10, 24, 50, 100 Гц при скважности 50 и 75 %. [9].

Исследование действия импульсного электромагнитного излучения СВЧ (8,8 ГГц) и КВЧ (37 ГГц) диапазона с большой пиковой мощностью (20–65 кВт) и длительностью импульсов 60–180 нс не выявило повреждений ДНК в лейкоцитах и лимфоцитах мышей и человека *in vitro* при использовании щелочного варианта комета-теста, когда частота следования импульсов составляла 50 Гц. Однако увеличение частоты КВЧ-излучения до 500 Гц и длительности импульса до 400–800 нс приводило к образованию перекиси водорода в наномолярных концентрациях, способной повреждать ДНК, в результате суммарного влияния возбуждаемых термоакустических колебаний и тепла [5].

Таким образом, приведенные данные показывают, что при высокой интенсивности импульсного воздействия [9, 10, 15] частотная зависимость биологического эффекта в диапазоне 1–100 Гц отсутствует, но проявляется при низкоинтенсивных воздействиях как ионизирующих, так и неионизирующих излучений, в том числе рентгеновского, СВЧ, ультразвукового [1, 2, 6, 13]. Суммарный список частот, при которых наблюдались особенности действия импульсных излучений – 0,5, 1, 3, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 50, 100 Гц – при недостаточной их воспроизводимости и низком дозовом диапазоне проявления, возможно, свидетельствует об общности механизма(ов) частотного эффекта с такими известными в радиобиологии феноменами в области малых доз как адаптивная реакция, гиперчувствительность и индуцированная радиорезистентность (ГЧ/ИР) [3, 8, 20]. Все три эффекта проявляются в определенном, достаточно узком диапазоне доз и

мощностей доз и характеризуются известной неспецифичностью, т.к. индуцируются физическими и химическими факторами разной природы. Нельзя исключить, что сходство эффектов лишь внешнее, и за каждым из них стоят свои механизмы, но столь же правомерна и точка зрения об общности механизмов действия малых доз внешних воздействий на клетку, которая отвечает на них единообразными внутриклеточными процессами [3]. В частности, как в случае адаптивного ответа, так и импульсного СВЧ-излучения сообщается об изменении конформационного состояния хроматина в качестве реакции клетки на воздействие [17, 22].

В настоящем исследовании различий в эффективности импульсного с частотой 5 и 50 Гц и непрерывного нейтронного излучения не обнаружено. Одно из возможных объяснений заключается в том, что исследования были проведены при частотах следования импульсов, не совпадающих с оптимальными. Возможно также, что отсутствие эффекта связано с достаточно высокими дозами нейтронного излучения. Это касается как настоящей работы, так и результатов исследований на импульсных реакторах [15].

Однако полностью исключить повышенную эффективность импульсного нейтронного излучения в определенном (в настоящее время четко не обозначенном) диапазоне доз, мощностей доз и частот следования нельзя, поскольку в диапазоне низких доз (до 0,5 Гр) для нейтронов с энергией 14,5 МэВ наблюдали эффект ГЧ/ИР [12, 19], в основе которого, как предполагается, лежат общие закономерности действия малых доз повреждающих факторов внешней среды.

Выводы

1. Эффективности воздействия импульсного и непрерывного нейтронного излучения с энергией 14,5 МэВ генераторов ИНГ-031 и НГ-14 по клоногенной активности клеток китайского хомячка в исследованном диапазоне доз (до 6 Гр) статистически не отличаются.
2. Стандартный регрессионный анализ выхода аберраций хромосом в лимфоцитах крови человека, индуцированных импульсным нейтронным излучением с энергией 14,5 МэВ, показал, что его эффективность не зависит от

частоты следования импульсов 5 или 50 Гц и не отличается от эффективности непрерывного нейтронного воздействия.

Список литературы

1. Булдаков М.А., Литвяков Н.В., Климов И.А. и соавт. Влияние низкодозового импульсно-периодического рентгеновского излучения на рост и метастазирование карциномы легких Льюис. // Сиб. онкол. журнал, 2011, **48**, № 6, С. 47–51.
2. Булдаков М.А. Влияние импульсно-периодических неионизирующего и ионизирующего излучений на нормальные и опухолевые клетки. Автореферат дисс. канд. биол. наук. – Новосибирск, НИИ физиологии СО, 2009, 24 с.
3. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. // В сб. “Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты”. Под ред. А.Б. Рубина. – М.–Ижевск: НИЦ “Регулярная и хаотическая динамика”, Институт компьютерных исследований, 2007, С. 390–423.
4. Васильев С.А., Степанова Е.Ю., Кутенков О.П. и соавт. Двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах человека после однократного воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в малых дозах: нелинейная дозовая зависимость. // Радиация, биология. Радиоэкология, 2012, **52**, № 1, С. 31–38.
5. Гудкова О.Ю. Исследование генотоксического действия импульсных электромагнитных излучений с большой пиковой мощностью. Автореферат дисс. канд. биол. наук: Пушкино, 2006, 22 с.
6. Жаркова Л.П. Реализация окислительных процессов в печени и крови после кратковременного воздействия наносекундных импульсно-периодических электромагнитных излучений. Автореферат дисс. канд. биол. наук: Томск, ТГУ, 2010, 24 с.
7. Загускин С.Л., Никитенко А.А., Овчинников Ю.А. и соавт. О диапазоне периодов колебаний микроструктур живой клетки. // Докл. АН СССР, 1984, **277**, № 6, С. 1468–1471.
8. Засухина Г.Д. Адаптивный ответ – общебиологическая закономерность: факты, гипоте-

- зы, вопросы. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2008, **48**, № 4, С. 464–473.
9. Змиевской Г.Н., Филатов В.В. Исследование эффективности фотодинамического воздействия на живые клетки при различных режимах светового облучения. // Инженерный вестник. Электронный журнал. 2012, № 7, МГТУ им. Н.Э.Баумана.
 10. Исаева Е.В., Бекетов Е.Е., Корякин С.Н. и соавт. Сравнение биологической эффективности импульсного и непрерывного нейтронного излучения с энергией 14 МэВ на культуре клеток мышины меланомы В-16. // Радиация и риск, 2012, **21**, № 2, С. 83–90.
 11. Корякина Е.В. Цитогенетические эффекты излучения со сверхвысокой мощностью дозы. – Saarbrücken, LAP Lambert Academic Publishing, 2014, 168 с.
 12. Корякина Е.В., Потетня В.И. Цитогенетические эффекты низких доз и мощностей доз нейтронов в клетках млекопитающих. Междунар. научн. конф. “Радиобиологические основы лучевой терапии опухолей”. Материалы конференции. – Москва, 2013, С. 35.
 13. Литвяков Н.В., Булдаков М.А., Чердынцева Н.В. и соавт. Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2005, **45**, № 4, С. 460–463.
 14. Литвяков Н.В., Ростов В.В., Булдаков М.А. и соавт. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток импульсно-периодическим рентгеновским излучением. // Сиб. онкол. журнал, 2006, **17**, № 1, С. 24–31.
 15. Севаньяев А.В., Герасименко В.Н. Сравнительная частота аберраций хромосом в культуре лимфоцитов человека в зависимости от режима нейтронного облучения. // Радиобиология, 1989, **29**, С. 264–266.
 16. Севаньяев А.В., Жербин Е.А., Лучник Н.В. и соавт. Цитогенетические эффекты, индуцируемые нейтронами в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro*. // Генетика, 1979, **15**, № 6, С. 1046–1060.
 17. Семин Ю.А., Швацбург Л.К., Дубовик Б.В. Изменение вторичной структуры ДНК под влиянием внешнего электромагнитного поля малой интенсивности. // Радиационная биология. Радиоэкология, 1995, **35**, Вып. 1, С. 36–41.
 18. Фреши Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Пер. с англ. под ред. Ю.Н. Хомякова. – М.: Бином, 2010, 691 с.
 19. Dionet C., Tchirkov A., Alard J. P. et al. Effects of low-dose neutrons applied at reduced dose rate on human melanoma cells. // Radiat. Res., 2000, **154**, P. 406–411.
 20. Joiner M.C., Marples B., Lambin P. et al. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2001, **49**, P. 379–389.
 21. Lychagin A.A. Portable Neutron Generators in Medicine. // Biomed. Eng., 2014, **48**, No. 1, P. 9–12.
 22. Natarajan M., Vijayalaxmi, Szilagyi M. et al. NF-kV DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes. // Bioelectromagnetics, 2002, **23**, No. 4, P. 271–277.
 23. Rini F.J., Hall E.J., Marino S.A. The oxygen enhancement ratio as a function of neutron energy with mammalian cells in culture. // Radiat. Res., 1979, **78**, No. 1, P. 25–37.
 24. Zoetlief J., Barendsen G.W. Dose-effect relationships for induction of cell inactivation and asymmetrical chromosome exchanges in three cell lines by photons and neutrons of different energy. // Int. J. Radiat. Biol., 1983, **43**, No. 4, P. 349–362.

THE INFLUENCE OF IMPULSE 14.5 MEV NEUTRON IRRADIATION ON MAMMALIAN CELLS REACTIONS

E.V. Koryakina, V.I. Potetnya, S.E. Ulianenko
A.F. Tsyb Medical Radiology Scientific Center, Obninsk, Russia

The influence of impulse irradiation from portable neutron generators on cells reactions was investigated. It was shown that survival of CHO-K1 and V-79 cells and chromosome aberration yield in the human lymphocytes were similar for impulse frequencies of 5 and 50 Hz and for continuous irradiation.

Key words: *neutrons, continuous and impulse irradiation, mammalian cells, cell survival, chromosome aberrations*

E-mail: ek-koryakina@mrrc.obninsk.ru