

SAINT-PETERSBURG STATE UNIVERSITY

Manuscript Copy

Kotb Omar Mahmoud Elsayed

**THE EFFECT OF THE HIGH-ENERGY PROTON
COMPONENT OF COSMIC RAYS
ON THE DNA STRUCTURE**

Specialization 01.04.16 - Physics of the atomic nucleus and elementary particles
Thesis for the PhD degree of physico-mathematical sciences

Scientific supervisor:
Candidate of physico-mathematical
sciences, associate professor
Ezhov Victor Fedorovich

Scientific supervisor:
Candidate of physico-mathematical
sciences, associate professor
Paston Sofia vladimirovna

St. Petersburg
2020

TABLE OF CONTENTS

Introduction	4
1. Literature review	12
1.1. Space research	12
1.1.1. Space exploration and cosmic radiation.....	12
1.1.2. Possibilities of modeling primary cosmic radiation in terrestrial conditions.	14
1.2. Proton therapy	15
1.2.1. Comparison between proton therapy and conventional photon radiation therapy.....	16
1.2.2. Proton therapy on a proton beam of energy 1 GeV (PNPI SC-1000 MeV).....	20
2. Irradiation and dosimetry of biological samples with a proton beam of 1 GeV and gamma rays.	24
2.1. DNA irradiation on the medical beam of PNPI synchrocyclotron ...	24
2.2. Irradiation of DNA with gamma rays at the NRC KI (PNPI).....	27
3. The effect of ionizing radiation on DNA (review).....	29
3.1. Energy absorption of ionizing radiation	29
3.2. DNA structure	37
3.3. The cell cycle and radiation cell death.....	39

3.4.	Direct and indirect action of radiation	40
3.5.	Radiation damage in the DNA structure	42
3.6.	The effect of cosmic radiation on biological systems	48
4.	Material and methods	56
4.1.	Material	56
4.2.	Spirin method	56
4.3.	DNA melting	57
4.4.	Circular dichroism (CD)	61
5.	Results and discussion	65
5.1.	Application of spectral methods for determining the radiation damage in the DNA structure	65
5.2.	Comparison of the effect of high-energy protons and gamma rays on the structure of DNA	86
5.3.	The effect of catechin in the process of DNA damage by high-energy protons and γ -radiation.	104
	Conclusion	111
	List of abbreviations and symbols	113
	References	115

Introduction

During interplanetary manned space flights, the first priority is to protect the crew from the effects of cosmic radiation, the main component of which are high-energy protons. The study of the biological effects of high-energy protons is necessary for the development of medical means for protecting astronauts. It is known that radiation damage to the body is determined by DNA damage of the most rapidly dividing cells (red bone marrow, epithelium). One of the most dangerous long-term effects of radiation - carcinogenesis - is also instigated by the damage of the genetic cells apparatus. Therefore, the study of the defects in the DNA structure under the action of high-energy proton radiation is necessary for understanding the molecular mechanisms of the radiation effect and the search for radioprotectors.

Over many decades of radiobiological research, a huge amount of information has been accumulated about damages in the structure of DNA caused by γ - and X-ray irradiation. Data on radiation damage to DNA caused by heavy charged particles is much less; Researchers' attention is concentrated mainly on radiation with high linear energy transfer (LET) in the vicinity of the Bragg peak, since this is very important for the development of new methods of treating cancer. High-energy charged particles (in the region of the Bragg curve plateau) have a high penetrating power and low LET, approaching the LET of ^{60}Co γ -radiation, which is currently accepted as the standard for calculating the relative biological efficiency (RBE) of different types of radiation.

The value of RBE is used to calculate the permissible absorbed radiation doses for people who are exposed to radiation by the nature of their professional activities, to assess radiation risks, in particular, when planning radiation therapy. It is very important to take into account that the LET of radiation is not the only factor determining RBE; the type of biological object on which radiation is tested also plays an important role (in the case of cells, the rate of division, phase of the cell cycle, incubation conditions, etc.), the criterion of biological effect, dose rate, patterns of absorption of a given type of radiation by a substance. Therefore, estimation of the RBEs of different types of radiation are ambiguous. A comparison of the biological effectiveness of high-energy protons and standard γ -

radiation is necessary to calculate the radiation load on the human body during an expedition to deep space.

To clarify the initial physico-chemical stages of the development of radiation damage processes, it is convenient to use model systems - aqueous DNA solutions. The secondary structure of DNA in the cell and in solution is similar, and is a B-form double helix. The use of DNA solutions to study the radiation effect avoids the influence of many biological factors (for example, the action of the reparative system) that act in the cell and complicate the picture of radiation damage. In addition, model solutions are convenient for testing the radio-modifying action of substances - potential protectors. Varying the solvent composition and the concentration of target molecules can provide additional information on the mechanisms of the action of high-energy protons on biological objects.

Under terrestrial conditions, high-energy protons can be obtained using accelerators. We used the synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics Research Center "Kurchatov Institute" SC-1000 with a monoenergetic proton beam with an energy of 1 GeV, which corresponds to the maximum proton energy of the primary cosmic radiation. In addition, since 1975 there has been a medical center for stereotactic proton therapy based on this synchrocyclotron, which successfully conducts scientific research and treatment of brain diseases. This center is the only one in the world that uses a beam of protons of such high energies. The study of the damage in the DNA molecule caused by proton radiation should allow us to evaluate the effectiveness of radiation exposure and improve the method of proton therapy.

The aim of the thesis is to study the structure of a DNA molecule irradiated with protons with an energy of 1 GeV in solutions and compare the radiation effect of proton and standard gamma radiation ^{60}Co , as well as to study the effect of the antioxidant catechin on the process of DNA damage by high-energy protons.

Research Objectives:

- 1) To develop a method for the irradiation and dosimetry of the biological samples on a proton beam of energy 1 GeV.
- 2) To simulate the effect of the proton component of cosmic rays on the genetic apparatus of cells at the SC-1000 synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics, Kurchatov Institute.
- 3) Test the capabilities of various spectral methods (UV spectrophotometry, Spirin method, spectrophotometric DNA melting, circular dichroism) to determine the structural damage in DNA irradiated with standard ^{60}Co γ -radiation in aqueous solutions.
- 4) To study the structural damage of DNA under the action of irradiation with protons with an energy of 1 GeV in solutions under varying conditions of irradiation (ionic strength of the solution, DNA concentration, radiation dose). Compare the radiation effect of proton and gamma radiation.
- 5) To obtain the dependence of the radiation effect on the concentration of catechin in the solutions irradiated with proton and γ -radiation. To analyze the effectiveness of the radioprotective action of catechin.

In the framework of this work, model aqueous solutions of DNA were irradiated with protons with an energy of 1 GeV in doses of 0–100 Gy. To compare the radiation effect, ^{60}Co γ -radiation was used, which has the same LET value = 0.3 keV / μm as the proton radiation under study. To determine the radiation-chemical yield (G) of the destroyed nitrogenous DNA bases, the Spirin method was firstly used for spectrophotometric determination of the concentration of nucleic acids. For systems exposed to γ -irradiation, this method gave results that are agreed with the literature data obtained by using other physico-chemical methods. For the first time, G values of the destroyed nitrogenous DNA bases were obtained under the action of protons with an energy of 1 GeV in the absorbed dose range 0–100 Gy, with varying irradiation conditions (electrolyte and DNA

concentrations). The dependence of G on the target concentration during proton and gamma irradiation was investigated. The effect of the well-known plant-derived antioxidant catechin on radiation damage to DNA was studied by using the DNA melting temperature (T_m) as a criterion for radiosensitivity.

The reliability of the results obtained is provided by the use of proven methods for studying the DNA structure in a solution, reproducibility of experimental results and the consistency of data obtained for DNA solutions exposed to γ -radiation with known literature data.

The statements to be defended:

1) A method of irradiation and dosimetry of biological samples on a 1 GeV proton beam has been developed.

2) Modeling of the effect of the proton component of cosmic rays on the genetic apparatus of cells on the synchrocyclotron SC-1000 of the St. Petersburg Institute of nuclear physics NRC « Kurchatov Institute » was carried out.

3) The dependence of the radiation-chemical yield G of the destroyed nitrogenous bases on the dose of γ -irradiation of DNA in solutions of different ionic strengths was obtained. It is shown that the Spirin method can be applied to determine the amount of destroyed bases. Using a combination of spectral methods, the secondary structure parameters of γ -irradiated DNA were determined. A decrease in the radiation effect with an increase in the ionic strength (μ) of the irradiated solution was found, which can be explained by a decrease in the size of the target, and also by the change in the structure and composition of the hydration shell of DNA.

4) The dose dependences of G of the destroyed DNA nitrogenous bases under the action of protons with an energy of 1 GeV in the absorbed dose range 0–100 Gy were determined, with varying electrolyte concentrations. It was found that the radiation-chemical yield of the destroyed nitrogenous bases of DNA and thymidine nucleoside in solution under the action of proton radiation is higher than the γ -radiation of ^{60}Co .

5) The dependence of G on the target concentration obtained in this work and the experiment using the OH radical scavenger (ethanol) showed that the contribution of the direct action of radiation on DNA and thymidine in the aqueous medium is higher in the case of proton radiation than in the case of γ -radiation.

6) Dose dependences of the melting temperature of DNA irradiated with high-energy protons and γ -quanta in solution of ionic strength 5 mM and 0.15 M NaCl were obtained. A monotonic decrease in T_m with increasing the radiation dose was found, as well as a broadening of the temperature interval of the helix-coil transition, indicating an increase in the heterogeneity of the DNA structure.

7) The effect of the well-known antioxidant catechin on radiation damage to DNA was studied by using the melting temperature (T_m) as a criterion for radiosensitivity. The dependences of T_m on the concentration of catechin in the irradiated solution are obtained. It was found that at a catechin concentration above 2.2×10^{-4} M, the T_m of γ -irradiated DNA completely restores the value obtained for native DNA (T_{m0}), while T_m of DNA irradiated with protons with an energy of 1 GeV is 0.85 T_{m0} . This confirms the conclusion made in the work about the greater contribution of the direct action of radiation to DNA damage during proton irradiation. The results show that the traditional protector-scavengers of free radicals, which are used to protect against photon radiation, will be less effective in protecting the body from the damage induced by high-energy protons.

Scientific novelty of the results:

1. A method of irradiation and dosimetry of biological samples on a 1 GeV proton beam has been developed.
2. Modeling of the effect of the proton component of cosmic rays on the genetic apparatus of cells on the synchrocyclotron SC-1000 of the St. Petersburg Institute of nuclear physics NRC « Kurchatov Institute » was carried out.
3. For the first time, the Spirin method was used to determine the radiation damage of DNA bases.

4. For the first time, dose dependences of the radiation-chemical yield G of the destroyed DNA nitrogenous bases under the action of protons with an energy of 1 GeV were obtained.
5. For the first time, the dependence of G of the destruction of bases. on the concentration of DNA in solution during proton irradiation was determined
6. For the first time, dose dependences of the melting temperature of DNA irradiated with high-energy protons were obtained.
7. For the first time, the effect of catechin on radiation damage to DNA under the effect of protons with an energy of 1 GeV was studied.

The practical significance of the work lies in the fact that the obtained data can be used to determine the RBE of high-energy protons, calculate the radiation load on the cosmonaut's body, and also to evaluate the effectiveness of proton therapy. The results of experiments using the catechin antioxidant will provide recommendations for choosing the medical protection of the space crew from the influence of cosmic rays.

Approbation of the work

The research results were published in peer-reviewed journals:

1. S.A. Tankovskaia, O.M. Kotb, O.A. Dommes, S. V. Paston, Application of spectral methods for studying DNA damage induced by gamma-radiation, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 200, 2018, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.04.011>.
2. S.A. Tankovskaia, O.M. Kotb, O.A. Dommes, S. V. Paston, DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy, in: *J. Phys. Conf. Ser.*, Institute of Physics Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1038/1/012027>.

The results of the work were reported at the following scientific conferences:

- 1) Svetlana Tankovskaia, Omar M. Kotb, Olga Dommès, and Sofia Paston, Application of spectral methods for studying of DNA damage induced by gamma-radiation, in: XIVh Int. Conf. Mol. Spectrosc. Białka Tatrzańska, Poland, 3–7 September 2017, pp. 223, T2: P–8.
- 2) Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Paston S.V., DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy, in: Conf. PhysicA.SPb, Saint Petersburg, 2017, 52/359.
- 3) Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommès O.A., Paston S.V. Helix – coil transition in DNA with defects of primary structure, In Book of Abstracts of 9th International Symposium "Molecular Mobility and Order in Polymer Systems", St.-Petersburg, June 19-23, 2017, P-059.
- 4) Omar Kotb, Svetlana Tankovskaia, Comparative Study of the DNA Irradiated with Proton Particles and Gamma Radiation, in: Int. Stud. Conf. Science and Progress-2017"-SPb.: SOLO, 13-17 November, 2017, 272 pp. p. 219.
- 5) Omar M. Kotb, Sofia V.Paston, DNA damage in aqueous solutions as a result of indirect action of ionizing radiation, в Сб. тезисов VIII Международной молодежной научной школы-конференции "Современные проблемы физики и технологий", МИФИ 15-20 апреля, 2019, Москва, pp. 55-56.
- 6) Котб О.М., Пастон С.В., Гулевич Е.П., Брожик Д.С., Карлин Д.Л., Пак Ф.А., Халиков А.И. Исследование повреждений молекулы ДНК, вызванных облучением протонами и гамма-квантами. В Сборнике Научных Трудов Vi Съезда Биофизиков России, Сочи, 16–21 сентября 2019 , p. 231.
- 7) Kotb O.M., Paston S.V., Ezhov V. F., Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A.3, Khalikov A.I., DNA Structural Alterations In Aqueous Solutions Induced By High Energy Proton Beam Radiation, in: 15th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists "Modern Problems of Polymer Science", 28 – 31 October 2019, Saint Petersburg, 4-O-13, 195.

The co-authors of the publications are Ph.D. Ezhov V.F., Ph.D. Paston S.V., Tankovskaya S.A. (student for the duration of the work), Dommes O.A. (graduate student for the duration of the work), Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A., Halikov A.I. Ph.D. Ezhov V.F. and Ph.D. Paston S.V. are the supervisors of studies, with them an active discussions of the results at all stages of the work were conducted. Together with Tankovskaya S.A. and Dommes O.A. preliminary results of DNA melting in γ -irradiated solutions were obtained. Employee of the Department of Molecular and Radiation Biophysics, PNPI named B.P. Konstantinov NRC "Kurchatov Institute" Gulevich E.P. conducted γ -irradiation of samples at the Researcher facility. Employees of the complex of radiation therapy "on the fly" on the basis of the accelerator SC-1000 FSBI PNPI named B.P. Konstantinov NRC "Kurchatov Institute" Brozhyk D.S., Karlin D.L., Pak F.A., Halikov A.I. provided technical support of the equipment.

The author's personal contribution was the preparation of water-salt solutions of DNA, conducting experimental studies, processing and interpreting data obtained by spectral methods, analyzing the results obtained, as well as writing articles and preparing reports on the results of research.

1. Literature review

1.1. Space research

1.1.1. Space exploration and cosmic radiation

Long-term space flights and exposure to cosmic radiation: When planning long-term space trips, the problem of protecting the crew of the spacecraft from the radiation effects of cosmic radiation is of great importance. To solve this global problem, it is necessary to carefully study the radiobiological effect of this radiation on the human body. Based on the obtained data, methods for protection from cosmic radiation will be developed, and also protectors should be developed to reduce the effect of penetrating radiation on the body of the crew members. Researchers in various scientific centers of countries involved in space research are working to solve this problem. The health risks associated with space radiation are the most serious problem for space research, as they can interfere with these flights for safety reasons or increase their cost to an extent exceeding reasonable.

It is very difficult to carry out shielding from cosmic radiation in space because the high energy of cosmic rays and the severe mass restrictions in space flight represent a very serious obstacle for protection. Passive shielding can be effective for secondary cosmic radiation, but it is limited for galactic cosmic rays. Active shielding may be able to overcome complex technical obstacles to protect from Galactic cosmic radiation. However, the most likely solution to the problems of radiation protection from primary cosmic radiation are genetic and biomedical approaches. Therefore, in order to obtain accurate risk models for long-term research flights, experimental data on damage of biological molecules and related effects are required [1,2].

Primary cosmic radiation: Cosmic radiation is usually divided into primary and secondary components. Primary cosmic rays are stable charged particles that were created during primary nucleosynthesis and accelerated to huge energies by astrophysical sources such as black holes, neutron stars, pulsars, supernovae, active galactic nuclei, quasars. The most common component of primary cosmic radiation is protons (95%), 4% - helium

nuclei, and 1% - the otherwise consists of nuclei of other elements, up to iron. Since cosmic rays are electrically charged, they are deflected by magnetic fields, and their motion directions are random, making it impossible to determine where they originated. However, cosmic rays in other regions of the Galaxy can be traced to the electromagnetic radiation that they produce [3,4].

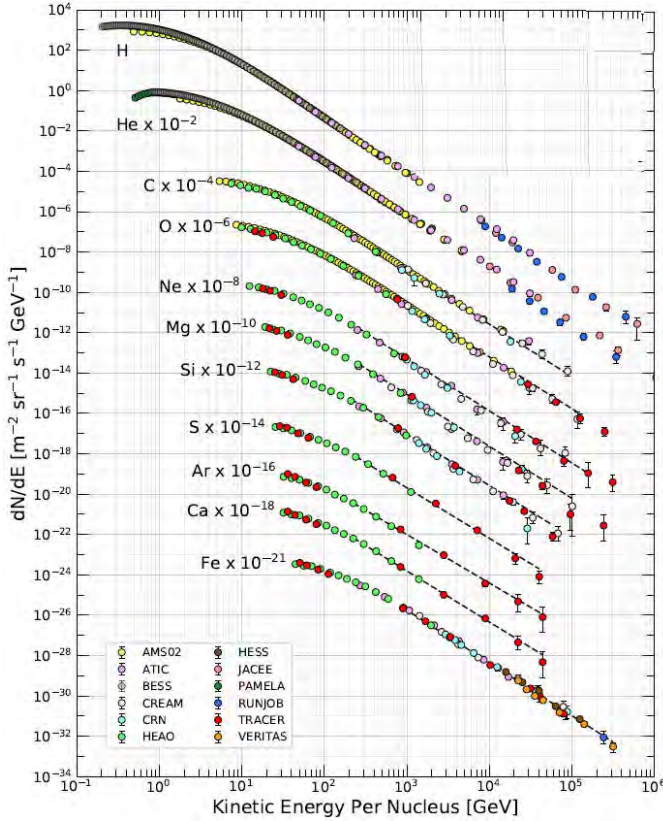


Fig 1.1 The fluxes of primary cosmic radiation nuclei in particles for the energy and for the nucleus, depending on the kinetic energy [4].

The most complete experimental spectrum of primary cosmic radiation as a function of energy is shown in the figure from the latest issue of Particle Data Group (Fig 1.1) [4].

The energy range of the primary cosmic radiation ranges from 10^9 eV to 10^{20} eV. The intensity of the primary nucleons in this range is approximately described by the formula:

$$I_N(E) \approx 1.8 \times 10^4 \left(\frac{E}{1 \text{ GeV}} \right)^{-\alpha} \frac{\text{nucleons}}{\text{m}^2 \text{s sr GeV}}$$

where E is the particle energy per nucleon, and $\alpha \approx 2.7$.

It should be noted here that the main component of the primary cosmic radiation is protons with an energy of the order of 1 GeV.

Secondary cosmic radiation: Charged particles of primary cosmic radiation coming from outside into the solar system are “modulated” by the solar wind, which consists mainly of electrons, protons and helium nuclei. The secondary component of cosmic radiation includes particles that are formed during the interaction of primary particles with interstellar gas. When entering the Earth’s atmosphere, cosmic rays collide with the atoms and molecules that form it, mainly oxygen and nitrogen. As a result of nuclear reactions, a cascade of lighter particles is formed, called the air shower secondary radiation. It consists of x-rays, muons, protons, alpha particles, pions, electrons and neutrons. All the formed products of nuclear reactions form a narrow cone (of the order of one degree) in the direction of the path of the primary particle [4].

1.1.2. Possibilities of modeling primary cosmic radiation in terrestrial conditions

The subject of studies of radiobiological risks to human health of the spacecraft crew caused by primary galactic cosmic rays in this work is their proton component. Therefore, it is necessary to use proton and ion accelerators. For this purpose, the synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics Research Center "Kurchatov Institute SC-1000" (PNPI SC) with a monoenergetic proton beam with an energy of 1 GeV was used (Fig 1.2), which exactly corresponds to the maximum proton energy of the primary cosmic radiation.



Fig 1.2 PNPI Synchrocyclotron SC-1000

The intensity of the PNPI SC internal proton beam is $3.5 \mu\text{A}$ due to the implementation of a vertical electrostatic focusing system in the central region of the accelerator. In this case, the intensity of the beam extracted from the accelerator chamber is $1 \mu\text{A}$. The beam intensity is in units of particles/sec- up to 6×10^{12} prot/sec.

At the PNPI SC-1000 synchrocyclotron, the only neutron source in Russia has been created that repeats the atmospheric neutron spectrum. The capabilities of this source allow testing the radiation resistance of the electronic products for civilian and military aircraft operating in the upper atmosphere, as well as irradiating the biological objects under conditions simulating the radiation conditions in the upper atmosphere. There are only three such installations in the world.

1.2. Proton therapy

The physical ability of proton radiation with high linear energy transfer value (LET) to deposit a huge amount of radiation energy within a much confined volume has been

instigation for the development of new methods of proton radiation therapy. Currently, proton therapy is an advanced modern and promising modality of radiation therapy that will be discussed in detail in this section.

1.2.1. Comparison between proton therapy and conventional photon radiation therapy

Recently, proton radiation therapy is one of the most important and fast developing tool for cancer treatments [5–7]. Robert Wilson was the first to prescribe the possibility of proton particles for medical use, based on the physics of protons as they slow down during the penetration of tissues, and thus was the first to outline the advantages of proton therapy as compared with conventional photon radiation therapy in 1946 [8]. After that, Tobias, Anger, and Lawrence in 1952 published the first work about the biological effects of proton, deuteron, and helium particles on mice [9]. Then many experiments with mice were performed in California at the Lawrence Berkeley Laboratory (LBL) [10], and the first person was treated in 1954 [11].

Protons are heavy positively charged particles that have mass higher than that of electron by 1836 times. Free protons are obtained during the decay of neutron particles (in nuclear reactions) and by stripping the hydrogen atom of its electron (requiring a minimum energy of 13.5 eV). High energy proton particles occur naturally in cosmic radiations as mentioned before. Protons are accelerated in various types of cyclotrons, synchrotron, Van de Graaff generators, etc. [5,12].

Protons (also other charged particles like α -particles, and heavy ions) interact with matter differently than do photons, undergoing inelastic collisions with other atomic electrons without changing direction appreciably while travelling through matter, giving up a part of their radiation energy with each collision. Hence, monoenergetic proton beams continue to loss their energy while passing through tissue. The rate of energy loss by charged particles (interaction cross section) increases as the energy of these particles decreases (where the energy lost by charged particles is inversely proportional to the square of their velocity). Therefore, the maximum dose deposition occurs in a sharp peak immediately before the particle comes to completely stop (i.e. the normal tissues in the

path of proton beam have very fewer doses than that given at the target). This peak is known as Bragg peak (for William Henry Bragg who discovered it in 1903), and beyond it the absorbed dose is negligible (i.e. the absorbed dose of normal organs beyond the tumor is approximately zero) [5–7] (Fig 1.3).

The depth of Bragg peak inside the patient is dependent on the incident protons beam energy. Bragg peak is narrow 1.5 - 2 mm. Therefore, to deliver a uniform radiation dose to the tumor target, the proton energy is varied and tuned to superimpose multiple Bragg peaks across the tumor, producing a region of relatively uniform radiation dose known as spread out Bragg peak (SOBP), with low entrance and negligible exit dose. On the other hand, photons damage action reduces exponentially during penetrating the patient, delivering higher radiation dose in the path to the target (i.e. the dose delivered to normal cells higher than to the target itself, thus decrease the prescribed target dose for tumor cells) and lower (but nonnegligible) dose beyond the target. So, protons have dosimetric advantages over photons, producing less integral radiation dose to the normal organs and maximum dose to the tumor. Furthermore, most proton treatment plans need only one to three radiation beams [5]. Characteristics of protons and photons beam depth dose are indicated in Fig 1.3.

To compare the biological effects of different types of radiation, the parameter of relative biological effectiveness (RBE) is used. RBE is determined by the following ratio [13]:

$$RBE = \frac{\text{biological effect of the studied radiation}}{\text{biological effect of the standard radiation}} = \frac{\text{absorbed dose (Gy) from standard radiation required to induce a given biological effect}}{\text{absorbed dose (Gy) from the studied radiation required to produce the same biological effect}} \quad (1.1)$$

Historically, X-rays with a quantum energy of 200-250 keV were chosen as standard radiation, however, it is currently recommended to use ^{60}Co γ -radiation [14].

In this work, we will compare radiation effects caused by the action of high-energy protons and ^{60}Co γ -radiation. RBE depends not only on the type of radiation, but also on the irradiated biological object, the radiation effect selected as a criterion, the dose rate and fractionation of radiation [13,14].

The relative biological efficiency (RBE) of proton is similar to that of megavoltage photons used in radiotherapy. The RBE of the therapeutic energy proton particles (about 250 MeV) is around 1.1, however the RBE arises from 1.1 to 1.7 in the Bragg peak where protons induce maximum deposition [15–18]. Therefore, proton therapy must be planned more accurately to avoid maximum dose delivery to critical structure around the Bragg peak (at which RBE is high). The RBE of protons was examined in 1960s using experiments on mortality in mice [19], chromosome aberrations in the bean roots [20], and skin reaction on primates [21]. The first patient was treated employing the Bragg peak in 1960, using a helium beam for metastatic lesions in the deltoid muscle [22].

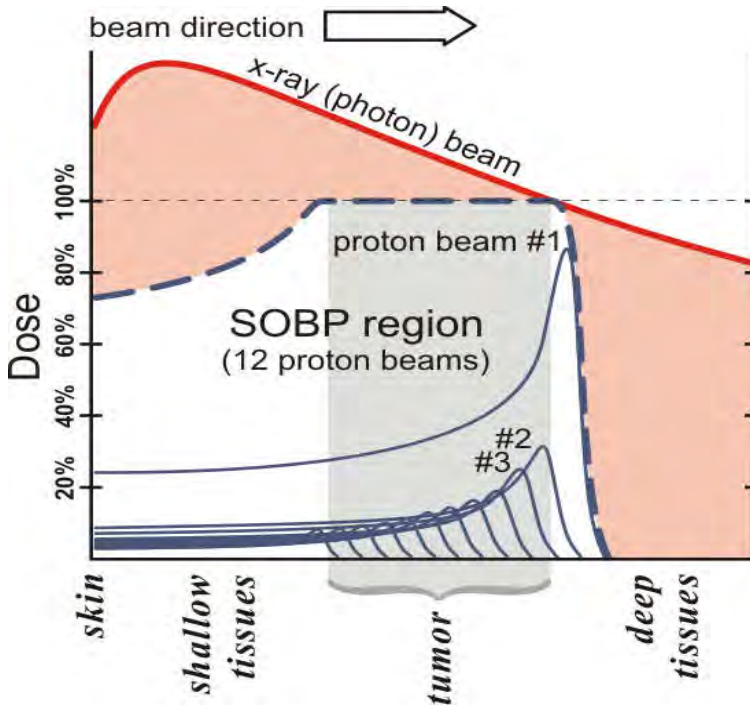


Fig 1.3 In a typical treatment plan for proton therapy, the spread out Bragg peak (SOBP, dashed blue line) is the therapeutic radiation distribution. The SOBP is the sum of several individual Bragg peaks (thin blue lines) at staggered depths. The depth-dose plot of an X-ray beam (red line) is provided for comparison. The pink area represents additional doses of X-ray radiotherapy—which can damage normal tissues and cause secondary cancers, especially of the skin [23].

Proton therapy in his early advent was associated with an inherent problem, in which the synchrotron produces a small pencil beam that required to be directed onto scattering foil to produce larger fields matched with tumor volume. This process generates neutrons that deliver higher total equivalent dose to the patient than that from conventional radiation linear accelerator (LINAC). Scanning the proton pencil beam produces treatment field matched with the tumor shape and size, avoiding the production of neutrons, and leads to much less leakage dose even than that produced by conventional photon therapy [5,24].

Today proton therapy can be effectively applied for many cancer types and sites, and more accurate than photons in the tumor control and/or healthy organs complications probability. Target dose distribution can be shaped with protons by using fewer radiation beams than with photons; furthermore, the use of intensity modulated proton therapy and scanning proton beam technology make proton therapy more accurate and advanced. On the other hand, improving and shaping the dose distribution of photons has a limit because the total dose deposited inside the patient and thus to the healthy tissues cannot be decreased but only distributed differently. Various dosimetric studies indicate clearly maximum normal tissues sparing with protons [25–29].

Proton therapy is specifically ideal for concave- shaped tumors, or tumors located close to the critical structures [30], and particularly valuable for tumor cells located near from the serially-organized tissues (where a significant complication may be caused by only small local overdose). However, there are some cases and treatment sites where the proton advantages are marginal [31].

Proton therapy is proven to reduce the overall normal tissues dose (i.e. induces reduction of the secondary effects- the risk of second malignancies) and to improve the overall quality of life [31]. The decrease of the total absorbed radiation energy (2-3 times) in the pediatric patient with proton therapy is most significant [32]. Treatment of the cranio-spinal cases with proton can minimize significantly the dose delivered to the thyroid glands. On the other hand, the treatment of medulloblastoma (i.e. cancer cells originate in the medulla and spreads into the cerebellum) with photon therapy induce a significant dose to the lung, heart, abdominal tissues, and organ at risk located in the cranium, while these side effects can be largely avoided utilizing protons [33–36]. In some cases, proton therapy

is the only technique of treatment with no alternative. Proton therapy in oncology has become a real alternative to surgery.

Traditionally, proton therapy in the world uses the Bragg peak, in which a proton beam with an energy of 100 - 200 MeV is completely absorbed at distances determined by the proton beam energy and the position (depth) of the Bragg peak. The main disadvantage of this technique includes a sufficiently large damage to healthy patient tissue as compared with the result of exposure with other heavy ions. The dose in healthy tissues depends on the size of the tumor and ranges from 20% to 60% of the dose in the tumor.

Study of the effect of protons with an energy of 1 GeV on DNA will also significantly expand the understanding of the processes that occur when using the Gatchina method for stereotactic proton therapy that will be discussed in the following section. During the entire duration of the irradiation of patients, there was not a single case of damage to the optic nerve located just a few millimeters from the irradiated object (pituitary gland).

1.2.2. Proton therapy on a proton beam of energy 1 GeV (PNPI SC-1000 MeV)

The relevance of the work of the PNPI SC-1000 MeV of proton beam is not limited to the study of the radiobiological effects of cosmic radiation (i.e. proton component) on the cosmonaut's body. The fact is that since 1975, there has been a medical center for stereotactic proton therapy on the basis of the PNPI synchrocyclotron, in which, together with the Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies (RSC RST), research and treatment of brain diseases are successfully carried out. This center is the only center in the world that uses a beam of protons of such high energies. During their pass through an irradiated object, protons with an energy of 1000 MeV practically do not scatter. The length of their absorption in water (of which biological tissue mainly consists) is 3.24 m and protons fly through the target with a slight loss of energy. This method is called in the literature as the "Gatchina method".

In proton irradiation, a constant movement of the irradiated object around two rotation axes located in different planes is used. The center of these rotations is the irradiated tumor, in which the maximum radiation dose is reached, since it is always in the irradiation zone, at the same time, neighboring tissues receive a significantly lower dose

load. This method allows you to create a high gradient of the distribution of the dose field in healthy tissues and tumors (1: 200). Such values are not achievable in the widely used method of gamma therapy. Since 1975, 1394 patients have been exposed to protons. It should be emphasized that after conducting the proton therapy sessions, none of the patients revealed radiation complications when observed up to 10 years [37,38].



Fig 1.4 Hall of the irradiation complex of proton therapy [39].

DNA irradiation experiments were also carried out on the medical channel of the synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics NRC "Kurchatov Institute" SC-1000.

Medical proton tract of the synchrocyclotron: Unlike other Russian and foreign proton therapy centers that use proton therapy at the Bragg peak, at the PNPI synchrocyclotron uses a unique irradiation technique; irradiating intracranial targets with protons with an energy of 1000 MeV all the time in combination with a movable irradiation technique.

Granov et al [37], studied the proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas, where 465 patients with these diseases have been irradiated with proton energy 1000 MeV on the PNPI synchrocyclotron. The treatment of pituitary endosellar adenomas with proton radiosurgery is highly effective, safe, and sometimes, is the only method. Generally, the high energy proton beam (1000 MeV) has low scattering properties and can form high edge gradient dose field in the irradiated target, therefore it is more appropriate for the treatment of the intra-cranium targets located close to the critical parts of the brain [40].

The principle of the installation's operation is based on the specific properties of the interaction of proton beams with matter, including human tissues, which are shown as following;

- The scattering of a proton beam in the medium is much less than that of electron beams and gamma rays, therefore healthy tissues and structures located on the side of the proton beam path are not damaged;
- During the proton beam irradiation, better deep-dose distributions are created with high gradients at the edges of the dose fields, which allows the use of higher absorbed doses, fractionated irradiation with minimal radiation loads on healthy tissues.

The scheme of the medical proton tract of the PNPI Synchrocyclotron "Kurchatov Institute" is presented in Fig 1.5, and the main parameters of the medical beam indicated in Table 1.1, [40–42].

Table 1.1 Parameters of the medical proton beam.

Parameters	value
Proton energy	1000 MeV
Intensity	10^9 sec^{-1}
Beam size, half maximum width	5-10 mm
Maximum absorbed dose rate	50 Gy/min
Edge gradient of the dose field from 70% to 10%	20%/mm
The dose ratio in the center and on the surface of the head.	200:1

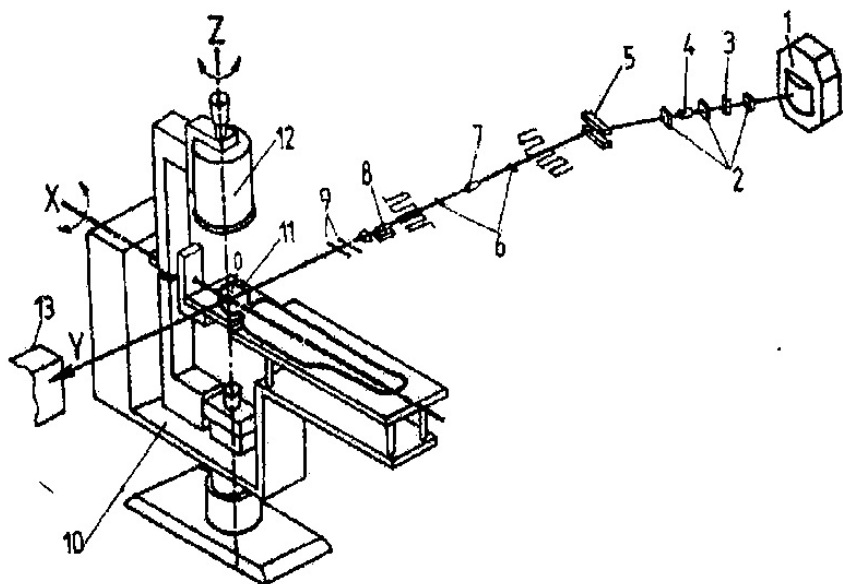


Fig 1.5 The scheme of the medical proton tract of the Synchrocyclotron NRC "Kurchatov Institute"-PNPI; 1- synchrocyclotron, 2- profilometers in the accelerator hall, 3- magnetic corrector, 4- collimator, 5- deflecting magnet SP-40, 6- profilometers of the experimental hall, 7- anti-collimator, 8- doublet of quadrupole lenses, 9- multiwire cameras for determining the beam profile and monitoring its parameters in the irradiation hall, 10- installation for stereotactic therapy (SPST), 11- patient head fixation device, 12- X-ray centralizer with fixed rotation angles, and 13- proton beam absorber.

The complex meets the requirements of the European Group for Clinical Dosimetry (European Clinical Heavy Particle Dosimetry Group) and the International Commission on Radiation Units and Measurements -ICRU.REPORT59.

2. Irradiation and dosimetry of biological samples with a proton beam of 1 GeV and gamma rays.

2.1. DNA irradiation on the medical beam of PNPI synchrocyclotron

To provide stereotactic irradiation on the medical tract there is a set of equipment that allows you to accurately center the proton beam exactly in the target zone. This is achieved by displacing the object around two axes of rotation located in different planes. In this case, the tumor located in the center of rotation is always in the irradiation zone, while neighboring tissues receive a significantly lower dose. The main element of the installation is the table on which the patient is placed, who performs pendulum-like swings in the horizontal plane in the range of $\pm 40^\circ$.

To simulate the effect of the proton component of cosmic rays on the genetic apparatus of cells at the SC-1000 synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics NRC « Kurchatov Institute », a special radiation technology and dosimetry technique have been developed that use the capabilities of technological equipment of the proton therapy complex.

During irradiation in this work, the irradiated target with DNA samples was placed on the patient's table, and the target position was adjusted by the system for moving and adjusting the table.

Physico-technical conditions of irradiation were similar in all cases. The beam has a size of 15-20 mm. Irradiation is single, and the maximum absorbed dose varies with the specific task from 4 to 120 Gy. The dose fields characteristic of this irradiation technique are characterized by a pronounced maximum absorbed dose in the center. Isodoses from 90% to 30% have a shape close to the shape of an ellipse. Before each irradiation, a beam shape is measured. For this purpose, packages with photographic paper are placed in the future site of irradiation, and carried out their “illumination” under the effect of the proton beam during 1 minute (“illumination” is the output of the proton beam for the time that

you set, and this time is enough to get a clear image of the beam on the photo paper), then photo paper appears.



Fig 2.1 The radiation hall of the proton therapy complex [39]. 1 - drive of the 2-axis moving device of the treatment table, 2 - telescopic lift, 3 - electric drive of rotation around the vertical axis Z, 4 - deck of the head fixing device (HFD), 5 – front drive of the (HFD), 6 - deck of the treatment table, 7 - mask for fixing the patient's head, 8 - racks with blocks of the CTPS control system, 9 - block of the X-ray tube of the X-ray centralizer (RC), 10 - block of the RC tube, 11 - U-shaped rocker of the RC, 12 - isocenter simulator.

The beam focusing is checked using a semiconductor detector, which is first placed in the plane of the beginning of the target, and then moved along the beam in the plane of the target's end. An example of scanning the beam cross section with a semiconductor detector is shown in [Fig 2.2](#).

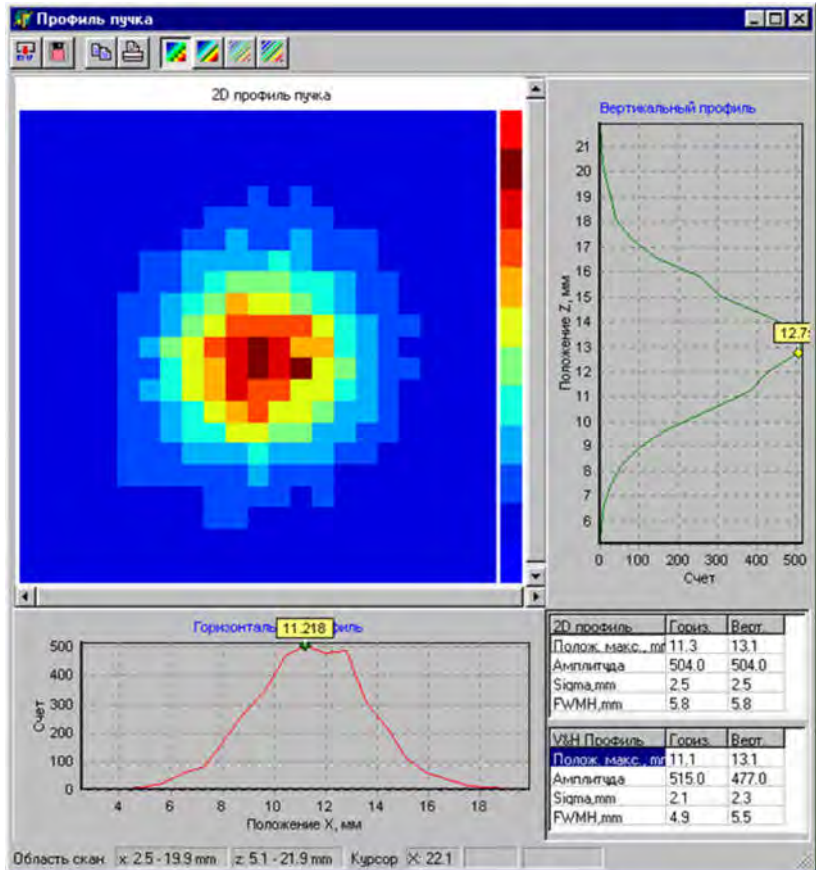


Fig 2.2 An example of scanning the cross section of a beam by a semiconductor detector.

Multi-wire proportional cameras- profilometers, a beam scanner and a two-channel absorbed dose monitoring system are installed on the proton tract in the irradiation hall. At each irradiation, the ionization chambers were checked for leakage currents.

Beam profile and intensity calibration was carried out using the proton beam ionization monitor developed at the PNPI NRC KI. This proton beam monitor allows you to measure the number of protons in real time without pre-calibration. The parameters of

an ionization monitor with a profilometer function for measuring the absolute values of proton fluxes and their density distribution in the cross section are studied in detail [43,44].

The monitor detector is a two-section ionization chamber with sections that differ in the size of interelectrode gaps and are filled with air at atmospheric pressure. In the continuous beam output mode, the monitor allows you to determine the number of protons and the average value of the proton flux, as well as calculate the number of protons in a single pulse of the proton beam. The error in measuring the number of protons in the flow range $10^6 - 5 \cdot 10^9 \text{ Sec}^{-1}$ is no more than 5%.

To monitor the radiation parameters of the accelerator proton beam, a standard set of equipment was used: a UNIDOS weblin dosimeter, as well as PinPoint ionization chambers of 0.03 cm^3 and 0.015 cm^3 . The doses used at a dose rate of 4 Gy/min were monitored using a universal PTW Unidos dosimeter.

2.2. Irradiation of DNA with gamma rays at the NRC KI (PNPI)

To compare the effectiveness of DNA damage by protons with DNA damage by gamma radiation, irradiation was carried out at the Researcher facility, Department of Molecular and Radiation Biophysics, NRC « Kurchatov Institute »- PNPI named. B.P. Konstantinova.

In this installation, a ^{60}Co source was used as a source of gamma quanta. The decay scheme of ^{60}Co is shown in Fig 2.3. The dose rate used was 41.2 Gy / min, 85 Gy / min, 119 Gy / min.

The installation uses a fixed source of gamma radiation with "local" protection. In it, the irradiated object is installed in the working chamber and moves to the irradiator using the lifting and lowering mechanism.

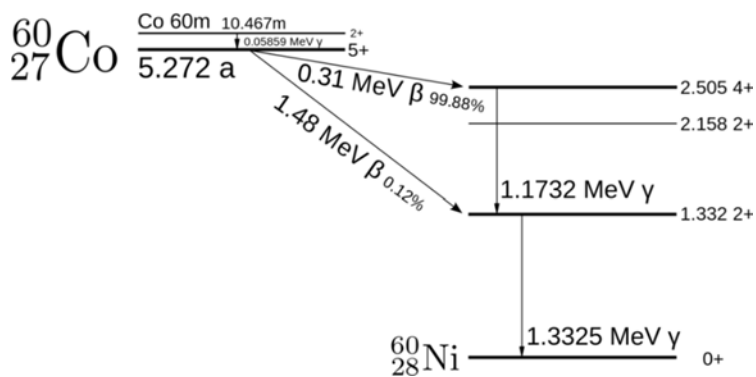


Fig 2.3 ^{60}Co decay scheme

3. The effect of ionizing radiation on DNA (review)

3.1. Energy absorption of ionizing radiation

The passage of ionizing radiation through a substance (i.e., radiation with a particle energy exceeding the ionization potential $I \approx 12$ eV for a hydrogen atom) causes a variety of physico-chemical processes that depend on the nature and energy of the radiation, the composition of the target substance, and the absorbed energy.

Changes in a substance can be caused only by the part of radiation energy that is absorbed by this substance; the energy of radiation that is reflected or passes through the substance has no effect (Grotthus principle) [13]. The absorbed dose of radiation is defined as;

$$D_r = \frac{d\bar{E}}{dm}$$

Where $d\bar{E}$ is the by average energy imparted ionizing radiation to a substance in an elementary volume, and dm is the mass of the substance in this volume. The unit of the absorbed dose in SI is 1 Gray: $1\text{Gy} = 1\text{J} / 1\text{kg}$.

The effect of ionizing radiation on a substance also depends on the linear energy transfer value (LET), which determines the average energy loss per unit path of the primary ionizing particle as [45]:

$$\text{LET} = \frac{d\bar{E}}{dx}$$

Water is taken to determine the LET value in an absorbing substance equivalent to biological objects. The minimum values of $\text{LET} = 0.2\text{--}0.3$ keV / μm are characteristic of photon radiation with a quantum energy above 0.5 MeV [13,14]. During the passage of ionizing radiation through a matter, energy absorption occurs only in single sparsely scattered microvolumes, since the energy exchange between radiation and the atoms of the absorber is of a discrete stochastic character.

Absorption of photon radiation Photon radiation includes X-ray radiation (its sources are X-ray tubes, quantum energy $h\nu \sim 12 \text{ eV} - 100 \text{ keV}$), γ -radiation (arising from the change in the energy state of the atomic nucleus, the decay of elementary particles and annihilation of particle pairs, $h\nu \sim 10 \text{ keV} - 1 \text{ GeV}$), cosmic radiation and synchrotron radiation (a wide range of photon energies) [4,13]. Photon energy is absorbed by matter as a result of one of the following processes: photoelectric effect, Compton effect and the production of electron-positron pairs. The probabilities of these processes depend on the photon energy (Fig 3.1). Consequently, an electron possessing a reserve kinetic energy (the so-called primary electron) is ejected from an atom of the absorbing substance, and the atom turns into a positive ion. Each primary electron from the moment of its release to the capture by an atom of a substance repeatedly interacts with atoms located along its path, generating secondary electrons, which, in turn, induce further ionization and excitation of atoms of the substance. Primary ionization under the action of photon radiation is negligible compared to the number of ionized and excited atoms that arise as a result of the interaction of primary and secondary electrons with matter [13] (Fig 3.2). Therefore, photons with energy $h\nu > 12 \text{ eV}$ are indirectly ionizing radiation that release directly ionizing particles in the substance - high energy electrons. Another example of indirectly ionizing radiation is neutrons, which, as a result of interaction with the atomic nuclei of an absorber substance, cause the appearance of accelerated nuclei (recoil nuclei), which, moving in the substance, produce further ionization and excitation of atoms [13].

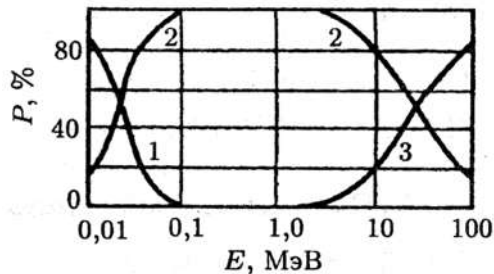


Fig 3.1 The relative frequency P of the electrons pair production by photons (in carbon) depending on the photon energy: 1-photoeffect, 2-Compton effect, 3-pair production [13].

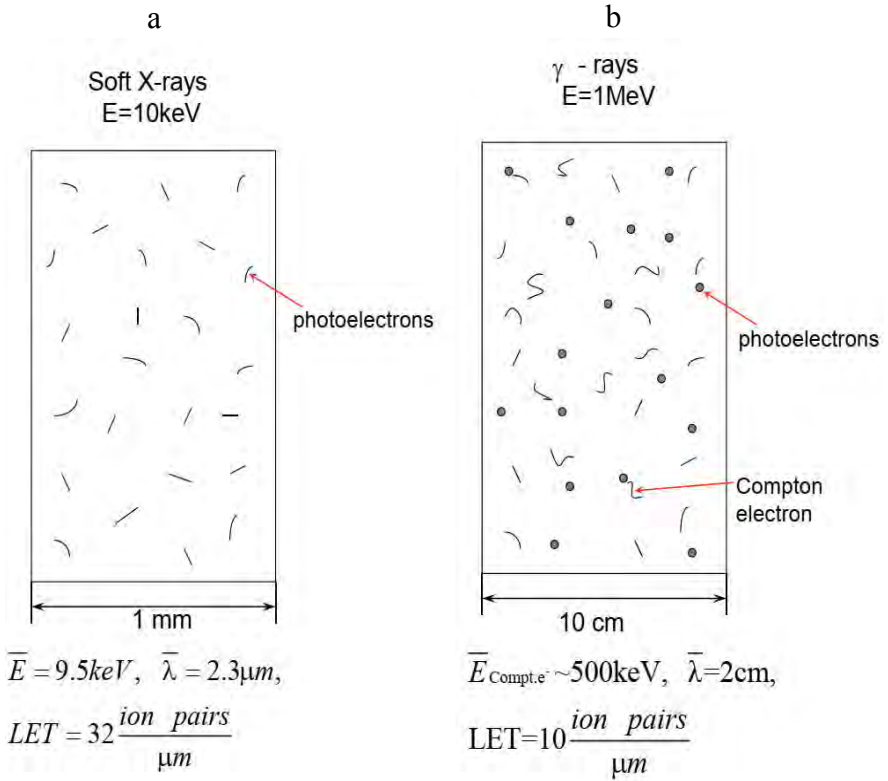


Fig 3.2 The nature of the ionization of matter by photons of soft x-ray (a) and hard γ -radiation (b); The parameters of Compton and photoelectrons are indicated. [13], with changes.

Energy absorption of accelerated charged particles Accelerated charged particles that irradiate a substance, or that originated in the substance during the passage of indirectly ionizing radiation, interact with the electronic shells of the atoms of the absorbent substance and cause ionization or excitation of the atoms. An accelerated charged particle can be considered as a source of an electric field moving in space; it causes a temporary perturbation of each atom near which it passes, and transmits to the atom the greater the energy, the greater the charge of the particle and the longer it stays near this atom.

The energy loss of the charged particle per unit path length is determined from the Bethe-Bloch equation [13]:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 z^2 N Z}{m v^2} \left[\ln \frac{2 m v^2}{I_0} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 \right], \quad (3.1)$$

where e is the electron charge, v is the particle velocity, N is the number of atoms in 1 cm^3 of substance, Z is the average number of electrons in the atom of the absorber substance, i.e. "effective" atomic number, z is the particle charge in units of elementary charge, $\beta = \frac{v}{c}$ is the ratio of the speed of a charged particle to the speed of light, I_0 is the average ionization potential of atoms of a substance, determined experimentally.

It can be seen from equation (3.1) that the LET of a charged particle depends on the velocity as $\frac{1}{v^2}$, therefore, as $v \rightarrow 0$, infinitely large energy losses can be expected. In reality, this does not happen due to the decrease in the particle charge during its deceleration. So, for example, an α -particle at low speeds captures an electron and then moves as a helium ion He^+ , while at a lower speed, another electron is captured, and a neutral helium atom is formed - the charged particle ceases to exist. The characteristic dependence of the LET of a charged particle on the path length in the substance is shown in Fig 1.3; the sharp increase in energy loss at the end of the particle path, as already mentioned, is known as the Bragg peak.

In this work, we study the effect of protons with an energy of 1 GeV on aqueous DNA solutions. Here 1 GeV is the kinetic energy of a moving proton (E_{kin}). The total energy of a particle moving at a speed close to the speed of light is calculated by the formula [46]:

$$E_{\text{total}} = \frac{mc^2}{\sqrt{1 - \beta^2}} = E_{\text{rest}} + E_{\text{kin}} \quad (3.2)$$

The rest energy of a particle is $E_{\text{rest}} = mc^2$. For the proton, $E_{\text{rest}} = 0.938 \text{ GeV}$. Substituting the E_{rest} and E_{kin} of the proton in the formula (3.2), we find $\beta^2 = 0.766$, $\beta = 0.875$. Thus, the proton velocity in the beam is $2.62 \times 10^8 \text{ m/sec}$. In the Bethe Bloch

equation (3.1), we substitute the obtained values of β and v ; the proton charge $z = 1$, for the absorber (water) $I_0 = 15 \text{ eV}$ [13] and the average number of electrons in $1 \text{ cm}^3 \text{ NZ} = 3.3 \times 10^{23}$ (all values must be expressed in CGS units). The calculation gives the LET of $\approx 0.3 \text{ keV} / \mu\text{m}$.

The track of a heavy charged particle in a substance is almost straightforward. Along the particle path, excited atoms and ion-electron pairs (primary ionizations) arise, which then generate secondary ionizations. These clusters are called the "swarm of ions" or "spur" [13]. Spur is a sphere with a diameter of 1-2 nm in liquids and contains either a single pair of charges or several particles (on average 2-3 ions and 2-3 excited molecules) [47].

The distance between the spurs depends on the type of incident particle and its energy. Due to the close location and low kinetic energies of ions and electrons in the spurs, the probability of their recombination is high. In addition to slow electrons, the ionizing particle is able to eject fast electrons (the so-called δ -electrons, with an energy of more than 100 eV) that leave the spur (Fig 3.3). The LET of these fast electrons may be greater than the LET of the initial particle. The track length of a δ -electron can also exceed the track length of a heavy particle. The portion of δ -electron record about 25% of all ionization caused by the primary particle [13,48]. Secondary electrons with energies from 100 to 500 eV form local ionization regions that contain up to 20 ions - the so-called blobs. Here, secondary electrons give rise to tertiary electrons, tertiary - fourth-generation electrons, etc., which are characterized by very small ranges and, obviously, cannot go far from their place of formation. If the energy of the secondary electrons is 500–5000 eV, then the overlap of the resulting spurs creates a structure with cylindrical symmetry called a "short track". The probability of recombination of ions and electrons in blobs is very high. Electrons with an energy of $\sim 5 \text{ keV}$ form branched tracks, similar in structure to the main track. Here the spurs are located far from each other [47].

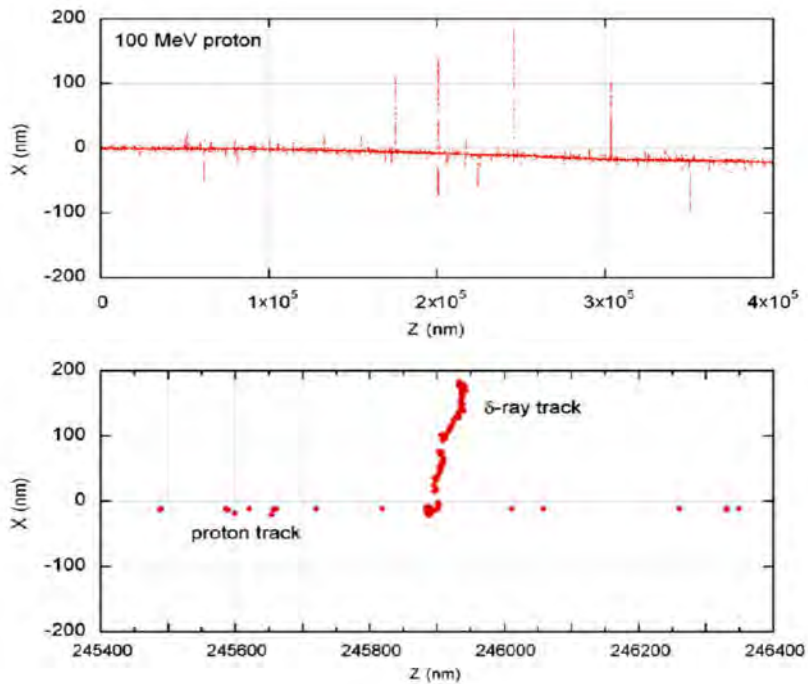


Fig 3.3 Two-dimensional representation of a part of the proton track with an energy of 100 MeV (upper graph) and the track of a high-energy δ -electron knocked out of an atom by a proton. The red points indicate the ionized and excited atoms [48].



Fig 3.4 The spatial distribution of ions and excited atoms along the track of an accelerated electron [47].

For heavy charged particles, the track structure is the same as for fast electrons. However, in this case, the spurs are located very close to each other. Therefore, they immediately after their formation merge into a continuous cylindrical column (columnar ionization) [47].

Ionizing radiation is divided into sparsely and densely ionizing (with low and high LET, respectively). The separation value of LET between them is taken equal to 10 keV/ μ m [14]. Fig 3.5 shows the dependence of relative biological efficiency on LET radiation. At LET <10 keV / μ m RBE \approx 1. At LET \sim 100 keV / μ m, RBE reaches a maximum, and with further increase of LET, the relative biological efficiency of radiation decreases. This is due to the fact that even at LET = 100 keV / μ m, a critical number of ionizations occurs in the cell, which leads to cell death. Therefore, increasing the ionization density does not give any additional contribution to cell damage (the so-called "overkill effect") [13,49].

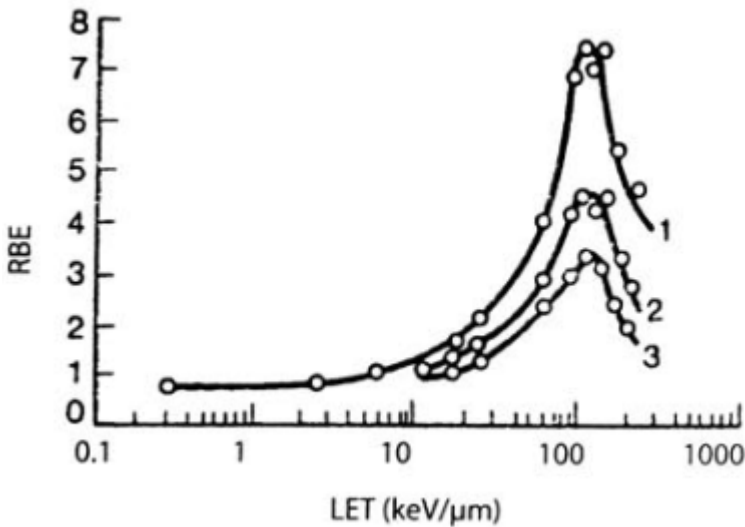


Fig 3.5 Dependence of RBE radiation on LET according to the criterion of human kidney cell survival in culture: curves 1, 2, 3 correspond to the percentage of survived cells of 0.8, 0.1 and 0.01, respectively [13].

The LET values of different types of ionizing radiation are given in [Table 3.1](#).

Table 3.1 Approximate LET values and RBE of different radiation types [5,14]		
Radiation type	LET(keV/μm)	RBE
250 keV X rays(standard)	2	1
Cobalt-60 γ -rays (1.17–133 MeV)	0.2- 0.3	0.8-0.9
3 MeV X rays	0.3	-
Linac X-rays (6-15 MeV)	0.3	~0.8
1 keV electrons	12.3	-
10 keV electrons	2.3	-
1 MeV electrons	0.25-0.3	0.9
Neutron 2.5 MeV	20	-
Neutron 14 MeV	12	-
Neutron 19 MeV	7	-
Neutrons	0.5-100	1-2
Proton 2 MeV	16	-
Proton 150 MeV (therapy energies)	0.5	~1.1
Alpha particles	50-200	5-10
Carbon ions (in spread out Bragg peak)	40-90	2-5

So, the energy of ionizing radiation is transferred to the substance in discrete portions, causing ionization and excitation of the atoms of the substance. For the formation of 1 pair of ions in biological tissue, an average energy of 33.7 eV is needed [5]. However, experiments have shown that the most probable value of the “energy packet” transmitted to a substance by ionizing radiation is 22 eV, and the average amount of energy loss per interaction event is 60 eV [13].

The transfer of radiation energy to matter, the appearance of excited and ionized atoms and molecules that are unevenly distributed in the volume of matter, occurs in the first 10^{-16} - 10^{-13} sec after the passage of radiation. This is the so-called physical stage of radiation action. The next physical and chemical stage includes various reactions leading to the redistribution of the excess energy of ionized and excited molecules of the substance. It lasts 10^{-13} - 10^{-10} sec, and as a result, a variety of reactive products (ions, radicals) are formed. At the next chemical stage of the radiation action (for 10^{-6} - 10^{-3} sec), ions and radicals interact with each other and with surrounding molecules, resulting in the formation of stable products [13].

3.2. DNA structure

One of the vital structures inside each cell in the body is the deoxyribonucleic acid (DNA). In this macromolecule the genetic material is represented to be utilized during the reproduction, functioning, and development of the cell [13,14,50–53]. The DNA is considered the critical target of ionizing radiation induced mutations and cell killing because of its fundamental role [54–60].

The DNA molecule is a polymer combined by two twisted strands composing a double helix of diameter 2 nm approximately. The total length of DNA in one human cell is about 2 m [61].

The main element of each DNA strand is the nucleotide which consists of nitrogen bases (purines: adenine (A) and guanine (G), and pyrimidines: thymine (T) and cytosine (C)) and a sugar phosphate backbone (forming the base of the helix). Nitrogen bases form complementary pairs A – T and G – C; two hydrogen bonds are formed between adenine and thymine, and three are formed between cytosine and guanine [54–58]. The structure of the DNA double helix is similar to a ladder, in which base pairs form the steps of the ladder, and sugar-phosphate groups make up the vertical side parts of the ladder (Fig 3.6).

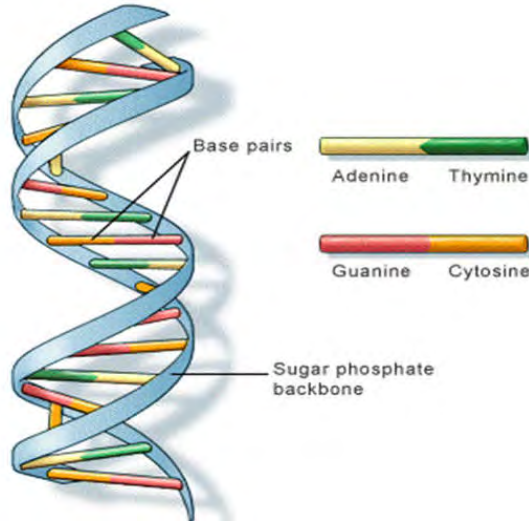


Fig 3.6 Schematic representation of the DNA structure [62].

There are different forms of the secondary DNA structure that differ in the conformation of the sugar-phosphate backbone and the parameters of the double helix.

- The most common and ordinary form of the DNA inside the cell is the B-form (under normal conditions: low salt concentration and high humidity). The B-DNA pairs of nitrogenous bases are almost perpendicular to the axis of the helix, with about 10 pairs per each helix step.

- When the water content decreases in the presence of certain cations, the DNA transforms from B-form to A-form. The double helix in the A-form is more twisted, and the conformation is more compact and shorter than the B-DNA. The A-form is also formed when a heteroduplex is formed, one strand in which is DNA and the other is RNA.

- Finally, the Z-form of DNA was performed by increasing the salt contents in the sequences with the repetition of pyrimidine purines. Unlike A and B forms of DNA, Z-DNA is a left-handed double helical structure. The Z-form is longer and less twisted than the B-form, and its sugar-phosphate backbone forms a “zigzag” [63].

RNA also exists in the cell, which performs various functions in the process of protein biosynthesis. The primary structure of RNA differs from the primary structure of DNA in that thymine is replaced by uracil in RNA, and sugar is represented by ribose [63].

3.3. The cell cycle and radiation cell death

The cell cycle consists of two periods, the first- interphase (G1, S, and G2), corresponds to 90% of the cell life time in which the cell is growing. During this phase the DNA is unwound and the cell will do a copy of it. After doubling the DNA located in the nucleus is linked to its copy by an element known as centromere. The second cell period is the mitosis M, during which the cell division occurs. During this stage, the cell cycle is relatively short, complex and highly regulated, and the DNA is wound into chromosomes. Generally, cell grows until it reaches a specific size, then it divides. The time between consecutive divisions is known as cell cycle time [14,61].

Between the different phases of the cell cycle there are checkpoints that entirely arrest the cell (as observed between G1/S-phase and G2/M phase) or just slow down the succession through the intra S-Phase in order the cells get the time to maintenance their DNA damage [64].

The radiosensitivity of a cell varies during the different phases of the cell cycle. In general, the cell is most radiosensitive in the mitotic Phase M and stage G2 and most radioresistance in the interphase S and late G1 stage [65]. The radioresistance of the phase S is due to the existence of large quantities of synthesis DNA enzymes, which acquire high ability to quickly repair damaged DNA [52]. Furthermore, the topology of chromatin structure through the different cell cycle period plays an important role in the cell radiosensitivity. In the phase G1 the DNA has a highly opened chromatin structure that makes the reparation process of the DNA lesion relatively easy. On the other hand, the chromatin structure is compact in G2/M phases leads to less repair efficient and then higher sensitivity [65–67].

To characterize the radiosensitivity of various biological objects, the D_{37} value is used - this is the radiation dose at which 37% of the objects survive (remain inactive), that

is, the number of living, unaffected objects N is e times less than the initial number of objects N_0 : $\frac{N}{N_0} = e^{-1} = 0.37$. D_{37} is said to be the standard for radiosensitivity (higher radiosensitivity means lower D_{37} values). Comparing the dose-effect curves makes it possible to obtain radiosensitivity of various biological structures [13].

The cells of malignant tumors are quickly and continuously divided with cell cycle time shorter than that of normal cell, therefore cancer cells are more sensitive to radiation (where their DNA damage has not enough time to repair between the sequence divisions as compared with the normal cell) [14,52].

3.4. Direct and indirect action of radiation

At the end of the chemical stage of radiation action, damage to various molecules and intracellular structures is formed in the cell, which lead to functional disorders and responses of the cell and, in general, of the body. These reactions constitute the biological stage of the radiation action, which extends from a few seconds to many years. The biological influences of ionizing radiation result mainly from the damage to DNA- the critical target inside the cell [54–60]; however, there are also other sites in cells (Cell membranes) that, when inactivated, induce cell death. When ionizing radiation is deposited in biological structure, the cell or DNA damage may occur directly or indirectly [14] as following;

- **Direct action** occurs when ionizing radiation (primary or secondary particles) directly interacts with atoms of a critical target (DNA), causing excitation or ionization [5,68]. About quarter to third of all biological damage to macromolecules formed in irradiated cells is due to the direct effect of radiation with low LET. The direct action arises to approximately 100% for radiation with high LET. Thus, direct action is the predominant process for radiation with high LET [5,52,57]. Proteins damage in the cell does not seem to be significant.

- **In indirect action** the ionizing radiation interacts with other atoms or molecules than the DNA in the cell, particularly water molecules (since the human body consists

mainly of water, approximately 70-80 %), with the formation of short-lived and extremely reactive ions and free radicals (including reactive nitrogen species-RNS and reactive oxygen species-ROS) in a process known as water radiolysis [5,52,57,69–71].

A schematic diagram of the direct and indirect effects of radiation is shown in Fig 3.7. Free radicals have unpaired electrons on their outer shells, therefore they have high chemical reactivity and are able to diffuse far enough to react with DNA.

The main free radicals produced in the process of water radiolysis are e_{aq}^- , OH^\bullet and H^\bullet , while the most reactive one to DNA is the hydroxyl free radical (OH^\bullet) that has average lifetime 10^{-6} sec and diffusion distance around 1 nm. It is evidence to note that any OH^\bullet free radicals generated through a cylinder of diameter about 4nm and around DNA double helix have the ability to spread out to the DNA and induce damage [57,72]

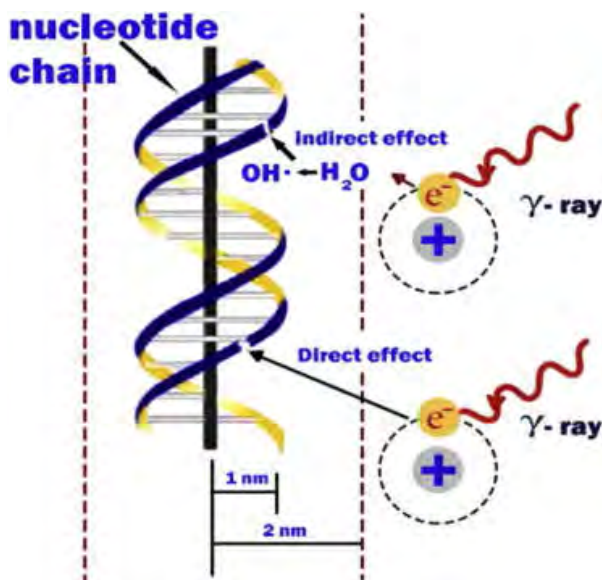


Fig 3.7 Direct and indirect actions of radiation (modified from Hall & Giaccia, 2011)[70].

About two thirds of all radiation damage caused in the biological macromolecules is due to the indirect action of sparsely ionizing radiation (with low LET) and is mediated by free radicals, but this action reduces to approximately zero when exposed to radiation with high LET. Therefore, indirect action is the predominant process for low LET radiation [5,52,57]. Indirect action of radiation can be modified by radiation protectors or chemical sensitizers [57].

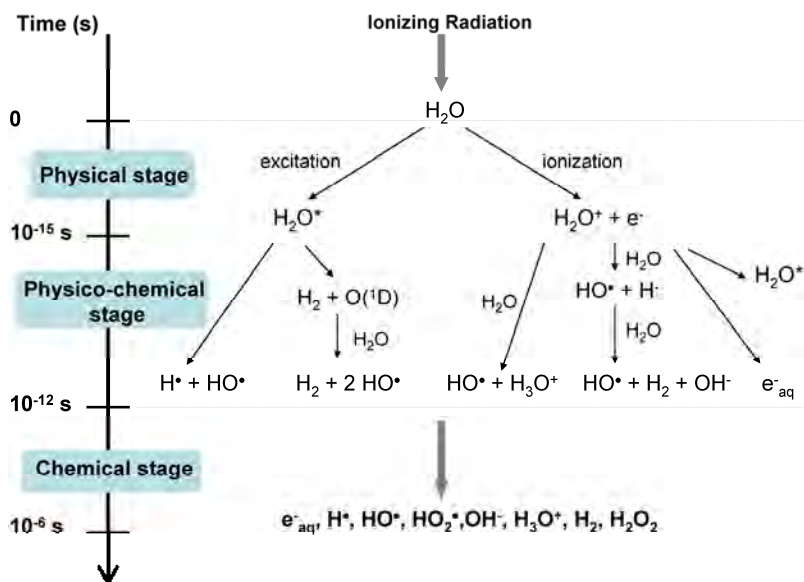


Fig 3.8 Main reactions occurring during the three stages of water radiolysis [71].

3.5. Radiation damage in the DNA structure

The study of the physicochemical basis of DNA damage caused by ionizing radiation of various types and intensities depending on environmental conditions is crucial for the development of radiation safety and radiation therapy methods. Radiation damage in the DNA structure can be divided into two groups. The first group consists of single-site or

single lesions, such as single-strand breaks (SSB), base modifications, base release (which results in sites without a purine or a pyrimidine). The second group includes local multiple damage (LMD), such as cluster DNA damage (two or more closely spaced single-site lesions), double-stranded DNA breaks (DSB), intermolecular DNA-protein and DNA-DNA crosslinking [13,49,73].

All these damages are recorded during irradiation of DNA in living cells and in model systems - solutions, films, dried samples of macromolecules. The formation of single lesions in DNA is predominantly the result of the indirect effects of radiation, while LMD are caused mainly by the direct effects of radiation.

Single-strand break (SSB): the break in the sugar-phosphate backbone of one of the complementary chains (Fig 3.9). Such damage may be accompanied by a release of the nitrogen base. A break in one of the DNA strands has little effect on cell survival, because DNA is easily repaired by using an undisturbed complementary strand as a template. If the reparation does not occur correctly (repair with errors), this can lead to a mutation [5,57].

Double strand break (DSB): includes the breaking of both strands of the DNA molecule. If these breaks in both strands are separated enough, the DNA repair again occurs readily typically as in the case of single strand break (where the two breaks are treated separately) (Fig 3.9). By contrast, if these breaks are opposite to each other, or separated by only few base pairs within a region of around 10-20 base pairs, neither the chromatin nor the hydrogen bonds can retain the two strands together and result in a double strand break (DSB)- the chromatin piece snaps into two pieces [5,57,74].

It is believed that the DSB is the most significant DNA damage (the major contributor to cytotoxicity), and is rarely repaired or misrepaired, resulting in cell death, mutations, and chromosome aberrations, or carcinogenesis [5,57,75–77]. Practically, DSB in the DNA induced by ionizing radiation can be the result of free radicals in each of the complementary DNA strands or may be the result of direct ionization of both DNA strands or a mixture of them [57,72]. Furthermore, it was proposed that the enzymatic activity in the cell could transform nearby spaced single lesions in the DNA molecule into DSB

[78,79]. The amount of DSBs induced in the cell is sometimes used to determine the biological response and degree of radiation exposure [77].

Base modification: is one of the most common types of radiation damage to DNA (Fig 3.9). About 70-85% of these modifications during γ -irradiation of cells are the result of the interaction of DNA with OH^\bullet radicals and superoxide anion radicals $\text{O}_2^{\bullet-}$ (they are formed upon irradiation in an aqueous medium in the presence of molecular oxygen) [73,80]. Therefore, the level of oxygen and radical scavengers in the irradiated systems has a strong influence on the yield of damaged bases in the DNA. The radiosensitivity of the free DNA bases decreases in the following order: $\text{T} > \text{C} > \text{A} > \text{G}$ [81]. During irradiation of nucleotides, nucleosides and nucleic acids as nucleobases, qualitatively the same changes are observed as in their free state. Quantitatively, the degree of degradation of the bases decreases in the sequence: free bases > nucleosides > nucleotides > nucleotide diphosphates > bases in single-stranded DNA > bases in double-stranded DNA > bases in DNA as part of chromatin [49,82–84].

Locally multiple damage (LMD). The formation of LMD in DNA plays a major role in radiation death, the occurrence of mutations and cell transformation. The formation of a significant part of the LMD of DNA is due to the direct effect of radiation. The mechanisms leading to the formation of most LMDs are based on the occurrence of cluster damage as a result of the passage of an ionizing particle track within the local volume of the target- the DNA molecule (direct action), as well as the attack of a DNA region by a variety of free radicals (indirect action) [13].

Since the concentration of radicals in a hole is higher for densely ionizing particle than for rarely ionizing particle, the amount of DNA LMD increases with the increase in LET of radiation [85]. LMDs typically include DSB, SSB, nitrogen base modifications, intermolecular crosslinking, and other damages. Such lesions cover longer or shorter lengths of DNA, and single-stranded regions can be formed within them as a result of the loss of oligonucleotides from one strand while maintaining the integrity of the second. It has been shown that LMDs, including DSB, can arise as a result of at least two ionization events in a 1.5–3 nm DNA region [73]. Heavy charged ions with high LET can induce LMD, covering the double helix region up to 40 base pairs or more.

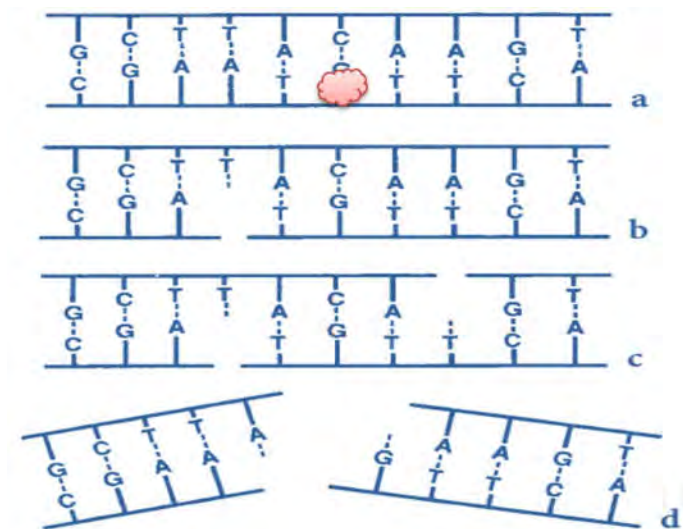


Fig 3.9 Scheme of the formation of some types of radiation damage in DNA: a - base modification, b - SSB, c - two closely spaced SSBs, d - DSB [57].

Intermolecular crosslinking. Crosslinking of DNA-DNA are usually formed in small amounts when the cells are irradiated with biologically significant doses, in contrast to crosslinking of DNA-protein. DNA-DNA cross-linking can often occur during irradiating model systems - concentrated solutions, films, dried samples. Their occurrence is usually detected by an increase in the molecular weight of the irradiated DNA [73].

DNA- protein crosslinking occurs when the cells are irradiated. Generally, highly purified DNA from many cells of higher organisms contains about 0.2–0.5% of strongly bound protein. When the DNA is isolated from irradiated cells, an increase in the content of such a protein is detected. This indicates the formation of strong covalent bonds - DNA-protein crosslinking (DNA-PC). These bonds are formed mainly between the bases of the DNA and individual amino acids of protein, for example: thymine – aliphatic amino acids, cytosine – tyrosine, etc. The radiation yield of DNA-PC substantially depends on the cell division rate and the cell cycle phase. Obviously, the DNA packing density in the

composition of nuclear chromatin affects the DNA-PC yield. The distribution of DNA-PC is not the same in different parts of the chromatin: if, in General, about 150 DNA-PC/1 Gy are formed per cell, then in some parts of the condensed chromatin, an excess of the average value of these damages of 5 times or more is recorded, while in the transcription sites the number of DNA-PC is much lower than the average [73].

Histones carry a positive charge and interact with the DNA in chromatin electrostatically. Therefore, in irradiated cells, DNA crosslinking with histones is observed mainly. The yield of DNA-PC increases with the increase in radiation LET [73,86].

The break of hydrogen bonds (radiation denaturation) [13]. In places where any damage to the primary structure of DNA occurs, a local defect of the secondary structure occurs - the breaking of hydrogen bonds. This type of damage is registered mainly by reducing the thermal stability of DNA under the influence of irradiation [73]. Sometimes other methods are used, based on the study of changes in the spectral parameters of DNA. To date, it has been established that a change in the optical density of γ -irradiated DNA solutions is caused by two factors: on the one hand, defects can occur in the secondary structure of DNA under the influence of irradiation — broken hydrogen bonds. They can lead to increased absorption. On the other hand, the destruction of nitrogenous bases leads to a decrease in the optical density of the irradiated solution [73,81].

To characterize the radiation transformations of the studied molecules, the value of the radiation-chemical yield G is introduced [13]:

$$G = \frac{\text{number of modified molecules (groups)}}{100 \text{ eV of absorbed energy}}$$

Table 3.2 shows the characteristic G values for different types of DNA damage under the effect of γ -radiation [13,81].

Table 3.2 Radiation damage to DNA γ -irradiated in an aqueous solution [13,81].

Types of radiation DNA damage	Solution composition	DNA concentration, %	$G, \frac{\text{Molecule}}{100\text{eV}}$
SSB	0.01 M NaCl	0.02	0.24
DSB	0.01 M NaCl	0.02	0.002
DNA denaturation (break of hydrogen bonds)	0.01 M NaCl	0.14	38
Break of bases:			
Thymine	0.01 M Na ₃ PO ₄	0.5	0.45
Cytosine			0.28
Guanine			0.17
Adenine			0.12
Release of bases:			
Thymine	0.01 M Na ₃ PO ₄	0.5	0.5
Cytosine			0.08
Adenine			0.07
Guanine			0.04

3.6. The effect of cosmic radiation on biological systems

The problem of assessing radiation risks in space is very complex and multifaceted. The radiation doses received by the members of the space crew depend on the flight path, its duration, and the cosmonaut's work program. It is also necessary to take into account the periods of solar activity during which the frequency and intensity of solar flares increases. The astronaut's health hazard is the accumulation of a dose of low-intensity ionizing radiation in low earth orbits, intense radiation exposure when the ship crosses the Earth's radiation belts, exposure to galactic and solar cosmic rays outside the Earth's radiation belts [2,87–93].

Therefore, special attention is paid to the study of the biological effect of cosmic rays. Numerous experiments on biological objects of different levels of organization (mammals, plants, microorganisms, cells, etc.) are carried out on satellites and space stations, as well as in terrestrial conditions, using accelerators as sources of charged particles for modeling various components of cosmic rays [1,2,87,90–92,94–100]. In addition, comprehensive medical examinations of cosmonauts who returned to Earth are carried out [87,89,90]. It should be noted that additional factors that can modify the radiation effect during space flight are weightlessness, overloads, vibration, altered composition of the gaseous medium, etc., and their influence has not yet been studied sufficiently [90,93,101,102].

A significant part of the research is devoted to the study of the biological effectiveness of heavy charged particles with high LET using different criteria of radiosensitivity [2,87,95,103–105]. Many authors note that the nature and degree of radiation damage to cells and tissues changes significantly if the particle is completely inhibited in a biological sample (i.e., if the Bragg peak lies inside the sample). At the end of the hadron track, the diameter of the ionization and excitation region increases sharply, the number of δ electrons also increases, and one particle can cause the death of several neighboring cells [87].

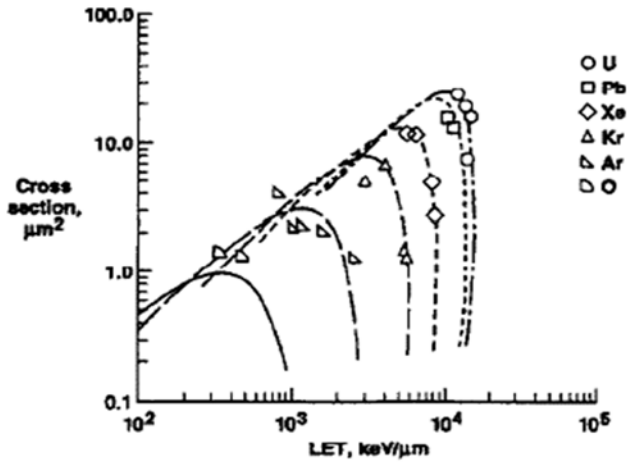


Fig 3.10 Experimental and calculated values of the cross-section of inactivation of E-Coli cells as a function of LET [95].

Fig 3.10 shows the experimental data and the results of modeling the dependence of the inactivation cross section (corresponding to 37% of the surviving cells) of the E-Coli culture after irradiation with heavy ions [95]. It can be seen that for radiation with $LET \sim 10^4 \text{ keV}/\mu\text{m}$, the inactivation cross section reaches tens of μm^2 . The result of such radiation damage, even with an absorbed dose not exceeding the maximum permissible, may be the so-called long-term consequences; especially the passage of densely ionizing radiation affects the functioning of highly specialized biological systems, such as the retina of the eye and the central nervous system [87,92,102,104]. The long-term effects of heavy ion irradiation also include cancer, disorders of the immune and cardiovascular systems, radiation cataract [2,87,92,98,103,104].

Detailed studies of the biological effects of heavy charged particles of different energies have shown that RBE of radiation for the certain biological criterion is determined not only by LET. It is necessary to take into account the distribution of ionizations in the

particle track, which is determined, in particular, by its charge. A large array of data on the biological efficiency of various charged particles was generalized in [106], and the dependence of the RBE on the LET for particles with different charges was constructed (Fig 3.11).

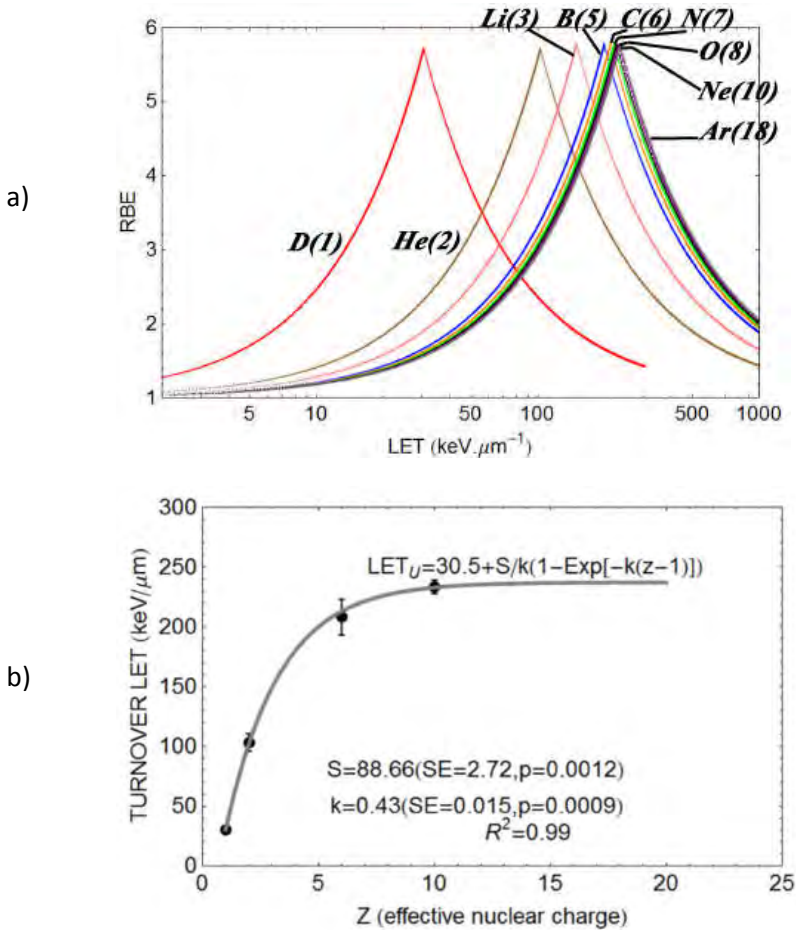


Fig 3.11 Dependence of the RBE on LET for nuclei with different charges (the charge is indicated in brackets); b) the dependence of the peak position according to $RBE = f(LET)$ on the particle charge [106].

Note that for protons, the RBE maximum is reached at the lowest LET value of 30 keV / μm among all nuclei. RBE also depends on the absorbed dose: with increasing dose, RBE decreases [106,107].

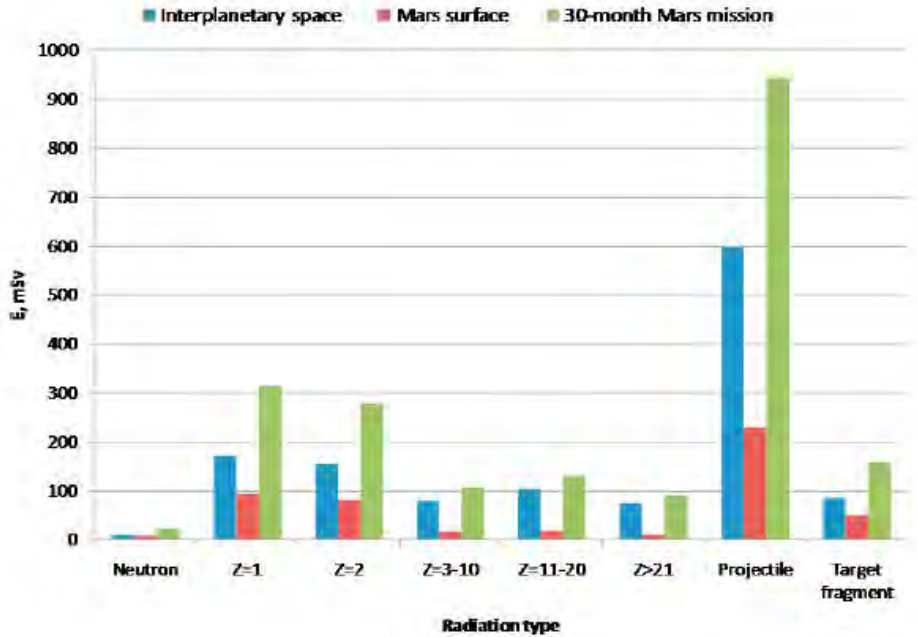


Fig 3.12 Effective doses for particles of different charges that make up cosmic radiation, determined inside a spacecraft with an aluminum shielding shell with a thickness of 5 g / cm^2 thick (irradiation for 1 year for interplanetary space and the surface of Mars, for 30 months for an expedition to Mars) [108].

To assess the radiation risks of the space crew and develop ways to protect them, it is important to find out the contribution of various components of cosmic rays to the effective dose received by the astronauts. In [2,108], on the basis of many years of research, the effective radiation doses received by crew members when cosmic rays passed through the ship's skin were calculated (Fig 3.12). It can be seen that particles with $Z = 1$ (protons)

make the largest contribution to the total effective dose. Indeed, as already noted, the main component of cosmic radiation are high-energy protons [4]. The biological effect of proton radiation according to the criteria of cell transformation and cancer development is also the largest among all cosmic ray particles (Fig 3.13) [2].

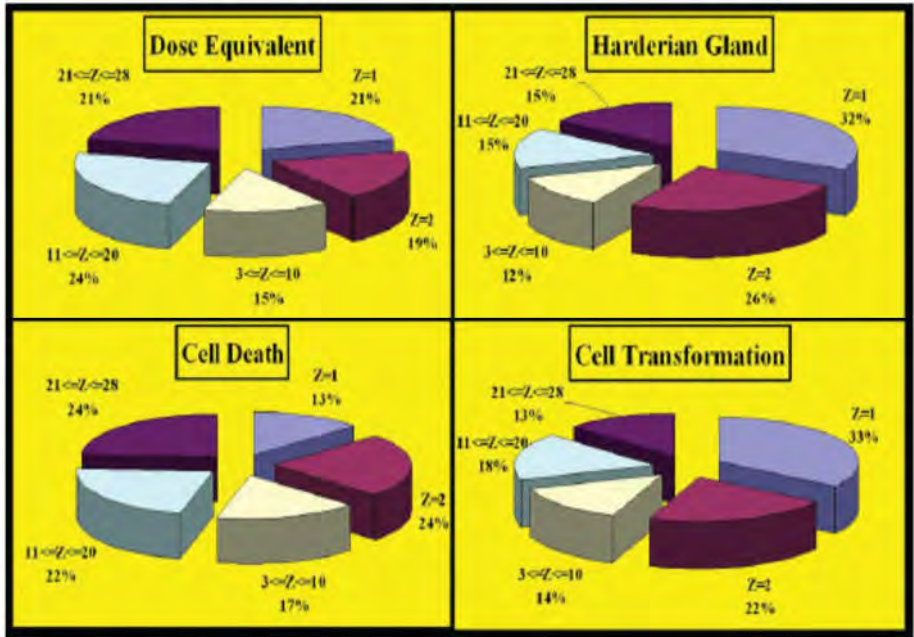


Fig 3.13 The biological effect of charged particles of cosmic radiation [2].

As it is known, cells are more radiosensitive, the less differentiated they are and the more intensively they divide (Bergonier and Tribondo rule) [13]. In the body, such particularly radiosensitive cells are hematopoietic stem cells and epithelial stem cells. Their death or transformation is the result of DNA damage [13,81,86]. Therefore, the study of the effect of various types of radiation on the structure of DNA is a key problem for understanding the mechanisms of development of the biological consequences of irradiation of the body and the search for protection facilities.

Over many decades of radiobiological research, a huge amount of data has been accumulated on damage to the DNA structure caused by γ - and X-ray irradiation [13,49,73,81,86]. Data on radiation damage to DNA caused by heavy charged particles is significantly less; Researchers' attention is focused mainly on high LET radiation in the vicinity of the Bragg peak, since this is very important for the development of hadron therapy [5,72,106,107,109,110]. Recently, methods of a mathematical experiment have been actively developed to determine radiation damage to DNA [48,111–114]. They are based on the Monte Carlo method for modeling the structure of the track of charged particles. However, the results obtained in the course of a computer experiment depend to a large extent on the DNA model used, as well as on the degree of detail of accounting for the reactions occurring at the physico-chemical and chemical stages of radiation action. Often, when describing the indirect effect of radiation, only reactions involving the OH radical [48] are taken into account, which can lead to calculation errors. So, for example, the data obtained in [111] and [114] on the yield of cluster DNA damage by the same types of radiation differ by an order of magnitude. There are very few studies of the radiation effect of high-energy protons, both theoretical and experimental.

It should be emphasized once again that although LET is considered to be the main parameter determining the RBE of radiation [72,111], however, both the particle charge and the absorbed dose affect the biological efficiency. Fig 3.14 shows the initial segment of the dependence of RBE on the LET of protons (normalized to the LET of ^{60}Co γ radiation) for two doses: 2 Gy and 10 Gy [110]. For $\text{LET} = \text{const}$, the greater the RBE, the smaller the dose. It can be assumed that as the radiation dose increases, the density of ions and radicals in the sample increases, and, consequently, the probability of their recombination increases, which leads to a decrease in RBE.

Despite the fact that the LET of proton radiation with an energy of 1 GeV and standard γ -radiation of ^{60}Co is almost identical ($\text{LET} \approx 0.3 \text{ keV} / \mu\text{m}$), nevertheless, when calculating the equivalent dose, the value of the weighting radiation quality factor W_R for protons with energies above 2 MeV is taken $W_R = 5$ [13] (according to other recommendations $W_R = 2$ [2]). In the study [111], for protons with $\text{LET} \approx 0.3 \text{ keV} / \mu\text{m}$, the output values of single-stranded breaks are 154 per 1 Gy per 10^6 bp . (^{60}Co γ -radiation

causes, depending on the type of cells and the irradiation conditions, 7–70 SSB per 1 Gy per 10^6 bp [115–119]), double-strand breaks are 6 per 1 Gy per 10^6 bp. (for γ -radiation, the number of DSB is estimated to be about 1 per 1 Gy per 10^6 bp [115–119]), cluster damage 0.1 per 1 Gy per 10^6 bp (at that 1 cluster contains 2 double-strand breaks).

Fig 3.15 shows the dose-response curves obtained by irradiating the cell culture with ^{60}Co γ -radiation, 9 GeV protons ($\text{LET} = 0.22 \text{ keV} / \mu\text{m}$) and 4 GeV / nucleon helium ions ($\text{LET} = 0.88 \text{ keV} / \mu\text{m}$) [87]. It can be seen that, despite the fact that the LET of protons is less than that of γ -quanta, in this experiment the RBE of protons is greater than 1. Thus, to understand the mechanisms of the formation of the radiation effect of high-energy protons, a detailed study of the dose-effect dependences for different types of structural DNA damage is required in comparison with similar dependencies for standard radiation.

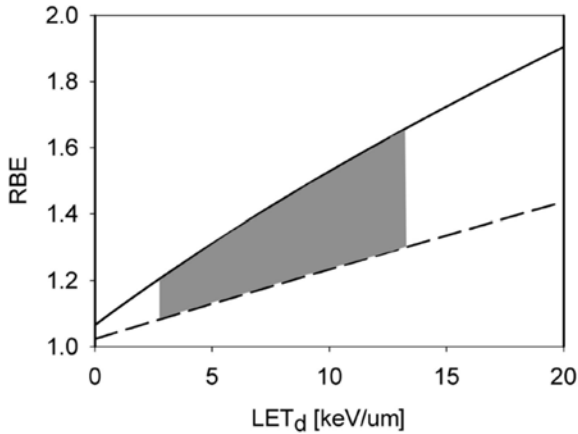


Fig 3.14 Dependence of RBE of protons by the criterion of clonogenic activity of cells on $\text{LET}_d = \frac{\text{LET}}{\text{LET}_\gamma}$ (LET of protons normalized to LET of ^{60}Co γ radiation) for a dose of 2 Gy (solid line) and 10 Gy (dashed line) [110]

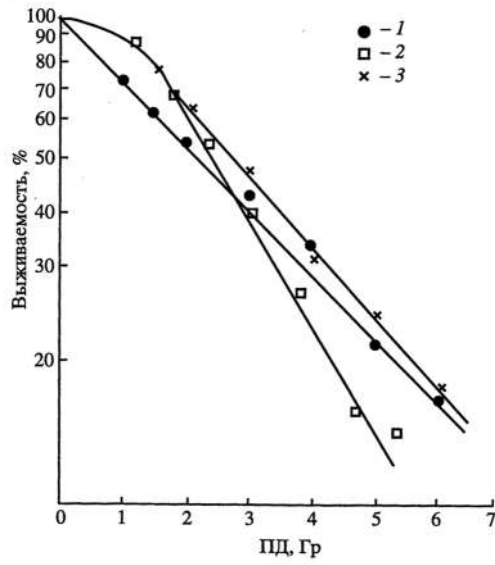


Fig 3.15 Survival curves of Chinese hamster cells after irradiation with helium ions 4 GeV/nucleon (1), protons 9 GeV (2) and γ -radiation ^{60}Co (3) [87].

4. Material and methods

4.1. Material

DNA samples (Sigma) from calf thymus with a molecular mass of $(11.2 \pm 0.6) \cdot 10^6 Da$ and $(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^6 Da$ were used. All aqueous solutions were prepared using a deionized water. NaCl, MgCl₂ and HClO₄ were reagent-grade. NaCl and MgCl₂ solutions of the required concentration were prepared from the saturated solutions. Bioflavonoid (±)-catechin (Cat) was purchased from Sigma. Cat concentration was determined spectrophotometrically at $\lambda_{\max}(\text{Cat})=280 \text{ nm}$, using the molar extinction coefficient $\epsilon(\text{Cat}, 280\text{nm})=3800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

The DNA solutions were exposed to ⁶⁰Co γ-irradiation under the aerobic conditions at room temperature on an “Issledovatel” apparatus at the B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics (St.- Petersburg). Irradiation with protons E=1 GeV was carried out under aerobic conditions at room temperature at the B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics at the SC-1000 synchrocyclotron.

4.2. Spirin method

One of the most appropriate methods for quantification of DNA concentration is UV spectrophotometry. This method is based on The Beer–Lambert law which states that the absorption of light in a solution is directly proportional to the concentration of the absorbing species in this solution and the path length [120]. Therefore, for a fixed path length, UV spectroscopy can be performed to quantify the concentration of the absorber in a specific solution. For DNA and other biopolymers with secondary structure absorption value (optical density D) varies greatly depending on the structure state of their molecules.

The method of Spirin is the most preferred method for quantification of nucleic acid concentration in solutions [121]. In this method the denaturation of DNA was carried out by adding 3 mL of 6% HClO₄ to 1 mL of DNA solution, and a subsequent exposure in a boiling water bath during 20 min and quick cooling to 0 °C. Acid medium prevents DNA renaturation. The concentration of DNA in the solution was determined using Spirin

method from the difference in UV absorption of treated solutions at wavelengths 270 nm and 290 nm (D_{270} and D_{290}) measured at room temperature (22 ± 2) °C [121]:

$$C = \frac{10.1(D_{270} - D_{290})}{0.19} \frac{V_2}{V_1} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

where V_1 is the volume of the DNA solution and V_2 is the volume of the solution after acid and heat treatment.

Using the obtained value of C and the UV absorption intensity in the original non-treated solution at the maximum (D_{260}) we calculated the molar extinction coefficient, which gives an information about the degree of DNA helicity [122]:

$$\varepsilon_{260}(p) = \frac{31 \cdot D_{260}}{0.009 \cdot CL}$$

where L – is the optical path length (in this work $L = 1$ cm), 0,099 = 9,9% is the phosphorus percentage in DNA, 31 is the phosphorus atomic mass. If the DNA concentration value is used in mg/mL, the value of $\varepsilon_{260}(P)$ will be in the range 6000–10000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. The values of experimental errors for C were estimated from 3 experiments with unirradiated DNA solution.

The absorbance of DNA solutions was measured on SF-56 spectrophotometer (LOMO, St. Petersburg, Russia). These experiments were carried out at room temperature. Generally, the UV absorption spectroscopy can provide essential information about the DNA structure. The method of A.S. Spirin [121] allows to find the concentration of chromophores (nucleobases) in the DNA solution and thus estimate the amount of nucleobases destructed under the action of radiation.

4.3. DNA melting

DNA melting process is very sensitive to any defects in the primary and secondary structure of DNA [123]. The secondary structure of the DNA is known to be stabilized in aqueous solutions due to the interaction force between complementary basis (transverse

interactions) and between the neighboring pairs of bases (interplanar interactions, longitudinal, or stacking) [123]. Melting method is the most widely used method of measuring the absorption of the DNA solution in the ultraviolet region (the region of 260 nm), based on the hyperchromic effect – the relative growth of DNA UV absorbance resulted from the denaturation of the macromolecule. This increase in absorption occurs due to the disappearance of the interaction of neighboring base pairs during the helix-coil transition [124]. In our study the denaturation of DNA was carried out by heating of the solution up to 98°C.

The melting curves of DNA samples were obtained by measuring the dependence of the optical density of DNA solution at $\lambda = 260$ nm on the temperature ($D_{260}(T)$) (Fig 4.1.a). The experiment was carried out on Specord 210 Plus (Analytik Jena, Germany) with the Peltier equipment in a 0.5° step mode, the velocity of heating was 1° per min, the DNA concentration $C_{DNA} = (20-60) \cdot 10^{-3}$ g/L. The data were collected with the help of the software WinASPECT (Analytik Jena, Germany) supplied with the instrument, further data processing were carried out via OriginPro. The melting curves $D_{260}(T)$ were smoothed by the *LOESS* method as shown for example in Fig 4.1.a.

The melting temperature (T_m) of DNA is determined as the point of maximum of first derivative of the melting curve $dD(T)/dT$ (i.e. the temperature point at which 50% of the DNA is denatured) (Fig 4.1.a,b). The value of experimental error for T_m was estimated from 3 experiments with unirradiated DNA solution. Melting temperature is a physical property of the nucleic acids that gives information about the duplexes stability in a specified environment. This method is widely used in molecular biology and theoretical biophysics [125].

Naturally, the DNA macromolecules are quite different from each other depending on their contents of A-T and G-C base pairs [124]. Generally, the DNA melting temperature depends significantly on the environmental condition in which the DNA molecules are dissolved. Typically, the DNA are dissolved in aqueous solution with specific ionic strength of Na^+ .

At neutral pH, the DNA melting temperature can be calculated theoretically as following [124];

$$T_m = 176.0 - (2.60 - X_o)(36.0 - 7.04 \log[Na^+]), \quad X_o = \frac{G + C}{A + T + G + C}$$

Where T_m is the melting temperature in °C, $[Na^+]$ is the molar concentration of Na^+ , X_o is the G-C pairs portion. In our study we used DNA from calf thymus as mentioned before, which is 41.9 mole % G-C and 58.1 mole % A-T [126]. The increase of the molar ionic concentration of Na^+ inside the DNA solution arises the stability of the DNA molecules, and subsequently increases the DNA melting temperature [124,127]. The melting point also depends on the pH value inside the medium, significantly T_m decreases when pH values below 5 and above 9 [124].

In our experiment, firstly we measure the UV absorption spectrum for the studied DNA solution at room temperature as represented by the black curve in Fig 4.1.c, secondly we increase the temperature up to 98°C at fixed wavelength (260 nm) to measure the corresponding melting curve as shown in Fig 4.1.a, then measure the UV absorption spectra for the denatured DNA (at 98°C) as indicated by the red curve in Fig 4.1.c, and consequently cooling the DNA solution step by step to 25°C to measure the UV absorption spectrum for the renatured DNA as represented by the blue curve in Fig 4.1.c. It can be seen that hydrolysis causes the more complete DNA denaturation as represented by the yellow curve in Fig 4.1.c. The hyperchromicity of DNA was calculated by the formula:

$$\delta = \frac{D_{260}^{98^\circ C} - D_{260}^{25^\circ C}}{D_{260}^{25^\circ C}}$$

where $D_{260}^{25^\circ C}$, $D_{260}^{98^\circ C}$ is the optical density of the studied DNA solution in the maximum of the DNA absorption spectrum at room temperature and at temperature of 98°C respectively. Hyperchromic effect also indicates the degree of DNA helicity [122]. The hyperchromicity of the native DNA at 0.15M NaCl is about 0.4 [122].

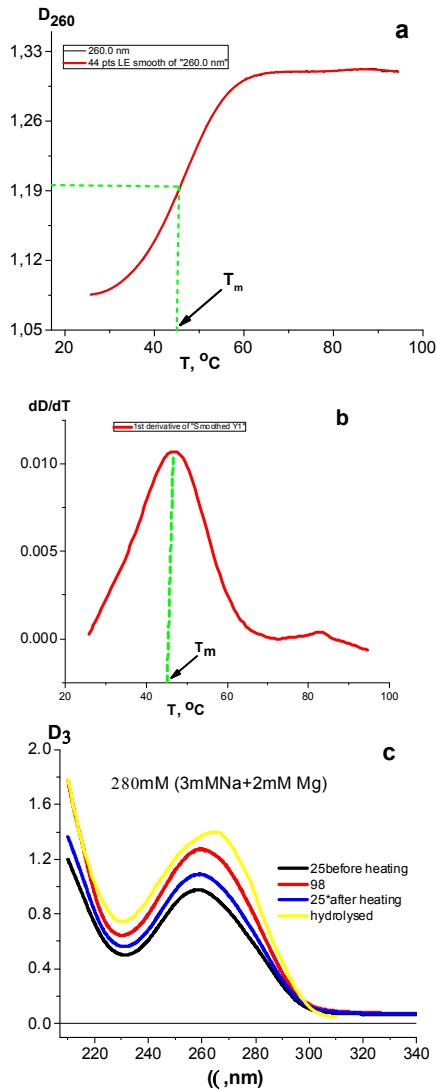


Fig 4.1 DNA solution irradiated with dose of 50 Gy of proton particles; DNA melting curve (a), their first derivative (b), and UV absorbance spectra (c).

4.4. Circular dichroism (CD)

Circular dichroism (CD) is a form of light absorption spectroscopic technique that measures the differential absorption of right- and left-handed circularly polarized light by a substance [128,129]. The Left- and right hand circular polarized light (i.e. LCPL and RCPL respectively) indicate the two possible states of the spin angular momentum for a photon. Electromagnetic radiation consists of an electric field (E) and magnetic field (B) oscillating perpendicularly to each other and to the direction of propagation, producing a transverse wave [130]. Circularly polarized light induces when the direction of the electric field vector rotates around its propagation direction while the vector magnitude remains constant (Fig 4.2.a) [131], however the linear polarized light occurs when the vector of the electric field oscillates only in one plane (Fig 4.2.b). The electric vector for RCPL rotates counterclockwise, while for LCPL the electric vector rotates clockwise.

When the circularly polarized light passes through an absorbing medium, the speeds between the left and right polarizations differ ($C_L \neq C_R$) as well as their wavelengths ($\lambda_L \neq \lambda_R$) and subsequently the extent to which they are absorbed (i.e. their molar absorption coefficient – $\epsilon_L \neq \epsilon_R$). The experimental parameter measured in CD is the differential absorption for left - and right -handed circularly polarized light by a substance in dependence on wavelength as follows [128];

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

Where ϵ_L , and ϵ_R are molar absorption coefficients of left- and right-handed circularly polarized light, respectively.

The electric field of the light beam produces a linear displacement of the charge when interacting with the molecule (i.e. electric dipole), while its magnetic field induces a circulation of the charge (i.e. magnetic dipole). These two motions combined together and induce an excitation of the electron in the helical motion, including translation and rotation.

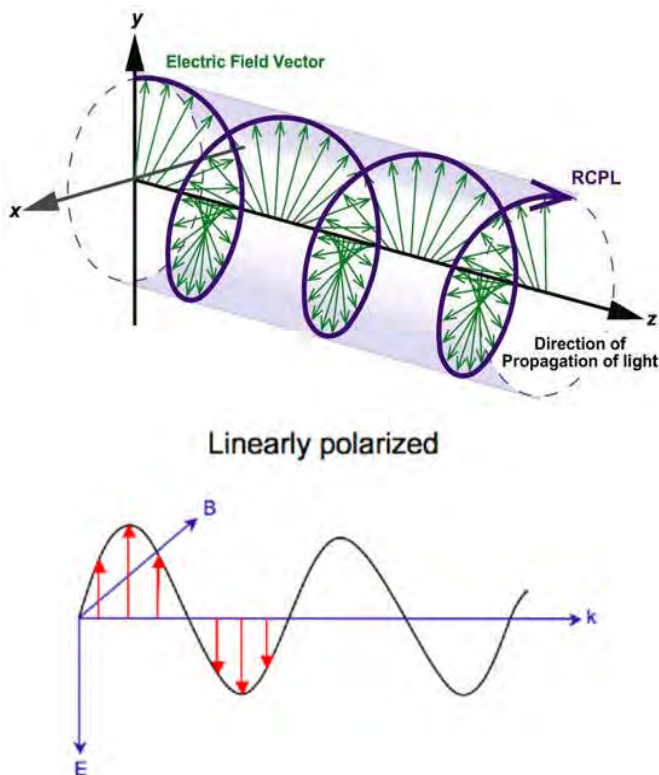


Fig 4.2 Schematic diagram for circular polarized light (a) and linearly polarized light(b) [131].

From the Beer–Lambert law, $\Delta\epsilon$ can be measured as

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta A}{C \cdot L} \text{ (in } \text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L)}$$

where $\Delta A = A_L - A_R$, is the directly measured difference of absorbance of left (A_L)- and right-polarized light (A_R), and it is a function of the wavelength. [128].

The measured CD depends on the molecular conformation and is not simply an intrinsic property of the molecule. The CD is not only wavelength dependent but may also be a function of concentration, temperature, the chemical environment including solvents,

and other parameters under studying. In this case the recorded CD value must also specify these other relevant factors in order to be meaningful.

Most of the CD instruments are based on the modulation techniques explained by Grosjean and Legrand (Fig 4.3). Firstly, the Light is linearly polarized through a monochromator. The single wavelength light is then passed through a modulating device (usually a photoelastic modulator-PEM), which transforms the linear light to a circular polarized light. The incident light on the studied sample switches between LCPL and RCPL. When the incident light switches the direction of polarization, the absorption changes and the differential molar absorption can be calculated [132].

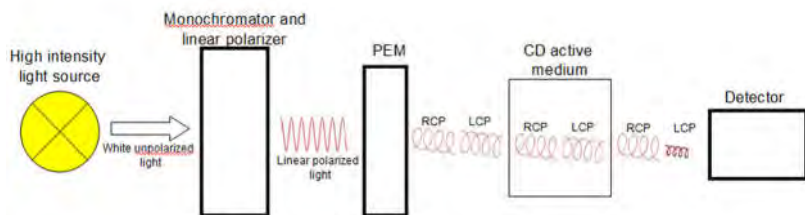


Fig 4.3 The instrumentation for a common CD spectrometer showing the polarization of light and the differential absorption of LCP and RCP light [132].

Circular dichroism (CD) is an ideal method to study the molecular structures, composition and interactions of chiral systems. It is the only method capable for the determination of the absolute configuration (absolute stereostructure assignment) [128]. CD is sensitive to the conformations of molecules, and often provides important information about the functions and conformations of biomolecules that are not directly available from other conventional spectroscopic techniques (such as absorbance and fluorescence) [129]. UV CD is used to investigate the protein and DNA secondary structure, and their complexes with low-molecular substances [133].

Although CD is not able to provide the specific detailed structural information available from X-ray diffraction and nuclear magnetic resonance (NMR), CD measurements have more advantages as follows [129];

- It is independent on the physical form of the substance being analyzed and can be performed with samples in solution, solid dispersions, gas phase, films, liquid crystal, gels and even applicable for samples that are difficult to be crystallized or obtained at high concentrations [128,134].
- It is the best method for determining any structural alterations that result from changes in the environmental conditions (such as pH, temperature and ionic strengths) [129].
- The sensitivity, nondestructive nature and ease of CD measurements, and can be performed on relatively small amounts of material [129,134].
- The CD spectra of DNA molecules in solution can provide important information about its overall conformational state when compared with the CD spectrum of known structures (i.e. reference samples) [134].

The information from the CD spectrum is complementary to that from the absorption spectrum. For example, the relative absorption change at 260 nm on the DNA denaturation is much larger than the relative change of the long-wavelength CD bands, but the different DNA secondary structures can be more easily distinguished by CD spectra [134].

In this work the CD spectra were measured on a Mark IV dichrograph (Jobin-Yvon, France), at room temperature. The absorbance and CD of the corresponding solvent were subtracted from the spectra of DNA solution.

5. Results and discussion

5.1. Application of spectral methods for determining the radiation damage in the DNA structure

As already mentioned, one of the most common types of radiation damage in the DNA structure is the destruction of nitrogen bases and deformation of the DNA secondary structure (partial denaturation), which occurs in the vicinity of defects in the primary structure of a macromolecule: modified nitrogen bases, a purine and a pyrimidine sites, single and double-strand breaks. Currently, various types of immunoassay [135–137], as well as high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry [138,139] are used to study these types of structural DNA damage.

In this work, it is proposed to use the Spirin spectral method for determining the total amount of DNA nitrogen bases [121] to estimate the fraction of the destroyed nitrogen bases induced by ionizing radiation. It was previously shown that irradiation of DNA solutions causes the so-called "loss of hyperchromism" - a decrease in the intensity of DNA absorption in the UV region, measured at a temperature of 80 ° C [140]. Discoloration of dyes under the influence of ionizing radiation is used in dosimetry [13]. The authors of [141] used the absorption spectroscopy to determine the radiation damage of free bases in solution.

Radiation damage in the DNA structure affects its absorption spectrum in different ways: the destruction of nitrogen bases (the main chromophores of DNA in the UV region) leads to a decrease in absorption, and partial denaturation causes a hyperchromic effect [142]. To separate these effects, it is necessary to completely destroy the secondary structure of DNA (inducing denaturation) and in this state determine the concentration of chromophores. Then, using the obtained concentration value, it is possible to determine the degree of helicity of the irradiated DNA before denaturation. In the method of Spirin the destruction of the DNA secondary structure is caused by hydrolysis: the DNA is kept for 20 minutes at 100 ° C in a solution of 4.5% perchloric acid and then sharply cooled to 0 ° C [121].

In this case, not only the separation of complementary chains is carried out but also their partial fragmentation. Due to protonation of nitrogen bases, renaturation does not occur during cooling of the solution, and the absorption of the hydrolyzed solution depends only on the content of chromophores in it.

The degree of the DNA nativity can be estimated from the value of the molar extinction coefficient at the maximum UV absorption - ϵ_{260} . Circular dichroism (CD) is also a very informative method for studying the secondary structure of DNA. It is widely used to study the conformational transitions in the DNA structure caused by changes in the composition of the solvent during its interaction with biologically active compounds [143–149], as well as to detect radiation damage to the macromolecule [150,151]. The CD method can provide additional information about DNA conformation (without hydrolysis), since base destruction and partial denaturation lead to similar changes in the CD DNA spectra: a decrease in intensity [149].

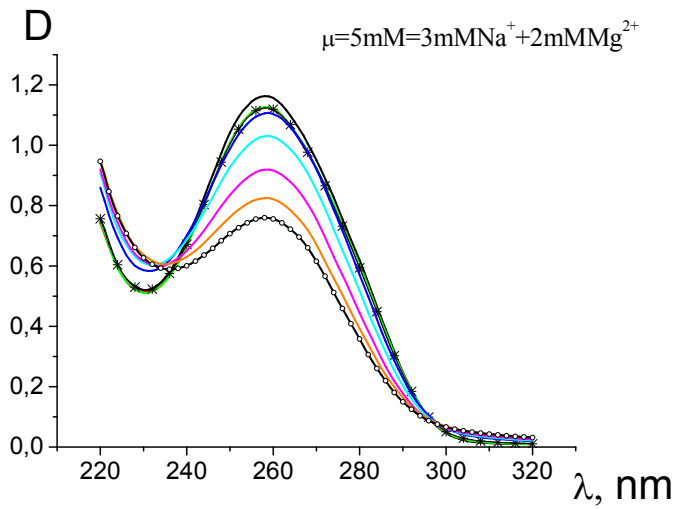
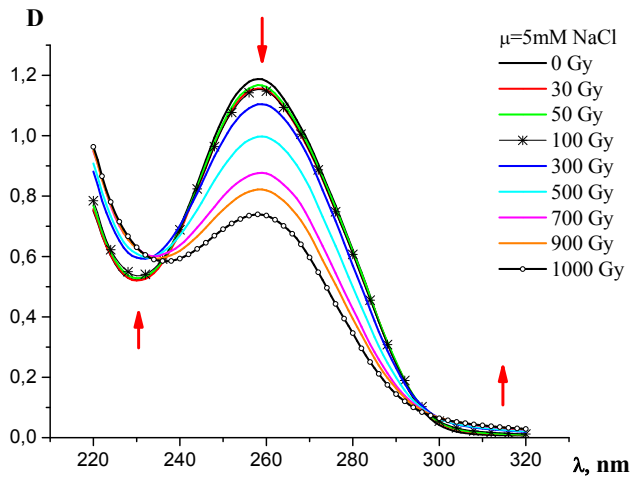
Another method used in this work to assess radiation damage is spectrophotometric DNA melting. This process is of helix-coil transition during heating of the solution is very sensitive to the state of the primary and secondary structure of DNA (in particular, to the GC composition and ionic strength of the solution) [123,124] and is often used to study the complexation of DNA with ions and others biologically active substances [152–154].

The first series of experiments was performed with DNA irradiated with ^{60}Co γ -quanta in solutions of different ionic strengths [155–157]. Structural DNA damage caused by gamma and x-ray irradiation has been studied in sufficient detail; therefore, the results obtained in this work can be compared with the literature data. In addition, it was interesting to study the effect of the ionic environment of DNA on the radiation effect. DNA in aqueous solution at neutral pH is a polyanion with a high charge density. Interaction with counterions plays a crucial role in the formation of its structure. Most alkali metal ions (Na^+ , Li^+ , K^+) and alkaline earth metals (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) interact mainly with negatively charged oxygen atoms of the DNA phosphate groups, stabilizing the secondary structure of the macromolecule; transition metal cations (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc.) are able to interact with both phosphate groups and nitrogenous DNA bases [147,158,159].

In the cell and in the water-salt solution, DNA exists in a complex with counterions, which are introduced into the hydration shell of the macromolecule and form a diffuse cloud around it [158–161]. The interaction with cations determines the specific volume of the DNA coil in solution, i.e. its tertiary structure [159–161]. Despite this, there are few studies of the effect of ionic conditions on the DNA radiosensitivity [150,162,163]. It has been shown that the radiation effect, which is expressed in a decrease in the specific volume of DNA, decreases with increasing ionic strength [162]. D. Grigoriev et al. found a linear increase in the yield of the modified 8-OHdGuo base with an increase in the γ -radiation dose in DNA solutions; with an increase in ionic strength, a decrease in the yield of this damage was also observed [163].

In this work, we studied aqueous DNA solutions with different concentrations of NaCl (3 mM - 3.2 M) and in the presence of Mg^{2+} ions, exposed to γ -radiation in doses up to 10^3 Gy. The spectral methods described above were applied to determine the amount of destroyed nitrogenous bases and the degree of helicity of irradiated DNA. The objectives of this study were to compare the capabilities of different methods for detecting the indicated types of radiation damage of DNA, and to study the effect of Na^+ and Mg^{2+} ions on the radiosensitivity of DNA in solution [155–157].

The UV absorption spectra of DNA γ -irradiated with doses of 0–1000 Gy in solutions of ionic strength 0.003 M, 0.005 M, 0.15 M, 1 M, 3.2 M NaCl, as well as total ionic strength $\mu = 5$ mM containing 3 mM NaCl and 2 mM $MgCl_2$ were measured. The radiation intensity was 20 Gy / min; the DNA concentration in the irradiated solution was $C = 0.05$ g / L = const. Fig 5.1 shows the obtained series of spectra at $\mu = 5$ mM NaCl, $\mu = 5$ mM = 3 mM $Na^+ + 2$ mM Mg^{2+} , $\mu = 1$ M NaCl and $\mu = 3.2$ M NaCl.



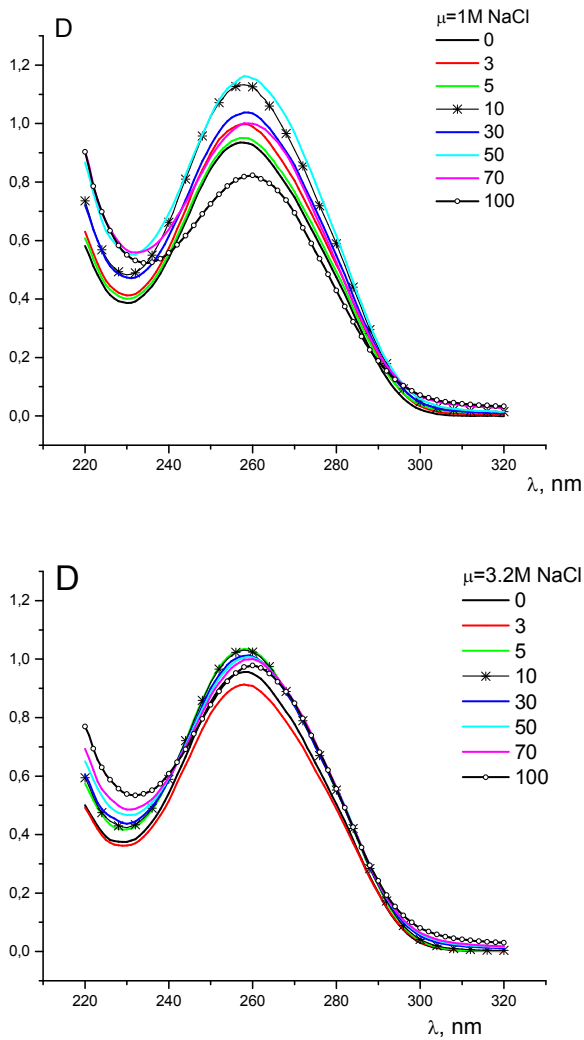


Fig 5.1 UV absorption spectra of DNA γ -irradiated in solutions of different ionic strengths. Ionic strengths and radiation doses are indicated in the graphs.

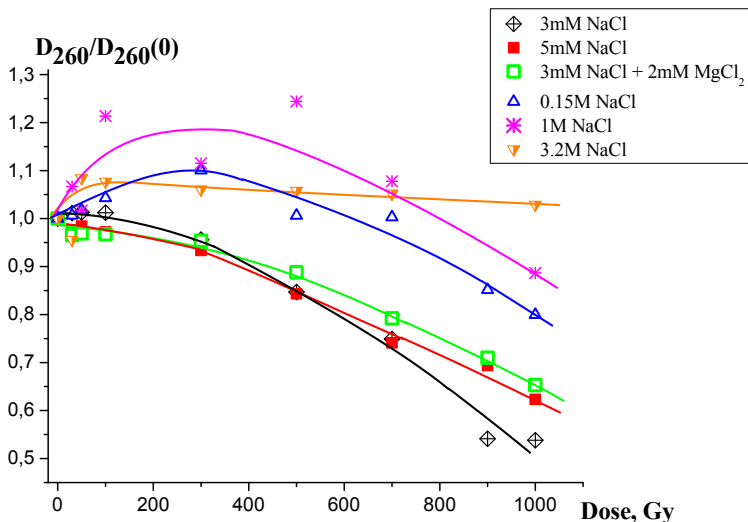


Fig 5.2 The relative change of the maximum absorption in DNA spectrum as a function of radiation dose. The ionic strengths in the solutions are shown in the figure.

It can be seen that the form of these spectra is mainly determined by the competition of two factors: a decrease in intensity due to the destruction of chromophores and an increase in intensity caused by partial denaturation. At low ionic strengths (5 mM), the destruction of nitrogenous bases “wins”: the absorption intensity almost monotonously decreases with increasing radiation dose. With an increase in the ionic strength (for $\mu = 1\text{M}$ and $\mu = 3.2\text{M}$), these factors make comparable contributions and almost cancel each other out. Fig 5.2 shows the dependence of the intensity at the maximum of the absorption spectrum of DNA on the radiation dose for the studied ionic strengths.

To separate the contribution of these two factors to the absorption spectrum of irradiated DNA, hydrolysis of these solutions was carried out. Fig 5.3 shows for example two series of spectra of hydrolyzed irradiated DNA solutions at $\mu = 5\text{ mM NaCl}$ and $\mu = 3.2\text{ M NaCl}$. It cannot be excluded that during the hydrolysis, additional reactions of

unstable products resulting from irradiation process can occur. This additional contribution to DNA damage cannot be avoided in this experiment.

In hydrolyzed solutions, DNA is in the form of fragmented single-stranded molecules, and its absorption is determined only by the concentration of chromophores (undisturbed bases). The contribution of modified bases. to the spectra of hydrolyzed solutions is insignificant (the yield of modified bases. under γ -irradiation of DNA solutions is about 1 per 10^7 bases. per 1 Gy [164]), and it can be neglected. The obtained spectra can be used to determine the concentration of chromophores in irradiated solutions by the formula (1).

Note that spectral changes similar to those observed in Fig 5.3.a were obtained in [141] when studying the effect of γ -radiation on the absorption spectra of free bases in an aqueous solution. The dependence of the fraction of destroyed nitrogen bases on the radiation dose in solutions of different ionic strengths are shown in Fig 5.4.a. For all the studied systems, a linear increase is observed with an increase in the dose, but the slope of the straight lines decreases with an increase in the ionic strength of the irradiated solution. A linear dependence of the amount of 8-OHdGuo in DNA on the radiation dose, as well as a decrease in the radiation effect with an increase in the ionic strength of the solution, were observed by the authors of [163]. They suggest that the specifying factor that reduces the radiation effect when the concentration of counterions increases is the change in the DNA conformation.

The radiation-chemical yield G of the destroyed bases. in the studied solutions is shown in Fig 5.4.b. It is interesting to observe a similar dependence of G on the radiation dose in solutions of low ionic strength (3 mM – 5 mM): a sharp drop with increasing dose in the range of lower doses (less than 100 Gy), and then reaching the plateau, $G \approx 1$ bases/100 eV. The following values of G of the destroyed bases during irradiation of DNA solutions are given in the literature as: 1 bases / 100eV [13], 1–3 bases / 100eV [81] (depending on the irradiation conditions) and $G = 0.3\text{--}4$ bases / 100 eV when irradiating free bases in solution [81]. Thus, the G values obtained in this work are in good agreement with the available literature data. However, a discussion of the dependence of the radiation-chemical yield on the radiation dose could not be found in the literature. It is known that the yield of single-site lesions (for example, SSB) decreases with an increase in LET of

radiation, and the yield of cluster damages, on the contrary, increases with an increase in LET, passing through the maximum in the vicinity of LET is about 500 keV / μm [111]. The destroyed bases. can be either a single-site damage, or be part of a cluster damage [13,109]. Under the action of ^{60}Co γ - radiation with LET = 0.3 keV / μm [52], cluster damages are unlikely to appear [111], and under these conditions, the observed damage is predominantly single-site. Analyzing the dependence of G on the radiation dose (Fig 5.4.b), it can be assumed that the main factor determining the form of this dependence is the size of the target (DNA coil) in the solution. Indeed, in the region of moderate ionic strengths (0.003–0.15 M NaCl), the volume of the DNA coil in the solution linearly depends on $1 / \sqrt{\mu}$, and when μ increases from 0.003M to 0.15M, the volume of the macromolecule decreases by about 2 times [159].

However, the replacement of a part of Na^+ ions with Mg^{2+} ions (while maintaining the total ionic strength of 0.005 M) leads to additional shielding of the phosphate groups of DNA and, consequently, to an additional decrease in the volume of the DNA coil. According to the data of [159,165] $\frac{[\eta]}{[\eta]_0} \approx 0.75$, where $[\eta]_0$ is the characteristic viscosity of DNA (proportional to the specific volume of the macromolecule) at $\mu = 5 \text{ mM NaCl}$, $[\eta]$ is the characteristic viscosity of DNA at $\mu = 5\text{mM} = 3\text{mM Na}^+ + 2\text{mM Mg}^{2+}$. However, experience shows that the output of the destroyed bases in these systems is the same within the margin of error. It should also be noted that the volume of the DNA coil in solutions $\mu = 0.15 \text{ M NaCl}$, $\mu = 1 \text{ M NaCl}$ and $\mu = 3.2 \text{ M NaCl}$ is almost the same [159], but the radiosensitivity of DNA is noticeably different (Fig 5.4). So, we can conclude that the target volume in the solution is not the only factor that determines the radiation yield of bases, although it is certainly important: after all, the strongest dependence of G on the radiation dose is observed just for those solutions in which DNA has the largest volume (Fig 5.4 b). The following assumption can be proposed to explain this dependence. Since all samples were irradiated at the same dose rate, the absorbed dose was proportional to the irradiation time. With prolonged irradiation in the solution, ions and radicals accumulate, which increases the probability of their recombination [13]. Therefore, in terms of the yield of DNA base damage, large doses are less effective.

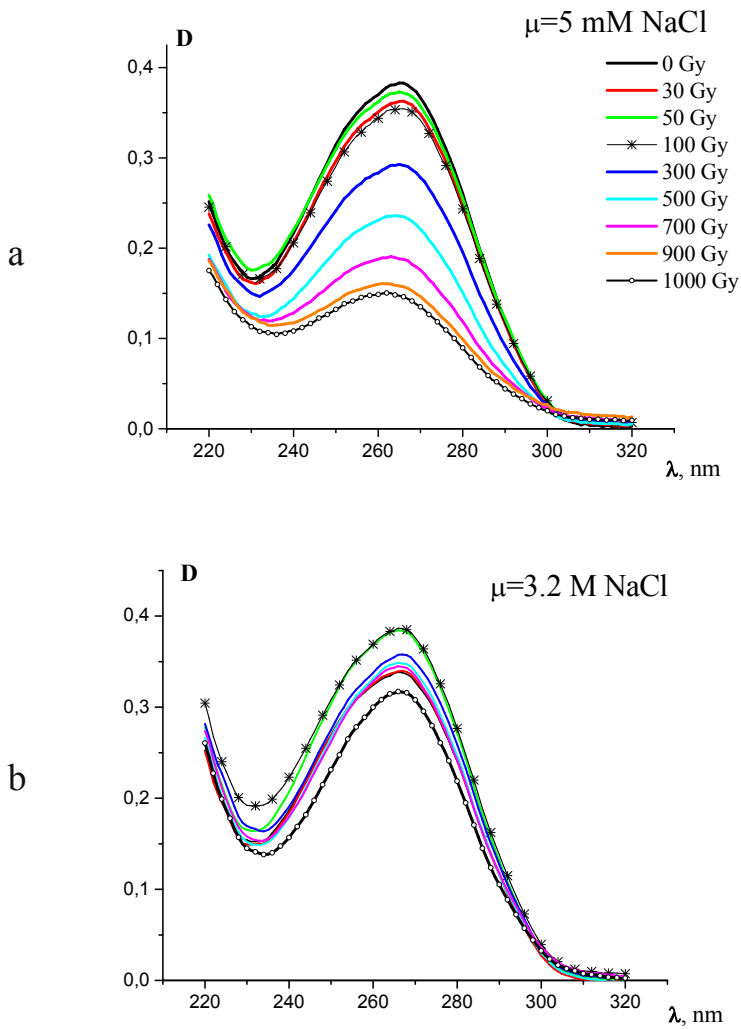
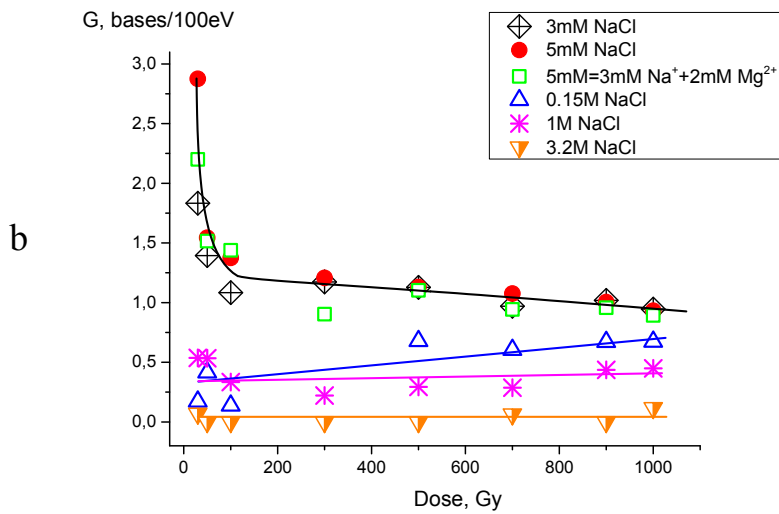
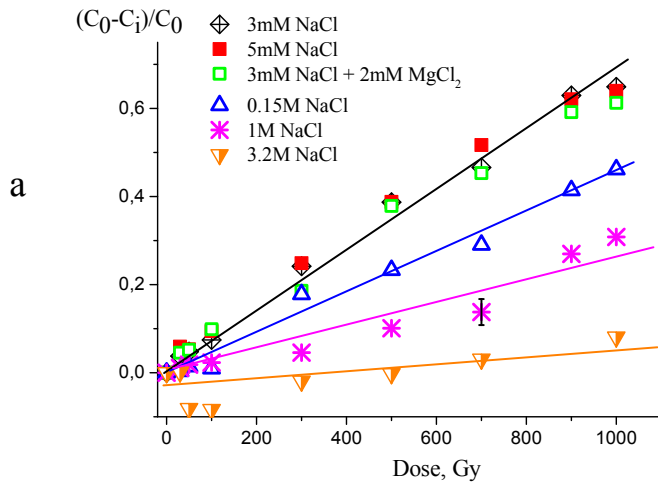


Fig 5.3 Absorption spectra of irradiated DNA solutions after hydrolysis.



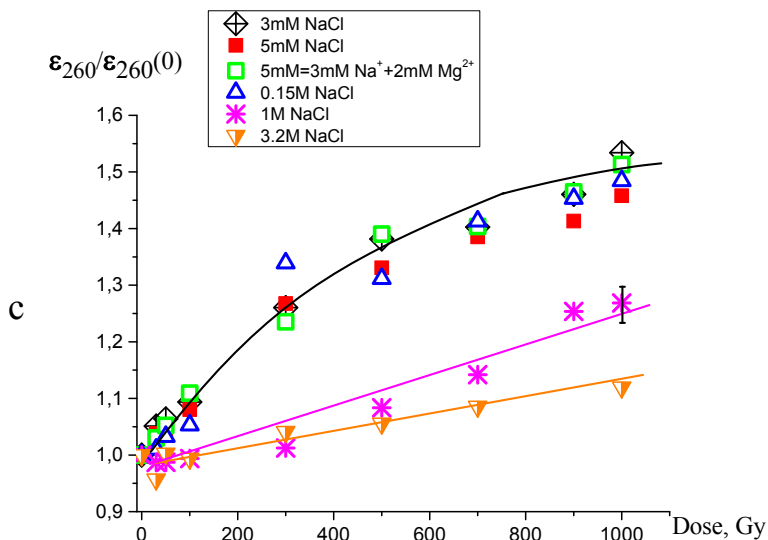


Fig 5.4 Dependences of the relative decrease in the number of nitrogenous bases (a), radiation-chemical yield of bases (b), and the relative change in the molar extinction coefficient of DNA (c) on the dose of γ -radiation in solutions of different ionic strengths.

It can be seen, however, that at $\mu \geq 0.15$ M NaCl the nature of the dose dependence of G is different, and at $\mu = 3.2$ M NaCl $G \approx 0$. Obviously, for more reasonable explanations of the observed effects, it is necessary to perform additional studies, in particular, to obtain information about the yield of other types of damage in these experimental conditions.

The increase in the molar extinction coefficient of DNA in irradiated solutions (ϵ_{260}) compared with the value for native DNA ($\epsilon_{260}(0)$) indicates that the degree of helicity decreases in irradiated DNA (Fig 5.4.c). The magnitude of this type of radiation damage is even less correlated with the size of the target: the most significant and identical value of the deformations in the DNA secondary structure are observed in solutions of ionic strength 0.003–0.15 M (in which the volume of the DNA coil is 2 times different). A further increase in ionic strength does not lead to noticeable changes in the size of the

DNA coil in a solution, but gives a significant reduction in radiation damage to the secondary structure.

Let us turn to the results obtained by the CD method. As already mentioned, contributions from the destruction of bases. and partial denaturation, the intensities of the CD DNA spectrum do not compete, but add up: each of them leads to a decrease in the intensity of the positive and negative bands. CD DNA spectra were obtained in all the studied systems. Fig 5.5 shows, for example, the CD spectra of DNA γ - irradiated with doses of 0–1000 Gy in solutions of ionic strength 0.005 M and 3.2 M NaCl. The type of CD spectra of native DNA is a typical for the B-form of the secondary structure of the macromolecule [142]. It can be seen that in a solution of 0.005 M NaCl, the CD spectrum gradually degrades with an increase in the radiation dose, while at $\mu = 3.2$ M NaCl, the radiation practically does not affect the CD spectrum of DNA. Fig 5.6 shows the dose dependences of the intensities of the positive and negative bands in the CD spectrum of DNA in the studied solutions. It can be seen that here the factor determining the type of dose dependence is also the total ionic strength of the irradiated solution.

It can be assumed that the influence of the ionic strength of the solution on the observed radiation effects is caused by a change in the degree of DNA hydration. Studies of the yield of single and double-strand breaks [119,166,167] and the release of bases [168] in DNA samples of different degrees of hydration showed that the radiosensitivity of DNA decreases with a decrease in its degree of hydration. The authors of [119,168] note that the structure of the hydration shell of DNA affects the radiation effect for at least two reasons: due to changes in the secondary structure of DNA and due to a change in the number of water molecules bound to DNA and being part of the target. Changing the size of the target changes the relationship between the direct and indirect effects of radiation [13]. In addition, there is a difference in the composition of the products of radiolysis of bound water molecules and bulk water [169,170]. Finally, the higher the concentration of counterions, the lower the DNA charge, hence the less its interaction with charged and

polar products of water radiolysis. The results obtained in this work are agreed with these data.

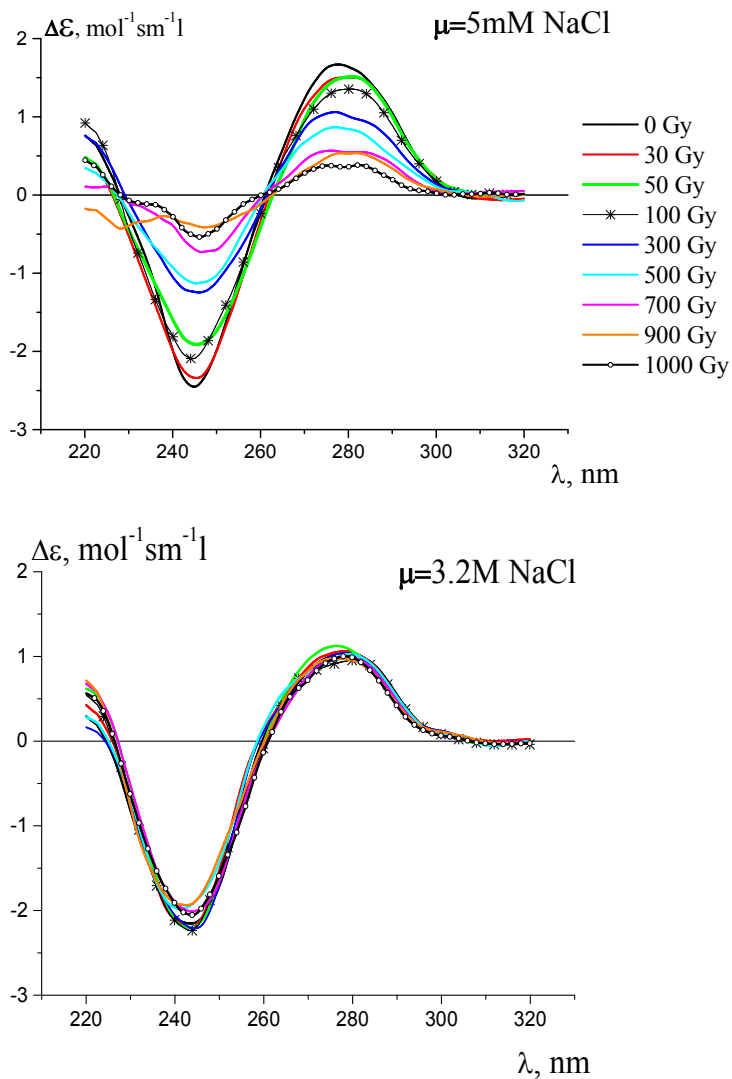


Fig 5.5 CD spectra of DNA exposed to γ -irradiation in solutions of ionic strength 0.005 M and 3.2 M NaCl. Ionic strengths and radiation doses are indicated in the graphs.

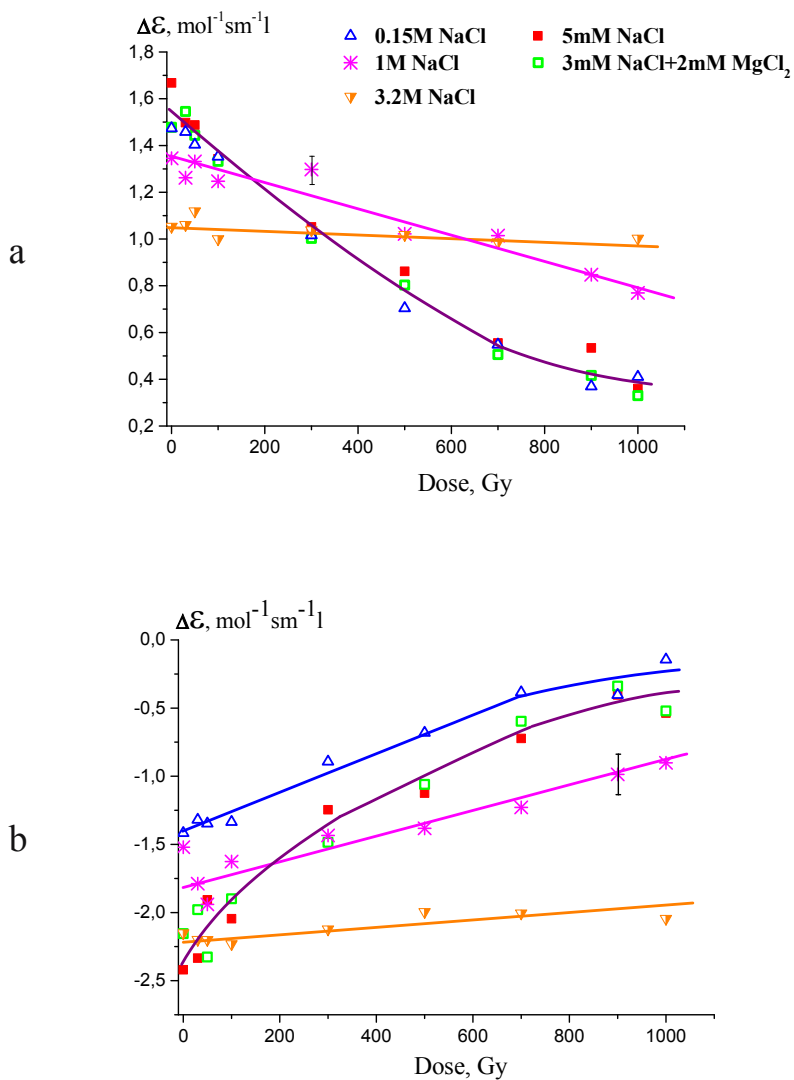
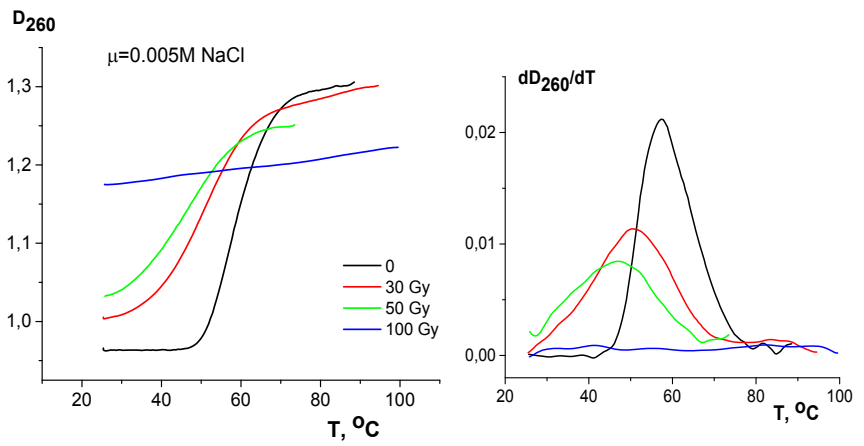


Fig 5.6 Dose dependences of the intensities of the positive and negative bands in the CD spectra of the irradiated DNA solution at different ionic strengths.

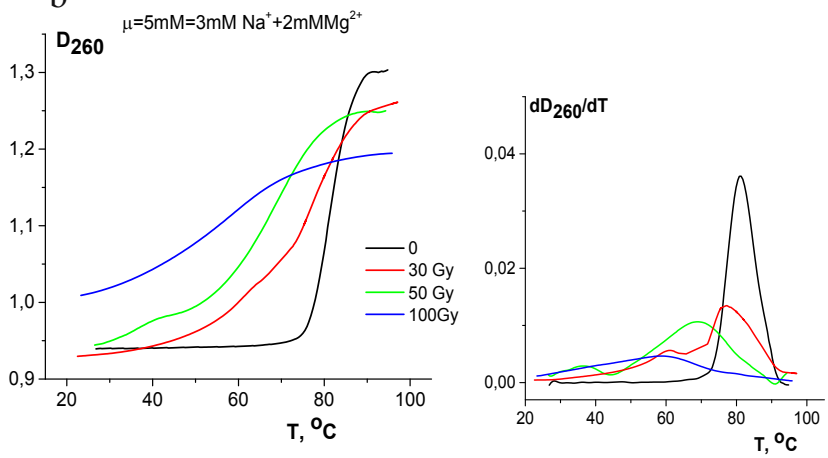
Particularly, it is known that at high ionic strengths ($\mu > 2.4$ M NaCl), the orientation of strongly bound water molecules in the primary hydration shell of DNA changes [159]. It should be noted that in the entire studied range of ionic strengths, the original native DNA was in the B form, as follows from the form of CD spectra (Fig 5.5). Thus, we can conclude that the observed decrease in the radiation effect with the growth of μ is caused by 1) a decrease in the size of the target, 2) a change in the structure and composition of the DNA hydration shell.

The defects in the secondary structure of DNA can be studied using the DNA melting method [123,124]. Fig 5.7 shows the DNA melting curves ($D_{260} = f(T)$) and the corresponding differential melting curves of DNA $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ exposed to γ - radiation at doses of 30, 50, and 100 Gy in solutions with $\mu = 5$ mM NaCl and $\mu = 0.15$ M NaCl [155–157]. Fig 5.8 shows examples of UV absorption spectra of DNA in control unirradiated solutions and irradiated in a dose of 50 Gy at $\mu = 5$ mM NaCl. The spectra were recorded at different temperatures during DNA melting process and after rapid cooling of the solution (within 10 min.). The same graphs show the absorption spectra of DNA after hydrolysis. When a DNA solution is heated from 25 ° C to 95 ° C, the well-known hyperchromic effect occurs due to denaturation of the double helix. Upon subsequent cooling of the DNA solution, an incomplete recovery of absorption is observed, which is explained by partial renaturation of complementary DNA segments belonging to both different single-stranded molecules and one strand (in the latter case, “hairpins” are formed) [124,142,171]. For high molecular weight DNA, complete renaturation does not occur even with very slow annealing due to the difficulty of the mutual penetration of two single-stranded tangles and the convergence of complementary sequences [142]. As a result of partial renaturation of DNA, double-stranded sections are formed in solution, alternating with single-stranded, and they can belong to several different strands. During hydrolysis, not only complete separation of the DNA chains occurs, but also partial fragmentation [121], therefore, the absorption spectra of hydrolyzed DNA show a stronger hyperchromic effect than the DNA spectra at 95 ° C (Fig 5.8). In addition, a bathochromic shift is observed in the hydrolyzed DNA spectra due to protonation of nitrogenous bases in an acidic medium [148].

a



b



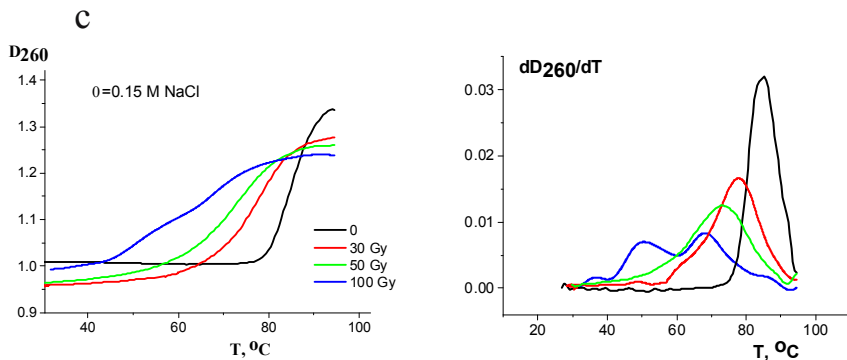


Fig 5.7 Melting curves of native DNA (control) and γ -irradiated at doses of 30 and 50 Gy in solutions with $\mu = 5 \text{ mM NaCl}$ (a), $\mu = 5 \text{ mM} = 3 \text{ mM Na}^+ + 2 \text{ mM Mg}^{2+}$. (b) and $\mu = 0.15 \text{ M NaCl}$ (c).

An increase in the degree of screening of phosphate groups in the region of moderate ionic strengths stabilizes the secondary structure of DNA. This is manifested in an increase in the melting temperature T_m of the native DNA and a narrowing of the temperature interval of the helix-coil transition with an increase in the ionic strength of the solution or replacing a part of Na^+ ions with Mg^{2+} ions while maintaining a constant total ionic strength (Fig 5.7). Irradiation causes a decrease in the melting temperature of DNA and a broadening of the transition for all studied μ . In a solution of 0.005 M NaCl irradiated with a dose of 100 Gy , it is not possible to determine the DNA melting temperature, obviously, due to a very significant damage of the DNA structure under these irradiation conditions (Fig 5.7.a).

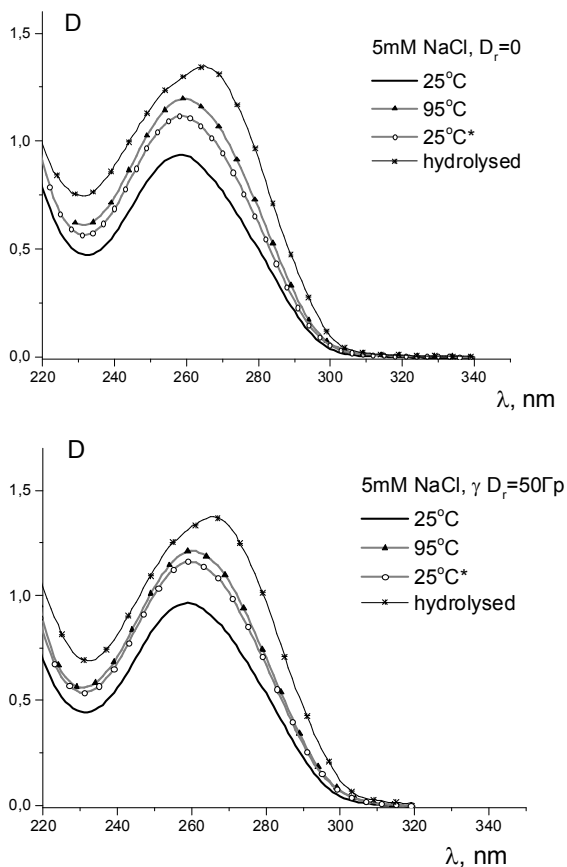


Fig 5.8 UV absorption spectra of DNA in solutions of ionic strength $\mu=5$ mM NaCl unirradiated and gamma-irradiated at a dose of 50 Gy. The temperatures at which the spectra were measured are shown in the graphs; 25°C* - the spectra measured after melting and rapidly cooling the DNA solution. The spectra are presented to the same DNA concentration.

Various types of radiation damage affect the parameters of the helix-coil transition in the irradiated macromolecule. Single- and double-strand breaks, destruction, modification, and separation of nitrogenous bases lead to the destabilization of secondary structure and

lower the DNA melting temperature [13,124,142], whereas the inter-strand crosslinking increases the T_m [171]. The broadening of the interval of transition indicates an increase in the heterogeneity of the DNA structure, i.e. about the appearance of sites in the DNA chain that differ greatly in thermal stability. We note that in solutions containing Mg^{2+} ions, after γ -irradiation at doses of 30 and 50 Gy, additional maxima appear on the differential melting curves at temperatures below the temperature of the main maximum (Fig 5.7.b). At an irradiation dose of 100 Gy, the maximum on the curve $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ is only one, but it is so blurry that it is not possible to draw any conclusions about its components. DNA melting in the presence of divalent cations has some features [172]: at the initial stage of the helix-coil transition, in the first small areas with a broken secondary structure, additional binding sites are opened for alkaline earth metal ions binding with nitrogen bases (oxygen atoms of ketogroups and endocyclic nitrogen atoms) [63,172]. In irradiated DNA, regions with a disturbed secondary structure also exist at room temperature. It can be assumed that the binding of Mg^{2+} ions to nitrogenous bases on single-stranded sites leads to additional destabilization of the secondary structure of irradiated DNA, and, as a result, the helix-coil transition becomes multi-stage. Also, in the presence of divalent cations, the probability of crosslinking in DNA under the influence of irradiation increases, and, therefore, more refractory sites appear in the macromolecule. The combined effect of these factors is likely to result in the observed shape of the melting curves in irradiated solutions with $MgCl_2$.

Several maxima in the curve $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ are also observed for DNA irradiated at a dose of 100 Gy at $\mu = 0.15$ M NaCl (Fig 5.7.c). Under these conditions, it is also possible to assume the formation of crosslinks (both between two complementary strands and between the DNA sections removed along the chain) during irradiation. As already mentioned, the volume of the DNA coil at $\mu = 0.15$ M NaCl is approximately 2 times less than at $\mu = 0.005$ M NaCl [159]. The size of the target decreases, but the density of DNA in the coil increases, which increases the probability of the formation of both cross-links and cluster damages [49,73,173]. Cluster lesions (two or more single breaks located within ~ 10 base pairs) can be the result of both direct and indirect effects of radiation; the probability of their occurrence increases with increasing radiation dose [13,49,73,173]. For

example, if there are two closely spaced single-stranded breaks in one of the complementary strands of DNA, then this section of the macromolecule will “melt” at a lower temperature [142]. Thus, it can be concluded that the presence of several maxima on the differential melting curve indicates the accumulation of a significant amount of radiation damage in DNA. More precise conclusions require additional studies of all possible types of radiation damage of DNA in these systems.

Table 5.1 summarizes the values of the DNA melting temperature (T_m) in the studied systems, and the concentration of intact bases (C), DNA molar extinction coefficient ϵ_{260} , hyperchromic effect δ , and degree of DNA renaturation after melting at rapid cooling (9). The totality of these data allows us to evaluate the number of destroyed bases and the disturbance of the DNA secondary structure under the influence of radiation. The DNA melting method provides interesting information about the state of the primary and secondary structure of DNA, and it will be used in this work to study radiation damage in DNA caused by high-energy protons irradiation. Despite the fact that, in some cases, the interpretation of the melting curves can be ambiguous, nevertheless, the magnitude of the melting temperature can serve as a completely reliable criterion for radiosensitivity. Another important parameter by which one can estimate the degree of radiation damage to DNA is the relative decrease in the amount of residual nucleobases. (chromophores) in irradiated DNA relative to unirradiated $\left(\frac{C_0 - C}{C_0}\right)$. As mentioned before, the concentration of bases in irradiated solutions determined by the Spirin method made it possible to calculate the radiation-chemical yield G of destroyed nucleobases, and the obtained values are in good agreement with the available literature data for DNA γ -irradiated. This approach will be applied in the following section when studying the action of proton radiation on DNA.

Table 5.1 DNA melting temperature (T_m), concentration of intact nucleobases (C), a relative decrease in the amount of nucleobases in irradiated solutions ($\frac{\Delta C}{C_0}$), the molar extinction coefficient of DNA (ε_{260}), the hyperchromic effect (δ) and the degree of DNA renaturation after melting upon rapid cooling (ϑ_R).

conditions	($T_m \pm 1$), °C	($\Delta T_m \pm 2$), °C	($C \pm 0.5$) 10^{-3} , gm/L	$\frac{\Delta C}{C_0} 10^{-3}$	($\varepsilon_{260} \pm 100$), $M^{-1} \text{cm}^{-1}$	($\delta \pm 0.5$), %	($\vartheta_R \pm 0.5$), %
<u>5mM Na⁺</u> D=0	57		46.1		6300	28.2	31.1
D=30 Gy	51	6	45.8	6.5±0.2	6900	30.0	22.4
D=50 Gy	47	10	42.5	78±2	7100	26.2	20.7
D=100 Gy	–	–	40.9	113±3	7700	14.5	19.0
<u>3mM Na⁺ + 2mM Mg²⁺</u> D=0	81		45.0		6200	40.9	66.9
D=30 Gy	77**	4	44.0	22.2±0.5	6200	37.9	60.0
D=50 Gy	69**	12	41.8	71±2	6600	33.4	53.6
D=100 Gy	59	22	38.1*	101±3	7600	18.7	43.0
<u>0.15M Na⁺</u> D=0	84		45.5		6400	36.7	67.8
D=30 Gy	78	6	44.3	26.4±0.5	6300	35.6	56.6
D=50 Gy	73	11	43.6	42±1	6400	33.7	54.3
D=100 Gy	–	–	42.3	70±2	6800	26.4	47.1

* $C_0 = 42.4 \cdot 10^{-3} T_m$

** 3a T_m the position of the main maximum on the differential melting curve is assumed.

5.2. Comparison of the effect of high-energy protons and gamma rays on the structure of DNA

Spirin method, which showed results that are in good agreement with the known data for the yield of destroyed nucleobases upon γ -irradiation of DNA, was used to study the destruction of bases under the effect of proton radiation [174–176]. The concentration of nucleobases in solutions with ionic strength of 5 mM NaCl and 0.15 M NaCl, irradiated with protons with an energy of 1 GeV were determined. Fig 5.9 shows the dependences of the relative change in concentration of bases on the radiation dose as a result of irradiation of DNA solutions with protons (dose rate was 4 Gy / min) and γ -quanta (dose rate of 100 Gy / min).

The DNA concentration in the initial irradiated solutions was constant and equal to (0.045 ± 0.003) g / L. It can be seen that with both low and high electrolyte concentrations, protons cause greater destruction of the DNA nucleobases than the same dose of gamma radiation. It is interesting to note that the lines obtained by extrapolating the data for $\frac{\Delta C}{C} = f(Dose)$ at higher doses of γ -radiation (from section 3.1 of this work) are lower than the dependences obtained at low doses of γ -radiation. As already mentioned, there is evidence in the literature that the RBE of radiation is dose-dependent (Fig 1.19) [110]. It can be assumed that the lower efficiency of the higher doses is explained by the fact that, at higher doses, reactive radicals accumulate in the irradiated solutions, and this increases the probability of their recombination with each other.

Therefore, at higher doses, a smaller fraction of radicals (normalized to the total number of radicals formed in solution at a given dose) occurs in the DNA fraction. It can be concluded that the data obtained are consistent with the well-known dependence of RBE on the radiation dose. Based on the data obtained in Fig 5.9, the values of the radiation-chemical yield G of destroyed nucleobases (Fig 5.10) were calculated. It is interesting to note that the form of this dependence for a 5 mM NaCl solution irradiated with protons is similar to the dependence obtained for γ -irradiated solutions of low ionic strengths (Fig 5.4.b).

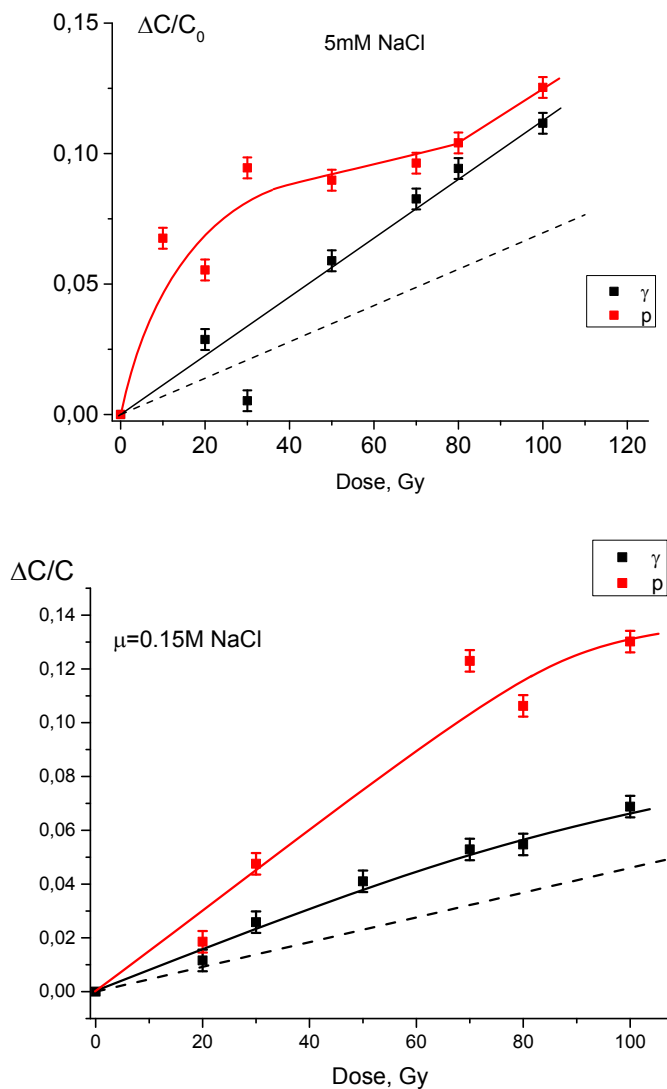
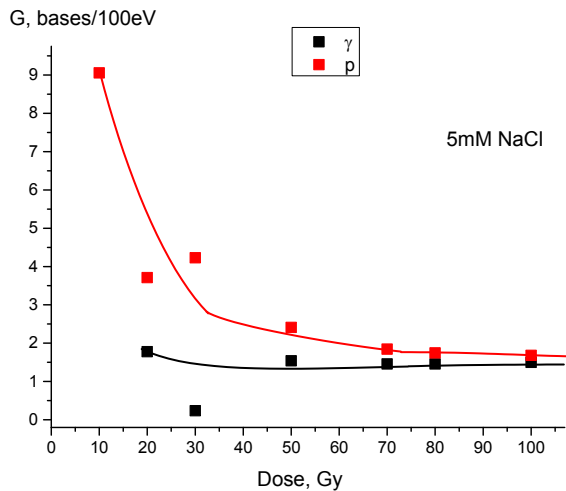


Fig 5.9 Dose dependences of the relative decrease in the concentration of DNA nucleobases under proton (p) and γ -radiation (γ) in solutions of 5 mM and 0.15 M NaCl. The dashed lines are the result of extrapolating the data obtained in this work at higher doses of γ -radiation (Section 3.1).

a



b

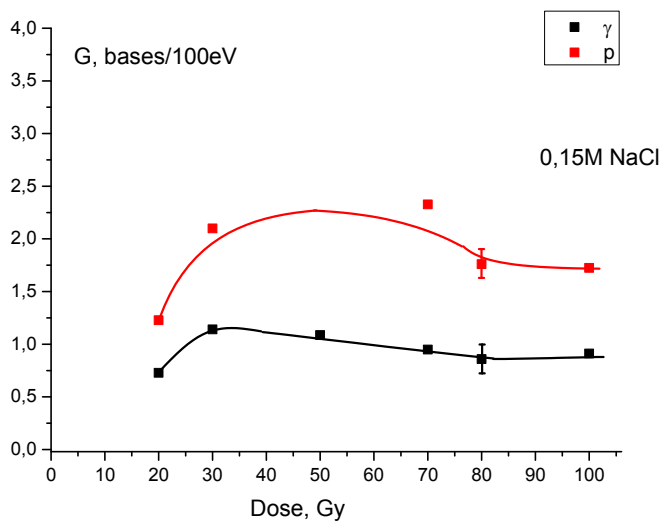


Fig 5.10 Dose dependences of the radiation-chemical yield of the destroyed nucleobases under proton and gamma irradiation.

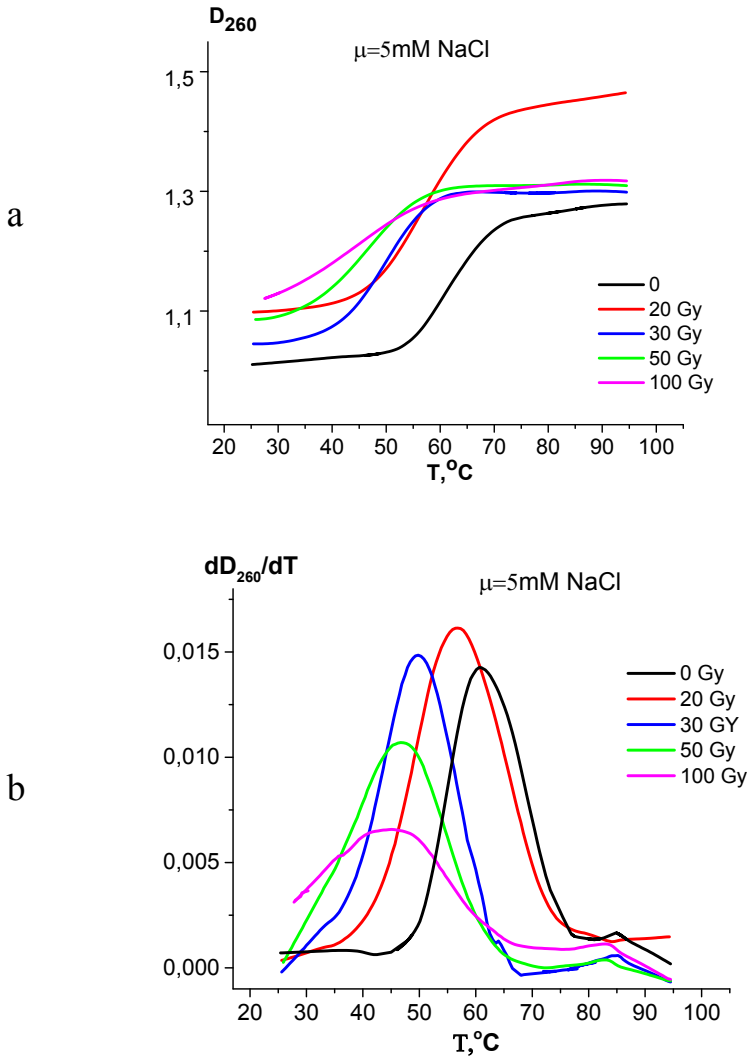


Fig 5.11 Melting curves of DNA irradiated with 1 GeV protons in a 5 mM NaCl solution. Radiation doses are shown in the graphs.

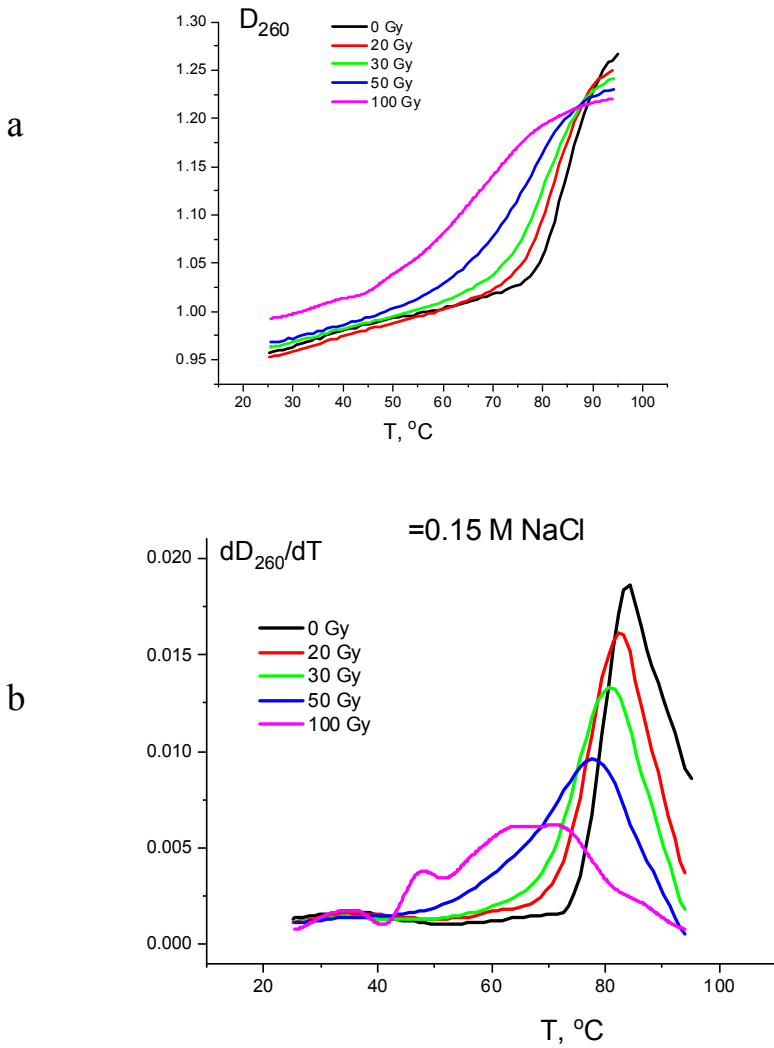


Fig 5.12 Melting curves of DNA irradiated with 1 GeV protons in a solution of 0.15 M NaCl. Radiation doses are shown in the graphs.

The results of measuring the melting temperature of DNA in solutions irradiated with high-energy protons are shown in Fig 5.11, Fig 5.12. It is interesting to note that at $\mu = 5$ mM NaCl, it was possible to obtain the melting temperature of DNA irradiated with protons at a dose of 100 Gy (unlike DNA in 5 mM NaCl, γ -irradiated with the same dose (see Fig 5.7.a). The same as for gamma irradiation at a dose of 100 g in a solution of 0.15 M NaCl (Fig 5.7.c), several maxima are observed on the curve $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ for DNA irradiated with protons at a dose of 100 Gy at the same ionic strength (Fig 5.12.b). Under these conditions, it is also possible to assume the formation of crosslinking (both between two complementary strands, and between the DNA sections removed along the chain) during irradiation.

With increasing in the dose of proton irradiation, a decrease in the melting temperature of DNA and a broadening of the helix-coil transition interval are observed. Melting curves (Fig 5.11.a, Fig 5.12.a) also allow one to notice a decrease in the hyperchromic effect in irradiated DNA. Fig 5.13 shows the dose dependences of the hyperchromic effect δ in the systems under study. In a solution of 0.15M NaCl (Fig 5.13.b), the hyperchromic effect monotonically decreases with an increase in the radiation dose, and the data obtained under proton and γ - irradiation fall into one dependence. However, in a solution of 5mM NaCl after proton irradiation at doses of 10 and 20 Gy, hyperchromism significantly increased and reached values even exceeding the δ of the native DNA.

The decrease in hyperchromism is explained by defects in the secondary structure of DNA upon irradiation (an increase in the value of $D_{260}^{25^\circ C}$) and, simultaneously, a decrease in the number of chromophores (a decrease in the value of $D_{260}^{98^\circ C}$); this tendency is particularly pronounced on the melting curves in Fig 5.12.a. Radiation defects in the secondary structure of DNA (partial denaturation) can be fixed by the value of the molar extinction coefficient of DNA ϵ_{260} , calculated taking into account the concentration of bases in the irradiated solution, determined by the Spirin method (Fig 5.14). It can be seen from these graphs that ϵ_{260} monotonously increases with increasing radiation dose, and it is approximately the same in the case of proton and γ -radiation. So, the destruction of

chromophores under proton irradiation is greater than under γ -irradiation, and radiation denaturation is approximately the same.

What can one explain the growth of the hyperchromic effect at doses of 10 and 20 Gy of proton irradiation in a solution of 5mM NaCl (Fig 5.13.a)? It can be assumed that in these systems, when heated to 98 ° C, there is a more complete defects of the stacking interactions between the DNA bases than under the same conditions in the native macromolecule. This can be done if not only the divergence of complementary strands occurs during heating, but also the fragmentation of single strands. Such fragmentation during heating can occur if there was a certain number of single-strand breaks in the DNA. This assumption is consistent with the literature that proton radiation with $LET \approx 0.3 \text{ keV} / \mu\text{m}$ produces at least 2 times more SSB and about 6 times more DSB in the DNA chain than γ radiation [111,115–119].

At doses of proton irradiation greater than 40 Gy, DNA hyperchromism no longer exceeds the δ value of the native DNA, probably because the growth of δ due to DNA fragmentation is compensated by a drop in δ due to an increase in other radiation effects: a decrease in the number of chromophores and partial denaturation of DNA. It is interesting to note that such an anomalous behavior of δ is observed only in a solution of low ionic strength. In 0.15 M NaCl, the dose dependences of δ are monotonous and the same for proton and γ -radiation. The available data is not enough for a reasonable and unambiguous conclusion about the causes of the observed effect, we can only make assumptions.

It is possible that the observed difference in the behavior of $\delta = f(\text{Dose})$ in solutions of 5 mM and 0.15 M NaCl is related to the different volumes of target macromolecules in these systems. We also note that at doses of proton and γ -irradiation of less than 100 Gy in solutions of 0.15 M NaCl, the secondary DNA structure is more resistant to radiation than in 5 mM NaCl solutions (a less sharp increase in ϵ_{260} and a less significant drop in δ with an increase in the dose of both proton and γ -irradiation (Fig 5.13, Fig 5.14), while the destruction of the bases is at the same level for solutions of 5 mM and 0.15 M NaCl. However, at γ -radiation doses above 100 Gy, it was found that the dose dependences of ϵ_{260} are the same for $\mu = 5\text{mM}$ and $\mu = 0.15\text{M}$ NaCl (see Fig 5.4).

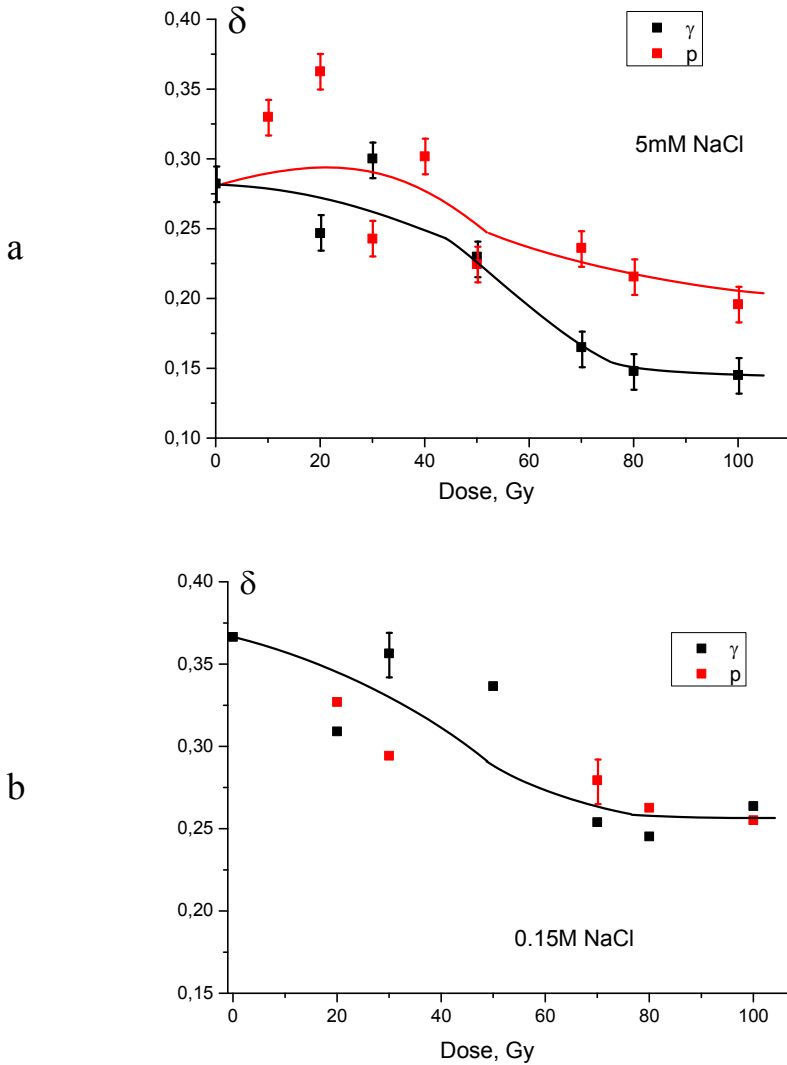


Fig 5.13 Dose dependences of the hyperchromic effect of DNA irradiated with 1 GeV protons and γ -quanta.

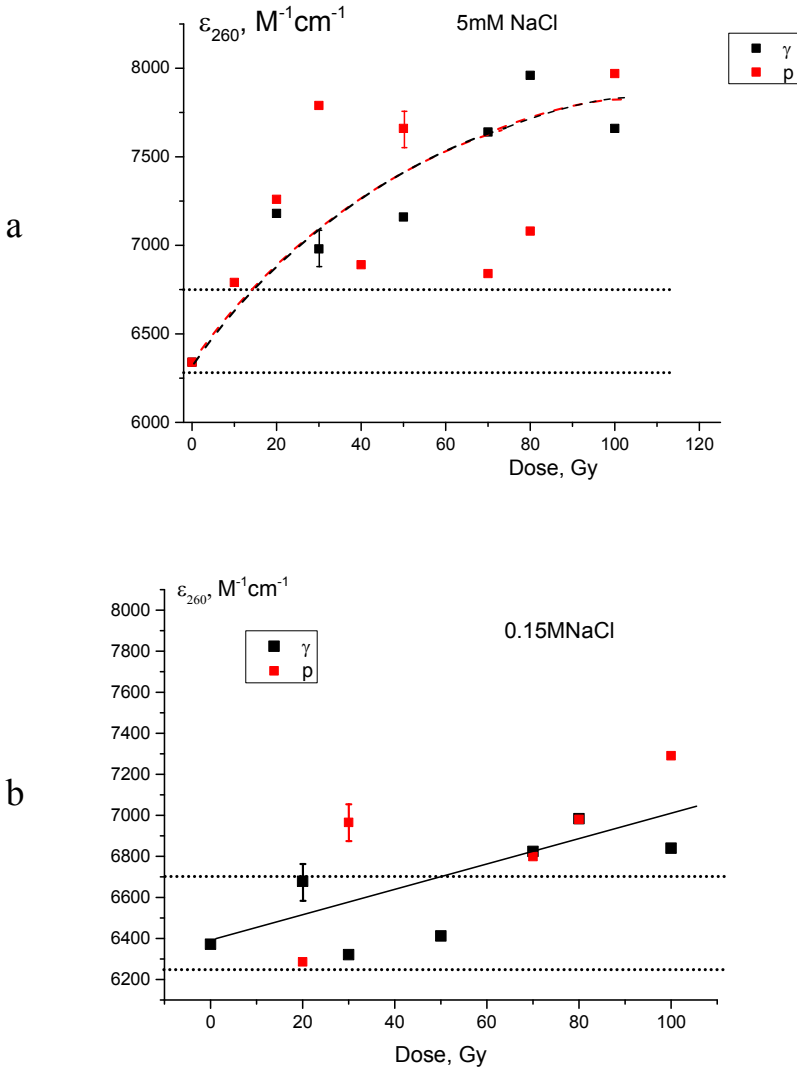


Fig 5.14 Dose dependences of the molar extinction coefficient of DNA ϵ_{260} , irradiated with 1 GeV protons and γ -quanta in a solution of 5 mM NaCl (a) and 0.15 M NaCl (b). The dotted line shows the range of ϵ_{260} values acceptable for native DNA.

Apparently, this difference in the effect of large and small doses of radiation, as well as in other biological effects (Fig 5.9, [110]) can be explained by the difference in the spatial distribution of the active radicals in the irradiated solutions.

Fig 5.15 shows the dose dependences of the decrease in the melting temperature of DNA irradiated with proton and γ -radiation: $\Delta T = T_{m0} - T_m$ (where T_{m0} is the melting temperature of native DNA, T_m is the melting temperature of irradiated DNA). Experiment shows that proton irradiation causes a lower drop in DNA T_m than γ -irradiation in a solution of 0.15 M NaCl at doses of 0–100 Gy and in 5 mM NaCl solution at doses of 70–100 Gy. Taking into account that defects of the DNA secondary structure in solutions irradiated with protons and γ -quanta are the same (Fig 5.14), and the yield of destroyed chromophores during proton irradiation is greater (Fig 5.9, Fig 5.10), it must be assumed that the value of T_m is affected by factors that are not clearly detected in the experiment, and about them we can only make some assumptions. In particular, the melting temperature is affected by the distribution of defects in the primary and secondary structure of DNA. It, in turn, is determined by the structure of the track and the distribution of ionizations and excited molecules in the path of the ionizing particle, and these parameters obviously differ for γ -radiation and high-energy protons.

To investigate the contribution of the direct and indirect effects of radiation to the structural DNA damage, we studied the dependence of radiation effects on the concentration of DNA in the irradiated solution (C_0) of ionic strength 5 mM NaCl. Fig 5.16 shows the obtained dependences of the yield G of destroyed bases upon irradiation of DNA solutions with protons and γ -quanta in a dose of 50 Gy. On the curve obtained for γ -irradiated systems, a plateau is observed in the region $18 \times 10^{-4} \text{ g / dl} < C_0 < 70 \times 10^{-4} \text{ g / dl}$, which indicates that under these conditions the observed damage is caused by the indirect action of radiation. Similar plateaus on the $G(C_0)$ dependence upon irradiation of solutions of biological macromolecules with X-ray and γ -radiation are well known in the literature and are called the “Dale effect” or “dilution effect” [177].

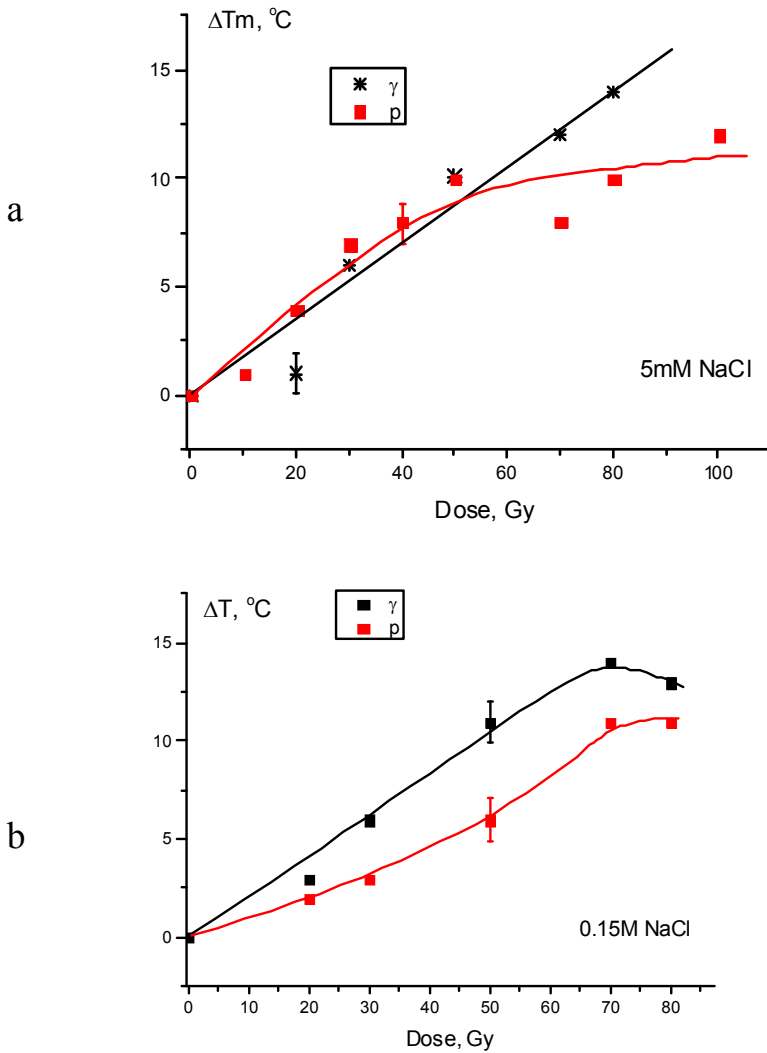


Fig 5.15 Dose dependences of the decrease in the melting temperature ΔT of DNA exposed to irradiation with protons and γ -quanta.

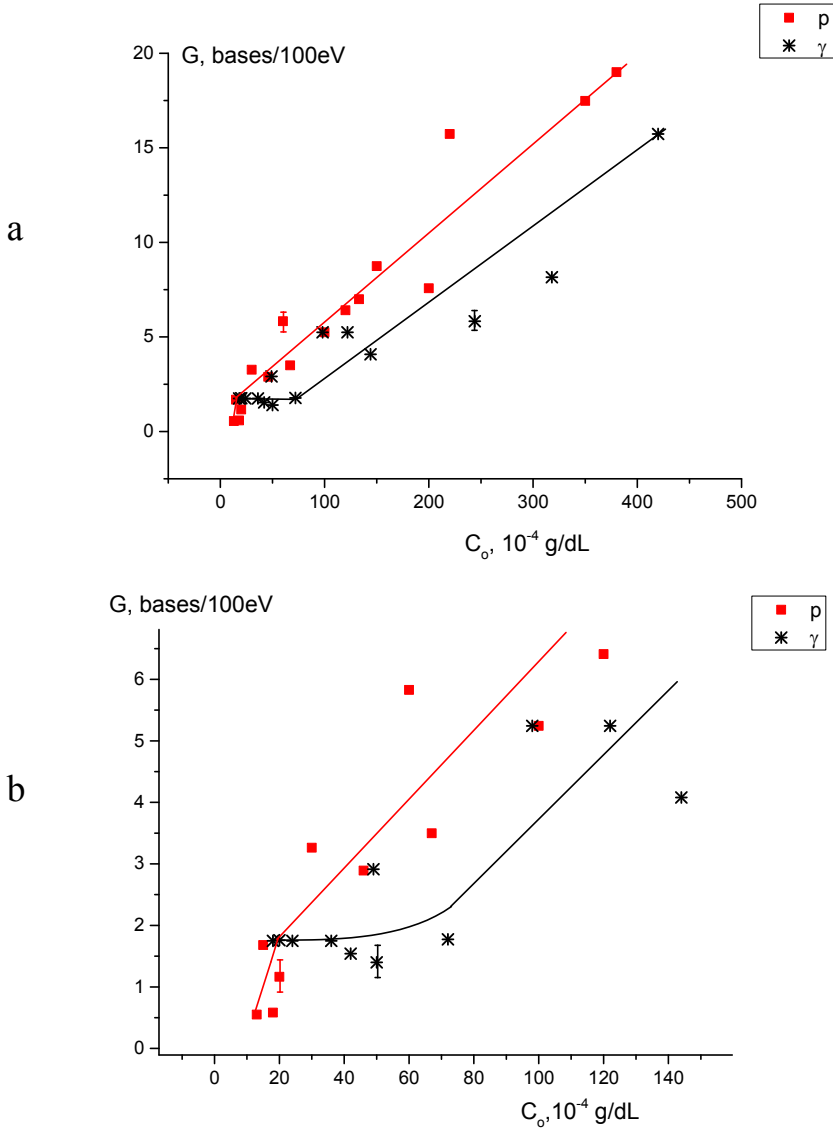


Fig 5.16 The dependence of the radiation-chemical yield of the destroyed bases on the concentration of DNA in the irradiated solution under proton and gamma irradiation at a dose of 50 Gy, $\mu=5$ mm NaCl, in Fig.(b) shows the initial progress of the dependency.

If the damage to the molecules in the solution is the result of the indirect effect of radiation (due to interaction with the active products of water radiolysis), then at a fixed dose of radiation in a certain concentration range, the damage yield does not depend on the number of target molecules. Only at very low concentrations, when the number of targets is less than the number of radiolysis products, an increase in concentration will increase the absolute number of damaged molecules [177]. But when the number of targets becomes equal to the number of active radicals (which is limited by the radiation dose and, in the case of X-ray and photon radiation, is distributed almost uniformly in the solution [85]), a further increase in the target concentration will not increase the yield of damage.

In the concentration range corresponding to the plateau in the $G(C_0)$ dependence, the amount of damage remains unchanged and is determined by the amount of free radicals that arise in the solution. At DNA concentrations in the irradiated solution, $C_0 > 70 \cdot 10^{-4}$ g / dl, G grows with increasing C_0 . This suggests that the direct effect of radiation begins to make an additional contribution to DNA damage. A qualitatively other progress of the dependence is observed for the radiation-chemical yield of destroyed bases from C_0 when irradiated with protons. There is no plateau, and G grows monotonously with increasing concentration of targets in the irradiated solution. This indicates the predominant contribution of the direct effect of radiation to DNA damage by protons.

The obtained dependences of the melting temperature of DNA on the concentration of DNA in the irradiated solution (Fig 5.17) also demonstrate different behavior for systems subjected to proton and γ -irradiation. With a decrease in C_0 , the melting temperature of DNA irradiated with protons increases, and even reaches the characteristic values of the native macromolecule. In contrast, in γ -irradiated solutions, with a decrease in C_0 , T_m decreases markedly. At $C_0 > 0.01$ g / dl, both dependences reach saturation $T_m \approx 57^\circ \text{C} = \text{const}$ ($\Delta T = 6^\circ \text{C}$).

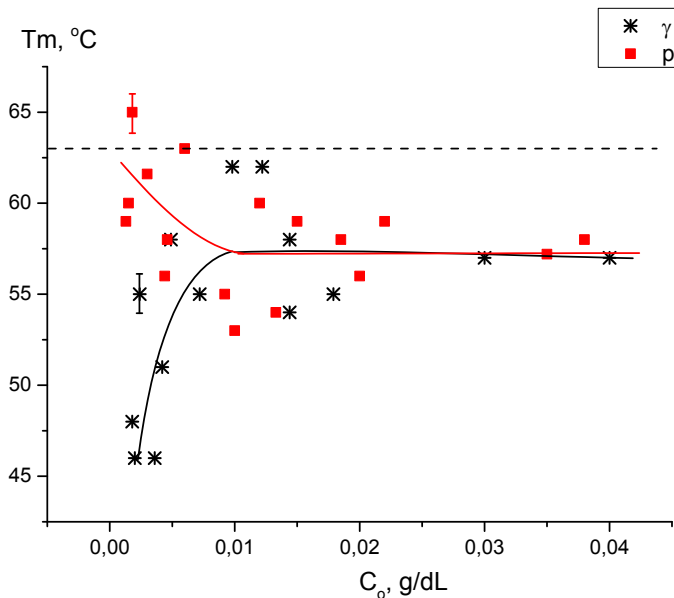


Fig 5.17 Dependence of the melting temperature of DNA irradiated by proton and γ -radiation on the concentration of DNA in the irradiated solution. The irradiation dose is 50 Gy, the ionic strength of the solution is 5mM NaCl.

It must be emphasized that the radiation-chemical yield G shows the absolute number of damages in the sample per 100 eV of absorbed energy, while DNA T_m gives an average value over all macromolecules in the solution. The result of this averaging naturally depends on the total number of molecules in the ensemble and is determined by the fraction of damaged DNA regions. Thus, we see that at a low DNA concentration in the irradiated solution, the fraction of damaged sites in the case of proton irradiation is very small, and in the case of γ -irradiation, on the contrary, is quite large. The yield of damaged bases at low C_o under proton irradiation is also lower than under γ irradiation (Fig 5.16). This confirms the earlier conclusion that γ -irradiation damages DNA predominantly by an indirect mechanism, and the active ions and radicals that damage DNA are uniformly distributed in the solution [85]. In the case of proton beam passage, the acts of ionization and excitation in solution and the formation of active radicals occur in a narrow region

along the proton track (see Fig 3.3). Thus, with low C_0 , the probability of damage with γ -radiation is higher than with proton irradiation.

The molar extinction coefficient ϵ_{260} and the degree of DNA renaturation θ were determined for all the studied systems (Fig 5.18). The determination of these parameters also involves averaging over all macromolecules exist in the solution. The degree of DNA denaturation (Fig 5.18.a) in γ -irradiated solutions is most significant at low C_0 , decreasing monotonously with the growth of the total number of macromolecules in the solution. In solutions irradiated with protons, radiation denaturation is insignificant at low C_0 (Fig 5.18.a) (which correlates with a low yield of damaged bases and high T_m values (Fig 5.16, Fig 5.17)), but it rises with the growth of C_0 . The maximum on the curve $\epsilon_{260} = f(C_0)$ reflects the struggle of factors that make the opposite contribution to the determined quantity ϵ_{260} . From one hand, with the growth of C_0 , the probability of direct DNA damage by proton radiation and the destabilization of the secondary structure of DNA increase; we see at the same time an increase in the yield of destroyed bases and a decrease in T_m of DNA (Fig 5.16, Fig 5.17). This is responsible for the growth of ϵ_{260} . On the other hand, the total number of macromolecules in the solution increases, and when averaging the value of ϵ_{260} , sites with undisturbed secondary structure make an increasingly noticeable contribution.

The ability of DNA to be renaturated upon cooling to 25 ° C after heating to 98 ° C depends on many factors. As already mentioned, complete renaturation of high molecular weight DNA is not possible even with very slow annealing due to the fact that each single DNA strand after a discrepancy turns into a ball, which makes it extremely unlikely to reverse self-assembly of fully complementary double-stranded structures. Destruction and modification of bases complicates the renaturation process. However, other types of radiation damage - single- and double-strand breaks, inter-strand crosslinking - increase the probability of reverse self-assembly of complementary sequences during annealing. In Fig 5.18.b we see the result summarizing the contributions of these factors: the θ value of the DNA irradiated with protons and γ -quanta mainly lies below the value of $\theta = 0.31$ obtained for native DNA, however, in some cases it exceeds it. The tendency toward an increase in the degree of renaturation is observed with increasing C_0 , which probably

reflects an increase in the probability of crosslinking under these conditions during both proton and gamma irradiation.

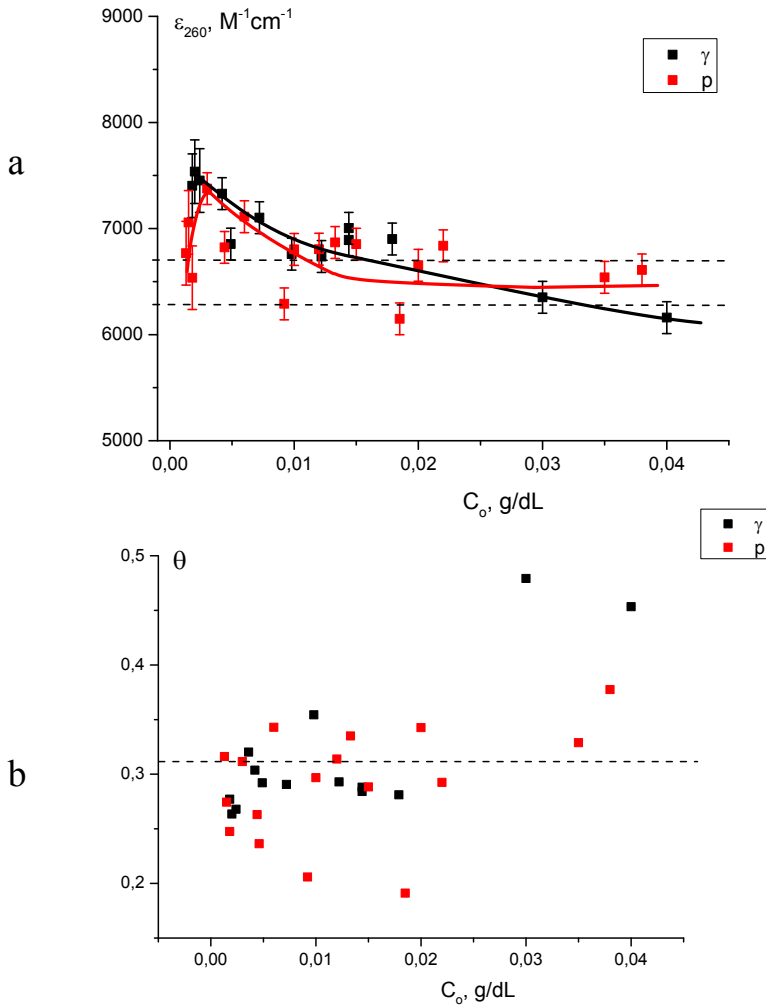


Fig 5.18 Dependences of the molar extinction coefficient ϵ_{260} and the degree of DNA renaturation θ on the concentration C_0 of the DNA in the irradiated solution upon irradiation with proton and γ -radiation. The irradiation dose is 50 Gy, the ionic strength of the solution is 5mM NaCl.

The study of radiation damage under the effect of proton and γ -radiation in simpler systems - aqueous solutions of thymidine nucleotide was performed. Thymidine is a nucleoside that is part of DNA; it exhibits the highest radiosensitivity compared to other nucleosides in DNA [81]. The destruction of thymidine under the effect of radiation can be detected by its absorption. Knowing the molar extinction coefficient of thymidine (ϵ_{265} . (Thym, water) = $9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ϵ_{265} . (Thym, 15% ethanol) = $7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), it is possible to determine the concentration of thymidine in the solution after irradiation and calculate the yield of its destruction.

The yield G of thymidine destruction was determined during irradiation with protons and γ -radiation in an aqueous solution and in a solution containing 15 vol.% Ethanol (Fig 5.19, Table 5.2). Ethanol is a scavenger of OH radicals and is widely used in experiments to identify the role of these active radiolysis products in the radiation damage of various biological objects [177,178]. The value of $G = 1.60$ molecules / 100 eV for thymidine, γ -irradiated in water, is consistent with the available data [81]. Experiment has shown that the yield of thymidine destruction when irradiated with protons is higher than when irradiated with γ -quanta (Table 5.2). In the presence of ethanol, the destruction of thymidine by both proton and γ -radiation decreases markedly: for proton radiation, the dose-reduction factor $\frac{G(w)}{G(eth)} = 12$, for γ -radiation $\frac{G(w)}{G(eth)} = 15$.

Apparently, the main reason for the weakening of the radiation effect is the ethanol scavenger ability of the most active product of water radiolysis - the OH radical. However, it should be noted that in the water-ethanol solution, the association between thymidine molecules increases, that is, its distribution in the solution becomes less uniform [179]. This can lead to an additional decrease in the radiation effect during proton irradiation, which is also characterized by a high degree of heterogeneity of the distribution of ions and radicals in the irradiated sample. Therefore, experiment has shown that the removal of OH radicals from a solution protects thymidine from destruction by proton irradiation less effectively than under γ -irradiation. This indicates that the contribution of the direct effect of radiation on thymidine in the aqueous medium in the case of proton radiation is higher than in the case of γ -radiation.

Table 5.2 The radiation-chemical yield of thymidine destruction upon proton and γ -irradiation.

Type of Radiation	Solvent composition	$G \pm 0.02$, molecule/100 eV
p	water	2.19
γ	Water	1.60
p	15 Vol.% ethanol	0.18
γ	15 Vol.% ethanol	0.11

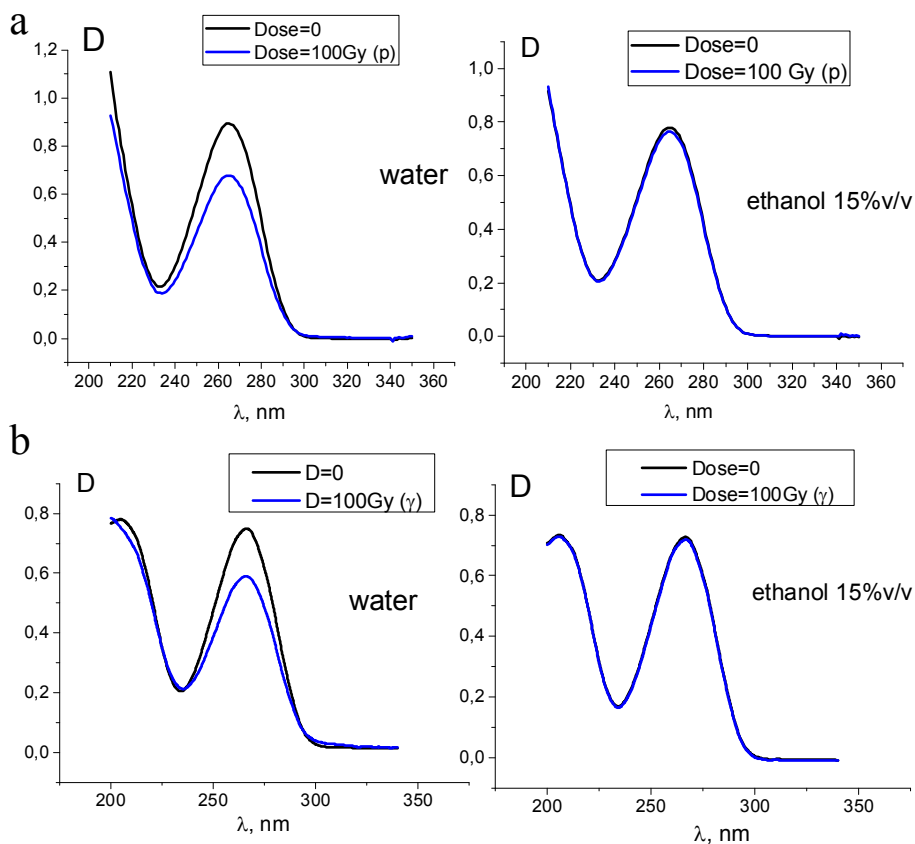


Fig 5.19 Absorption spectra of thymidine irradiated with proton (a) and γ -radiation at a dose of 100 Gy.

5.3. The effect of catechin in the process of DNA damage by high-energy protons and γ -radiation.

Catechin belongs to the group of bioflavonoids - polyphenols of plant origin. The structural formula of catechin is shown in Fig 5.20. Catechins are characterized by the ability to easily oxidize. Under the action of sunlight or with weak heating, they acquire a color, which is associated with the oxidation by air of oxygen of a part of phenolic hydroxyl groups [180]. Catechin is found in tea, coffee, fruits and berries [181].

The beneficial effect of tea on the human body is largely due to the presence of a large number of catechins [181–183]. The hydroxyl groups of the catechin are hydrogen donors, and therefore it is able to inactivate free radicals [181,184–186]. It is known that catechins exhibit radioprotective properties during UV and γ -irradiation of biological systems of different levels of organization [186–189]. In this work, we studied the effect of catechin on radiation damage to DNA in solution during irradiation with high-energy protons and γ -radiation [190].

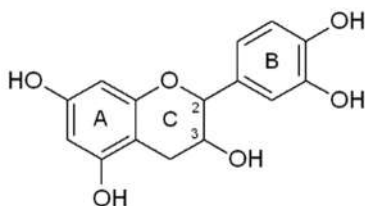


Fig 5.20 The structural formula of catechin [181].

The absorption spectrum of catechin in water is shown in Fig 5.21. It overlaps with the absorption spectrum of DNA; its maximum is at $\lambda = 280$ nm. As already mentioned, catechin is oxidized when heated, and its spectrum undergoes changes. Therefore, using the hydrolysis procedure to determine the concentration of DNA in solutions containing catechin may not give completely correct results.

Consequently, the registration of radiation damage to DNA in solutions with catechin is limited by the data of the DNA melting method. When the catechin solution is heated to 98 ° C, its absorption at a wavelength of 260 nm (at which absorption is registered in the DNA melting method) changes slightly (Fig 5.21).

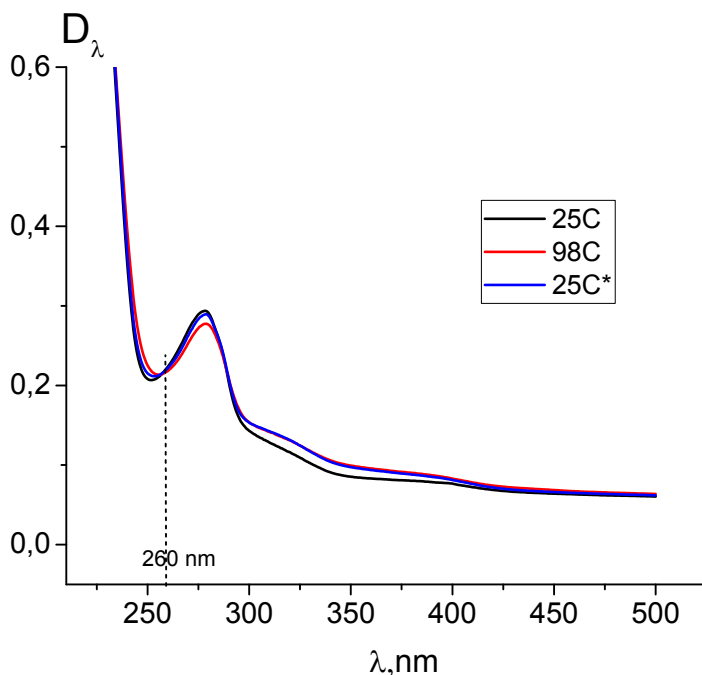


Fig 5.21 Absorption spectrum of catechin in water. The graph shows the temperatures at which the spectra were registered, * - the spectrum of a solution heated to 98 ° C, and then cooled to 25 ° C.

In this experiment, a DNA sample with a molecular mass of $(11.2 \pm 0.6) \cdot 10^6 Da$ was used. For native DNA in a solution of 5 mM NaCl, the value of $T_{m0} = 69^\circ C$ was obtained. In addition, for this DNA sample, it was possible to obtain the T_m value after γ -irradiation at a dose of 100 Gy.

Subsequently, studying the effect of catechin on DNA radiation damage under the action of proton and γ - radiation was carried out at a fixed dose of 100 Gy (so that the observed effect was as noticeable as possible) with varying catechin concentrations in the irradiated solution. The concentration of DNA in the solution was 0.004 g / dl, and the ionic strength of the solutions was 5 mM NaCl.

Fig 5.22 shows the melting curves of native DNA, as well as DNA irradiated with 1 GeV protons and γ -radiation at a dose of 100 Gy in a water-salt solution of $\mu = 5$ mM NaCl in the absence of catechin. It can be seen that irradiation with both protons and γ -quanta causes a significant decrease in T_m and a broadening of the helix-coil transition interval. These effects have already been observed in this work (Sec. 3.1, 3.2).

Fig 5.23, Fig 5.24 show the melting curves of DNA irradiated with protons and γ -quanta in solutions containing catechin. Fig 5.25 shows the dependence of the melting temperature of DNA on the concentration of catechin in unirradiated solutions (control) and in solutions exposed to proton and γ -radiation. In the presence of catechin, the melting temperature of DNA in unirradiated solutions does not change within the experimental error. This is agreed with the literature data that catechin binds weakly to DNA, probably through hydrophobic and hydrophilic interactions. The preferred binding sites of catechin are in the grooves of the double helix, while the secondary structure of DNA is not defected [187,191,192].

With the growth in the concentration of catechin in the irradiated solution, an increase in the melting temperature of DNA is observed, as well as a narrowing of the melting interval for both systems irradiated with protons and γ -irradiated. In the range $0 < C(\text{Cat}) < 5 \cdot 10^{-5}$ M T_m of irradiated DNA increases sharply (Fig 5.25), and then at $C(\text{Cat}) > 5 \cdot 10^{-5}$ M it reaches saturation. Moreover, the T_m of γ -irradiated DNA almost reaches the values obtained for unirradiated DNA, while the T_m of DNA in solutions irradiated with protons is significantly lower than T_{m0} (Fig 5.25).

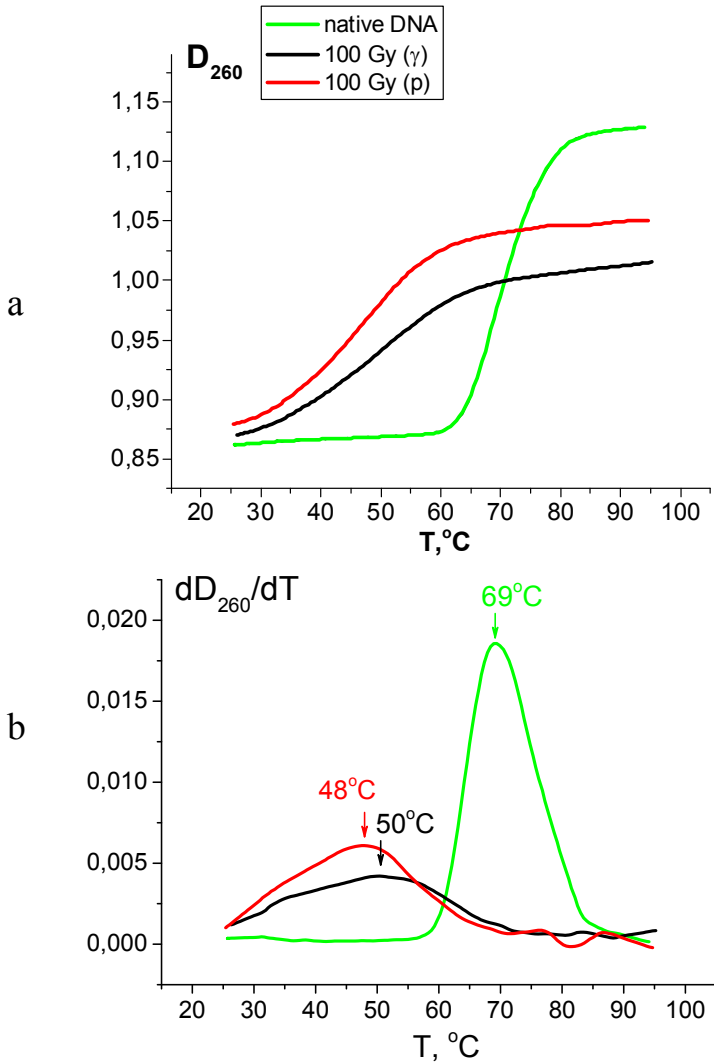


Fig 5.22 Melting curves (a) and their first derivative with respect to temperature (b) for native DNA and DNA exposed to proton and γ -irradiation at a dose of 100 Gy in a water-salt solution $\mu = 5$ mM NaCl. Melting temperatures are shown in the graph.

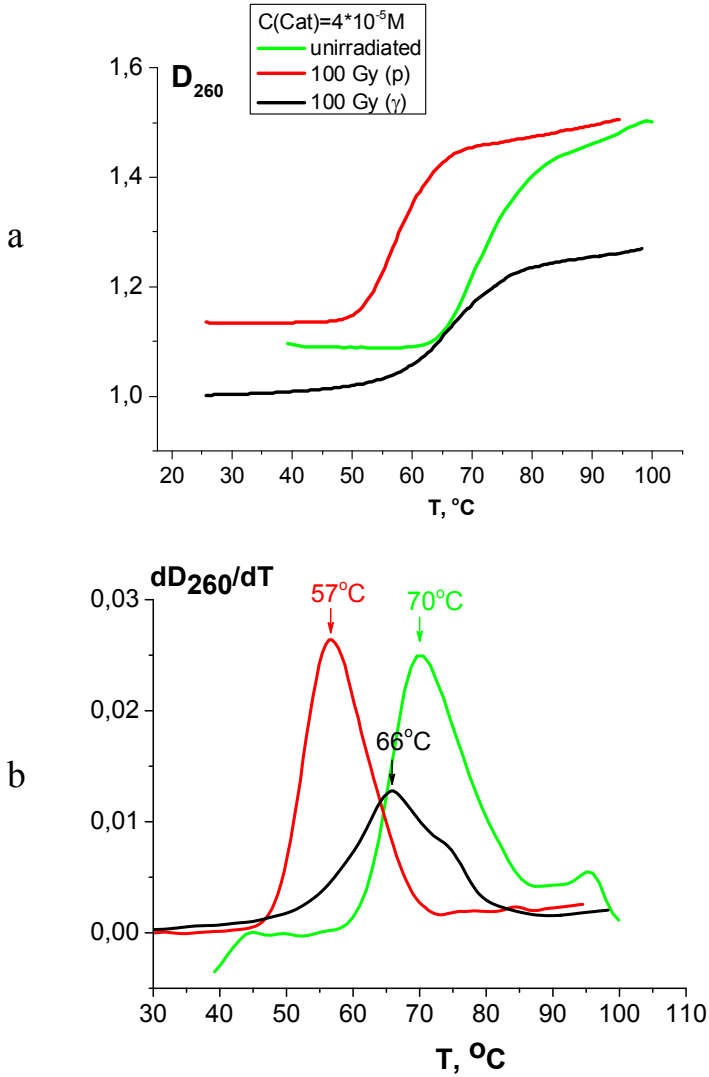


Fig 5.23 Melting curves (a) and their first derivative with respect to temperature (b) for unirradiated DNA and DNA exposed to proton and γ -irradiation at a dose of 100 Gy in a solution containing $4 \cdot 10^{-5}$ M catechins. Melting temperatures are shown in the graph.

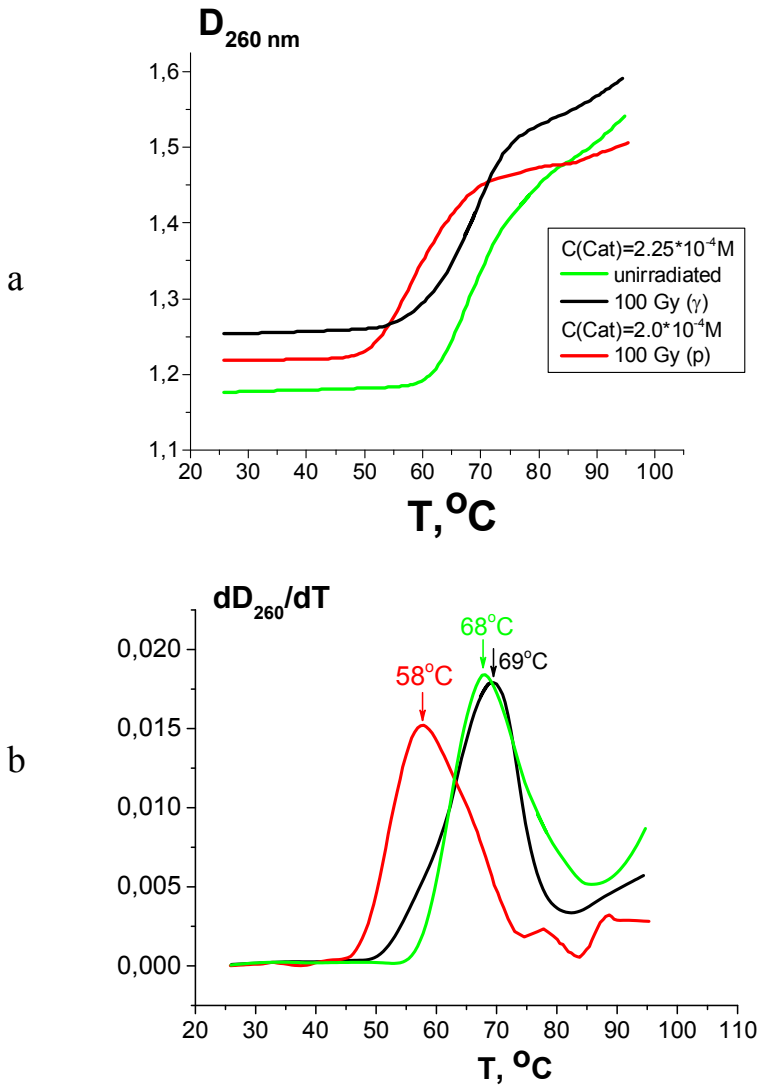


Fig 5.24 Melting curves (a) and their first derivative with respect to temperature (b) for unirradiated DNA and DNA exposed to proton and γ -irradiation at a dose of 100 Gy in a solution containing $2.5 \cdot 10^{-5}$ M, $2 \cdot 10^{-4}$ M catechins. Melting points are shown in the graph.

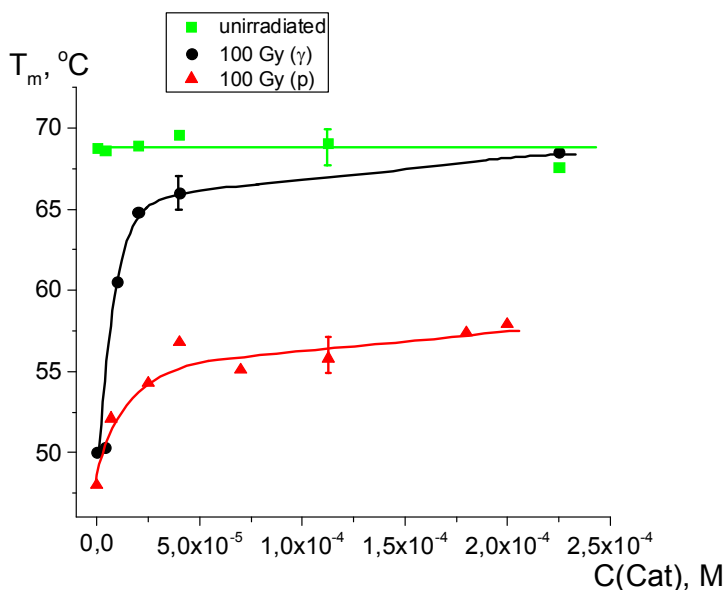


Fig 5.25 Dependence of the melting temperature of DNA on the concentration of catechin in unirradiated solutions (control) and in solutions exposed to proton and γ -irradiation at a dose of 100 Gy.

It can be concluded that the radioprotective properties of catechin are manifested to a much greater extent in DNA solutions exposed to γ -irradiation than to irradiation with protons. Since the radioprotective effect of catechin is due to the scavenger of active oxidative radicals, the data obtained confirm the conclusion made earlier in the work that the direct effect of radiation makes a significant contribution to DNA damage by high-energy protons. Thus, it can be assumed that many traditional protector-scavengers of free radicals that are used to protect against photon radiation will be less effective in protecting the body from damage by high-energy protons.

Conclusion

In order to simulate the effect of the high-energy proton components of cosmic radiation on the DNA structure, we used a monoenergetic proton beam with an energy of 1 GeV obtained at the synchrocyclotron of the St. Petersburg Institute of Nuclear Physics NRC “Kurchatov Institute” SC-1000, and corresponds to the maximum proton energy of primary cosmic radiation.

In this work, spectral studies of model aqueous DNA solutions irradiated with high-energy protons at doses of 0–100 Gy were performed. To compare the radiation effect, ^{60}Co γ radiation was used, which has the same LET value = 0.3 keV / μm as the proton radiation under study. To determine the radiation-chemical yield (G) of the destroyed nitrogenous DNA bases, the Spirin method was firstly used for spectrophotometric determination of the concentration of nucleic acids. For systems exposed to γ -irradiation, this method gave results that are in agreement with the literature data obtained using other physico-chemical methods.

Main results and conclusions:

- 1) A decrease in the radiation effect with an increase in the ionic strength (μ) of the irradiated solution was detected at γ -irradiation doses up to 1000 Gy, which can be explained by a decrease in the size of the target, and also by the change in the structure and composition of the DNA hydration shell.
- 2) For the first time, the G values of the destroyed nitrogenous bases of DNA were obtained, as well as the melting temperature and parameters of the secondary structure of DNA in solutions irradiated with protons with an energy of 1 GeV in the absorbed dose range 0–100 Gy, with varying electrolyte concentration. It was found that the yield of the destroyed nitrogenous bases of DNA and thymidine nucleoside in solution under the action of proton radiation is higher than that of ^{60}Co γ -radiation. The dependence of G on the concentration of targets obtained in the work and the experiment using a scavenger of OH radicals (ethanol) showed that the contribution of the direct action of radiation on DNA

and thymidine in an aqueous medium is higher in the case of proton radiation than in the case of γ -radiation.

- 3) The dose dependences of the melting temperature (T_m) of DNA irradiated with high-energy protons and γ -quanta at $\mu = 5$ mM and $\mu = 0.15$ M NaCl were measured. A monotonic decrease in T_m with increasing radiation dose was found, as well as a broadening of the temperature interval of the helix-coil transition, indicating an increase in the heterogeneity of the DNA structure. At a dose of 100 Gy, signs of the formation of cross-linking are observed.
- 4) The effect of the well-known catechin antioxidant on the radiation damage to DNA was studied using the melting temperature (T_m) as a criterion for radiosensitivity. The dependences of T_m on the concentration of catechin in the irradiated solution were obtained. It was found that at a catechin concentration above 2.2×10^{-4} M, the T_m of γ -irradiated DNA almost completely restores the value obtained for native DNA (T_{m0}), while T_m of DNA irradiated with protons with an energy of 1 GeV is $0.85 T_{m0}$. This confirms the conclusion made in the work about the greater contribution of the direct action of radiation to DNA damage during proton irradiation. The results show that the traditional protectors-scavengers of free radicals, which are used to protect against photon radiation, will be less effective in protecting the body from damage by high-energy protons.

List of abbreviations and symbols

LET - Linear energy transfer

G - radiation-chemical yield

T_m - melting temperature of DNA

PNPI SC – Synchrocyclotron of Petersburg Nuclear Physics Institute

NRC KI – National Research Center Kurchatov Institute

LBL - Lawrence Berkeley Laboratory

SOBP - Bragg peak

RBE - relative biological effectiveness

LINAC - Linear accelerator

RSC RST - Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies

e - the electron charge

v - the particle velocity

$\beta = \frac{v}{c}$ the ratio of the speed of a charged particle to the speed of light

I₀ - the average ionization potential of atoms of a substance

C - speed of light

D₃₇ - the radiation dose at which 37% of the objects survive (remain inactive)

e_{aq} - hydrated electron

SSB - single-strand break

DSB - double-stranded break

LMD -local multiple damage

DNA-PC - DNA-protein crosslinking

bp – base pair

Cat – catechin

ε - the molar extinction coefficient

C_{DNA} - DNA concentration

CD - Circular dichroism

LCPL - Left- hand circular polarized light

RCPL - right- hand circular polarized light

δ - hyperchromic effect

θ - degree of DNA renaturation after melting with rapid cooling

References

1. Kim M.H.Y., Rusek A., Cucinotta F.A. Issues for simulation of galactic cosmic ray exposures for radiobiological research at ground-based accelerators // *Front. Oncol.* 2015. Vol. 5, № JUN. P. 1–14.
2. Durante M., Cucinotta F.A. Physical basis of radiation protection in space travel // *Rev. Mod. Phys.* 2011. Vol. 83, № 4.
3. Valdés-Galicia J.F., González L.X. Solar modulation of low energy galactic cosmic rays in the near-earth space environment // *Adv. Sp. Res. COSPAR*, 2016. Vol. 57, № 6. P. 1294–1306.
4. M. Tanabashi et al. (Particle Data Group). RPP-29. Cosmic Rays // *Phys. Rev. D*. 2018. Vol. 98, № October 2017. P. 030001.
5. Hasan Murshed. *Fundamentals of Radiation Oncology: Physical, Biological, and Clinical Aspects*. 3rd ed. Academic Press, 2019. 743 p.
6. Paganetti H. *Proton therapy physics*. CRC press, 2018.
7. William R. Hendee. *Proton and Carbon Ion Therapy* // CRC press / ed. Ma C. -m. C., Lomax T. 2012.
8. WILSON R.R. Radiological use of fast protons. // *Radiology*. 1946.
9. TOBIAS C.A., ANGER H.O., LAWRENCE J.H. Radiological use of high energy deuterons and alpha particles. // *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 1952.
10. Ashikawa J.K. et al. Acute effects of high-energy protons and alpha particles in mice. // *Radiat. Res. Suppl.* 1967.

11. Lawrence J.H. Proton irradiation of the pituitary // *Cancer*. 1957.
12. Breuer H., Smit B.J. Proton Therapy and Radiosurgery. Springer Science & Business Media, 2001.
13. Kudrjashov Ju.B. Radiacionnaja biofizika (ionizirujushhie izluchenija) // Izdatel'stvo "Fizmatlit." 2004. 448 / 443 p.
14. Podgorsak E. B. Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005. 485–505 p.
15. Paganetti H. et al. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002.
16. Gerweck L.E., Kozin S. V. Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy // *Radiotherapy and Oncology*. 1999.
17. Britten R.A. et al. Variations in the RBE for Cell Killing Along the Depth-Dose Profile of a Modulated Proton Therapy Beam // *Radiat. Res.* 2013.
18. Matsumoto Y. et al. Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: In vitro study // *J. Radiat. Res.* 2014.
19. Dalrymple G. V. et al. The Relative Biological Effectiveness of 138-Mev Protons as Compared to Cobalt-60 Gamma Radiation // *Radiat. Res.* 1966.
20. Larsson B., Kihlman B.A. Chromosome aberrations following irradiation with high-energy protons and their secondary radiation: A study of dose distribution and biological efficiency using root-tips of vicia faba and allium cepa // *Int. J. Radiat. Biol.* 1960.
21. Dalrymple G. V. et al. Some Effects of 138-Mev Protons on Primates // *Radiat. Res.* 1966.

22. LAWRENCE J.H. et al. Heavy-particle irradiation in neoplastic and neurologic disease. // J. Neurosurg. 1962.
23. Levin W.P. et al. Proton beam therapy // Br. J. Cancer. 2005. Vol. 93, № 8. P. 849–854.
24. Levitt SH, Purdy JA, Perez CA V.S. Technical basis of radiation therapy: practical clinical applications. 4th revise. New York: Springer, 2006.
25. Lin R. et al. Conformal proton radiation therapy of the posterior fossa: A study comparing protons with three-dimensional planned photons in limiting dose to auditory structures // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2000.
26. St. Clair W.H. et al. Advantage of protons compared to conventional X-ray or IMRT in the treatment of a pediatric patient with medulloblastoma // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
27. Suit H. et al. Proton Beams to Replace Photon Beams in Radical Dose Treatments // Acta Oncologica. 2003.
28. Yock T. et al. Proton radiotherapy for orbital rhabdomyosarcoma: Clinical outcome and a dosimetric comparison with photons // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005.
29. Weber D.C. et al. A treatment planning comparison of intensity modulated photon and proton therapy for paraspinal sarcomas // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
30. Chan A.W., Liebsch N.J. Proton radiation therapy for head and neck cancer // Journal of Surgical Oncology. 2008.
31. Lee M. et al. A comparison of proton and megavoltage X-ray treatment planning for prostate cancer // Radiother. Oncol. 1994.

32. Lomax A.J. et al. A treatment planning inter-comparison of proton and intensity modulated photon radiotherapy // *Radiother. Oncol.* 1999.
33. Glimelius B M.A. Proton beam therapy do we need the randomized trials and can we do them? // *Radiother. Oncol.* 2007.
34. Goitein M., Cox J.D. Should randomized clinical trials be required for proton radiotherapy? // *Journal of Clinical Oncology.* 2008.
35. Goitein M. Trials and tribulations in charged particle radiotherapy // *Radiotherapy and Oncology.* 2010.
36. Brada M., Pijls-Johannesma M., De Ruyscher D. Current clinical evidence for proton therapy // *Cancer Journal.* 2009.
37. Granov A.M. et al. The results of proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas // *Vopr. Onkol.* 2013.
38. Granov A.M. et al. SOROKALETNIJ OPYT KLINICHESKOGO PRIMENENIJA SINHCROKLOTRONA PETERBURGSKOGO INSTITUTA. 2016. P. 10–17.
39. Karlin D.L., Konnov B.A., Nizkovolos V.B. The state and prospects in the development of the medical proton tract on the synchrocyclotron in Gatchina // *Meditinskaya Radiol.* 1983. Vol. 28, № 3.
40. Abrosimov N.K. et al. 1000 MeV Proton beam therapy facility at Petersburg Nuclear Physics Institute Synchrocyclotron // *Journal of Physics: Conference Series.* 2006.
41. N.K.Abrosimov, A.AVorob'ev, VAEIseev, E.M.Ivanov, G.F.Miheev, G.A.Rjabov, EA.Zherbin, D.L.Karlin, BA.Konnov, L.A.Mel'nikov. Sovremennoe sostojanie medicinskogo protonnogo trakta sinhrociklotrona LIJaF AN SSSR // *Voprosy atomnoj nauki i tehniki, serija «Elektrofizicheskaja apparatura».* 1987.

№ 23. P. 61–66.

42. N.K.Abrosimov, A.AVorob'ev, VAEliseev, E.M.Ivanov, G.F.Miheev, G.ARjabov, EA.Zherbin, D.L.Karlin, B.AKononov, V.N.Kuz'min, V.B.Nizkovolos, KJa.Senichev, L.AMel'nikov, B.V.Vinogradov. Klinicheskie i fiziko-tehnicheskie issledovanija na sinhrociklotrone Leningradskogo instituta jadernoj fiziki // AN SSSR, Medicinskaja radiologija. 1987. Vol. 8. P. 10-16.
43. Ermakov K.N., Ivanov N.A., Kotikov E.A., Lobanov O.V., Najdenkov A.F., Pashuk V.V. T.M.. Absoljutnyj ionizacionnyj monitor s funkciej profilometra // Voprosy Atomnoj Nauki i Tehniki, serija “Fizika radiacionnogo vozdejstvija na radiojelektronnuju apparaturu”, Nauchno-tehnicheskij sbornik, vypusk 1. 2011. P. 37–42.
44. Ivanov N.A., Lobanov O.V., Pashuk V.V. Absoljutnyj ionizacionnyj monitor puchkov protonov © 2009. 2009. № 6. P. 5–10.
45. 16 I.R. ICRU Report 16: Linear energy Transfer // J. Int. Comm. Radiat. Units Meas. 1970.
46. L.D. Landau, E. M. Lifshic. “Teoreticheskaja fizika”, tom II, Teorija polja. M.: Fizmatlit, 2012. 536 s. p.
47. Kabakchi S.A., Bulgakova G.P. Radiacionnaja himija v jadernom toplivnom cikle (uchebnoe rukovodstvo). 1997. P. 104s.
48. Nikjoo H. et al. Can Monte Carlo track structure codes reveal reaction mechanism in DNA damage and improve radiation therapy? // Radiat. Phys. Chem. 2008. Vol. 77, № 10–12.
49. Clemens von Sonntag. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. 1st ed. Springer, 2006. 528 p.

50. Kudryashov Yu. B. RADIATION BIOPHYSICS (IONIZING RADIATION). New York: Nova: Science Publishers, 2008.
51. Coggle J.E. The effect of radiation at the tissue level." Biological effects of radiations. London: Taylor & Francis Ltd, 1983.
52. Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Basic radiation oncology // Basic Radiation Oncology. 2010.
53. Thomas D. P W.C.E. Cell Biology. Philadelphia: Saunders, 2007. 20–47 p.
54. Gunderson L. L, Tepper J. E. The biologic basis of radiation oncology: // Clin. Radiat. Oncol. Philadelphia Elsevier. 2016. Vol. 4th ed. P. 2–40.
55. Hall E.J. Radiobiology for the Radiologist 6th edition // tp1. 2006.
56. Perez C. A, Brady L. W. Biologic basis of radiation therapy: principles and practice of radiation oncology // Balt. MD Lippincott Williams Wilkins. 2013. № 6th ed. P. 61–88.
57. Hall, Eric J., and David J. Brenner. Radiobiology of low-and high-dose-rate brachytherapy." Technical Basis of Radiation Therapy // Springer, Berlin, Heidelberg,. 2006. P. 291–308.
58. Savage, John R.K. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations // Environ. Mol. Mutagen. 1993.
59. Olive P.L. The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation // Radiat. Res. 1998.
60. Calini V., Urani C., Camatini M. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells // Cell Biol. Toxicol. 2002. Vol. 18, № 6. P. 369–379.

61. Annunziato A.T. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin // Nature Education. 2008.
62. Cells and DNA. Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services. 2020.
63. Zenger V. Principy strukturnoj organizacii nukleinovyh kislot. 1987. 584 p.
64. Deckbar D., Jeggo P.A., Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2011. Vol. 46, № 4. P. 271–283.
65. Pawlik T.M., Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
66. Cancer Information & supportNetwork.
67. Goodarzi A.A., Jeggo P., Lobrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax // DNA Repair (Amst). Elsevier B.V., 2010. Vol. 9, № 12. P. 1273–1282.
68. IAEA. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students // IAEA Training Course Series. 2010.
69. Pauwels E.K.J. Radioactivity Radionuclides Radiation // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2005.
70. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the radiologist: Seventh edition // Radiobiology for the Radiologist: Seventh Edition. 2012.
71. Le Caër S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation // Water. 2011. Vol. 3, № 1. P. 235–253.

72. GOODHEAD D.T. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations. // J. Radiat. Res. 1999. Vol. 40, № Supl. P. 1–13.
73. Gaziev A.I. Povrezhdenie DNK v kletkah pod dejstviem ionizirujushhej radiacii. // Radiacionnaja biologija. Radiojekologija. 1999. Vol. 39, № № 6. P. s.630– 638.
74. Van der Schans G.P. Gamma-ray induced double-Strand breaks in DNA resulting from randomly-inflicted single-strand breaks: Temporal local denaturation, a new radiation phenomenon? // Int. J. Radiat. Biol. 1978. Vol. 33, № 2. P. 105–120.
75. Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation // Radiother. Oncol. 1989. Vol. 14, № 4. P. 307–320.
76. Jeggo P.A., Löbrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? // Oncogene. 2007. Vol. 26, № 56. P. 7717–7719.
77. Magnander K., Elmroth K. Biological consequences of formation and repair of complex DNA damage // Cancer Letters. 2012. Vol. 327, № 1–2. P. 90–96.
78. Ahnström G., Bryant P.E. DNA double-Strand breaks generated by the repair of x-ray damage in chinese hamster cells // Int. J. Radiat. Biol. 1982. Vol. 41, № 6. P. 671–676.
79. Bonura T., Smith K.C. Enzymatic production of deoxyribonucleic acid double strand breaks after ultraviolet irradiation of Escherichia coli K 12 // J. Bacteriol. 1975. Vol. 121, № 2. P. 511–517.
80. Whiteman M. et al. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: Implications for assessment of oxidative damage in vivo // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 296, № 4.
81. Savich A. V.,Shal'nov M.I.,Timofeev-Resovskij N. V. Vvedenie v

molekuljarnuju radiobiologiju. M., Medicina, 1981. 321 p.

82. Scholes G., Ward J.F., Weiss J. Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids // J. Mol. Biol. 1960. Vol. 2, № 6.
83. Leuchtenberger, A. Effect of ionizing radiation on DNA. Physical, chemical and biological aspects / ed. herausgegeben von AJ Bertinchamps, J. Hüttermann W.K. und R.T. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1978.
84. Falk M., Lukášová E., Kozubek S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 2008. Vol. 1783, № 12.
85. Pikaev A.K., Kabakchi S.A., Makarov I.E. Vysokotemperaturnyj radioliz vody i vodnyh rastvorov // Jenergoatomizdat Moskva. 1988.
86. Rjabchenko N. I. Radiacija i DNK. M. Atomizdat, 1979.
87. Fedorenko B. S. Radiobiologičeskie jeffekty korpuskuljarnyh izluchenij: Radiacionnaja bezopasnost' kosmicheskikh poletov. M.: Nauka, 2006. 189 p.
88. Durante M., Manti L. Human response to high-background radiation environments on Earth and in space // Adv. Sp. Res. 2008. Vol. 42, № 6.
89. Snigiryova G.P., Novitskaya N.N., Fedorenko B.S. Cytogenetic examination of cosmonauts for space radiation exposure estimation // Adv. Sp. Res. 2012. Vol. 50, № 4.
90. Walsh L. et al. Research plans in Europe for radiation health hazard assessment in exploratory space missions // Life Sci. Sp. Res. 2019. Vol. 21.
91. Cortese F. et al. Vive la radiorésistance!: Converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration

and colonization // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 18.

92. Norbury J.W. et al. Galactic cosmic ray simulation at the NASA Space Radiation Laboratory // *Life Sci. Sp. Res.* 2016. Vol. 8. P. 38–51.
93. Sihver L., Mortazavi S.M.J. Radiation Risks and Countermeasures for Humans on Deep Space Missions // *IEEE Aerosp. Conf. Proc. IEEE*, 2019. Vol. 2019-March. P. 1–10.
94. Miousse I.R. et al. Changes in one-carbon metabolism and DNA methylation in the hearts of mice exposed to space environment-relevant doses of oxygen ions (16O) // *Life Sci. Sp. Res.* 2019. Vol. 22.
95. Katz R., Cucinotta F.A., Zhang C.X. The calculation of radial dose from heavy ions: Predictions of biological action cross sections // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*. 1996. Vol. 107, № 1–4. P. 287–291.
96. De Vera J.P. et al. Supporting Mars exploration: BIOMEX in Low Earth Orbit and further astrobiological studies on the Moon using Raman and PanCam technology // *Planet. Space Sci.* 2012. Vol. 74, № 1. P. 103–110.
97. Cucinotta F.A., Dicello J.F. On the development of biophysical models for space radiation risk assessment // *Adv. Sp. Res.* 2000. Vol. 25, № 10. P. 2131–2140.
98. Kennedy A.R., Wan X.S. Countermeasures for space radiation induced adverse biologic effects // *Advances in Space Research*. 2011. Vol. 48, № 9.
99. Lu T. et al. Detection of DNA damage by space radiation in human fibroblasts flown on the International Space Station // *Life Sci. Sp. Res.* 2017. Vol. 12.
100. Backhaus T. et al. DNA damage of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique // *Planet.*

Space Sci. 2019. Vol. 177.

101. Moreno-Villanueva M., Wu H. Radiation and microgravity – Associated stress factors and carcinogenesis // REACH. 2019. Vol. 13.
102. Kokhan V.S. et al. An investigation of the single and combined effects of hypogravity and ionizing radiation on brain monoamine metabolism and rats' behavior // Life Sci. Sp. Res. 2019. Vol. 20.
103. Blakely E.A., Chang P.Y. A review of ground-based heavy-ion radiobiology relevant to space radiation risk assessment. Part II: Cardiovascular and immunological effects // Adv. Sp. Res. 2007. Vol. 40, № 4.
104. Blakely E.A., Chang P.Y. A review of ground-based heavy ion radiobiology relevant to space radiation risk assessment: Cataracts and CNS effects // Adv. Sp. Res. 2007. Vol. 40, № 9.
105. Antonelli F. et al. DNA fragmentation induced by Fe ions in human cells: Shielding influence on spatially correlated damage // Adv. Sp. Res. 2004. Vol. 34, № 6.
106. Jones B. A simpler energy transfer efficiency model to predict relative biological effect for protons and heavier ions // Front. Oncol. 2015. Vol. 5, № Aug.
107. Jones B. Clinical radiobiology of proton therapy: modeling of RBE // Acta Oncol. (Madr). 2017. Vol. 56, № 11.
108. Cucinotta F.A. et al. Space radiation risk limits and Earth-Moon-Mars environmental models // Sp. Weather. 2010. Vol. 8, № 12.
109. Sage E., Shikazono N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis // Free Radic. Biol. Med. 2017. Vol. 107, № December 2016. P. 125–135.

110. Paganetti H. Proton relative biological effectiveness-uncertainties and opportunities // *Int. J. Part. Ther.* 2018. Vol. 5, № 1. P. 2–14.
111. Friedland W. et al. Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № February. P. 1–15.
112. Sakata D. et al. Evaluation of early radiation DNA damage in a fractal cell nucleus model using Geant4-DNA // *Phys. Medica.* 2019. Vol. 62.
113. de la Fuente Rosales L. et al. Accounting for radiation-induced indirect damage on DNA with the Geant 4-DNA code // *Phys. Medica.* 2018. Vol. 51.
114. Lee, Brian Hee Eun, Wang, C. K.Chris. A cell-by-cell Monte Carlo simulation for assessing radiation-induced DNA double strand breaks // *Phys. Medica.* 2019. Vol. 62.
115. Klimczak U. et al. Irradiation of plasmid and phage DNA in water-alcohol mixtures: Strand breaks and lethal damage as a function of scavenger concentration // *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. Vol. 64, № 5.
116. Pogożelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. Quantitative Assessment of the Contribution of Clustered Damage to DNA Double-Strand Breaks Induced by 60 Co Gamma Rays and Fission Neutrons // *Radiat. Res.* 1999. Vol. 151, № 4.
117. Herskind C. Single-Strand breaks can lead to complex configurations of plasmid DNA in vitro // *Int. J. Radiat. Biol.* 1987. Vol. 52, № 4.
118. Peak J.G. et al. DNA damage produced by exposure of supercoiled plasmid DNA to high- and low-LET ionizing radiation: Effects of hydroxyl radical quenchers // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. Vol. 67, № 1.
119. Ito T, Baker SC, Stickley CD, Peak JG P.M. Dependence of the yield of strand

breaks induced by gamma-rays in DNA on the physical conditions of exposure: water content and temperature. // *Int J Radiat Biol.* 1993. Vol. 63, № 3. P. 289-96.

120. Mehta A. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Derivation of Beer-Lambert Law [Electronic resource] // *Pharmaxchange.info*. 2012.
121. Spirin AS. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. // *Biokhimiia* (Moscow, Russ. 1958. Vol. 23(5). P. 656–662.
122. Cantor C.R., Schimmel P.R. Part II: Techniques for the study of biological structure and function // *Biophysical Chemistry*. 1980.
123. YU.S. Iazurkin, M.D. Frank-Kamenetskii, and E.N. Trifonov. Melting of DNA: Its Study and Application as a Research Method. 1970. Vol. 9. P. 1263–1306.
124. A. A. Vedenov, A. M. Dyhne M.D. Frank-Kamenetskij. PEREHOD SPIRAL" - KLUBOK V DNK // *UFN*. 1971. Vol. t.105, № vyp.3. P. 479–519.
125. Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis // *Biophys. Chem.* 2005. Vol. 117, № 3. P. 207–215.
126. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // *J. Mol. Biol.* 1962.
127. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. Enthalpy of helix-coil transition of dna: Dependence on na^+ concentration and gc-content // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1990. Vol. 8, № 1. P. 131–138.
128. Gawronski J., Skowronek P. Electronic circular dichroism for chiral analysis // *Chiral Anal.* 2006. P. 397–459.
129. Martin S.R., Schilstra M.J. Circular Dichroism and Its Application to the Study

of Biomolecules // Methods in Cell Biology. 2008.

130. Alison Rodger; Bengt Nordén. Circular Dichroism and Linear Dichroism. Oxford University Press., 1997.
131. Yang G. et al. The chirality induction and modulation of polymers by circularly polarized light // Symmetry. 2019. Vol. 11, № 4.
132.
https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD_Chem_107B%3A_Physical_Chemistry_for_Life_Scientists/Chapters/7%3A_Spectroscopy/7.9%3A_Optical_Rotatory_Dispersion_and_Circular_Dichroism [Electronic resource].
133. Neidig M.L. et al. Kinetic and spectroscopic studies of N694C lipoxygenase: A probe of the substrate activation mechanism of a nonheme ferric enzyme // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 24. P. 7531–7537.
134. Gray D.M., Ratliff R.L., Vaughan M.R. Circular dichroism spectroscopy of DNA // Methods Enzymol. 1992. Vol. 211, № C. P. 389–406.
135. Lee A.J., Wallace S.S. Visualizing the search for radiation-damaged DNA bases in real time // Radiat. Phys. Chem. 2016. Vol. 128.
136. Su Y. et al. Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system // Exp. Dermatol. 2010. Vol. 19, № 8.
137. Ticli G., Prosperi E. In situ analysis of dna-protein complex formation upon radiation-induced dna damage // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 22.
138. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A.R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay // Mutat. Res. - Genet.

Toxicol. Environ. Mutagen. 2009. Vol. 674, № 1–2.

139. Cadet J., Wagner J.R. Radiation-induced damage to cellular DNA : Chemical nature and mechanisms of lesion formation // Radiat. Phys. Chem. Elsevier, 2016. Vol. 128. P. 54–59.
140. Rafi A., Weiss J.J., Wheeler C.M. Effect of γ -radiation on aqueous solutions of DNA's of different base composition // BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth. 1968. Vol. 169, № 1.
141. Trumbore C.N. et al. Ultraviolet difference spectral studies in the gamma radiolysis of DNA and model compounds. I. Aqueous solutions of DNA bases // Int. J. Radiat. Biol. 1989. Vol. 56, № 6. P. 923–941.
142. C.R.Cantor, P.R. Schimmel. Biophysical Chemistry. Part 2,3. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
143. Minsky A. The chiral code: From DNA primary structures to quaternary assemblies // Chirality. 1998. Vol. 10, № 5.
144. Tunis-Schneider, Mary Jane B., Maestre, Marcos F. Circular dichroism spectra of oriented and unoriented deoxyribonucleic acid films-A preliminary study // J. Mol. Biol. 1970. Vol. 52, № 3.
145. Kypr J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA // Nucleic Acids Research. 2009. Vol. 37, № 6.
146. Ivanov V.I. et al. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism // Biopolymers. 1973. Vol. 12, № 1.
147. Kas'janenko N.A., D'jakonova H.E., Frisman Je.V. Issledovanie molekuljarnogo mehanizma vzaimodejstvija DNK s dvuhvalentnymi io-nami metallov // Molek. biologija. 1989. Vol. t.23, № vyp.4. P. s.835-841.

148. Kas'janenko N.A., Bartoshevich S.F. Issledovanie vlijanija rN sredi na konformaciju molekuly DNK. // Molekuljarnaja biologija. 1985. Vol. t.19, № vyp. 5. P. s. 1386-1393.
149. Ramm E.I. et al. Circular Dichroism of DNA and Histones in the Free State and in Deoxyribonucleoprotein // Eur. J. Biochem. 1972. Vol. 25, № 2.
150. Uyesugi D.F., Trumbore C.N. The effect of low ionic strength on the radiation chemistry and physical properties of calf thymus DNA // Int. J. Radiat. Biol. 1983. Vol. 44, № 6.
151. Paston S. V., Zamotin V. V. Conformational changes of DNA γ -irradiated in the presence of aliphatic alcohols in solution // J. Struct. Chem. 2009. Vol. 50, № 5.
152. Eichhorn G.L., Shin Y.A. Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. The Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity // J. Am. Chem. Soc. 1968. Vol. 90, № 26.
153. Lando D.Y. et al. Theoretical and experimental study of dna helix-coil transition in acidic and alkaline medium // J. Biomol. Struct. Dyn. 1994. Vol. 12, № 2.
154. Vardevanyan P.O. et al. Joint interaction of ethidium bromide and methylene blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34, № 7.
155. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S. V. Application of spectral methods for studying DNA damage induced by gamma-radiation // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V., 2018. Vol. 200. P. 85–92.
156. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S. V. DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy // Journal of Physics: Conference Series. Institute of Physics Publishing, 2018. Vol.

1038, № 1.

157. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S.V., Helix – coil transition in DNA with defects of primary structure // In Book of Abstracts of 9th International Symposium “Molecular Mobility and Order in Polymer Systems”, St.-Petersburg, June 19-23. 2017. P. P-059.
158. W. Saenger. Principles of Nucleic Acid Structure. Springer Advanced Texts in Chemistry. 1984. 574 p.
159. Kas'yanenko N.A. Conformational changes of DNA molecules in interactions with bioactive compounds. I. Influence of metal ions on the conformation of DNA molecules in solution // J. Struct. Chem. 2006. Vol. 47, № 1.
160. Feig M., Pettitt B.M. Sodium and chlorine ions as part of the DNA solvation shell // Biophys. J. 1999. Vol. 77, № 4.
161. Fenley M.O., Manning G.S., Olson W.K. Approach to the limit of counterion condensation // Biopolymers. 1990. Vol. 30, № 13–14.
162. Frisman E., Zarubina O. Effect of γ -irradiation on the conformation of the native DNA molecule // Biophys. Chem. 1993. Vol. 46, № 1.
163. Grygoryev D., Moskalenko O., Zimbrick J.D. Effect of sodium and acetate ions on 8-hydroxyguanine formation in irradiated aqueous solutions of DNA and 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate // Int. J. Radiat. Biol. 2011. Vol. 87, № 9. P. 974–983.
164. Cadet J., Douki T., Ravanat J.L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA // Free Radic. Biol. Med. Elsevier Inc., 2010. Vol. 49, № 1. P. 9–21.
165. N.A.Kas'janenko, G.Sjel'man-Husejn Sosa, V.N.Uverskij, Je.V.Frisman. Issledovanie vlijanija ionov Mn^{2+} i Mn^{2+} na konformaciju molekuly DNK //

Molekuljarnaja biologija. 1987. Vol. t.21, № vyp.1. P. 140-146.

166. Wanek J., Rühli F.J. Risk to fragmented DNA in dry, wet, and frozen states from computed tomography: a comparative theoretical study // Radiat. Environ. Biophys. 2016. Vol. 55, № 2.
167. Eschenbrenner A. et al. Strand breaks induced in plasmid DNA by ultrasoft X-rays: Influence of hydration and packing // Int. J. Radiat. Biol. 2007. Vol. 83, № 10.
168. Swarts S.G. et al. Radiation-Induced DNA Damage as a Function of Hydration: I. Release of Unaltered Bases // Radiat. Res. 1992. Vol. 129, № 3.
169. Falcone J.M. et al. Products of the reactions of the dry and aqueous electron with hydrated DNA: Hydrogen and 5,6-dihydropyrimidines // Radiat. Phys. Chem. 2005. Vol. 72, № 2–3.
170. Milano M.T., Bernhard W.A. The Effect of Packing and Conformation on Free Radical Yields in Films of Variably Hydrated DNA // Radiat. Res. 1999. Vol. 151, № 1.
171. Lando D.Y. et al. Melting of cross-linked dna: Ii. influence of interstrand linking on dna stability // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. Vol. 15, № 1.
172. Duguid J.G. et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. II. The thermal denaturation of DNA in the presence of Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} // Biophys. J. Elsevier, 1995. Vol. 69, № 6. P. 2623–2641.
173. Georgakilas A.G., O'Neill P., Stewart R.D. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? // Radiat. Res. 2013. Vol. 180, № 1. P. 100–109.
174. O.M. Kotb, S.V.Paston., DNA damage in aqueous solutions as a result of indirect

action of ionizing radiation // v Sb. tezisov VIII Mezhdunarodnoj molodezhnoj nauchnoj shkoly-konferencii "Sovremennye problemy fiziki i tehnologij", MIFI, 15-20 aprelja, Moskva. 2019. P. 55-56.

175. O.Kotb, S.Tankovskaia,. Comparative Study of the DNA Irradiated with Proton Particles and Gamma Radiation // in: Int. Stud. Conf. Science and Progress-2017"-SPb.: SOLO, 13-17 November,. 2017. P. 272 pp. p. 219.
176. Kotb O.M., Paston S.V., Ezhov V. F., Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A.3, Khalikov A.I. DNA STRUCTURAL ALTERATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS INDUCED BY HIGH ENERGY PROTON BEAM RADIATION // in: 15th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists "Modern Problems of Polymer Science", 28 – 31 October. Saint Petersburg, 2019. P. 4-O-13, 195.
177. Kudryashov Yu. RADIATION BIOPHYSICS (IONIZING RADIATION). New York: Nova: Science Publishers, 2008.
178. Sharpatyj V. A. Radiacionnaja himija biopolimerov. Moskva: Jenergoizda: Moskva. Jenergoizda, 1981. 168 s p.
179. Nikolaev A.I., Paston S. V. Solvent type influence on thymidine UV-sensitivity // J. Phys. Conf. Ser. 2015. Vol. 661, № 1.
180. Janeiro P., Oliveira Brett A.M. Catechin electrochemical oxidation mechanisms // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 518, № 1–2.
181. Zaprometov M.N. Biohimija katehinov. M., «Nauka», 1964.
182. Hamer M. The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from in vitro, animal, and human research // Nutrition Research. 2007. Vol. 27, № 7.

183. Yam T.S., Shah S., Hamilton-Miller J.M.T. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. Vol. 152, № 1.
184. Heijnen C.G.M. et al. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups // *Toxicol. Vit.* 2001. Vol. 15, № 1.
185. Iwai K. et al. Effect of tea catechins on mitochondrial DNA 4977-bp deletions in human leucocytes // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2006. Vol. 595, № 1–2.
186. Dale G. Nagle, Daneel Ferreira, and Yu-Dong Zhou. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives // *Phytochemistry.* 2006. Vol. 67, № 17. P. 1849–1855.
187. Ershov DS, Paston SV, Kartsova LA, Alekseeva AV, Ganzha OV K.N. Investigation of the radioprotective properties of some tea polyphenols(Article) // *Struct. Chem.* 2011. Vol. 22, № 2. P. 475–482.
188. Richi B., Kale R.K., Tiku A.B. Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2012. Vol. 747, № 1. P. 62–70.
189. Clarke K.A. et al. Green tea catechins and their metabolites in human skin before and after exposure to ultraviolet radiation // *J. Nutr. Biochem.* 2016. Vol. 27. P. 203–210.
190. Kotb O.M., Paston S.V., Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A., Halikov A.I. Issledovanie povrezhdenij molekuly DNK, vyzvannyh oblucheniem protonami i gamma-kvantami // *V SBORNIKE NAUCHNYH TRUDOV VI S##EZDA BIOFIZIKOV ROSSII, Sochi, 16–21 sentjabrja.* 2019. P. 231.

191. Kuzuhara T. et al. DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, № 25. P. 17446–17456.
192. Chanphai P., Tajmir-Riahi H.A. Structural dynamics of DNA binding to tea catechins // Int. J. Biol. Macromol. 2019. Vol. 125. P. 238–243.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Котб Омар Махмуд Эльсайед

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧНОЙ
ПРОТОННОЙ КОМПОНЕНТЫ
КОСМИЧЕСКИХ ЛУЧЕЙ НА СТРУКТУРУ ДНК**

Специальность 01.04.16 «Физика атомного ядра и элементарных частиц»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

(Перевод с английского)

Научный руководитель:
Кандидат физико-математических
наук, доцент
Ежов Виктор Федорович

Научный руководитель:
Кандидат физико-математических
наук, доцент
Пастон Софья Владимировна

Санкт-Петербург
2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	139
1. Обзор литературы	148
1.1. Космические исследования	148
1.1.1. Освоение космического пространства и космическое излучение..	148
1.1.2. Возможности моделирования первичного космического излучения в земных условиях	151
1.2. Протонная терапия	152
1.2.1. Сравнение между протонной терапией и традиционной фотонной лучевой терапией.....	152
1.2.2. Протонная терапия на пучке протонов 1 ГэВ (ПИЯФ ЦС-1000 МэВ).....	157
2. Облучение и дозиметрия биологических образцов пучком протонов 1 ГэВ и гамма квантами.....	162
2.1. Облучение ДНК на медицинском пучке синхротрона ПИЯФ.....	162
2.2. Облучение ДНК гамма-квантами в НИЦ КИ «ПИЯФ».....	165
3. Действие ионизирующего излучения на ДНК (обзор)	167
3.1. Поглощение энергии ионизирующих излучений.....	167
3.2. Структура ДНК	175

3.3.	Клеточный цикл и радиационная гибель клеток.....	177
3.4.	Прямое и косвенное действие радиации.....	178
3.5.	Радиационные повреждения в структуре ДНК	181
3.6.	Действие космического излучения на биологические системы	187
4.	Материалы и методы.....	195
4.1.	Материалы.....	195
4.2.	Метод Спирина	195
4.3.	Метод плавления.....	197
4.4.	Круговой дихроизм (КД).....	200
5.	Результаты и обсуждение.....	205
5.1.	Применение спектральных методов для определения радиационных повреждений в структуре ДНК	205
5.2.	Сравнение влияния высокоэнергетичных протонов и гамма-квантов на структуру ДНК.....	226
5.3.	Влияние катехина в процессе повреждения ДНК высокоэнергетичными протонами и γ -излучением.	244
	Заключение.....	251
	Список сокращений и обозначений.....	253
	Список литературы	255

Введение

В ходе межпланетных пилотируемых космических полётов первоочередной задачей является защита экипажа от воздействия космического излучения, основной компонентой которого являются протоны высоких энергий. Изучение биологического действия высокоэнергетичных протонов необходимо для разработки медицинских средств защиты космонавтов. Известно, что лучевое поражение организма определяется повреждениями ДНК наиболее быстро делящихся клеток (красный костный мозг, эпителий). Одно из наиболее опасных отдаленных последствий облучения – канцерогенез – также провоцируется повреждениями генетического аппарата клеток. Поэтому изучение нарушений в структуре ДНК под действием протонного излучения высоких энергий необходимо для понимания молекулярных механизмов радиационного эффекта и поиска радиопротекторов.

За многие десятилетия радиобиологических исследований накоплено огромное количество информации о повреждениях в структуре ДНК, вызванных γ - и рентгеновским облучением. Данных о радиационных повреждениях ДНК, вызванных тяжелыми заряженными частицами, существенно меньше; внимание исследователей сконцентрировано, в основном, на излучениях с высокой ЛПЭ в окрестности пика Брэгга, так как это весьма актуально для развития новых методов лечения онкологических заболеваний. Заряженные частицы высоких энергий (в области плато кривой Брэгга) обладают высокой проникающей способностью и низкой ЛПЭ, приближающейся к ЛПЭ γ -излучения ^{60}Co , которое в настоящее время принято в качестве стандартного для вычисления относительной биологической эффективности (ОБЭ) разных видов излучения.

Величина ОБЭ используется для расчетов допустимых поглощенных доз радиации для людей, которые по роду своей профессиональной деятельности подвергаются действию излучений, для оценки радиационных рисков, в частности, при планировании лучевой терапии. Очень важно учитывать, что ЛПЭ излучения является не единственным фактором, определяющим ОБЭ, также большую роль

играют вид биологического объекта, на котором тестируется излучение (в случае клеток – скорость деления, фаза клеточного цикла, условия инкубации и др.), критерий биологического эффекта, мощность дозы, закономерности поглощения данного вида излучения веществом. Поэтому оценки ОБЭ разных видов излучения бывают неоднозначными. Сравнение биологической эффективности высокоэнергетических протонов и стандартного γ -излучения необходимо для вычисления радиационной нагрузки на организм человека во время экспедиции в дальнем космосе.

Для выяснения начальных физико-химических этапов развития процессов радиационного поражения удобно использовать модельные системы – водные растворы ДНК. Вторичная структура ДНК в клетке и в растворе сходна, и представляет собой В-форму двойной спирали. Использование растворов ДНК для изучения радиационного эффекта позволяет избежать влияния многих биологических факторов (например, действия репарирующей системы), которые действуют в клетке и усложняют картину лучевого поражения. Кроме того, модельные растворы удобны для тестирования радиомодифицирующего действия веществ – потенциальных протекторов. Варьирование состава растворителя и концентрации молекул-мишеней может дать дополнительную информацию о механизмах действия высокоэнергетичных протонов на биологические объекты.

В земных условиях получить протоны высоких энергий можно с помощью ускорителей. В работе использован синхроциклотрон Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт» СЦ-1000 с моноэнергетическим пучком протонов с энергией 1 ГэВ, которая соответствует максимуму энергии протонов первичного космического излучения. Кроме того, на базе этого синхроциклотрона с 1975 года существует медицинский центр стереотаксической протонной терапии, в котором успешно проводятся научные исследования и лечение заболеваний головного мозга. Данный центр является единственным в мире, в котором используется пучок протонов столь высоких энергий. Изучение повреждений в молекуле ДНК, возникших под действием протонного излучения

должно позволить оценить эффективность лучевого воздействия и усовершенствовать методику протонной терапии.

Целью диссертационной работы является исследование структуры молекулы ДНК, подвергнутой облучению протонами с энергией 1 ГэВ в растворах и сравнение радиационного эффекта протонного и стандартного γ -излучения ^{60}Co , а также изучение влияния антиоксиданта катехина на процесс повреждения ДНК высокоэнергетичными протонами.

Задачи исследования:

- 1) Разработать методику облучения и дозиметрии биологических образцов на пучке протонов 1 ГэВ.
- 2) Провести моделирование действия протонной компоненты космических лучей на генетический аппарат клеток на синхроциклотроне СЦ-1000 Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт».
- 3) Опробовать возможности различных спектральных методов (УФ-спектрофотометрия, метод Спирина, спектрофотометрическое плавление ДНК, круговой дихроизм) для определения структурных повреждений в ДНК, облученной стандартным γ -излучением ^{60}Co в водных растворах.
- 4) Изучить структурные повреждения ДНК под действием облучения протонами с энергией 1 ГэВ в растворах при варьировании условий облучения (ионная сила раствора, концентрация ДНК, доза облучения). Сравнить радиационный эффект протонного и γ -излучения.
- 5) Получить зависимость радиационного эффекта от концентрации катехина в облучаемом растворе для протонного и γ -облучения. Проанализировать эффективность радиопротекторного действия катехина.

В рамках данной работы проводили облучение модельных водных растворов ДНК протонами с энергией 1 ГэВ в дозах 0–100 Гр. Для сравнения радиационного эффекта использовали γ -излучение ^{60}Co , имеющее то же значение ЛПЭ=0.3кэВ/мкм, что и исследуемое протонное излучение. Для определения радиационно-химического выхода (G) разрушенных азотистых оснований ДНК впервые был применен метод Спирина спектрофотометрического определения концентрации нуклеиновых кислот. Для систем, подвергнутых γ -облучению, этот метод дал результаты, согласующиеся с имеющимися в литературе данными, полученными с помощью других физико-химических методов. Впервые получены значения G разрушенных азотистых оснований ДНК под действием протонов с энергией 1 ГэВ в диапазоне поглощенной дозы 0–100 Гр, при варьировании условий облучения (концентрации электролита и ДНК). Была исследована зависимость G от концентрации мишеней при протонном и γ -облучении. Влияние известного антиоксиданта растительного происхождения катехина на радиационные повреждения ДНК изучалось с использованием величины температуры плавления ДНК в качестве критерия радиочувствительности.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием отработанных методик исследования структуры ДНК в растворе, воспроизводимостью экспериментальных результатов и согласованностью данных, полученных для растворов ДНК, подвергнутых γ -облучению, с известными литературными данными.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Разработана методика облучения и дозиметрии биологических образцов на пучке протонов 1 ГэВ.
- 2) Проведено моделирование действия протонной компоненты космических лучей на генетический аппарат клеток на синхротронном ускорителе СЦ-1000 Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт».

- 3) Получена зависимость радиационно-химического выхода G разрушенных азотистых оснований (а.о.) от дозы γ -облучения ДНК в растворах разных ионных сил. Показано, что метод Спирина может быть применен для определения количества разрушенных а.о. С помощью совокупности спектральных методов определены параметры вторичной структуры γ -облученной ДНК. Обнаружено снижение радиационного эффекта с ростом ионной силы (μ) облучаемого раствора, которое можно объяснить уменьшением размера мишени, а также изменением структуры и состава гидратной оболочки ДНК.
- 4) Определены дозовые зависимости G разрушенных азотистых оснований ДНК под действием протонов с энергией 1 ГэВ в диапазоне поглощенной дозы 0–100 Гр, при варьировании концентрации электролита. Обнаружено, что радиационно-химический выход разрушенных азотистых оснований ДНК и нуклеозида тимидина в растворе под действием протонного излучения выше, чем γ -излучения ^{60}Co .
- 5) Полученная в работе зависимость G от концентрации мишеней и опыт с использованием перехватчика ОН-радикалов (этанола) показали, что вклад прямого действия радиации на ДНК и тимидин в водной среде в случае протонного излучения выше, чем в случае γ -излучения.
- 6) Получены дозовые зависимости температуры плавления ДНК, облученной высокоэнергетичными протонами и γ -квантами при ионной силе раствора 5мМ и 0.15М NaCl. Обнаружено монотонное снижение T_m с ростом дозы облучения, а также уширение температурного интервала перехода спираль-клубок, свидетельствующее о повышении гетерогенности структуры ДНК.
- 7) Исследовано влияние известного антиоксиданта катехина на радиационные повреждения ДНК с использованием величины температуры плавления (T_m) в качестве критерия радиочувствительности. Получены зависимости T_m от концентрации катехина в облучаемом

растворе. Обнаружено, что при концентрации катехина свыше $2.2 \cdot 10^{-4}$ М T_m γ -облученной ДНК полностью восстанавливает значение, полученное для нативной ДНК (T_{m0}), тогда как T_m ДНК, облученной протонами с энергией 1 ГэВ составляет $0.85T_{m0}$. Это подтверждает сделанный в работе вывод о большем вкладе прямого действия радиации в повреждения ДНК при протонном облучении. Полученные результаты показывают, что традиционные протекторы-перехватчики свободных радикалов, которые используются для защиты от фотонного излучения, окажутся менее эффективными для защиты организма от поражения протонами высоких энергий.

Научная новизна результатов работы:

1. Разработана методика облучения и дозиметрии биологических образцов на пучке протонов 1 ГэВ.
2. Проведено моделирование действия протонной компоненты космических лучей на генетический аппарат клеток на синхроциклотроне СЦ-1000 Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт».
3. Впервые применен метод Спирина для определения радиационного разрушения а.о. ДНК.
4. Впервые получены дозовые зависимости радиационно-химического выхода G разрушенных азотистых оснований ДНК под действием протонов с энергией 1 ГэВ.
5. Впервые определена зависимость G разрушения а.о. от концентрации ДНК в растворе при протонном облучении.
6. Впервые получены дозовые зависимости температуры плавления ДНК, облученной высокоэнергетичными протонами.

7. Впервые исследовано влияние катехина на радиационные повреждения ДНК под действием протонов с энергией 1 ГэВ.

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные данные могут быть использованы для определения ОБЭ высокоэнергетичных протонов, вычисления радиационной нагрузки на организм космонавтов, а также для оценки эффективности протонной терапии. Результаты экспериментов с применением антиоксиданта катехина позволят дать рекомендации для выбора медикаментозной защиты космического экипажа от влияния космических лучей.

Апробация работы.

Результаты исследований были опубликованы в рецензируемых журналах:

1. S.A. Tankovskaia, O.M. Kotb, O.A. Dommès, S. V. Paston, Application of spectral methods for studying DNA damage induced by gamma-radiation, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 200, 2018, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.04.011>.
2. S.A. Tankovskaia, O.M. Kotb, O.A. Dommès, S. V. Paston, DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy, in: *J. Phys. Conf. Ser.*, Institute of Physics Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1038/1/012027>.

Результаты работы докладывались на следующих научных конференциях:

- 1) Svetlana Tankovskaia, Omar M. Kotb, Olga Dommès, and Sofia Paston, Application of spectral methods for studying of DNA damage induced by gamma-radiation, in: *XIVh Int. Conf. Mol. Spectrosc.* Białka Tatrzańska, Poland, 3–7 September 2017, pp. 223, T2: P–8.

- 2) Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Paston S.V., DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy, in: Conf. PhysicA.SPb, Saint Petersburg, 2017, 52/359.
- 3) Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S.V. Helix – coil transition in DNA with defects of primary structure, In Book of Abstracts of 9th International Symposium "Molecular Mobility and Order in Polymer Systems", St.-Petersburg, June 19-23, 2017, P-059.
- 4) Omar Kotb, Svetlana Tankovskaia, Comparative Study of the DNA Irradiated with Proton Particles and Gamma Radiation, in: Int. Stud. Conf. Science and Progress-2017"-SPb.: SOLO, 13-17 November, 2017, 272 pp. p. 219.
- 5) Omar M. Kotb, Sofia V.Paston, DNA damage in aqueous solutions as a result of indirect action of ionizing radiation, в Сб. тезисов VIII Международной молодежной научной школы-конференции "Современные проблемы физики и технологий", МИФИ 15-20 апреля, 2019, Москва, pp. 55-56.
- 6) Котб О.М., Пастон С.В., Гулевич Е.П., Брожик Д.С., Карлин Д.Л., Пак Ф.А., Халиков А.И. Исследование повреждений молекулы ДНК, вызванных облучением протонами и гамма-квантами. В СБОРНИКЕ НАУЧНЫХ ТРУДОВ VI СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ РОССИИ, Сочи, 16–21 сентября 2019 , p. 231.
- 7) Kotb O.M., Paston S.V., Ezhov V. F., Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A.3, Khalikov A.I., DNA STRUCTURAL ALTERATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS INDUCED BY HIGH ENERGY PROTON BEAM RADIATION, in: 15th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists "Modern Problems of Polymer Science", 28 – 31 October 2019, Saint Petersburg, 4-O-13, 195.

Соавторами публикаций являются к.ф.-м.н. Ежов В.Ф., к.ф.-м.н. Пастон С.В., Танковская С.А. (студент на время выполнения работы), Доммес О.А. (аспирант на время выполнения работы), Гулевич Е.П., Брожик Д.С., Карлин Д.Л., Пак Ф.А.,

Халиков А.И. К.ф.-м.н. Ежов В.Ф. и к.ф.-м.н. Пастон С.В. являются научными руководителями, с ними велось активное обсуждение результатов на всех этапах работы. Совместно с Танковской С.А. и Доммес О.А. были получены предварительные результаты плавления ДНК в γ -облученных растворах. Сотрудник Отделения молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» Гулевич Е.П. проводила γ -облучение образцов на установке Исследователь. Сотрудники Комплекса Лучевой терапии "на пролет" на базе ускорителя СЦ-1000 ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» Брожик Д.С., Карлин Д.Л., Пак Ф.А., Халиков А.И. осуществляли техническое обслуживание Комплекса.

Личный вклад автора заключался в приготовлении водно-солевых растворов ДНК, проведении экспериментальных исследований, обработке и интерпретации данных, полученных спектральными методами, анализе полученных результатов, а также в написании статей и подготовке докладов по результатам исследований.

1. Обзор литературы

1.1. Космические исследования

1.1.1. Освоение космического пространства и космическое излучение

Длительные космические полеты и воздействие космического излучения:

При планировании длительных космических путешествий огромное значение приобретает проблема защиты экипажа космического корабля от радиационного воздействия космического излучения. Для решения этой глобальной задачи необходимо тщательно исследовать радиобиологическое воздействие этого излучения на организм человека. На основе полученных данных будут разработаны методы защиты от космического излучения, а также должны быть разработаны протекторы, позволяющие уменьшить воздействие проникающего излучения на организм членов экипажа. Над решением этой задачи работают исследователи в различных научных центрах стран, занимающихся космическими исследованиями. Риски для здоровья, связанные с космической радиацией, являются самой серьезной проблемой для космических исследований, так как они могут помешать этим полетам по соображениям безопасности или увеличить их стоимость до размеров, превышающих разумные.

Осуществить экранирование от космического излучения в космосе очень сложно: высокая энергия космических лучей и серьезные ограничения массы в космическом полете представляют собой очень серьезное препятствие для этого. Пассивное экранирование может быть эффективным вторичного космического излучения, однако оно ограничено для галактических космических лучей. Активное экранирование возможно позволит преодолеть сложные технические препятствия для защиты от Галактического космического излучения. Однако наиболее вероятным решением проблем радиационной защиты от первичного космического излучения являются генетические и биомедицинские подходы. Поэтому для получения точных моделей риска при долгосрочных исследовательских полетах

нужны экспериментальные данные о повреждении биологических молекул и связанные с этим эффекты [1,2].

Первичное космическое излучение: Космическое излучение принято разделять на первичную и вторичную компоненты. Первичные космические лучи представляют собой стабильные заряженные частицы, которые были рождены в процессе первичного нуклеосинтеза и ускорены до огромных энергий астрофизическими источниками, такими как черные дыры, нейтронные звезды, пульсары, сверхновые, активные ядра галактик, квазары. Наиболее распространенной компонентой первичного космического излучения являются протоны (95%), 4%-ядра гелия, а 1% - остальное состоит из ядер других элементов, вплоть до железа. Поскольку космические лучи электрически заряжены, они отклоняются магнитными полями, а их направления движения хаотичны, что делает невозможным определить, где они возникли. Однако космические лучи в других регионах Галактики можно проследить по электромагнитному излучению, которое они производят [3,4].

Наиболее полный экспериментальный спектр первичного космического излучения в зависимости от энергии приведен на рисунке из последнего выпуска Particle Data Group (Рис 1.1) [4]. Диапазон энергий первичного космического излучения простирается от 10^9 эВ до 10^{20} эВ. Интенсивность первичных нуклонов в этом диапазоне приблизительно описывается формулой:

$$I_N(E) \approx 1.8 \times 10^4 \left(\frac{E}{1 \text{ GeV}} \right)^{-\alpha} \frac{\text{nucleons}}{\text{m}^2 \text{s sr GeV}}$$

где E – энергия частицы на нуклон, а $\alpha \approx 2.7$.

Здесь следует отметить, что основную компоненту первичного космического излучения составляют протоны с энергией порядка 1 ГэВ.

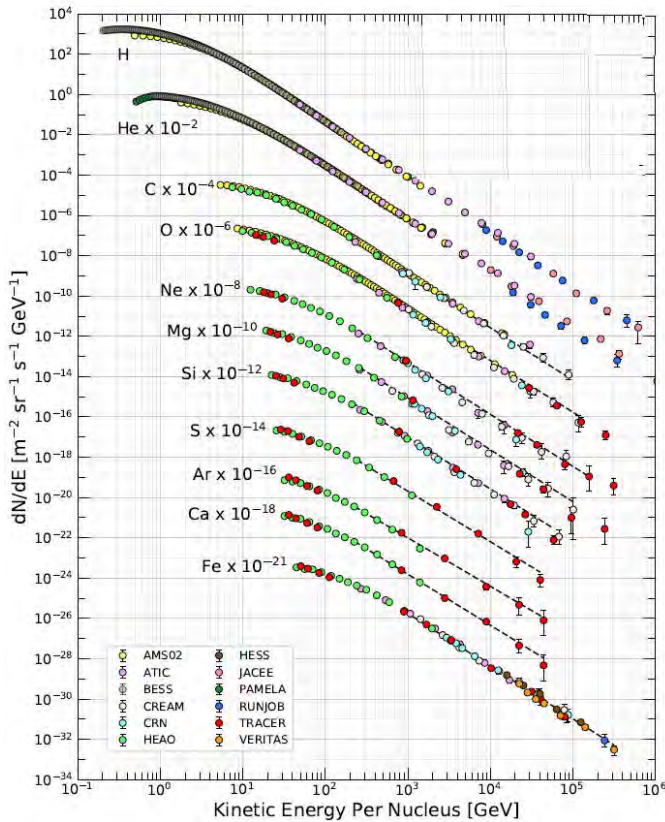


Рис 1.1 Потoki ядер первичного космического излучения в частицах на энергию и на ядро в зависимости от кинетической энергии [4].

Вторичное космическое излучение: Поступающие извне в Солнечную систему заряженные частицы первичного космического излучения “модулируются” солнечным ветром, который состоит в основном из электронов, протонов и ядер гелия. Ко вторичной компоненте космического излучения относят частицы, которые образуются при взаимодействии первичных частиц с межзвездным газом. При входе же в атмосферу Земли, космические лучи сталкиваются с образующими ее атомами и молекулами, в основном это кислород и азот. В результате ядерных реакций образуется каскад более легких частиц, называемый воздушным ливнем вторичного

излучения. Он состоит из рентгеновских лучей, мюонов, протонов, альфа-частиц, пионов, электронов и нейтронов. Все образованные продукты ядерных реакций образуют узкий конус (порядка одного градуса) в направлении пути первичной частицы [4].

1.1.2. Возможности моделирования первичного космического излучения в земных условиях

Предметом исследований радиобиологических рисков здоровья экипажа космического корабля, вызываемых первичными галактическими космическими лучами в данной работе является их протонная компонента. Поэтому на земле необходимо использовать ускорители протонов и ионов. С этой целью был использован синхроциклотрон Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт» СЦ-1000 с моноэнергетическим пучком протонов с энергией 1 ГэВ (Рис 1.2), которая как раз и соответствует максимуму энергии протонов первичного космического излучения.



Рис 1.2 ПИЯФ Синхроциклотрон СЦ-1000

Интенсивность внутреннего протонного пучка СЦ составляет 3,5 мкА за счет введения в центральной области ускорителя системы электростатической фокусировки пучка по вертикали. При этом интенсивность выведенного из ускорительной камеры пучка составляет 1 мкА. Интенсивность пучка в единицах частиц/сек - до $6 \cdot 10^{12}$ прот/сек.

На ПИЯФ синхротроклотроне СЦ-1000 создан единственный в России источник нейтронов, повторяющих спектр атмосферных нейтронов. Возможности этого источника позволяют проводить испытания радиационной стойкости электронных изделий для гражданских и военных летательных аппаратов, эксплуатируемых в верхних слоях атмосферы, а также проводить облучения биологических объектов в условиях, моделирующих радиационные условия в верхних слоях атмосферы. В мире действуют всего три подобных установки.

1.2. Протонная терапия

Физическая способность протонного излучения с высоким значением линейной передачи энергии (ЛПЭ) накапливать огромное количество энергии излучения в сильно ограниченном объеме послужила толчком для разработки новых методов лучевой протонной терапии. В настоящее время протонная терапия является передовым современным и перспективным методом лучевой терапии, который будет подробно обсуждаться в этом разделе.

1.2.1. Сравнение между протонной терапией и традиционной фотонной лучевой терапией

В последнее время протонная лучевая терапия является одним из наиболее важных и быстро развивающихся инструментов лечения рака [5–7]. Роберт Уилсон в 1946 году первым, предложил использовать протонные пучки в медицинских целях. Он основывался на том, что протоны проникают гораздо глубже в ткани по сравнению с фотонами [8]. После этого Тобиас, Энджер и Лоуренс в 1952 году опубликовали первую работу о биологическом воздействии частиц протона, дейтрона и гелия на мышей [9]. Затем многие эксперименты с мышами были

проведены в Калифорнии в лаборатории Лоуренса Беркли (LBL) [10], а первый человек был пролечен в 1954 году [11].

Протоны - положительно заряженные частицы, масса которых в 1836 раз превышает массу электрона. Свободные протоны получают в ядерных реакциях и за счет ионизации атома водорода (энергия ионизации 13,5 эВ). Высокоэнергетические протоны составляют основную часть космического излучения. Протоны ускоряются в различных типах циклотронов, синхротронов, генераторов Ван де Граафа и др. [5,12].

Протоны (а также другие заряженные частицы, такие как α -частицы и тяжелые ионы) при взаимодействии с веществом (в отличие от фотонов) при неупругих столкновениях с атомами отдают часть своей энергии при каждом столкновении и при этом практически не меняют направления движения при прохождении через материю. Скорость потери энергии заряженными частицами (поперечное сечение взаимодействия) возрастает с уменьшением энергии этих частиц (где энергия, теряемая заряженными частицами, обратно пропорциональна квадрату их скорости). Поэтому максимальное поглощение дозы происходит в резком пике непосредственно перед тем, как частица полностью остановится (т. е. нормальные ткани на пути протонного пучка получают значительно меньшие дозы, чем те, что выделяются на мишени). Этот пик известен как пик Брэгга (Уильяма Генри Брэгга, который открыл его в 1903 году), а за его пределами поглощенная доза значительно меньше [5–7] (Рис 1.3) .

Глубина нахождения Брэгговского пика внутри пациента зависит от энергии падающего пучка протонов. Пик Брэгга узкий 1.5 - 2 мм. Поэтому для доставки равномерной дозы облучения в большой опухолевой мишени энергию протонов изменяют и образуют наложение нескольких брэгговских пиков в опухоли, создавая область равномерной дозы облучения. С другой стороны, повреждающее действие фотонов уменьшается экспоненциально при проникновении в пациента, доставляя более высокую дозу излучения на пути к цели (т. е. доза, доставляемая к нормальным клеткам, выше, чем к самой мишени, таким образом, уменьшается предписанная целевая доза для опухолевых клеток). Таким образом, протоны имеют

дозиметрические преимущества перед фотонами, производя меньшую интегральную дозу облучения для нормальных органов и максимальную дозу для опухоли. Кроме того, в большинстве случаев протонного облучения требуется только один-три пучка излучения [5]. Сравнительные характеристики глубинной дозы пучка протонов и фотонов приведены на Рис 1.3.

Для сопоставления действия разных видов излучения на биологические объекты используют величину относительной биологической эффективности (ОБЭ, relative biological effectiveness – RBE). ОБЭ определяется соотношением [13]:

$$\text{ОБЭ} = \frac{\text{биологическая эффективность исследуемого излучения}}{\text{биологическая эффективность стандартного излучения}} = \frac{\text{поглощенная доза (Гр), необходимая для получения данного биологического эффекта при действии стандартного излучения}}{\text{поглощенная доза исследуемого излучения (Гр), необходимая для получения того же биологического эффекта}} \quad (1.1)$$

Исторически в качестве стандартного выбиралось рентгеновское излучение с энергией квантов 200-250 кэВ, однако в настоящее время рекомендуется применять γ -излучение ^{60}Co [14]. В данной работе будет проводиться сравнение радиационных эффектов, вызванных действием высокоэнергетичных протонов и γ -излучения ^{60}Co . ОБЭ зависит не только от вида излучения, но и от облучаемого биологического объекта, от радиационного эффекта, выбранного в качестве критерия, от мощности дозы и фракционирования облучения [13,14].

Относительная биологическая эффективность (ОБЭ) протонов аналогична эффективности фотонов мегаэлектронвольтовой энергии, используемых в радиотерапии. ОБЭ терапевтической энергии протонных частиц (около 250 МэВ) составляет около 1,1, однако ОБЭ возрастает от 1,1 до 1,7 в пике Брэгга, где протоны индуцируют максимальное осаждение [15–18]. Поэтому протонная терапия требует более точного планирования, чтобы избежать облучения здоровых тканей вокруг опухоли. ОБЭ протонов была исследована в 1960-х годах с использованием экспериментов по смертности у мышей [19], хромосомным aberrациям в корнях бобов [20] и кожной реакции у приматов [21]. Первый пациент был пролечен с

использованием пика Брэгга в 1960 году, причем использовался пучок ядер гелия для лечения метастатического поражения дельтовидной мышцы [22].

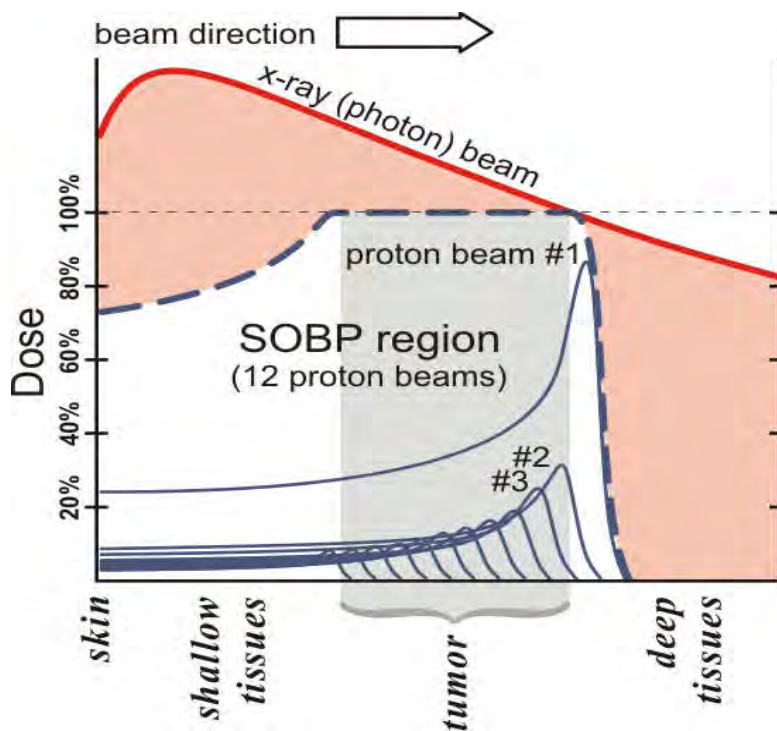


Рис 1.3 При типичном планировании лечения методом протонной терапии суммарный пик Брэгга (SOBP, пунктирная синяя линия) является терапевтическим распределением излучения. SOBP-это сумма нескольких отдельных пиков Брэгга (тонких синих линий) на разных глубинах. Для сравнения приводится график глубинной дозы рентгеновского пучка (красная линия). Розовая область представляет собой дополнительные дозы рентгенотерапии, которые могут повредить нормальные ткани и вызвать вторичные раковые заболевания, особенно кожи [23].

На первой стадии развития протонная терапия имела существенный недостаток из-за того, что синхротрон производит узкий пучок типа карандаша, который требовалось направить на рассеивающую фольгу, чтобы создать большие поля, соответствующие объему опухоли. Этот процесс генерирует нейтроны,

которые доставляли пациенту более высокую суммарную эквивалентную дозу, чем обычные тормозные фотоны LINAC. Сканирование пучком протонов создает лечебное поле, согласованное с формой и размером опухоли, без образования нейтронов, и приводит к гораздо меньшей дозе облучения даже по сравнению с обычной фотонной терапией [5,24].

Сегодня протонная терапия эффективно применяется для лечения многих типов рака и локализация облучения лучше, чем у фотонов, что приводит к меньшей вероятности осложнений для здоровых органов. Распределение необходимой дозы может быть сформировано с помощью протонов с использованием меньшего количества пучков излучения, чем с помощью фотонов; кроме того, использование интенсивно-модулированной протонной терапии и технологии сканирования протонного пучка делают протонную терапию более точной и передовой. К тому же, улучшение и формирование распределения дозы для фотонов имеет предел, поскольку общая доза, депонированная внутри пациента и, следовательно, в здоровые ткани, не может быть уменьшена, а только перераспределена по-разному. Различные дозиметрические исследования четко указывают на максимальное щадящее воздействие протонов на здоровые ткани [25–29].

Протонная терапия особенно подходит для опухолей вогнутой формы или опухолей, расположенных вблизи критических структур [30], и особенно ценна для опухолевых клеток, расположенных вблизи от последовательно организованных тканей (где значительное осложнение может быть вызвано только небольшой локальной передозировкой) [31].

Как уже отмечалось протонная терапия снижает общую дозу облучения нормальных тканей (т. е. индуцирует снижение вторичных эффектов - риска вторичных злокачественных новообразований) и улучшает общее качество жизни [31]. Наиболее значимо снижение суммарной поглощенной энергии излучения (в 2-3 раза) у педиатрического больного при протонной терапии [32]. Лечение краниоспинальных случаев протонами позволяет значительно уменьшить дозу, поступающую в щитовидную железу. С другой стороны, лечение медуллобластомы с помощью фотонной терапии индуцирует значительную дозу облучения в легкие,

сердце, ткани брюшной полости, в то время как эти побочные эффекты можно в значительной степени избежать, используя протоны [33–36]. В некоторых случаях протонная терапия является единственным методом лечения, не имеющим альтернативы. Протонная терапия в онкологии стала реальной альтернативой хирургии.

Традиционно в мире протонная терапия, использует пик Брэгга, при этом протонный пучок с энергией 100 – 200 МэВ полностью поглощается на расстояниях, определяемых энергией протонного пучка и положением пика Брэгга. К основному недостатку данной методики следует отнести достаточно большое повреждение здоровых тканей пациента по сравнению с результатом облучения другими тяжелыми ионами. Величина дозы в здоровых тканях зависит от размера опухоли и составляет от 20% до 60% от дозы в опухоли.

Исследование воздействия протонов с энергией 1 ГэВ на ДНК позволит значительно расширить понимание процессов, происходящих при использовании Гатчинского метода. За все время проведения облучений пациентов не было ни одного случая повреждения глазного нерва, находящегося всего в нескольких миллиметрах от облучаемого объекта (гипофиза).

1.2.2. Протонная терапия на пучке протонов 1 ГэВ (ПИЯФ ЦС-1000 МэВ)

Актуальность поставленной задачи не ограничивается изучением радиобиологического воздействия этого излучения на организм космонавта. Дело в том, что на базе синхроциклотрона ПИЯФ с 1975 года существует медицинский центр стереотаксической протонной терапии, в котором совместно с Российским научным центром радиологии и хирургических технологий (РНЦ РХТ) успешно проводятся научные исследования и лечение заболеваний головного мозга. Данный центр является единственным в мире центром, в котором используется пучок протонов столь высоких энергий. При прохождении их через облучаемый объект протоны с энергией 1000 МэВ практически не рассеиваются. Длина их поглощения в воде (из которой в основном и состоит биологическая ткань) составляет 3.24 м и

протоны пролетают сквозь мишень с небольшой потерей энергии. Этот метод получил в литературе название “Гатчинского метода”.

При протонном облучении используется постоянное перемещение объекта облучения вокруг двух осей вращения, расположенных в различных плоскостях. Центром этих вращений является облучаемая опухоль, в которой достигается максимальная доза облучения, поскольку она все время находится в зоне облучения, в тоже время, соседние ткани получают значительно меньшую дозовую нагрузку. Данный метод позволяет создавать высокий градиент распределения поля дозы в здоровых тканях и опухоли (1:200). Такие значения не достижимы в широко используемом методе гамма-терапии. С 1975 г. облучение протонами проведено 1394 пациентам. Следует особо подчеркнуть, что после проведения сеансов протонной терапии ни у одного из больных не выявлены радиационные осложнения при наблюдении до 10 лет [37,38].



Рис 1.4 Зал облучений комплекса протонной терапии [39].

Эксперименты по облучению ДНК проводились на медицинском канале синхроциклотрона Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт» СЦ-1000.

Медицинский протонный тракт синхроциклотрона: В отличие от других русских и зарубежных центров протонной терапии, на синхроциклотроне ПИЯФ НИЦ КИ используется уникальная методика облучения: облучение внутричерепных мишеней протонами с энергией 1000 МэВ напролет в сочетании с подвижной техникой облучения.

Гранов и др. [37] использовали радиохимию при эндоселлярных аденомах гипофиза, 465 пациентов с этими заболеваниями облучались протонной энергией 1000 МэВ на синхроциклотроне ПИЯФ. Лечение эндоклеточных аденом гипофиза с помощью протонной радиохимию является высокоэффективным, безопасным, а иногда и единственным методом. Высокоэнергетический протонный пучок (1000 МэВ) обладает низкими рассеивающими свойствами и может образовывать в облучаемой мишени высокое краевое градиентное поле дозы, поэтому он хорошо подходит для обработки внутричерепных мишеней, расположенных вблизи критических участков головного мозга [40].

В основе принципа действия установки лежат специфические свойства взаимодействия протонных пучков с веществом, в том числе с тканями человека, которые сводятся к следующему:

- Рассеяние пучка протонов в среде намного меньше, чем у пучков электронов и гамма-лучей, поэтому здоровые ткани и структуры, расположенные сбоку от пути пучка протонов, не повреждаются;
- При облучении протонным пучком создаются лучшие распределения глубинных доз с высокими градиентами на краях дозных полей, что позволяет использовать более высокие поглощенные дозы, фракционированное облучение при минимальных лучевых нагрузках на здоровые ткани.

Схема медицинского протонного тракта Синхроциклотрона НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ представлена на Рис 1.5, а основные параметры медицинского пучка в Табл 1.1, [40–42].

Табл 1.1. Параметры протонного медицинского пучка.

Параметры	Значение
Энергия протонов	1000 МэВ
Интенсивность	10^9 с^{-1}
Размер пучка, ширина на полувысоте	5-10 мм
Максимальная мощность поглощенной дозы	50 гр/мин
Краевой градиент дозного поля от 70% до 10%	20%/мм
Соотношение доз в центре и на поверхности головы.	200:1

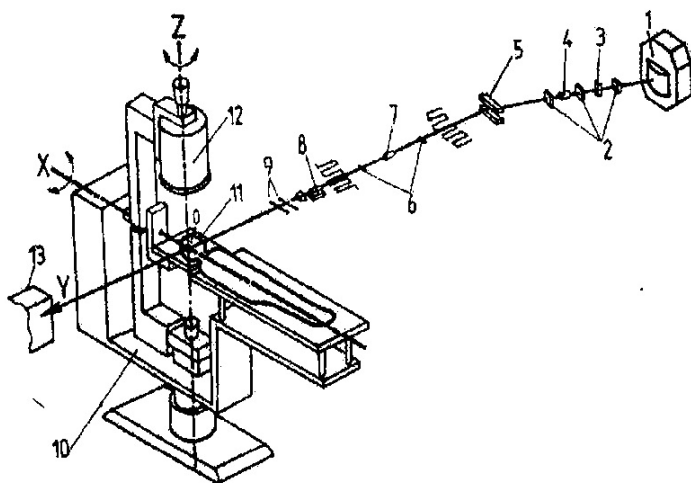


Рис 1.5 Схема медицинского протонного тракта Синхроциклотрона НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ; 1- синхроциклотрон, 2- профилометры в зале ускорителя, 3- магнитный корректор, 4- коллиматор, 5- отклоняющийся магнит СП-40, 6- профилометры экспериментального зала, 7- противоореольный коллиматор, 8- дуплет квадрупольных линз, 9- многопроволочные камеры для определения профиля пучка и контроля его параметров в зале облучения, 10- установка для стереотаксической терапии (УПСТ), 11- прибор-фиксатор головы Пациента, 12- рентгеновский центратор с фиксированными углами вращения, 13- поглотитель протонного пучка.

Комплекс отвечает требованиям Европейской группы по Клинической дозиметрии (European Clinical Heavy Particle Dosimetry Group) и международной комиссии по радиационным единицам и измерениям – ICRU.REPORT59.

2. Облучение и дозиметрия биологических образцов пучком протонов 1 ГэВ и гамма квантами.

2.1. Облучение ДНК на медицинском пучке синхроциклотрона ПИЯФ

Для обеспечения стереотаксического облучения на медицинском тракте имеется комплекс оборудования, позволяющий прецизионно центрировать пучок протонов точно в зоне мишени. Это достигается смещением объекта вокруг двух осей вращения, расположенных в различных плоскостях. При этом опухоль, находящаяся в центре вращений все время, находится в зоне облучения, в то время, как соседние ткани получают значительно меньшую дозу. Основной элемент установки - стол, на который укладывается больной, совершающий в горизонтальной плоскости маятникообразные качания в диапазоне $\pm 40^\circ$.

Для проведения моделирования действия протонной компоненты космических лучей на генетический аппарат клеток на синхроциклотроне СЦ-1000 Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт» были разработаны специальная технология облучений и методика дозиметрии, использующие возможности технологического оборудования комплекса протонной терапии.

В данной работе при проведении облучений облучаемая мишень образцами ДНК располагалась на столе пациента, а регулировка положения мишени осуществлялась системой перемещения и юстировки стола.

Физико-технические условия облучения во всех случаях были схожие. Пучок имеет размер 15-20 мм. Облучение однократное, а максимальная поглощенная доза варьируется с учетом конкретной задачи от 4 до 120 Гр. Дозные поля, характерные для данной методики облучения, характеризуются резко выраженным максимумом поглощенной дозы в центре. Изодозы от 90% до 30% имеют форму, близкую к форме эллипса. Перед каждым облучением производится измерение формы пучка. С этой целью пакеты с фотобумагой помещаются в место будущего облучения, и осуществляется их «засветка» протонным пучком в течение 1 минуты («засветка» -

это вывод пучка протонов на время, которое вы задаете, и этого времени достаточно, чтобы на фотобумаге получить четкое изображение пучка), затем фотобумага проявляется.



Рис 2.1 Зал облучений комплекса протонной терапии [39]. 1 –привод 2-х координатного перемещающего устройства лечебного стола (ЛС), 2 –телескопический подъемник ЛС, 3 – электропривод ротации вокруг вертикальной оси Z, 4 –дека прибора-фиксатора головы (ПФГ), 5 –стойка привода ПФГ, 6 –дека лечебного стола УПСТ, 7 –маска для фиксации головы пациента, 8 –стойки с блоками системы управления УПСТ, 9 –блок рентгеновской трубки рентгеновского центратора (РЦ), 10 – блок ЭОП РЦ, 11 – П-образное коромысло РЦ, 12 – имитатор изоцентра,

Фокусировка пучка проверяется с помощью полупроводникового детектора, который помещается сначала в плоскости начала мишени, а затем перемещается в

направлении по пучку в плоскость конца мишени. Пример сканирования сечения пучка полупроводниковым детектором приведен на Рис 2.2.

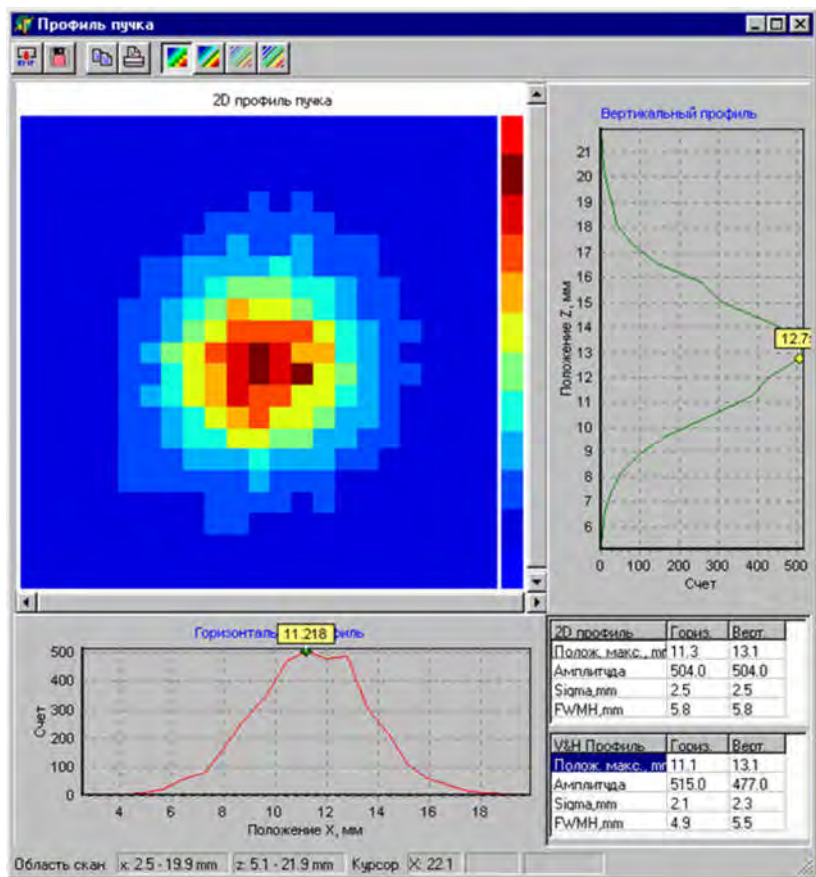


Рис 2.2 Пример сканирования сечения пучка полупроводниковым детектором.

На протонном тракте в зале облучения установлены многопроволочные пропорциональные камеры-профиломеры, сканер пучка и двухканальная система мониторингирования поглощенной дозы. При каждом облучении ионизационные камеры проверялись на токи утечки.

Калибровка пучка по профилю и интенсивности осуществлялась с помощью ионизационного монитора пучка протонов, разработанного в ПИЯФ НИЦ КИ. Этот монитор пучка протонов, позволяет проводить измерения числа протонов в режиме реального времени без его предварительной градуировки. Параметры ионизационного монитора с функцией профилометра для измерения абсолютных значений потоков протонов и распределения их плотности в поперечном сечении подробно исследованы в работах [43,44].

Детектором монитора является двухсекционная ионизационная камера с секциями, которые отличаются величиной межэлектродных зазоров и заполнены воздухом при атмосферном давлении. В режиме непрерывного вывода пучка монитор позволяет определять количество протонов и среднее значение потока протонов, а также вычислять количество протонов в одиночном импульсе пучка протонов. Погрешность измерений числа протонов в интервале потоков $10^6 - 5 \cdot 10^9$ с⁻¹ составляет не более 5%.

Для контроля радиационных параметров пучка протонного ускорителя использовался стандартный комплект оборудования: дозиметр UNIDOS weblines, а также ионизационные камеры типа "PinPoint" 0.03 см³ и 0.015 см³. Применяемые дозы при мощности дозы 4 гр/мин контролировались с помощью универсального дозиметра PTW Unidos.

2.2. Облучение ДНК гамма-квантами в НИЦ КИ «ПИЯФ»

Для сравнения эффективности повреждений ДНК протонами с повреждениями ДНК гамма излучением были проведены облучения на установке «Исследователь», Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ им. Б.П. Константинова.

В данной установке в качестве источника гамма квантов использовался источник ⁶⁰Со. Схема распада ⁶⁰Со приведена на Рис 2.3. Используемая мощность дозы составляла 41.2 Гр/мин, 85 Гр/мин, 119 Гр/мин.

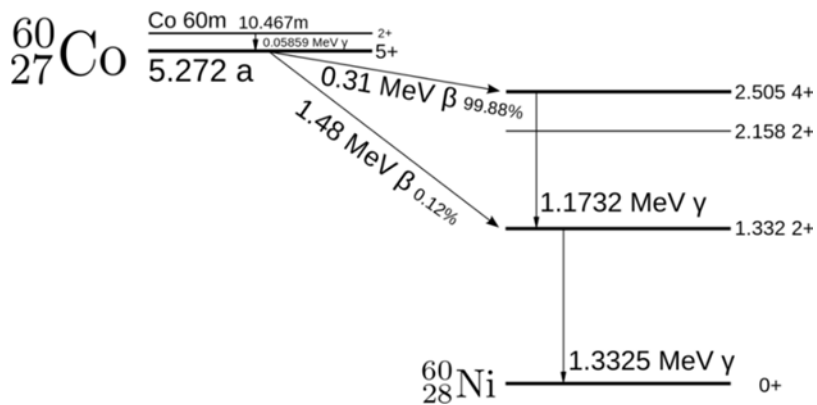


Рис 2.3 Схема распада ^{60}Co

В установке используется неподвижный источник гамма излучения с «местной» защитой. В ней облучаемый объект устанавливается в рабочую камеру и перемещается к облучателю с помощью механизма подъема и спуска.

3. Действие ионизирующего излучения на ДНК (обзор)

3.1. Поглощение энергии ионизирующих излучений

Прохождение через вещество ионизирующего излучения (т.е. излучения с энергией частицы, превышающей потенциал ионизации $I \approx 12 \text{ эВ}$ для атома водорода) вызывает разнообразные физико-химические процессы, зависящие от природы и энергии излучения, состава вещества-мишени и поглощенной энергии. Изменения в веществе может вызвать только та часть энергии излучения, которая поглощена этим веществом; энергия отраженного или прошедшего сквозь вещество излучения не оказывает действия (принцип Гротгуса) [13]. Поглощенная доза радиации определяется как

$$D_r = \frac{d\bar{E}}{dm},$$

где $d\bar{E}$ – средняя энергия, переданная ионизирующим излучением веществу, находящемуся в элементарном объеме, а dm – масса вещества в этом объеме. За единицу поглощенной дозы в СИ принят 1 Грей: $1 \text{ Гр} = \frac{1 \text{ Дж}}{1 \text{ кг}}$.

Действие ионизирующих излучений на вещество зависит также от величины линейной передачи энергии (ЛПЭ, linear energy transfer – LET), которая определяет средние потери энергии на единицу пути первичной ионизирующей частицы [45]:

$$\text{ЛПЭ} = \frac{d\bar{E}}{dx}.$$

Для определения ЛПЭ в качестве вещества-поглотителя, эквивалентного биологическим объектам, берется вода. Минимальные значения ЛПЭ=0.2–0.3 кэВ/мкм характерны для фотонного излучения с энергией квантов выше 0.5 МэВ [13,14]. При прохождении ионизирующих излучений в веществе поглощение энергии происходит лишь в отдельных, редко расположенных микрообъемах, так как обмен энергией между излучением и атомами поглотителя носит дискретный вероятностный характер.

Поглощение фотонного излучения К фотонному излучению относятся рентгеновское излучение (его источниками служат рентгеновские трубки, энергия квантов $h\nu \sim 12\text{эВ} - 100\text{кэВ}$), γ -излучение (возникающее при изменении энергетического состояния атомного ядра, распада элементарных частиц и аннигиляции пар частиц, $h\nu \sim 10\text{кэВ} - 1\text{ГэВ}$), космическое излучение и синхротронное излучение (широкий спектр энергий фотонов) [4,13]. Энергия фотонов поглощается веществом в результате одного из следующих процессов: фотоэлектрического, комптоновского и образования электрон-позитронных пар. Вероятности этих процессов зависят от энергии фотона (Рис 3.1). В результате от атома вещества-поглотителя отрывается электрон, обладающий запасом кинетической энергии (так называемый первичный электрон), а атом превращается в положительный ион. Каждый первичный электрон от момента своего высвобождения до захвата атомом вещества многократно взаимодействует с атомами, расположенными вдоль его траектории, генерируя вторичные электроны, которые, в свою очередь, индуцируют дальнейшие ионизации и возбуждения атомов вещества. Первичная ионизация при действии фотонного излучения пренебрежимо мала по сравнению с тем количеством ионизированных и возбужденных атомов, которое возникает в результате взаимодействия первичных и вторичных электронов с веществом [13] (Рис 3.2). Поэтому фотоны с $h\nu > 12\text{эВ}$ относятся к косвенно ионизирующему излучению, высвобождающему в веществе непосредственно ионизирующие частицы – высокоэнергетичные электроны. Другим примером косвенно ионизирующего излучения являются нейтроны, которые в результате взаимодействия с ядрами атомов вещества-поглотителя вызывают появление ускоренных ядер ("ядер отдачи"), которые, двигаясь в веществе, производят дальнейшие ионизации и возбуждение атомов [13].

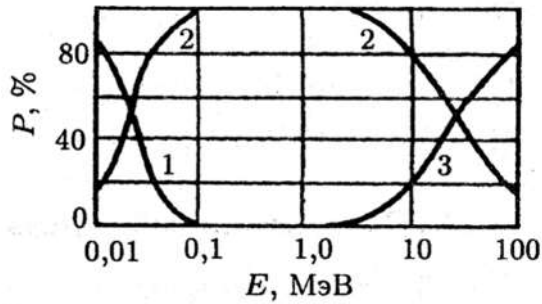


Рис 3.1 Относительная частота P образования электронов и пар фотонами (в углероде) в зависимости от энергии фотона: 1 – фотоэффект, 2 – комптоновский эффект, 3 – образование пар [13].

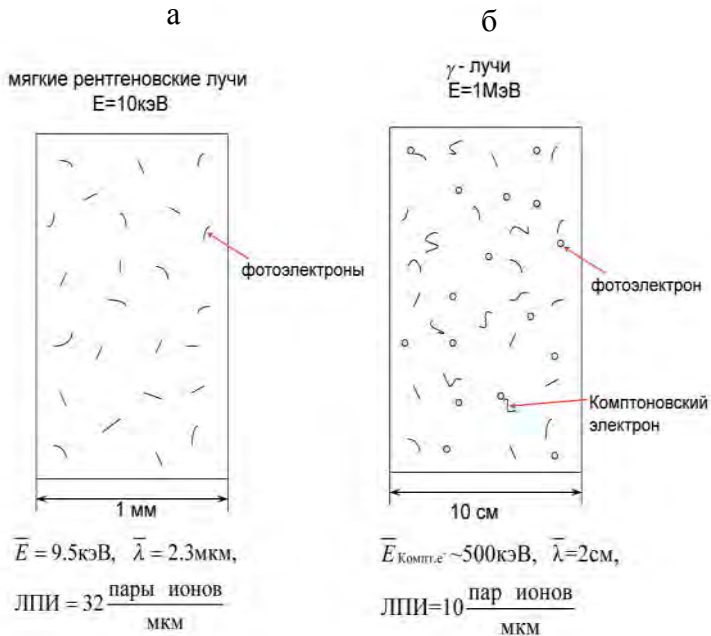


Рис 3.2 Характер ионизаций вещества фотонами мягкого рентгеновского (а) и жесткого γ -излучения (б); указаны параметры комптоновских и фотоэлектронов. [13], с изменениями.

Поглощение энергии ускоренных заряженных частиц Ускоренные заряженные частицы, которыми облучают вещество, или которые возникли в веществе при прохождении косвенно ионизирующего излучения, взаимодействуют с электронными оболочками атомов вещества-поглотителя и вызывают ионизацию или возбуждение атомов. Ускоренную заряженную частицу можно рассматривать как перемещающийся в пространстве источник электрического поля; она вызывает временное возмущение каждого атома, вблизи которого она пролетает, и передает атому тем большую энергию, чем больше заряд частицы и чем более длительное время она пребывает вблизи этого атома. Потери энергии заряженной частицы на единицу длины трека определяются из уравнения Бете-Блоха [13]:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 z^2 N Z}{mv^2} \left[\ln \frac{2mv^2}{I_0} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 \right], \quad (3.1)$$

где e – заряд электрона, v – скорость частицы, N – число атомов в 1 см^3 вещества, Z – среднее число электронов в атоме вещества-поглотителя, т.е. "эффективный" атомный номер, z – заряд частицы в единицах элементарного заряда, $\beta = \frac{v}{c}$ – отношение скорости заряженной частицы к скорости света, I_0 – средний потенциал ионизации атомов вещества, определяемый экспериментально. Из уравнения (3.1) видно, что ЛПЭ заряженной частицы зависит от скорости как $\frac{1}{v^2}$, поэтому при $v \rightarrow 0$ можно ожидать бесконечно больших потерь энергии. В действительности этого не происходит из-за уменьшения заряда частицы при ее замедлении. Так, например, α -частица при малых скоростях захватывает электрон и дальше движется уже как ион гелия He^+ , а при более низкой скорости происходит захват еще одного электрона, и образуется нейтральный атом гелия – заряженная частица перестает существовать. Характерная зависимость ЛПЭ заряженной частицы от длины пути в веществе показана на рисунке.1.3; резкий рост потерь энергии в конце пути частицы, как уже упоминалось, известен как пик Брэгга.

В данной работе исследуется воздействие протонов с энергией 1 ГэВ на водные растворы ДНК. Здесь 1 ГэВ – это кинетическая энергия движущегося протона ($E_{\text{кин}}$). Полная энергия частицы, движущейся со скоростью, близкой к скорости света, вычисляется по формуле [46]:

$$E_{\text{полн}} = \frac{mc^2}{\sqrt{1-\beta^2}} = E_{\text{пок}} + E_{\text{кин}} \quad (3.2)$$

Энергия покоя частицы $E_{\text{пок}} = mc^2$. Для протона $E_{\text{пок}} = 0.938$ ГэВ. Подставляя $E_{\text{пок}}$ и $E_{\text{кин}}$ протона в формулу (3.2), находим $\beta^2 = 0.766$, $\beta = 0.875$. Таким образом, скорость протонов в пучке $2.62 \cdot 10^8$ м/с. В уравнение Бете-Блоха (3.1) подставим полученные значения β и v ; заряд протона $z=1$, для поглотителя (воды) $I_0=15$ эВ [13] и среднее число электронов в 1 см^3 $NZ=3.3 \cdot 10^{23}$ (все величины должны быть выражены в единицах СГСЭ). Вычисление дает значение ЛПЭ ≈ 0.3 кэВ/мкм.

Трек тяжелой заряженной частицы в веществе практически прямолинеен. Вдоль пути частицы возникают возбужденные атомы и пары ион-электрон (первичные ионизации), которые затем порождают вторичные ионизации. Эти скопления получили название "рой ионов" или "шпора" [13]. Шпора представляет собой сферу диаметром 1-2 нм в жидкостях и содержит либо одиночную пару зарядов, либо несколько частиц (в среднем 2-3 иона и 2-3 возбужденные молекулы) [47]. Расстояние между шпорами зависит от вида падающей частицы и ее энергии. Из-за близкого расположения и низких кинетических энергий ионов и электронов в шпорах высока вероятность их рекомбинации. Кроме медленных электронов ионизирующая частица способна выбивать из атомов быстрые электроны (так называемые δ -электроны, с энергией больше 100 эВ), которые покидают шпору (Рис 3.3). ЛПЭ этих быстрых электронов может быть больше, чем ЛПЭ исходной частицы. Длина трека δ -электрона также может превышать длину трека тяжелой частицы. На долю δ -электронов приходится около 25% всей ионизации, вызываемой первичной частицей [13,48]. Вторичные электроны с энергиями от 100 до 500 эВ образуют локальные области ионизации, которые содержат до 20 ионов – так называемые бобы. Здесь вторичные электроны рожают третичные электроны, третичные – электроны четвертого поколения и т. д., которые характеризуются весьма малыми величинами пробега и, очевидно, не могут далеко уйти от места своего образования. Если энергия вторичных электронов составляет 500–5000 эВ, то перекрытие образующихся шпор создает структуру с цилиндрической симметрией, называемую "коротким треком". Вероятность рекомбинации ионов и электронов в бобах весьма велика. Электроны с энергией ~ 5 кэВ образуют разветвленные треки,

подобные по своей структуре основному треку. Здесь шпоры расположены далеко друг от друга (Рис 3.4) [47].

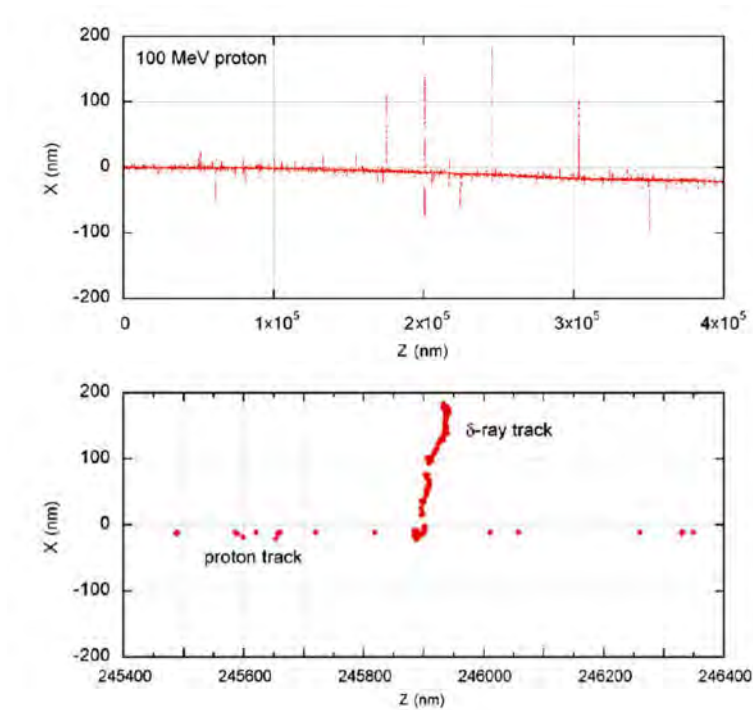


Рис 3.3 Двумерное представление части трека протона с энергией 100 МэВ (верхний график) и трека высокоэнергетического δ -электрона, выбитого протоном из атома. Красными точками показаны ионизации и возбужденные атомы [48].



Рис 3.4 Схема пространственного распределения ионов и возбужденных атомов вдоль трека ускоренного электрона [47].

Для тяжелых заряженных частиц структура треков такая же, как и для быстрых электронов. Однако в этом случае шпоры расположены очень близко друг к другу. Поэтому они сразу же после своего образования сливаются в сплошную цилиндрическую колонку (колончатая ионизация) [47].

Ионизирующее излучение подразделяется на редко- и плотноионизирующее (с низкой и высокой ЛПЭ, соответственно). Граничное значение ЛПЭ между ними принимается равным 10 кэВ/мкм [14]. На Рис 3.5 приведена зависимость относительной биологической эффективности от ЛПЭ излучения. При ЛПЭ <10 кэВ/мкм ОБЭ ≈ 1. При ЛПЭ ~ 100 кэВ/мкм ОБЭ достигает максимума, а при дальнейшем росте ЛПЭ относительная биологическая эффективность излучения снижается. Это связано с тем, что уже при ЛПЭ = 100 кэВ/мкм в клетке возникает критическое число ионизаций, которое приводит к гибели клетки. Поэтому наращивание плотности ионизации уже не дает никакого дополнительного вклада в поражение клеток (так называемый "overkill effect") [13,49].

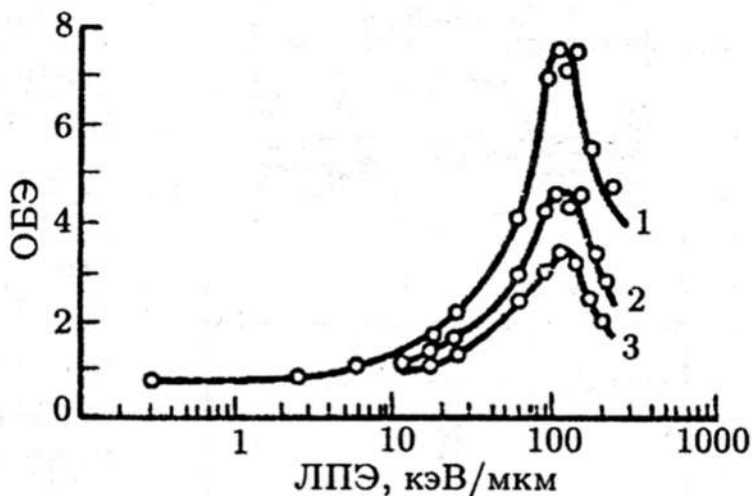


Рис 3.5 Зависимость ОБЭ излучения от ЛПЭ по критерию выживаемости клеток почек человека в культуре: кривые 1, 2, 3 соответствуют доле выживших клеток 0,8, 0,1 и 0,01, соответственно [13].

Значения ЛПЭ разных видов ионизирующего излучения приведены в [таблице 3.1](#).

[Таблица 3.1](#) Приблизительные значения ЛПЭ и ОБЭ ионизирующих излучений [5,14]

Вид излучения	LET(кэВ/мкм)	ОБЭ
Рентгеновское излучение 250 кэВ (стандартное)	2	1
γ -излучение ^{60}Co (1.17–133 МэВ)	0.2- 0.3	0.8-0.9
Рентгеновское излучение 3 МэВ	0.3	-
Тормозное фотонное излучение, полученное на линейных ускорителях (6-15 МэВ)	0.3	~0.8
Электроны 1 кэВ	12.3	-
Электроны 10 кэВ	2.3	-
Электроны 1 МэВ	0.25-0.3	0.9
Нейтроны 2.5 МэВ	20	-
Нейтроны 14 МэВ	12	-
Нейтроны 19 МэВ	7	-
Нейтроны	0.5-100	1-2
Протоны 2 МэВ	16	-
Протоны 150 МэВ (терапевтическая энергия)	0.5	~1.1
α -частицы	50-200	5-10
Ионы углерода (в расширенном пике Брэгга))	40-90	2-5

Итак, энергия ионизирующего излучения переносится веществу дискретными порциями, вызывая ионизацию и возбуждение атомов вещества. Для образования 1 пары ионов в биологической ткани в среднем необходима энергия 33.7 эВ [5].

Однако, как показали эксперименты, наиболее вероятная величина "пакета энергии", передаваемого веществу ионизирующим излучением, составляет 22 эВ, а среднее количество потерь энергии на одно событие взаимодействия 60 эВ [13]. Перенос энергии излучения веществу, появление возбужденных и ионизованных атомов и молекул, неравномерно распределенных в объеме вещества, происходят в первые 10^{-16} – 10^{-13} с после прохождения излучения. Это так называемая *физическая стадия* действия излучения. К следующей, *физико-химической, стадии* относятся различные реакции, приводящие к перераспределению избыточной энергии ионизованных и возбужденных молекул вещества. Она длится 10^{-13} – 10^{-10} с, и в результате образуются разнообразные активные продукты (ионы, радикалы). На следующей, химической, стадии действия излучения (за 10^{-6} – 10^{-3} с) ионы и радикалы взаимодействуют друг с другом и с окружающими молекулами, в результате чего формируются стабильные продукты [13] .

3.2. Структура ДНК

Одна из жизненно важных структур в каждой клетке организма – дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). В этой макромолекуле представлен генетический материал, который используется при делении, функционировании и развитии клетки [13,14,50–53]. ДНК считается критической мишенью при возникновении мутаций и гибели клеток под действием ионизирующего излучения из-за ее фундаментальной роли [54–60].

Молекула ДНК представляет собой полимер, образованный двумя закрученными друг относительно друга нитями, составляющими двойную спираль диаметром около 2 нм. Суммарная длина ДНК в одной клетке человека около 2 м [61].

Основным элементом каждой цепи ДНК является нуклеотид, который состоит из азотистых оснований (пурины: аденин (А) и гуанин (G), и пиримидины: тимин (Т) и цитозин (С)) и сахарофосфатного остова (образующего основу спирали). Азотистые основания образуют комплиментарные пары А–Т и G–С; между аденином и тиминном образуются две водородные связи, между цитозином и

гуанином – три. [54–58]. Структура двойной спирали ДНК похожа на лестницу, в которой пары оснований формируют ступеньки лестницы, а сахарофосфатные группы составляют вертикальные боковые части лестницы (Рис 3.6).

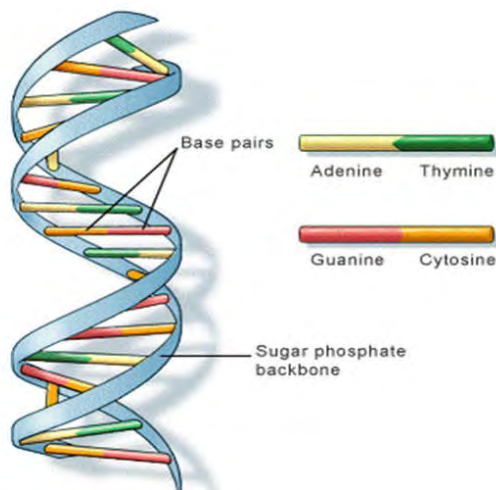


Рис 3.6 Схематическое представление структуры ДНК [62].

Существуют разные формы вторичной структуры ДНК, различающиеся конформацией сахаро-фосфатного остова и параметрами двойной спирали.

- Наиболее распространенной и обычной формой ДНК внутри клетки является В-форма (при нормальных условиях: небольшая концентрация соли и высокая влажность). Пары азотистых оснований В-ДНК почти перпендикулярны оси спирали, на один шаг спирали приходится примерно 10 пар.

- Когда содержание воды уменьшается в присутствии определенных катионов ДНК трансформируется из В-формы А-форму. Двойная спираль в А-форме более скручена, а конформация более компактна и короче, чем В-ДНК. А-форма также образуется, когда формируется гетеродуплекс, одна нить в котором ДНК, а другая – РНК.

• Наконец, Z-форма ДНК была обнаружена при увеличении содержания соли в последовательностях с повторением пуринов-пиримидинов. В отличие от А и В форм ДНК, Z-ДНК представляет собой левозакрученную двойную спиральную структуру. Z-Форма длиннее и менее скручена, чем В-форма, а ее сахарофосфатный остов образует «зигзаг» [63].

В клетке также существует РНК, которая выполняет разнообразные функции в процессе биосинтеза белка. Первичная структура РНК отличается от первичной структуры ДНК тем, что в РНК тимин заменен на урацил, а сахар представлен рибозой [63].

3.3. Клеточный цикл и радиационная гибель клеток

Клеточный цикл состоит из двух периодов. Первый – интерфаза (G1, S и G2) продолжается 90% времени жизни клетки, в этот период она растет. Во время этой фазы ДНК расплетается, и клетка делает ее копию. После удвоения ДНК, расположенная в ядре, связана со своей копией элементом, известным как центромера. Второй клеточный период – митоз М, в ходе которого происходит деление клетки. Этот период относительно короткий, сложный и строго регулируемый, в ходе митоза ДНК компактизована в хромосомы. Как правило, клетка растет, пока не достигнет определенного размера, затем она делится. Время между последовательными делениями известно как время клеточного цикла [14,61].

Между различными фазами клеточного цикла имеются контрольные точки, которые полностью останавливают клетку (как это наблюдается между G1/S-фазой и G2/М-фазой) или просто замедляют в процессе прохождения S-фазы, чтобы клетки получили время для репарации повреждений ДНК [64].

Радиочувствительность клетки изменяется в разных фазах клеточного цикла. В целом, клетка является наиболее радиочувствительной в фазе митоза М и фазе G2 и большей радиорезистентностью в фазах S и поздней G1 [65]. Радиорезистентность фазы S обусловлена наличием большого количества ферментов, участвующих в синтезе ДНК, они обладают высокой способностью быстро восстанавливать

поврежденную ДНК [52]. Кроме того, топология структуры хроматина в разные периоды клеточного цикла играет важную роль в радиочувствительности клеток. В фазе G1 ДНК содержится в деконденсированной (раскрытой) форме хроматина, что делает процесс репарации повреждения ДНК относительно простым. С другой стороны, структура хроматина компактна в фазах G2 и M, что приводит к меньшей эффективности репарации, и поэтому к более высокой чувствительности [65–67].

Для характеристики радиочувствительности различных биологических объектов используют величину D_{37} – это доза радиации, при которой выживает (остаются не инактивированными) 37% объектов, то есть число живых, непораженных объектов N в e раз меньше, чем первоначальное количество объектов N_0 : $\frac{N}{N_0} = e^{-1} = 0.37$. D_{37} является стандартом радиочувствительности (более высокая радиочувствительность означает более низкие значения D_{37}). Сравнение кривых зависимости эффекта от дозы позволяет получить радиочувствительность различных биологических структур [13].

Клетки злокачественных опухолей быстро и непрерывно делятся, причем время их клеточного цикла короче, чем у нормальной клетки. Поэтому раковые клетки более чувствительны к радиации, т.к. не имеют достаточного времени для восстановления повреждений ДНК между делениями по сравнению с нормальной клеткой) [14,52].

3.4. Прямое и косвенное действие радиации

В конце химической стадии действия излучения в клетке формируются повреждения различных молекул и внутриклеточных структур, которые приводят к функциональным нарушениям и ответным реакциям клетки и, в целом, организма. Эти реакции составляют биологическую стадию действия излучения, которая длится от нескольких секунд до многих лет. Биологическое действие ионизирующего излучения обусловлено главным образом повреждением ДНК – критической мишени внутри клетки [54–60]; однако в клетках также есть другие сайты (клеточные мембраны), которые при разрушении вызывают гибель клеток.

Когда ионизирующее излучение поглощается в биологической структуре, повреждение клетки или ДНК может происходить прямо или косвенно [14] следующим образом.

- **Прямое действие** происходит, когда ионизирующее излучение (первичные или вторичные частицы) непосредственно взаимодействует с атомами критической мишени (ДНК), вызывая возбуждение или ионизацию [5,68]. Приблизительно от четверти до трети всех биологических повреждений макромолекул, образующихся в облученных клетках, обусловлены прямым действием излучения с низкой ЛПЭ. Вклад прямого действия достигает почти 100% для излучения с высокой ЛПЭ. Таким образом, прямое действие является преобладающим процессом для излучения с высокой ЛПЭ [5,52,57]. Повреждение белков в клетке, по-видимому, не имеет существенного значения.

- **При непрямом (косвенном) действии** ионизирующее излучение взаимодействует с другими атомами или молекулами, отличными от ДНК в клетке, в основном с молекулами воды (поскольку человеческое тело состоит в основном из воды, приблизительно на 70-80%), с образованием короткоживущих и чрезвычайно активных ионов и свободных радикалов (включая активные формы азота – RNS и активные формы кислорода – ROS) в процессе, известном как радиолит воды [5,52,57,69–71].

Принципиальная схема прямого и непрямого действия излучения приведена на Рис 3.7. Свободные радикалы имеют неспаренные электроны на своих внешних оболочках, поэтому обладают высокой химической активностью и способны диффундировать достаточно далеко, чтобы вступить в реакцию с ДНК.

Основными активными продуктами, образующимися в процессе радиолиты воды, являются e_{aq}^- , OH^\bullet и H^\bullet , а наиболее реакционноспособным по отношению к ДНК является гидроксильный радикал (OH^\bullet) (Рис 3.7). Его среднее время жизни составляет 10^{-6} с, а расстояние диффузии составляет около 1 нм. Имеются данные, свидетельствующие о том, что любые свободные радикалы OH^\bullet , генерируемые внутри цилиндра диаметром около 4 нм вокруг двойной спирали ДНК, способны прореагировать с ДНК и вызывать повреждение [57,72].

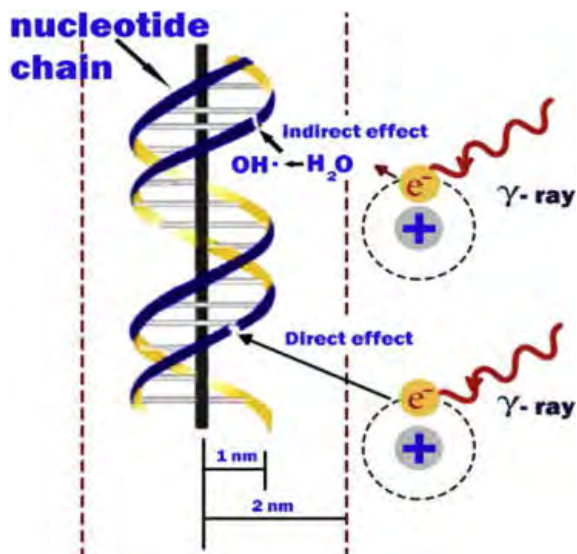


Рис 3.7 Прямое и косвенное действие радиации [70].

Около двух третей всех радиационных повреждений биологических макромолекул обусловлено косвенным действием редко ионизирующего излучения и опосредовано свободными радикалами, но косвенное действие уменьшается до нуля при воздействии излучения с высоким ЛПЭ. Следовательно, косвенное действие является преобладающим процессом для излучения с низкой ЛПЭ [5,52,57]. Косвенное действие излучения может быть модифицировано радиопротекторами или сенсibilizаторами [57].

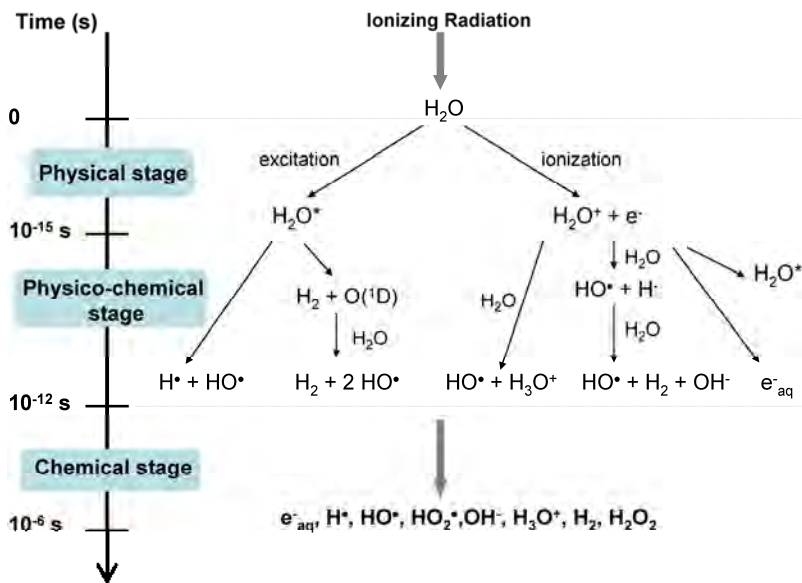


Рис 3.8 Основные реакции, протекающие в ходе трех стадий радиолиза воды [71] .

3.5. Радиационные повреждения в структуре ДНК

Изучение физико-химических основ повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением разных типов и интенсивности в зависимости от условий окружающей среды имеет решающее значение для разработки методов радиационной безопасности и лучевой терапии. Радиационные повреждения в структуре ДНК можно разделить на две группы. Первая группа – односайтовые, или одиночные повреждения, такие, как однонитевые разрывы (ОР), модификации оснований, отрыв оснований (результатом которого являются апуриновые и апиримидиновые сайты – АП-сайты). Вторая группа – локальные множественные повреждения (ЛМП), такие, как кластерные повреждения (два и более близко расположенных односайтовых повреждения), двунитевые разрывы ДНК (ДР), межмолекулярные сшивки ДНК-белок и ДНК-ДНК [13,49,73]. Все эти повреждения

регистрируются при облучении ДНК в живых клетках и в модельных системах – растворах, пленках, высушенных образцах макромолекул. Образование одиночных повреждений в ДНК является, преимущественно, результатом непрямого действия радиации, тогда как ЛМП вызваны, в основном, прямым действием излучения.

Однонитевой разрыв (OP, SSB): разрыв сахара-фосфатного остова одной из комплементарных цепей (Рис 3.9). Такое повреждение может сопровождаться отрывом азотистого основания. Разрыв в одной из цепей ДНК мало влияет на выживание клеток, потому что ДНК легко восстанавливаются с использованием ненарушенной комплементарной цепи в качестве матрицы. Если восстановление происходит неправильно (репарация с ошибками), это может привести к мутации [5,57].

Двунитевой разрыв (DP, DSB): включает разрыв обеих цепей молекулы ДНК. Если эти разрывы в обеих цепях достаточно разделены, восстановление ДНК снова происходит легко, как это обычно бывает в случае разрыва одной цепи (когда два разрыва рассматриваются по отдельности) (Рис 3.9). Однако, если эти разрывы противоположны друг другу или разделены только несколькими парами оснований в пределах области приблизительно 10-20 пар оснований, ни хроматин, ни водородные связи не могут удерживать две цепи вместе и возникает двойной разрыв цепи (DSB) – волокно хроматина распадается на две части [5,57,74].

Считается, что DSB является наиболее значительным повреждением ДНК (основной вклад в цитотоксичность) и редко восстанавливается или неправильно восстанавливается, что приводит к гибели клеток, мутациям, хромосомным aberrациям или канцерогенезу [5,57,75–77]. Практически DSB в ДНК, вызванные ионизирующим излучением, могут быть результатом появления радикалов в каждой из комплементарных цепей ДНК, а могут быть следствием прямой ионизации обеих цепей ДНК, или комбинации этих процессов [57,72]. Кроме того, известно, что действие ферментов в клетке может трансформировать близлежащие расположенные в молекуле ДНК повреждения в DSB [78,79]. Количество DSB, индуцированных в клетке, иногда используется для определения биологического ответа и степени радиационного воздействия [77].

Модификация оснований – это один из самых распространенных видов радиационных повреждений ДНК (Рис 3.9). Порядка 70-85% этих модификаций при γ -облучении клеток являются результатом взаимодействия с ДНК радикалов $\cdot\text{OH}$ и супероксидных анион-радикалов $\text{O}_2^{\cdot-}$ (они образуются при облучении в водной среде в присутствии молекулярного кислорода) [73,80]. Поэтому на выход поврежденных оснований в составе ДНК оказывает сильное влияние уровень кислорода и веществ-перехватчиков радикалов в облучаемых системах. Радиочувствительность свободных оснований ДНК уменьшается в следующем порядке: $\text{T} > \text{C} > \text{A} > \text{G}$ [81]. При облучении нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот в азотистых основаниях наблюдаются качественно те же изменения, что и в их свободном состоянии. Количественно же степень деградации оснований уменьшается в последовательности: свободные основания $>$ нуклеозиды $>$ нуклеотиды $>$ нуклеотиддифосфаты $>$ основания в одонитевой ДНК $>$ основания в двунитевой ДНК $>$ основания в ДНК в составе хроматина [49,82–84].

Локальные множественные повреждения (ЛМП). Образование ЛМП в ДНК играет главную роль в радиационной гибели, возникновении мутаций и трансформации клеток. Формирование значительной части ЛМП ДНК происходит за счет прямого действия радиации. В основе механизмов, ведущих к образованию большинства ЛМП, лежит возникновение кластеров повреждений в результате прохождения трека ионизирующей частицы в пределах локального объема мишени – молекулы ДНК (прямое действие), а также атака участка ДНК множеством свободных радикалов (косвенное действие) [13]. Так как для плотно ионизирующей частицы концентрация радикалов в шпуре выше, чем для редко ионизирующей, то с ростом ЛПЭ излучения количество ЛМП ДНК возрастает [85]. ЛМП как правило включают DSB, SSB, модификации азотистых оснований, межмолекулярные сшивки и др. повреждения. Такие повреждения охватывают участки ДНК большей или меньшей длины, в их пределах могут формироваться и одноцепочечные области в результате потери олигонуклеотидов из одной нити при сохранении целостности второй. Было показано, что ЛМП, включающие DSB, могут возникать в результате как минимум двух ионизаций на участке ДНК размером 1.5–3 нм [73]. Тяжелые

заряженные ионы с высокой ЛПЭ могут индуцировать ЛМП, охватывающие области двойной спирали до 40 пар оснований и более.

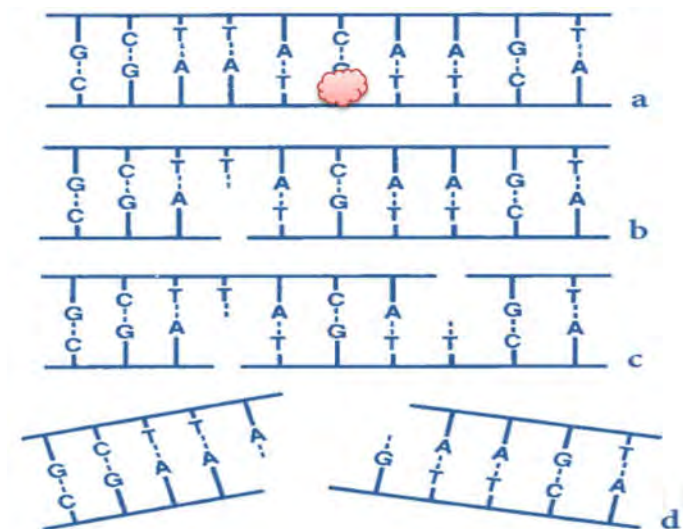


Рис 3.9 Схема образования некоторых типов радиационных повреждений в ДНК: а – модификация основания, b – SSB, c – два близко расположенных SSB, d – DSB [57].

Межмолекулярные сшивки. Сшивки ДНК-ДНК при облучении клеток в биологически значимых дозах формируются, как правило, в незначительных количествах, в отличие от сшивок ДНК-белок. Сшивки ДНК-ДНК могут чаще возникать при облучении модельных систем – концентрированных растворов, пленок, высушенных образцов. Их возникновение обычно обнаруживается по увеличению молекулярной массы облученной ДНК [73].

Сшивки ДНК-белок появляются при облучении клеток. Как правило, высокоочищенная ДНК из многих клеток высших организмов содержит около 0.2–0.5% прочно связанного белка. При выделении ДНК из облученных клеток обнаруживается увеличение содержания такого белка. Это указывает на образование прочных ковалентных связей – ДНК-белковых сшивок (ДНК-БС). Эти

связи формируются в основном между основаниями ДНК и отдельными аминокислотами белка, например: тимин–алифатические аминокислоты, цитозин–тирозин, и др. Радиационный выход ДНК-БС существенно зависит от скорости деления клеток и фазы клеточного цикла. Очевидно, что на выход ДНК-БС влияет плотность упаковки ДНК в составе хроматина ядер. Распределение ДНК-БС неодинаково в разных частях хроматина: если в целом на одну клетку образуется примерно 150 ДНК-БС/1 Гр, то в отдельных участках конденсированного хроматина регистрируется превышение среднего значения этих повреждений в 5 раз и более, тогда как в транскрипционных участках количество ДНК-БС гораздо ниже среднего [73].

Гистоны несут положительный заряд и взаимодействуют с ДНК в составе хроматина электростатически. Поэтому в облученных клетках наблюдаются главным образом сшивки ДНК с гистонами. Выход ДНК-БС возрастает с ростом ЛПЭ излучения [73,86].

Разрыв водородных связей (радиационная денатурация [13]. В местах образования любых повреждений первичной структуры ДНК происходит локальное нарушение вторичной структуры – разрыв водородных связей. Этот тип повреждений регистрируется, в основном, по снижению термостабильности ДНК под действием облучения [73]. Иногда применяются и другие методики, основанные на изучении изменений спектральных параметров ДНК. К настоящему времени установлено, что изменение оптической плотности γ -облученных растворов ДНК обусловлено влиянием двух факторов: с одной стороны, под действием облучения во вторичной структуре ДНК могут возникать дефекты – разрушенные водородные связи. Они могут привести к увеличению поглощения. С другой стороны, разрушение азотистых оснований приводит к уменьшению оптической плотности облученного раствора [73,81].

Для характеристики радиационных превращений исследуемых молекул вводят величину радиационно-химического выхода G [13]:

$$G = \frac{\text{количество модифицированных молекул (групп)}}{100 \text{ эВ поглощенной энергии}}$$

В таблице 3.1 приведены характерные значения G для разных типов повреждений ДНК под действием γ -облучения [13,81].

Табл.3.1 Радиационные повреждения ДНК, γ -облученной в водном растворе [13,81].

Типы радиационных повреждений ДНК	Состав раствора	Концентрация ДНК, %	$G, \frac{\text{молекул}}{100\text{эВ}}$
SSB	0.01 M NaCl	0.02	0.24
DSB	0.01 M NaCl	0.02	0.002
Денатурация ДНК (разрыв водородных связей)	0.01 M NaCl	0.14	38
Разрушение оснований:	0.01 M Na ₃ PO ₄	0.5	
тимин			0.45
цитозин			0.28
гуанин			0.17
аденин			0.12
Отщепление оснований:	0.01 M Na ₃ PO ₄	0.5	
тимин			0.5
цитозин			0.08
аденин			0.07
гуанин			0.04

3.6. Действие космического излучения на биологические системы

Проблема оценки радиационных рисков в космосе весьма сложна и многогранна. Полученные членами космического экипажа дозы излучения зависят от траектории полета, его продолжительности, программы работ космонавта. Необходимо также учитывать периоды солнечной активности, в течение которых увеличивается частота и интенсивность солнечных вспышек. Опасность для здоровья космонавтов представляет накопление дозы низкоинтенсивного ионизирующего излучения на низких околоземных орбитах, интенсивное лучевое воздействие при пересечении кораблем радиационных поясов Земли, воздействие галактических и солнечных космических лучей за пределами радиационных поясов Земли [2,87–93]. Поэтому изучению биологического действия космических лучей уделяется особое внимание. Многочисленные эксперименты на биологических объектах разных уровней организации (млекопитающих, растениях, микроорганизмах, клетках и др.) проводятся на спутниках и космических станциях, а также в земных условиях, с использованием ускорителей в качестве источников заряженных частиц для моделирования различных составляющих космических лучей [1,2,87,90–92,94–100]. Кроме того, проводятся всесторонние медицинские обследования вернувшихся на Землю космонавтов [87,89,90]. Следует отметить, что дополнительными факторами, которые могут модифицировать радиационный эффект во время космического полета, являются невесомость, перегрузки, вибрация, измененный состав газовой среды и др., и их влияние пока изучено недостаточно [90,93,101,102].

Значительная часть исследований посвящена изучению биологической эффективности тяжелых заряженных частиц с высокой ЛПЭ с использованием разных критериев радиочувствительности [2,87,95,103–105]. Многие авторы отмечают, что характер и степень радиационного поражения клеток и тканей существенно изменяется в случае, если частица полностью тормозится в биологическом образце (т.е. если пик Брэгга лежит внутри образца). В конце трека адрона диаметр области ионизации и возбуждения резко возрастает, увеличивается также число δ -электронов, и одна частица способна вызвать гибель нескольких

соседних клеток [87].

На Рис 3.10 показаны экспериментальные данные и результаты моделирования зависимости сечения инактивации (соответствующей 37% выживших клеток) культуры *E-Coli* после облучения тяжелыми ионами [95]. Видно, что для излучений с ЛПЭ $\sim 10^4$ кэВ/мкм сечение инактивации достигает десятков мкм². Результатом таких радиационных повреждений даже при поглощенной дозе, не превышающей предельно допустимую, могут быть так называемые отдаленные последствия; особенно сильно прохождение плотнойизирующего излучения сказывается на функционировании высокоспециализированных биологических систем, таких, как сетчатка глаза и центральная нервная система [87,92,102,104]. К отдаленным последствиям облучения тяжелыми ионами также относят рак, нарушения иммунной и сердечно-сосудистой системы, лучевую катаракту [2,87,92,98,103,104].

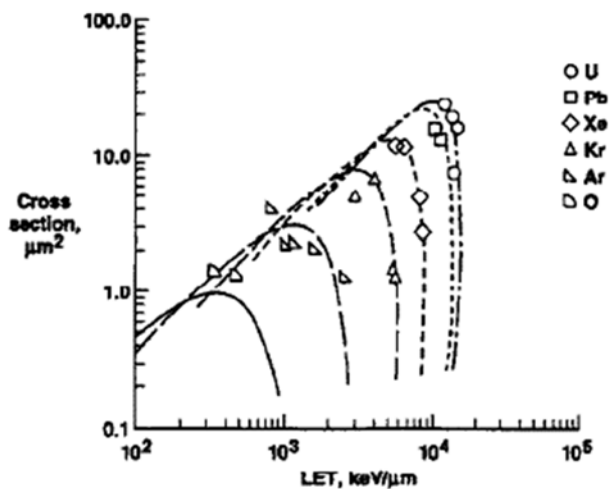


Рис 3.10 Экспериментальные и рассчитанные значения сечения инактивации клеток *E-Coli* как функция ЛПЭ [95].

Подробные исследования биологических эффектов тяжелых заряженных частиц разных энергий показали, что ОБЭ излучения для данного биологического критерия определяется не только ЛПЭ. Необходимо принимать во внимание распределение ионизаций в треке частицы, которое определяется, в частности, ее

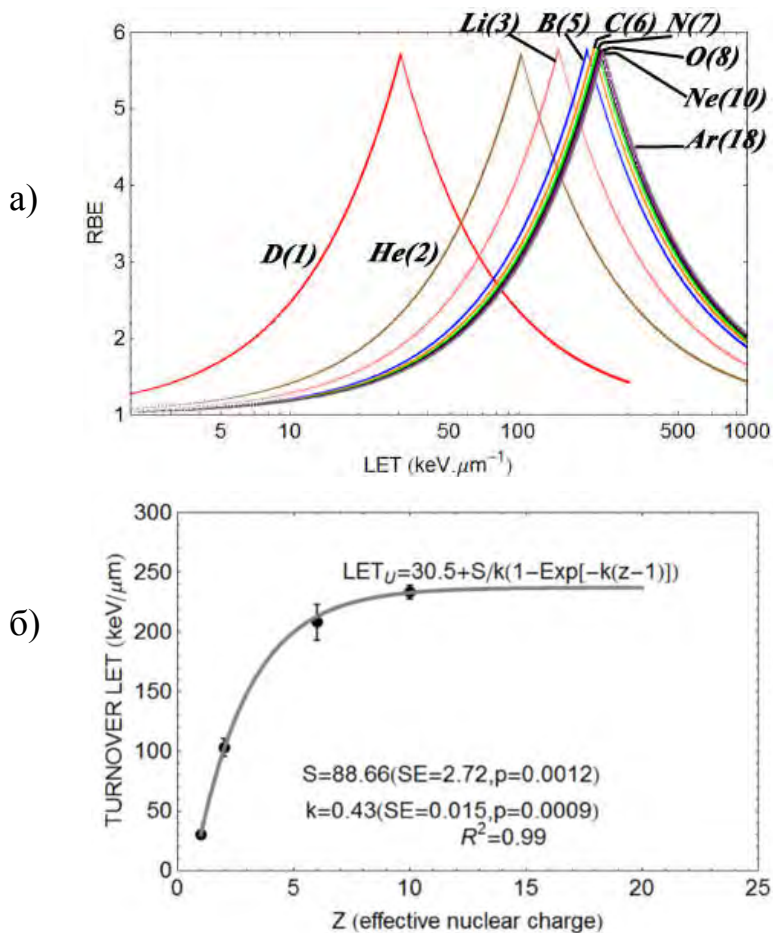


Рис 3.11 а) Зависимость ОБЭ от ЛПЭ для ядер с разным зарядом (заряд указан в скобках); б) зависимость положения максимума зависимости ОБЭ=f(ЛПЭ) от заряда частицы [106].

зарядом. В работе [106] обобщен большой массив данных о биологической эффективности различных заряженных частиц, и построена зависимость ОБЭ от ЛПЭ для частиц с разным зарядом (Рис 3.11). Отметим, что для протонов максимум ОБЭ достигается при наименьшем среди всех ядер значении ЛПЭ=30кэВ/мкм. ОБЭ также зависит от поглощенной дозы: с увеличением дозы ОБЭ уменьшается [106,107].

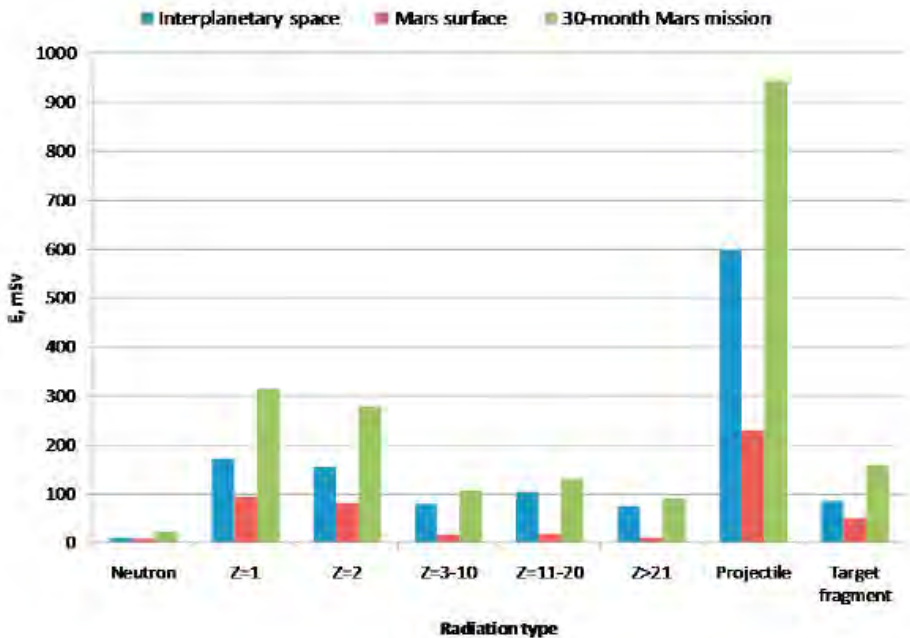


Рис 3.12 Эффективные дозы для частиц разных зарядов, входящих в состав космического излучения, определенные внутри космического корабля с алюминиевой экранирующей оболочкой толщиной 5г/см^2 (облучение в течение 1 года для межпланетного пространства и поверхности Марса, в течение 30 месяцев для экспедиции на Марс) [108].

Для оценки радиационных рисков космического экипажа и разработки способов его защиты важно выяснить вклад различных составляющих космических лучей в эффективную дозу, которую получают космонавты. В работах [2,108] на основании многолетних исследований были рассчитаны эффективные дозы радиации, получаемые членами экипажа при прохождении космических лучей сквозь обшивку корабля (Рис 3.12). Видно, что наибольший вклад в суммарную эффективную дозу вносят частицы с $Z=1$ (протоны). Действительно, как уже отмечалось, основной компонентой космического излучения являются протоны высоких энергий [4]. Биологический эффект протонного излучения по критериям трансформации клеток и развития рака также является наибольшим среди всех частиц космических лучей (Рис 3.13) [2].

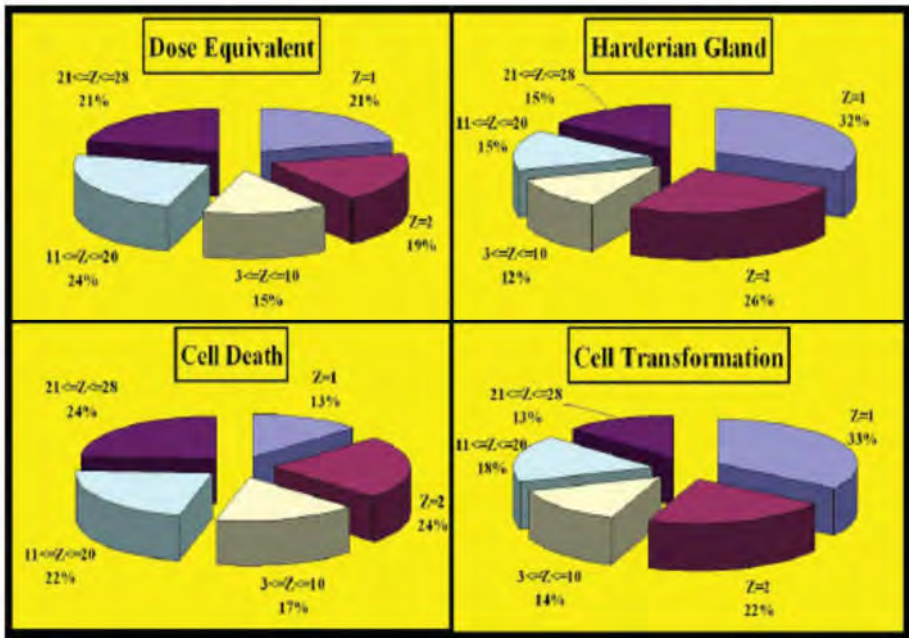


Рис 3.13 Биологический эффект заряженных частиц космического излучения [2].

Как известно, клетки тем более радиочувствительны, чем менее они дифференцированы и чем интенсивнее они делятся (правило Бергонье и Трибондо) [13]. В организме такими особо радиочувствительными клетками являются стволовые клетки кроветворной системы и эпителиальные стволовые клетки. Их гибель или трансформация является следствием повреждений ДНК [13,81,86]. Поэтому изучение влияния различных видов радиации на структуру ДНК является ключевой проблемой для понимания механизмов развития биологических последствий облучения организма и поиска средств защиты.

За многие десятилетия радиобиологических исследований накоплено огромное количество данных о повреждениях в структуре ДНК, вызванных γ - и рентгеновским облучением [13,49,73,81,86]. Данных о радиационных повреждениях ДНК, вызванных тяжелыми заряженными частицами, существенно меньше; внимание исследователей сконцентрировано, в основном, на излучениях с высокой ЛПЭ в окрестности пика Брэгга, так как это весьма актуально для развития адронной терапии [5,72,106,107,109,110]. В последнее время активно разрабатываются методы математического эксперимента для определения радиационных повреждений ДНК [48,111–114]. В их основе лежит метод Монте-Карло для моделирования структуры трека заряженных частиц. Однако, получаемые в ходе компьютерного эксперимента результаты в значительной степени зависят от используемой модели ДНК, а также от степени подробности учета реакций, происходящих на физико-химической и химической стадиях действия излучения. Зачастую при описании косвенного действия радиации учитывают только реакции с участием ОН-радикала [48], что может привести к ошибкам в расчетах. Так, например, полученные в работах [111] и [114] данные о выходе кластерных повреждений ДНК одними и теми же видами излучений различаются на порядок. Исследований радиационного эффекта высокоэнергетичных протонов, как теоретических, так и экспериментальных, крайне мало.

Следует еще раз подчеркнуть, что, хотя главным параметром, определяющим ОБЭ излучения, считается ЛПЭ [72,111], однако на биологическую эффективность влияет и заряд частицы, и поглощенная доза. На Рис 3.14 показан начальный отрезок зависимости ОБЭ от ЛПЭ протонов (нормированной на ЛПЭ γ -излучения ^{60}Co) для

двух доз: 2 Гр и 10 Гр [110]. Для ЛПЭ=const ОБЭ тем больше, чем меньше доза. Можно предположить, что с ростом дозы облучения увеличивается плотность ионов и радикалов в образце, и, следовательно, увеличивается вероятность их рекомбинации, что приводит к снижению ОБЭ.

Несмотря на то, что ЛПЭ протонного излучения с энергией 1ГэВ и стандартного γ -излучения ^{60}Co практически одинаковы (ЛПЭ \approx 0.3кэВ/мкм), тем не менее при вычислении эквивалентной дозы значение взвешивающего коэффициента качества излучения W_R для протонов с энергиями более 2 МэВ принимается $W_R=5$ [13] (по другим рекомендациям $W_R=2$ [2]). В работе [111] для протонов с ЛПЭ \approx 0.3кэВ/мкм приводятся значения выхода односторонних разрывов 154 на 1 Гр на 10^6 п.о. (γ -излучение ^{60}Co вызывает, в зависимости от вида клеток и условий облучения, 7–70 ОР на 1 Гр на 10^6 п.о. [115–119]), двусторонних разрывов 6 на 1 Гр на 10^6 п.о. (для γ -излучения количество ДР оценивается около 1 на 1 Гр на 10^6 п.о. [115–119]), кластеров повреждений 0.1 на 1 Гр на 10^6 п.о. (при этом на 1 кластер приходится 2 двусторонних разрыва).

На Рис 3.15 показаны кривые зависимости доза-эффект, полученные при облучении культуры клеток γ -излучением ^{60}Co , протонами 9ГэВ (ЛПЭ=0.22кэВ/мкм) и ионами гелия 4ГэВ/нуклон (ЛПЭ=0.88 кэВ/мкм) [87]. Видно, что, несмотря на то, что ЛПЭ протонов меньше, чем γ -квантов, в данном эксперименте ОБЭ протонов больше 1. Таким образом, для понимания механизмов формирования радиационного эффекта протонов высоких энергий требуется подробное изучение зависимостей доза-эффект для разных типов структурных повреждений ДНК в сравнении с аналогичными зависимостями для стандартного излучения.

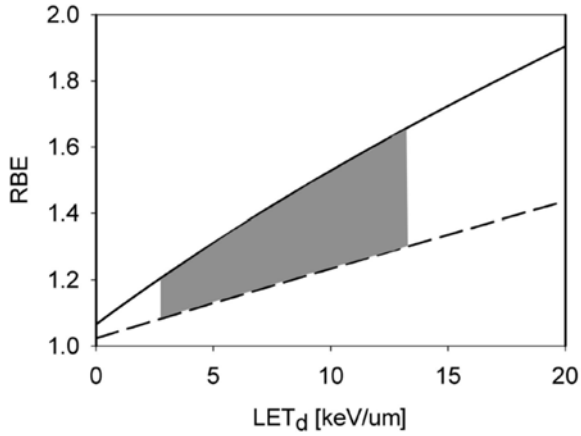


Рис 3.14 Зависимость ОБЭ протонов по критерию клоногенной активности клеток от $LET_d = \frac{LET}{LET_\gamma}$ (ЛПЭ протонов, нормированной на ЛПЭ γ -излучения ^{60}Co) для дозы 2 Гр (сплошная линия) и 10 Гр (штриховая линия) [110].

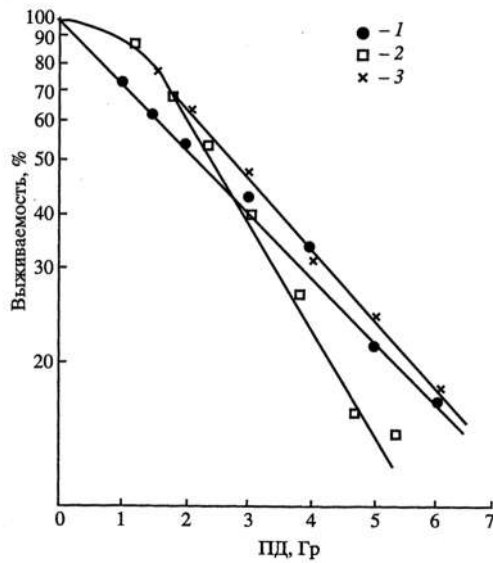


Рис 3.15 Кривые выживаемости клеток китайского хомячка после облучения ионами гелия 4ГэВ/нуклон (1), протонами 9 ГэВ (2) и γ -излучением ^{60}Co (3) [87].

4. Материалы и методы

4.1. Материалы

В работе использовали натриевую соль ДНК из тимуса теленка (Sigma) молекулярной массы $(11.2 \pm 0.6) \cdot 10^6 Da$ и $(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^6 Da$, химически чистые NaCl, MgCl₂, HClO₄. Все водные растворы готовились с использованием деионизованной воды. Растворы NaCl и MgCl₂ необходимой концентрации готовили из насыщенных растворов. Использовался биофлавоноид (\pm)-катехин (Cat) производства Sigma. Концентрацию Cat определяли спектрофотометрически при $\lambda_{\text{max}}(\text{Cat})=280\text{nm}$, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon(\text{Cat}, 280 \text{ nm}) = 3800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Облучение протонами с энергией 1ГэВ проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» в комплексе Лучевой терапии "на пролет" на базе ускорителя СЦ-1000. Интенсивность пучка составляла 4 Гр/мин. Гамма-облучение проводили в аэробных условиях при комнатной температуре на установке Исследователь (⁶⁰Co) в Отделении молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ им. Б.П. Константинова.

4.2. Метод Спирина

Одним из наиболее подходящих методов количественного определения концентрации ДНК является спектрофотометрический. Этот метод основан на законе Ламберта-Бера, который гласит, что поглощение света в растворе прямо пропорционально концентрации поглощающих частиц в этом растворе и длине пути [120]. Следовательно, для фиксированной длины пути может быть выполнено измерение оптического поглощения для количественной оценки концентрации поглотителя в конкретном растворе. Для ДНК и других биополимеров со вторичной структурой величина поглощения (оптическая плотность D) сильно варьируется в зависимости от состояния вторичной структуры их молекул.

Метод Спирина является наиболее предпочтительным методом количественного определения концентрации нуклеиновых кислот в растворах [121]. В этом методе денатурацию ДНК осуществляли путем добавления 3 мл 6% HClO_4 к 1 мл раствора ДНК и последующей выдержки на кипящей водяной бане в течение 20 минут и быстрого охлаждения до 0°C (т.е. гидролизом). Кислая среда предотвращает ренатурацию ДНК. Концентрацию ДНК в растворе определяли по методу Спирина по разнице в УФ-поглощении гидролизированных растворов на длинах волн 270 нм и 290 нм (D_{270} и D_{290}), измеренных при комнатной температуре $(22 \pm 2)^\circ \text{C}$ [121]:

$$C = \frac{10.1(D_{270} - D_{290})}{0.19} \frac{V_2}{V_1} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

где V_1 - объем раствора ДНК, а V_2 - объем раствора после гидролиза.

Используя полученное значение C и интенсивность УФ-поглощения в исходном необработанном растворе в максимуме (D_{260}), был рассчитан молярный коэффициент экстинкции, который дает информацию о степени спиральности ДНК [122]:

$$\varepsilon_{260}(p) = \frac{31 \cdot D_{260}}{0.009 \cdot CL}$$

где L - длина оптического пути (в данной работе $L = 1 \text{ см}$), $0,009 = 9,9\%$ - процентное содержание фосфора в ДНК, 31 - атомная масса фосфора. Если значение концентрации ДНК используется в мг /мл, значение $\varepsilon_{260}(P)$ будет в диапазоне $6000\text{--}10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Поглощение растворов ДНК измеряли на спектрофотометре SF-56 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Эти эксперименты проводились при комнатной температуре. Как правило, УФ-абсорбционная спектроскопия может предоставить

важную информацию о структуре ДНК. Метод А.С. Спирина [121] позволяет определить концентрацию хромофоров (азотистых оснований) в растворе ДНК и, таким образом, оценить количество оснований, разрушенных под действием радиации. Значения экспериментальных ошибок для C были оценены из 3 экспериментов с необлученным раствором ДНК.

4.3. Метод плавления

Процесс плавления ДНК очень чувствителен к любым дефектам ее первичной и вторичной структуры [123]. Известно, что вторичная структура ДНК стабилизируется в водных растворах благодаря водородным связям между комплементарными основаниями (поперечные взаимодействия) и между соседними парами оснований (межплоскостные взаимодействия, или стекинг-взаимодействия) [123]. Наиболее широко используемой реализацией метода плавления является измерение поглощения раствора ДНК в ультрафиолетовой области (в максимуме спектра при 260 нм), основанной на гиперхромном эффекте – относительном росте УФ-поглощения ДНК в результате денатурации макромолекулы. Это увеличение поглощения происходит из-за исчезновения взаимодействия соседних пар оснований при переходе спираль-клубок [124]. В нашем исследовании денатурация ДНК осуществлялась путем нагревания раствора до 98 °С.

Кривые плавления образцов ДНК были получены путем измерения зависимости оптической плотности раствора ДНК при $\lambda = 260$ нм от температуры ($D_{260}(T)$) (Рис 4.1 а). Эксперимент проводился на спектрофотометре Spescord 210 Plus (Analytik Jena, Германия) с оборудованным ячейкой Пельтье кюветным отделением, с шагом регистрации 0,5 °, при скорости нагрева 1 ° в минуту, концентрация ДНК составляла $C = (20-60) \cdot 10^{-3}$ г / л. Регистрация осуществлялась с помощью программного обеспечения WinASPECT (Analytik Jena, Германия), поставляемого с прибором, дальнейшая обработка данных осуществлялась с помощью пакета OriginPro. Кривые плавления $D_{260}(T)$ были сглажены методом *локальной полиномиальной регрессии*, как показано, например, на Рис 4.1 а.

Температура плавления (T_m) ДНК определяется как точка максимума первой производной кривой плавления $dD(T)/dT$ (т. е. это температура, при которой денатурировано 50% ДНК) (Рис 4.1.а, б). Значение экспериментальной ошибки для T_m было оценено из 3 экспериментов с необлученным раствором ДНК. Температура плавления является физическим свойством нуклеиновых кислот, которое дает информацию о стабильности дуплексов в определенной среде. Этот метод широко применяется в молекулярной биологии и теоретической биофизике [125].

Естественно, макромолекулы ДНК сильно отличаются друг от друга в зависимости от содержания в них пар оснований А-Т и G-С [124]. Как правило, температура плавления ДНК существенно зависит от условий окружающей среды, в которой растворена ДНК. Как правило, исследуют водные растворы ДНК с известной концентрацией низкомолекулярного электролита (NaCl).

При нейтральном pH температуру плавления ДНК можно рассчитать теоретически следующим образом [124]:

$$T_m = 176.0 - (2.60 - X_o)(36.0 - 7.04 \log[Na^+]), \quad X_o = \frac{G + C}{A + T + G + C}$$

где T_m - температура плавления в °C, $[Na^+]$ – молярная концентрация ионов Na^+ , X_o – доля пар G-С. В данном исследовании, как упоминалось ранее, использованы образцы ДНК из тимуса телят; эта ДНК содержит 41,9 мол. % G-С и 58,1 мол. % А-Т [126]. Увеличение молярная концентрация ионов Na^+ в растворе ДНК приводит к стабилизации двойной спирали и, как следствие, к повышению температуры плавления ДНК [124,127]. Температура плавления также зависит от значения pH среды, T_m значительно снижается при значениях pH ниже 5 и выше 9 [124].

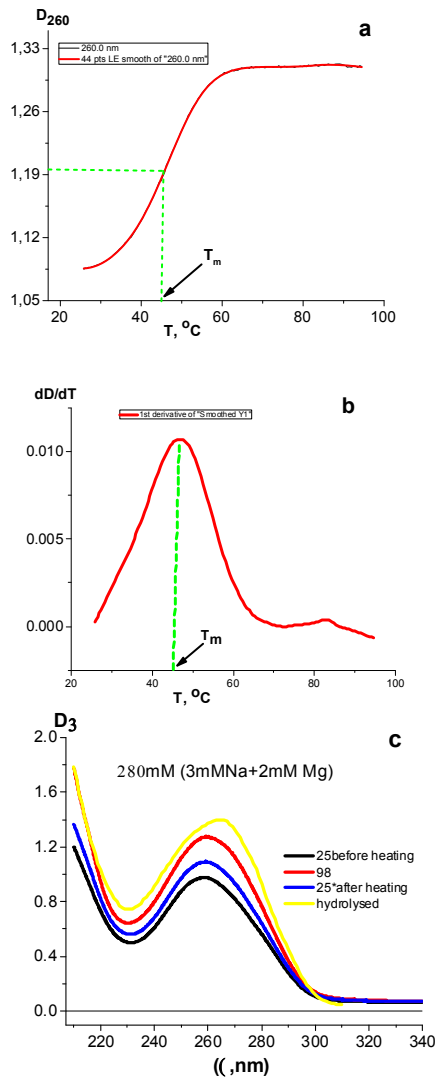


Рис 4.1 Кривая плавления ДНК, облученной протонами дозой 50 Гр (а), дифференциальная кривая плавления (б), спектры УФ-поглощения (с).

В эксперименте, проведенном в данной работе, во-первых, был измерен спектр УФ-поглощения для исследуемого раствора ДНК при комнатной температуре (черная кривая на Рис 4.1.с), во-вторых, температура раствора была повышена до 98⁰С, и была измерена соответствующая кривая плавления на фиксированной длине волны (260 нм), как показано на Рис 4.1.а, затем был измерен спектр УФ-поглощения денатурированной ДНК (при 98 ° С) (красная кривая на Рис 4.1.с), и далее раствор ДНК был быстро охлажден до 25 ° С. Спектр поглощения ДНК после охлаждения (частично ренатурированной) также был зафиксирован (синяя кривая на Рис 4.1.с). Видно, что гидролиз вызывает более полную денатурацию ДНК, (желтая кривая на Рис 4.1.с).

Гиперхромизм ДНК рассчитывали по формуле:

$$\delta = \frac{D_{260}^{98^{\circ}C} - D_{260}^{25^{\circ}C}}{D_{260}^{25^{\circ}C}}$$

где $D_{260}^{25^{\circ}C}$, $D_{260}^{98^{\circ}C}$ – оптическая плотность исследуемого раствора ДНК в максимуме спектра поглощения ДНК при комнатной температуре и при температуре 98⁰С соответственно. Гиперхромный эффект также указывает на степень спиральности исходной ДНК [122]. Гиперхромизм нативной ДНК при 0.15M NaCl составляет около 0,4 [122].

4.4. Круговой дихроизм (КД)

Круговой дихроизм (КД) - это спектроскопический метод исследования поглощения света веществом, который измеряет дифференциальное поглощение света правой и левой круговой поляризации [128,129]. Левый и правый круговой поляризованный свет (то есть LCPL и RCPL соответственно) указывают на два возможных состояния углового момента вращения фотона. Электромагнитное излучение состоит из электрического поля (Е) и магнитного поля (В), колеблющихся перпендикулярно друг другу и направлению распространения волны, образуя поперечную волну [130]. Циркулярно поляризованный свет возникает, когда

направление вектора электрического поля вращается вокруг его направления распространения, а величина вектора остается постоянной (Рис 4.2.а) [131], тогда как линейно поляризованный свет возникает, когда вектор электрического поля колеблется только в одной плоскости (Рис 4.2.б). Электрический вектор для RCPL вращается против часовой стрелки, а для LCPL электрический вектор вращается по часовой стрелке.

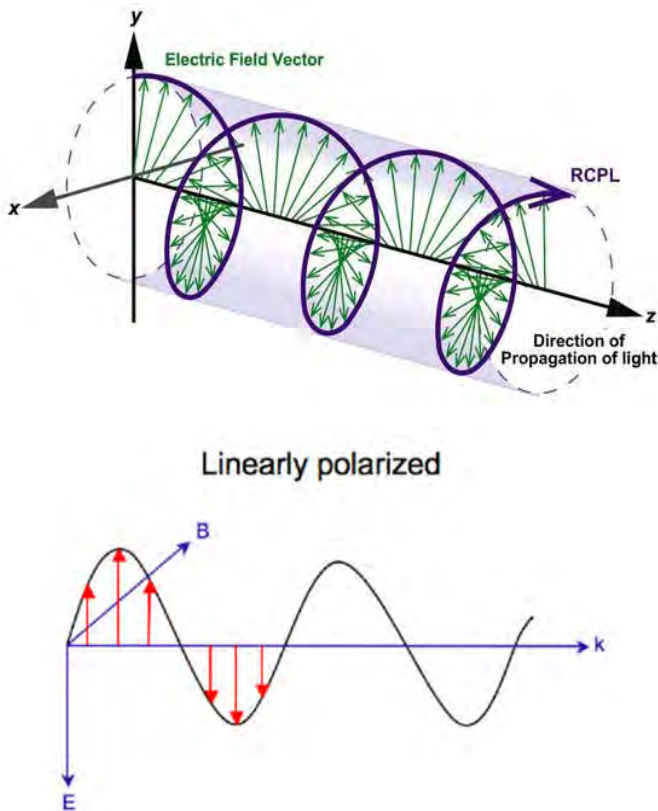


Рис 4.2 Принципиальная схема кругового поляризованного света (а) и линейно поляризованного света (б) [131].

Когда циркулярно поляризованный свет проходит через поглощающую среду, скорости распространения лево- и правополяризованного света различаются ($C_L \neq C_R$), а также различаются их длины волн ($\lambda_L \neq \lambda_R$) и, следовательно, степень их поглощения (то есть их молярные коэффициенты поглощения): $\epsilon_L \neq \epsilon_R$. Экспериментальный параметр, измеряемый в методе КД, представляет собой дифференциальное поглощение для левого и правого кругового поляризованного света веществом в зависимости от длины волны следующим образом [128];

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

где ϵ_L и ϵ_R – молярные коэффициенты экстинкции левого и правого кругового поляризованного света, соответственно.

Электрическое поле светового луча вызывает линейное смещение заряда при взаимодействии с молекулой (то есть индуцирует электрический диполь), тогда как его магнитное поле вызывает циркуляцию заряда (то есть индуцирует магнитный диполь). Эти два движения, объединенные, вместе, вызывают возбуждение электрона, которое можно представить, как движение по спирали.

Из закона Ламберта–Бера $\Delta\epsilon$ можно определить, как

$$\Delta\epsilon = \frac{\Delta A}{c \cdot L} \text{ (в моль}^{-1}\text{см}^{-1}\text{л)},$$

где $\Delta A = A_L - A_R$ – это непосредственно измеренная разность поглощения левого (A_L) и правополяризованного света (A_R), и она является функцией длины волны. [128].

Измеренный КД зависит от конформации молекулы и является не просто внутренним свойством молекулы. Он не только зависит от длины волны, но также может зависеть от концентрации, температуры, химического состава среды, включая растворители, и других параметров. В этом случае при регистрации КД также необходимо учитывать эти факторы, чтобы можно было правильно интерпретировать результат.

Большинство приборов для регистрации КД основаны на методах модуляции, разработанных Грожаном и Леграном (Рис 4.3). Во-первых, линейно поляризованный свет проходит через монохроматор. Затем свет с фиксированной

длиной волны пропускается через модулирующее устройство (обычно фотоупругий модулятор), которое преобразует линейный свет в круговой поляризованный свет. Падающий на образец свет переключается между LCPL и RCPL. Когда падающий свет меняет направление поляризации, поглощение изменяется, и можно рассчитать дифференциальное молярное поглощение [132].

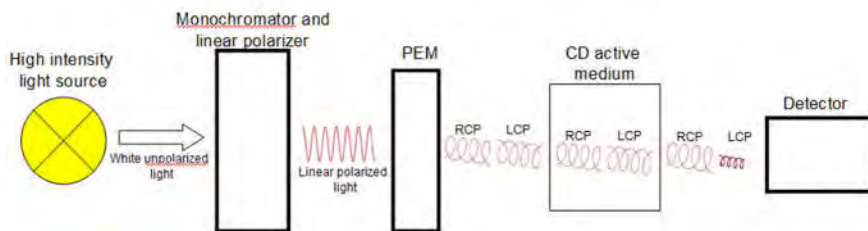


Рис 4.3 Принципиальная схема CD-спектрометра, показывающая поляризацию света и дифференциальное поглощение света LCP и RCP [132].

Круговой дихроизм (КД) является идеальным методом для изучения молекулярных структур, состава и взаимодействия хиральных систем. Это единственный метод, способный определить абсолютную конфигурацию (абсолютное стереоструктурное распределение) [128]. КД чувствителен к конформациям молекул и часто предоставляет важную информацию о функционировании и структуре биомолекул, которые не доступны напрямую из других традиционных методов спектроскопии (таких как поглощение и флуоресценция) [129]. УФ КД используется для исследования вторичной структуры белка и ДНК и их комплексов с низкомолекулярными веществами [133].

Хотя КД не может предоставить конкретную подробную структурную информацию, которую можно получить с помощью методов рентгеновской дифракции и ядерного магнитного резонанса, измерения КД имеют следующие преимущества [129]:

• Он не зависит от физической формы анализируемого вещества и может быть выполнен с образцами в растворе, дисперсиях твердого вещества, газовой фазе, пленках, жидких кристаллах, гелях и даже применим для образцов, которые трудно кристаллизовать или получить при высоких концентрациях [128,134].

• Это лучший метод для определения любых структурных изменений, возникающих в результате изменений условий окружающей среды (таких как pH, температура и ионная сила) [129].

• Чувствительность, неразрушающий характер и простота измерений КД, относительно небольшие количества материала [129,134].

• Спектры КД молекул ДНК в растворе могут предоставить важную информацию о ее общем конформационном состоянии по сравнению со спектром КД известных структур (то есть эталонных образцов) [134].

Информация, получаемая из спектра КД, дополняет информацию из спектра поглощения. Например, различные вторичные структуры ДНК легче обнаружить по спектрам КД [134], хотя относительное изменение поглощения при 260 нм при денатурации ДНК намного больше, чем относительное изменение длинноволновых полос КД.

В данной работе спектры КД были измерены на дихрографе Mark IV (Jobin-Yvon, Франция) при комнатной температуре. Поглощение и КД соответствующего растворителя вычитали из спектров раствора ДНК.

5. Результаты и обсуждение

5.1. Применение спектральных методов для определения радиационных повреждений в структуре ДНК

Как уже было упомянуто, одним из наиболее часто встречающихся видов радиационных повреждений в структуре ДНК является разрушение азотистых оснований и нарушение вторичной структуры ДНК (частичная денатурация), которое возникает в окрестностях дефектов первичной структуры макромолекулы: модифицированных азотистых оснований, апуриновых и апиримидиновых сайтов, одно- и двунитевых разрывов. В настоящее время для исследования указанных типов структурных повреждений ДНК используют различные варианты иммуноанализа [135–137], а также высокоэффективную жидкостную хроматографию в комбинации с масс-спектрометрией [138,139]. В данной работе предлагается применить спектральный метод Спирина определения общего количества азотистых оснований ДНК [121] для оценки доли разрушенных азотистых оснований. Ранее было показано, что облучение растворов ДНК вызывает так называемую "потерю гиперхромизма" – снижение интенсивности поглощения ДНК в УФ области, измеренное при температуре 80°C [140]. Обесцвечивание красителей под действием ионизирующего излучения используется в дозиметрии [13]. Авторы работы [141] применили спектроскопию поглощения для определения радиационного разрушения свободных оснований в растворе.

Радиационные повреждения в структуре ДНК по-разному влияют на ее спектр поглощения: разрушение азотистых оснований (основных хромофоров ДНК в УФ области) приводит к снижению поглощения, а частичная денатурация вызывает гиперхромный эффект [142]. Чтобы разделить эти эффекты, требуется полностью разрушить вторичную структуру ДНК (провести денатурацию) и в этом состоянии определить концентрацию хромофоров. Затем, используя полученное значение концентрации, можно определить степень спиральности, облученной ДНК до денатурации. В методе Спирина применяется разрушение вторичной структуры

ДНК путем гидролиза: ДНК выдерживается 20 мин. при 100°C в растворе 4.5% хлорной кислоты и затем резко охлаждается до 0°C [121]. При этом осуществляется не только разделение комплиментарных цепей, но и их частичная фрагментация, из-за протонирования азотистых оснований ренатурация при охлаждении раствора не происходит, и поглощение гидролизованного раствора зависит только от содержания в нем хромофоров.

Степень нативности ДНК можно оценить по значению молярного коэффициента экстинкции в максимуме УФ поглощения – ϵ_{260} . Также весьма информативным методом исследования вторичной структуры ДНК является круговой дихроизм (КД). Он широко применяется для исследований конформационных переходов в структуре ДНК, вызванных изменениями состава растворителя, при ее взаимодействии с биологически активными соединениями [143–149], а также для выявления радиационных повреждений макромолекулы [150,151]. Метод КД может дать дополнительную информацию о конформации ДНК (без применения гидролиза), поскольку разрушение оснований и частичная денатурация приводят к сходным изменениям в спектрах КД ДНК: уменьшению интенсивности [149].

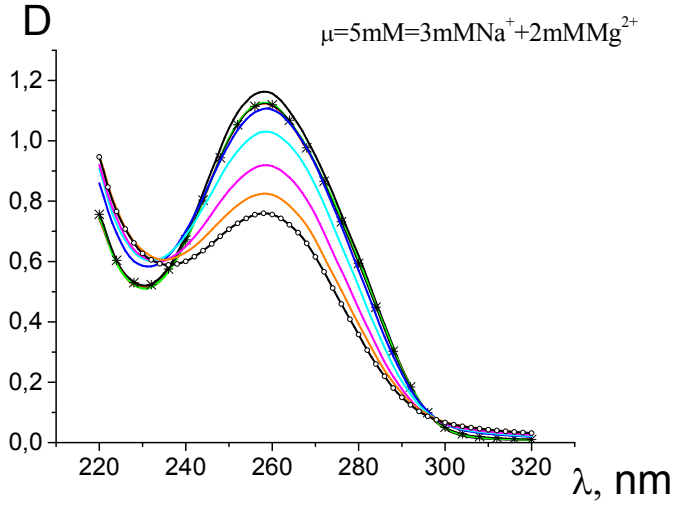
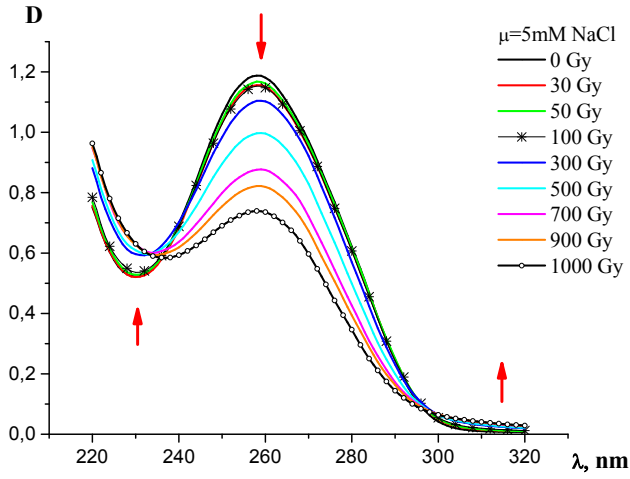
Еще один метод, применяемый в данной работе для оценки радиационных повреждений – спектрофотометрическое плавление ДНК. Процесс перехода спираль-клубок при нагревании раствора весьма чувствителен к состоянию первичной и вторичной структуры ДНК (в частности, к GC-составу и ионной силе раствора) [123,124] и часто применяется при исследовании комплексообразования ДНК с ионами и другими биологически активными веществами [152–154].

Первая серия экспериментов была выполнена с ДНК, облученной γ -квантами ^{60}Co в растворах разных ионных сил [155–157]. Структурные повреждения ДНК, вызванные γ - и рентгеновским облучением, достаточно подробно изучены, поэтому можно проводить сравнение полученных в работе результатов с литературными данными. Кроме того, было интересно изучить влияние ионного окружения ДНК на радиационный эффект. ДНК в водном растворе при нейтральных pH представляет собой полианион с высокой плотностью заряда. Взаимодействие с противоионами

играет важнейшую роль в формировании ее структуры. Большинство ионов щелочных металлов (Na^+ , Li^+ , K^+) и щелочноземельных металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) взаимодействуют в основном с отрицательно заряженными атомами кислорода фосфатных групп ДНК, стабилизируя вторичную структуру макромолекулы; катионы переходных металлов (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и др.) способны взаимодействовать как с фосфатными группами, так и с азотистыми основаниями ДНК [147,158,159]. В клетке и в водно-солевом растворе ДНК существует в комплексе с противоионами, которые внедряются в гидратную оболочку макромолекулы и образуют вокруг нее диффузное облако [158–161]. Взаимодействие с катионами определяет удельный объем клубка ДНК в растворе, т.е. ее третичную структуру [159–161]. Несмотря на это, работ, изучающих влияние ионных условий на радиочувствительность ДНК, немного [150,162,163]. Было показано, что радиационный эффект, выражающийся в уменьшении удельного объема ДНК, снижается с ростом ионной силы [162]. Д.Григорьев с соавторами обнаружил линейный рост выхода модифицированного основания 8-OHdGuo с повышением дозы γ -облучения в растворах ДНК; с ростом ионной силы также наблюдалось уменьшение выхода этого повреждения [163].

В данной работе исследовались водные растворы ДНК с различными концентрациями NaCl (3 мМ – 3,2 М) и в присутствии ионов Mg^{2+} , подвергнутые воздействию γ -излучения в дозах до 10^3 Гр. Описанные выше спектральные методы были применены для определения количества разрушенных азотистых оснований и степени спиральности, облученной ДНК. Целями данного исследования были сравнение возможностей разных методов для выявления указанных типов радиационных повреждений ДНК, и изучение влияния ионов Na^+ и Mg^{2+} на радиочувствительность ДНК в растворе [155–157].

Были измерены спектры УФ поглощения ДНК, γ -облученной дозами 0–1000 Гр в растворах ионной силы 0.003 М, 0.005 М, 0.15 М, 1М, 3.2 М NaCl , а также суммарной ионной силы $\mu=5\text{мМ}$, содержащих 3мМ NaCl и 2мМ MgCl_2 . Интенсивность излучения составляла 20 Гр/мин, концентрация ДНК в облучаемом растворе $C=0.05\text{г/л}=\text{const}$. На Рис 5.1 показаны полученные серии спектров при $\mu=5\text{мМ NaCl}$, $\mu=5\text{мМ}=3\text{мМ Na}^++2\text{мМ Mg}^{2+}$, $\mu=1\text{ М NaCl}$ и $\mu=3.2\text{ М NaCl}$.



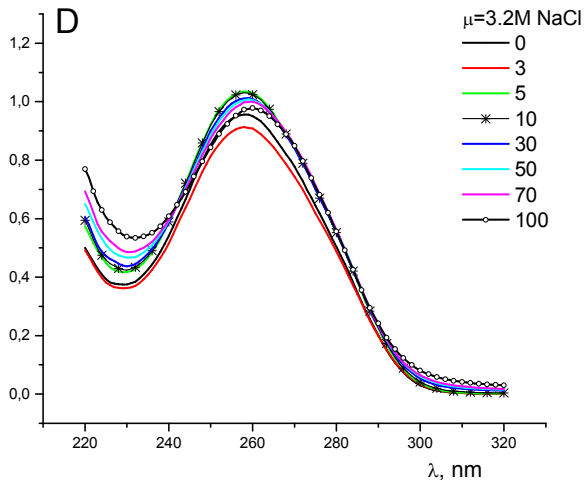
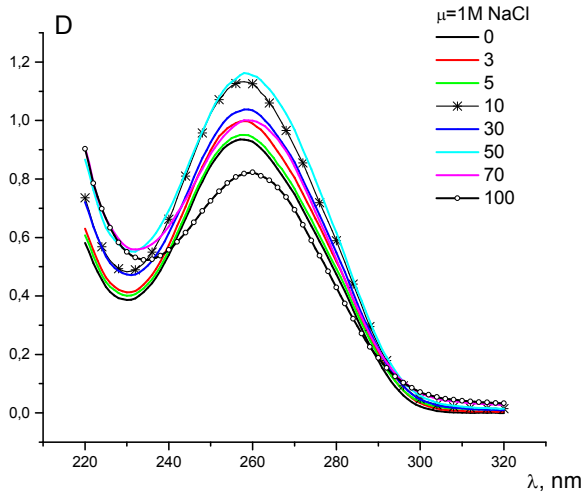


Рис 5.1 Спектры УФ поглощения ДНК, γ -облученной в растворах разных ионных сил. Ионные силы и дозы облучения указаны на графиках.

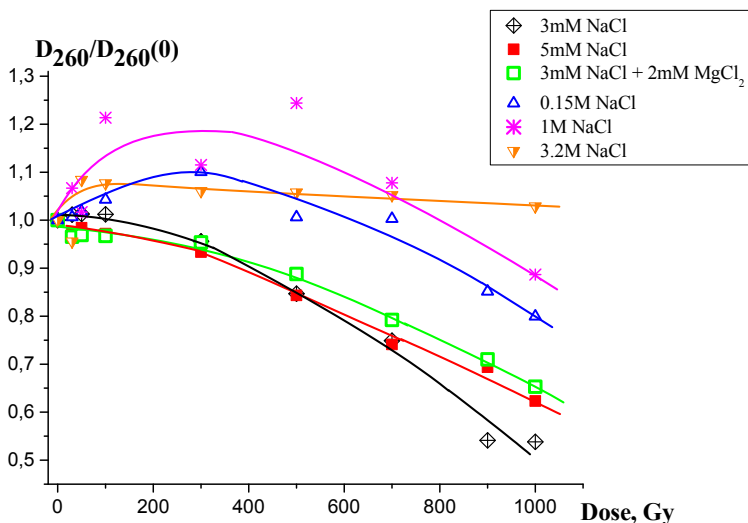


Рис 5.2 Относительное изменение поглощения в максимуме спектра ДНК как функция дозы облучения. Ионные силы растворов указаны на рисунке.

Видно, что вид этих спектров в основном определяется конкуренцией двух факторов: снижением интенсивности вследствие разрушения хромофоров и ростом интенсивности, вызванном частичной денатурацией. При малых ионных силах (5мМ) "побеждает" разрушение азотистых оснований: интенсивность поглощения практически монотонно снижается с увеличением дозы радиации. С ростом ионной силы (при $\mu=1\text{M}$ и $\mu=3.2\text{M}$) указанные факторы вносят сравнимые вклады и почти компенсируют друг друга. На Рис 5.2 показана зависимость интенсивности в максимуме спектра поглощения ДНК от дозы облучения при исследованных ионных силах.

Чтобы разделить вклад этих двух факторов в спектр поглощения облученной ДНК, был проведен гидролиз данных растворов. На Рис 5.3 приведены для примера две серии спектров гидролизованных облученных растворов ДНК при $\mu=5\text{ mM NaCl}$ и $\mu=3.2\text{ M NaCl}$. Нельзя исключить того, что в ходе гидролиза могут происходить дополнительные реакции нестабильных продуктов, появившихся в процессе облучения. Этого дополнительного вклада в повреждение ДНК невозможно избежать в данном эксперименте. В гидролизованных растворах ДНК находится в

форме фрагментированных одноцепочечных молекул, и ее поглощение определяется только концентрацией хромофоров (неразрушенных азотистых оснований (а.о.)). Вклад модифицированных а.о. в спектры гидролизированных растворов незначителен (выход модифицированных а.о. при γ -облучении растворов ДНК составляет порядка 1 на 10^7 а.о. на 1 Гр [164]), и им можно пренебречь. По полученным спектрам можно определить концентрацию хромофоров в облученных растворах по формуле (1). Отметим, что спектральные изменения, сходные с наблюдаемыми на Рис 5.3.а были получены в работе [141] при исследовании влияния γ -излучения на спектры поглощения свободных оснований в водном растворе. Зависимости доли разрушенных азотистых оснований от дозы облучения в растворах разных ионных сил представлена на Рис 5.4.а. Для всех исследованных систем наблюдается линейный рост с увеличением дозы, но угол наклона прямых уменьшается при увеличении ионной силы облучаемого раствора. Линейную зависимость количества 8-OHdGuo в ДНК от дозы облучения, а также снижение радиационного эффекта при увеличении ионной силы раствора наблюдали авторы работы [163]. Они предполагают, что определяющим фактором, снижающим радиационный эффект при увеличении концентрации противоионов, является изменение конформации ДНК.

Радиационно-химический выход G разрушенных а.о. в исследованных растворах показан на Рис 5.4.б. Интересно, что в растворах малой ионной силы (3мМ–5мМ) наблюдается сходная зависимость G от дозы облучения: в области малых доз (менее 100 Гр) резкое падение с ростом дозы, а затем выход на плато $G \approx 1 \text{ а.о./} 100 \text{ эВ}$. В литературе приводятся следующие значения G разрушенных а.о. при облучении растворов ДНК: $1 \text{ а.о./} 100 \text{ эВ}$ [13], $1\text{--}3 \text{ а.о./} 100 \text{ эВ}$ [81] (в зависимости от условий облучения) и $G = 0.3\text{--}4 \text{ а.о./} 100 \text{ эВ}$ при облучении свободных оснований в растворе [81]. Таким образом, полученные в настоящей работе значения G хорошо согласуются с имеющимися литературными данными.

Однако, обсуждения зависимости радиационно-химического выхода от дозы облучения найти в литературе не удалось. Известно, что выход односайтовых повреждений (например, ОР) снижается с увеличением ЛПЭ излучения, а выход

кластерных повреждений, наоборот, возрастает с ростом ЛПЭ, проходя через максимум в окрестности ЛПЭ \approx 500кэВ/мкм [111]. Разрушенное а.о. может быть, как односайтовым повреждением, так и входить в состав кластера повреждений [13,109]. При воздействии γ -излучения ^{60}Co с ЛПЭ=0.3 кэВ/мкм [52] появление кластеров повреждений маловероятно [111], и в данных условиях наблюдаемые повреждения являются, преимущественно односайтовыми. Анализируя зависимости G от дозы облучения (Рис 5.4.6) можно предположить, что основным фактором, определяющим вид этой зависимости, является размер мишени (клубка ДНК) в растворе. Действительно, в области умеренных ионных сил (0.003–0.15M NaCl) объем клубка ДНК в растворе линейно зависит от $\frac{1}{\sqrt{\mu}}$, и при увеличении μ с 0.003M до 0.15M объем макромолекулы снижается примерно в 2 раза [159]. Однако, замена части ионов Na^+ на ионы Mg^{2+} , (при сохранении суммарной ионной силы 0.005M) приводит к дополнительной экранировке фосфатных групп ДНК и, вследствие этого, к дополнительному снижению объема клубка ДНК. Согласно данным [159,165] $\frac{[\eta]}{[\eta]_0} \approx 0.75$, где $[\eta]_0$ – характеристическая вязкость ДНК (пропорциональная удельному объему макромолекулы) при $\mu=5\text{мМ NaCl}$, $[\eta]$ – характеристическая вязкость ДНК при $\mu=5\text{мМ}=3\text{мМ Na}^++2\text{мМ Mg}^{2+}$. Тем не менее, опыт показывает, что выход разрушенных а.о. в этих системах одинаковый в пределах погрешности. Следует также отметить, что объем клубка ДНК в растворах $\mu=0.15\text{M NaCl}$, $\mu=1\text{M NaCl}$ и $\mu=3.2\text{ M NaCl}$ практически одинаков [159], но радиочувствительность ДНК заметно отличается (Рис 5.4). Итак, можно заключить, что объем мишени в растворе является не единственным фактором, определяющим радиационный выход а.о., хотя, безусловно важным: ведь наиболее сильная зависимость G от дозы облучения наблюдается как раз для тех растворов, в которых ДНК имеет наибольший объем (Рис 5.4.6). Для объяснения этой зависимости можно выдвинуть следующее предположение. Так как все образцы облучались при одной мощности дозы, то поглощенная доза была пропорциональна времени облучения. При длительном облучении в растворе происходит накопление ионов и радикалов, что повышает вероятность их рекомбинации [13]. Поэтому с точки зрения выхода повреждений оснований ДНК большие дозы оказываются менее эффективными.

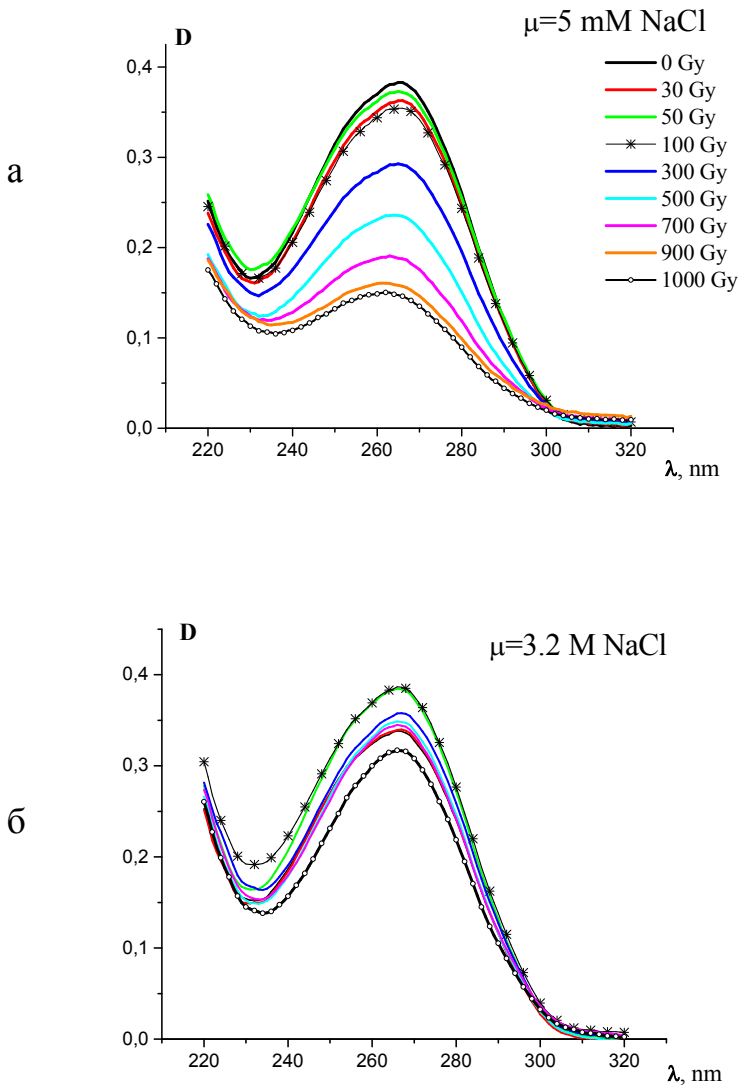
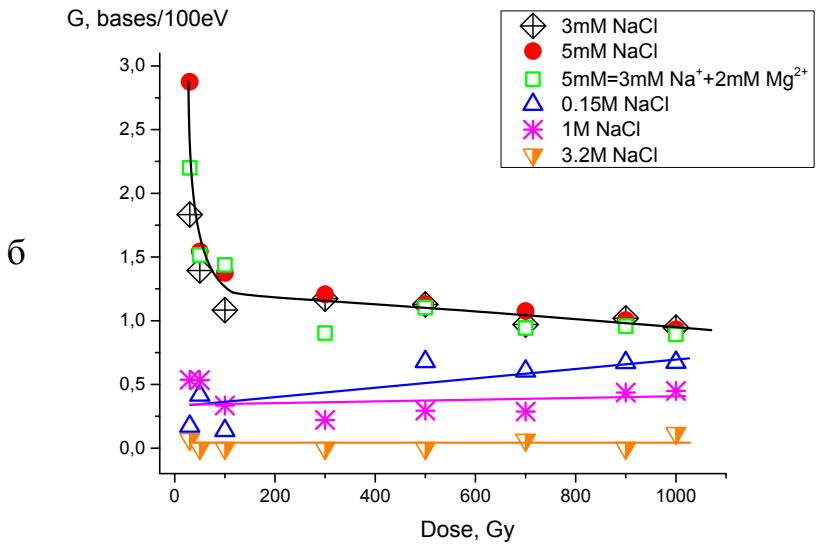
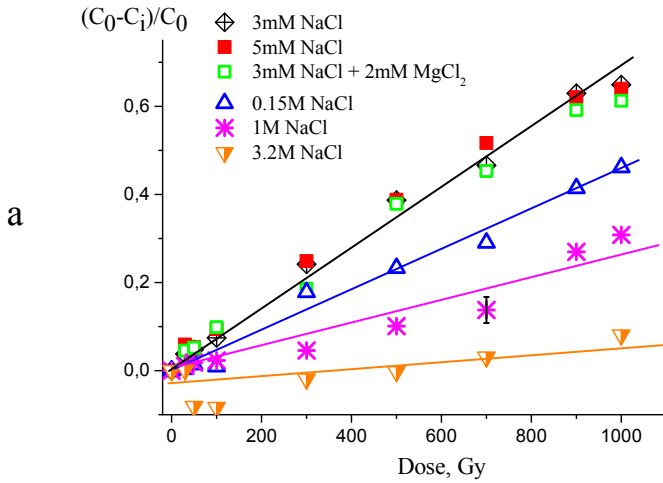


Рис 5.3 Спектры поглощения облученных растворов ДНК после гидролиза.



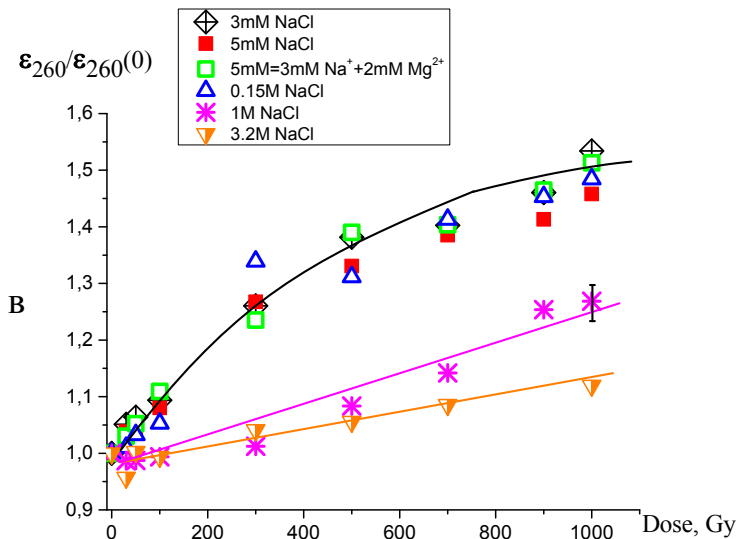


Рис 5.4 Зависимости относительного снижения количества азотистых оснований (а), радиационно-химического выхода а.о. (б) и относительного изменения молярного коэффициента экстинкции ДНК (в) от дозы γ -облучения в растворах разной ионной силы.

Можно видеть, однако, что при $\mu \geq 0.15\text{M NaCl}$ характер зависимости G от дозы иной, а при $\mu = 3.2\text{ M NaCl}$ $G \approx 0$. Очевидно, что для более обоснованных объяснений наблюдаемых эффектов необходимо провести дополнительные исследования, в частности, получить информацию о выходе других типов повреждений в данных условиях эксперимента.

Рост молярного коэффициента экстинкции ДНК в облученных растворах (ϵ_{260}) по-сравнению со значением для нативной ДНК ($\epsilon_{260}(0)$) показывает, что в облученной ДНК уменьшается степень спиральности (Рис 5.4.в)). Величина этого типа радиационного повреждения еще менее коррелирует с размером мишени: наиболее значительные и одинаковые по величине нарушения во вторичной структуре ДНК наблюдаются в растворах ионной силы $0.003\text{--}0.15\text{ M}$ (в которых объем клубка ДНК различается в 2 раза). Дальнейшее увеличение ионной силы не приводит к заметным изменениям размеров клубка ДНК в растворе, но дает существенное снижение радиационных повреждений вторичной структуры.

Обратимся к результатам, полученным методом КД. Как уже упоминалось, вклады от разрушения а.о. и частичной денатурации в интенсивность спектра КД ДНК не конкурируют, а складываются: каждый из них приводит к снижению интенсивности положительной и отрицательной полосы. Были получены спектры КД ДНК во всех исследуемых системах. На [Рис 5.5](#) приведены для примера спектры КД ДНК, γ -облученной дозами 0–1000 Гр в растворах ионной силы 0.005 М и 3.2 М NaCl. Вид спектров КД нативной ДНК характерен для В-формы вторичной структуры макромолекулы [\[142\]](#). Видно, как в растворе 0.005 М NaCl происходит постепенная деградация спектра КД с ростом дозы облучения, тогда как при $\mu=3.2$ М NaCl облучение практически не влияет на спектр КД ДНК. На [Рис 5.6](#) показаны дозовые зависимости интенсивностей положительной и отрицательной полос в спектре КД ДНК в исследованных растворах. Видно, что здесь фактором, определяющим вид дозовой зависимости, также является суммарная ионная сила облучаемого раствора.

Можно предположить, что влияние ионной силы раствора на наблюдаемые радиационные эффекты вызвано изменением степени гидратации ДНК. Исследования выхода одно- и двунитевых разрывов [\[119,166,167\]](#) и отщепленных а.о. [\[168\]](#) в образцах ДНК разной степени гидратации показало, что радиочувствительность ДНК снижается при уменьшении ее степени гидратации. Авторы [\[119,168\]](#) отмечают, что структура гидратной оболочки ДНК влияет на радиационный эффект по крайней мере по двум причинам: из-за изменения вторичной структуры ДНК и вследствие изменения количества молекул воды, связанных с ДНК и являющихся частью мишени. Изменение размера мишени меняет соотношение между прямым и косвенным действием излучения [\[13\]](#). Кроме того, есть различие в составе продуктов радиолитической реакции молекул связанной воды и объемной воды [\[169,170\]](#). Наконец, чем больше концентрация противоионов, тем меньше заряд ДНК, следовательно, тем меньше ее взаимодействие с заряженными и полярными продуктами радиолитической реакции воды. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с этими данными.

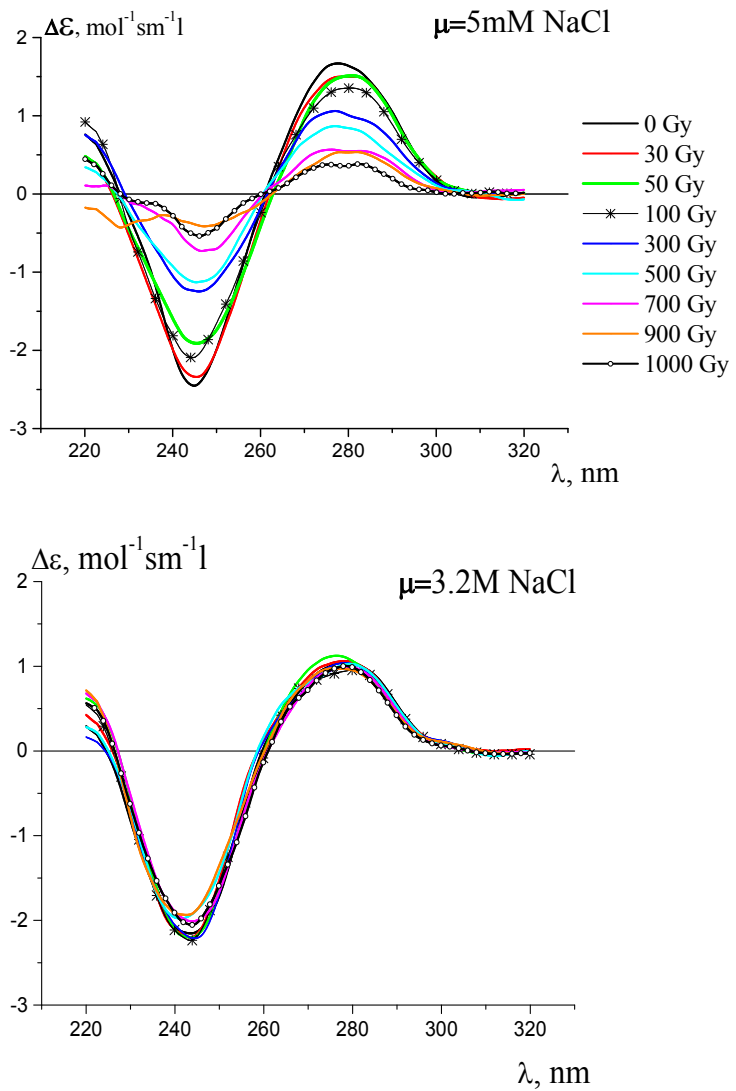


Рис 5.5 Спектры КД ДНК, подвергнутой γ -облучению в растворах ионной силы 0.005 М и 3.2 М NaCl. Ионные силы и дозы облучения указаны на графиках.

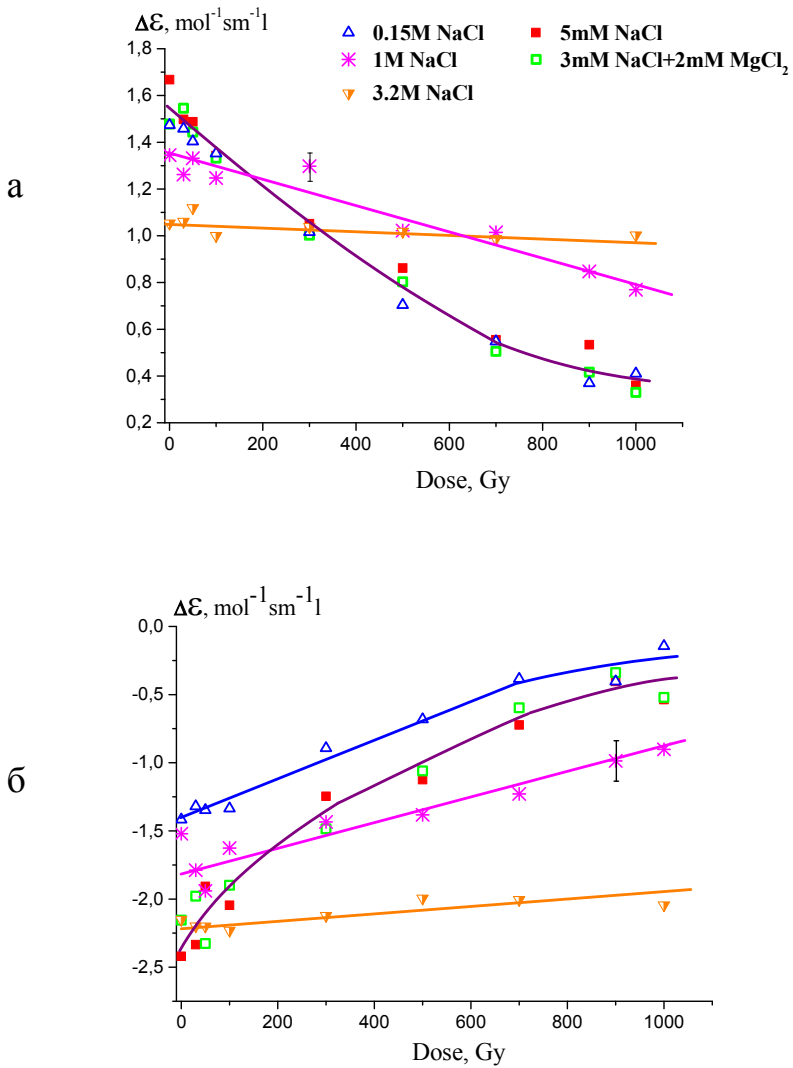
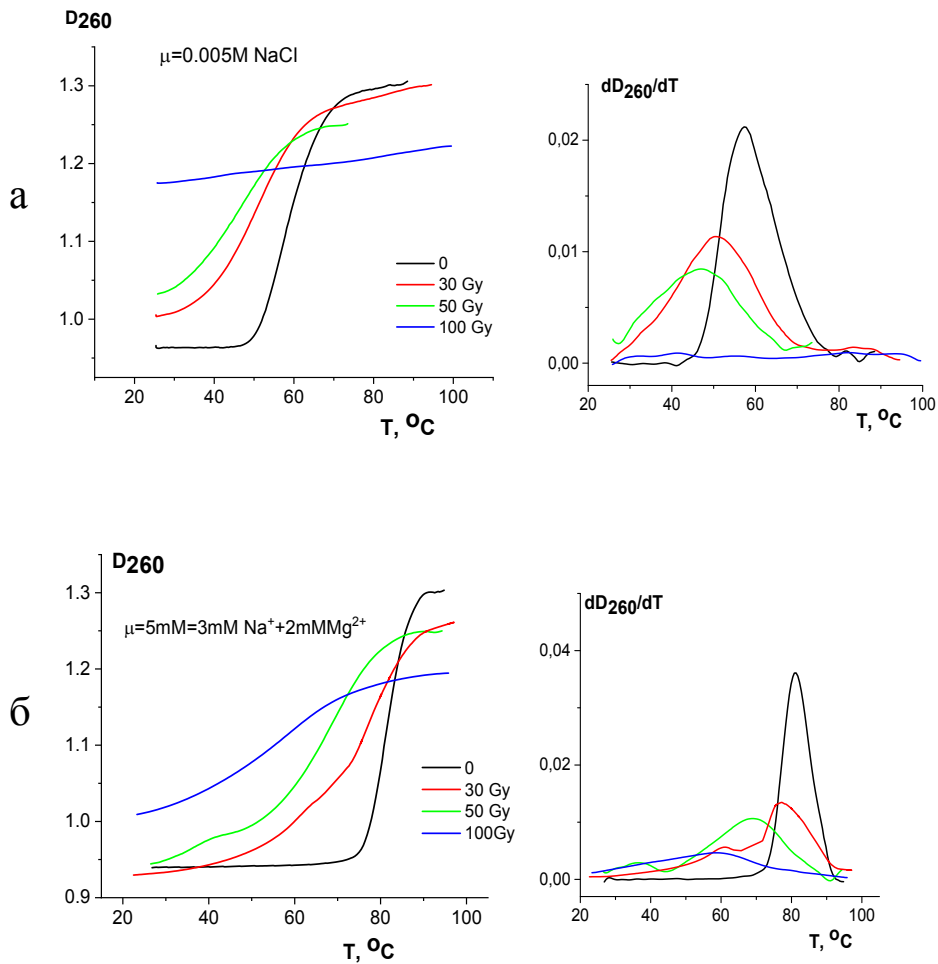


Рис 5.6 Дозовые зависимости интенсивностей положительной и отрицательной полос в спектрах КД ДНК при разных ионных силах облучаемого раствора.

В частности, известно, что при больших ионных силах ($\mu > 2.4 \text{ M NaCl}$) происходит изменение ориентации сильно связанных молекул воды в первичной гидратной оболочке ДНК [A20]. При этом следует отметить, что во всей исследованной области ионных сил исходная нативная ДНК находилась в В-форме, как это следует из вида спектров КД (Рис 5.5). Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое снижение радиационного эффекта с ростом μ вызвано 1) уменьшением размера мишени, 2) изменением структуры и состава гидратной оболочки ДНК.

Нарушения во вторичной структуре ДНК можно изучать с помощью метода плавления ДНК [123,124]. На Рис 5.7 показаны кривые плавления ДНК ($D_{260}=f(T)$) и соответствующие дифференциальные кривые плавления ДНК ($\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$), подвергнутой действию γ -излучения в дозах 30, 50 и 100 Гр в растворах с $\mu=5\text{mM NaCl}$ и $\mu=0.15 \text{ M NaCl}$ [155–157]. На Рис 5.8 приведены примеры спектров УФ поглощения ДНК в контрольных необлученных растворах, и облученных в дозе 50 Гр при $\mu=5\text{mM NaCl}$. Спектры были зафиксированы при разных температурах в процессе плавления ДНК и после быстрого (в течение 10 мин.) охлаждения раствора. На тех же графиках показаны спектры поглощения ДНК после гидролиза. При нагревании раствора ДНК от 25°C до 95°C возникает хорошо известный гиперхромный эффект вследствие денатурации двойной спирали. При последующем охлаждении раствора ДНК наблюдается неполное восстановление поглощения, которое объясняется частичной ренатурацией комплиментарных участков ДНК, принадлежащих как разным одноцепочечным молекулам, так и одной нити (в последнем случае образуются «шпильки») [124,142,171]. Для высокомолекулярной ДНК полная ренатурация не происходит даже при очень медленном отжиге из-за трудности взаимного проникновения двух одноцепочечных клубков и сближения комплиментарных последовательностей [142]. В результате частичной ренатурации ДНК в растворе образуются двуспиральные участки, перемежающиеся одноцепочечными, причем они могут принадлежать нескольким разным нитям. При гидролизе происходит не только полное разделение цепей ДНК, но и частичная фрагментация [121], поэтому спектры поглощения

гидролизованной ДНК демонстрируют более сильный гиперхромный эффект, чем спектры ДНК при 95°C (Рис 5.8). Кроме того, в спектрах гидролизованной ДНК наблюдается батохромный сдвиг вследствие протонирования азотистых оснований в кислой среде [148].



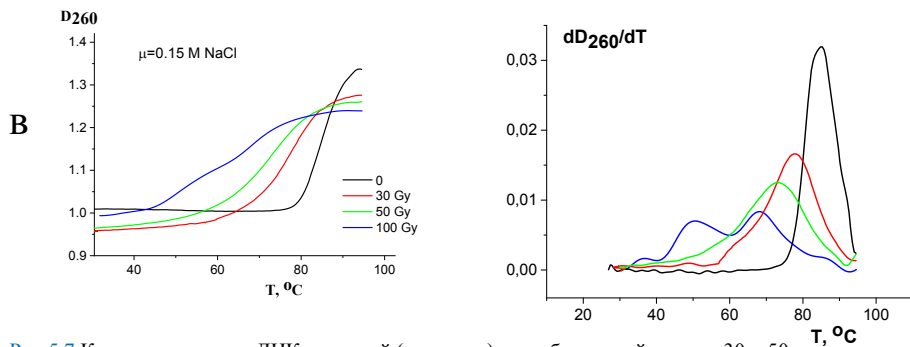


Рис 5.7 Кривые плавления ДНК нативной (контроль) и γ -облученной в дозах 30 и 50 Гр в растворах с $\mu = 5 \text{ mM NaCl}$ (а), $\mu = 5 \text{ mM} = 3 \text{ mM Na}^+ + 2 \text{ mM Mg}^{2+}$. (б) и $\mu = 0.15 \text{ M NaCl}$ (в).

Увеличение степени экранировки фосфатных групп в области умеренных ионных сил стабилизирует вторичную структуру ДНК. Это проявляется в увеличении температуры плавления T_m нативной ДНК и сужении температурного интервала перехода спираль-клубок при увеличении ионной силы раствора или замене части ионов Na^+ ионами Mg^{2+} при сохранении постоянной суммарной ионной силы (Рис 5.7). Облучение вызывает снижение температуры плавления ДНК и уширение перехода для всех исследованных μ . В растворе 0.005 M NaCl при дозе облучения 100 Гр определить значение температуры плавления ДНК не представляется возможным, очевидно, вследствие весьма значительного нарушения структуры ДНК при данных условиях облучения (Рис 5.7.а).

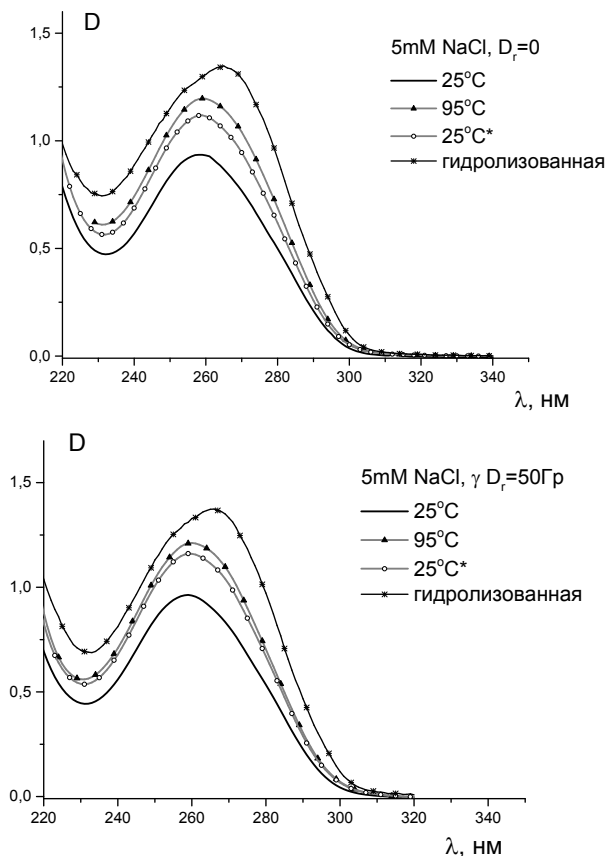


Рис 5.8 Спектры УФ поглощения ДНК в растворах ионной силы $\mu=5\text{mM NaCl}$ необлученной и γ -облученной в дозе 50 Гр. Температуры, при которых измерялись спектры, указаны на графиках; 25°C* – спектры, измеренные после плавления и быстрого охлаждения раствора ДНК. Спектры приведены к одинаковой концентрации ДНК.

На параметры перехода спираль-клубок в облученной макромолекуле влияют различные виды радиационных повреждений. Одно- и двунитевые разрывы, разрушение, модификация и отрыв азотистых оснований приводят к дестабилизации вторичной структуры и понижают температуру плавления ДНК [13,124,142], тогда как межнитевые сшивки повышают T_m [171]. Уширение интервала перехода

говорит о повышении гетерогенности структуры ДНК, т.е. о появлении в цепи ДНК участков, сильно различающихся по термостабильности. Обратим внимание, что в растворах, содержащих ионы Mg^{2+} , после γ -облучения в дозах 30 и 50 Гр на дифференциальных кривых плавления появляются дополнительные максимумы при температурах ниже температуры главного максимума (Рис 5.7.6). При дозе облучения 100 Гр максимум на кривой $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ только один, но он настолько размыт, что делать какие-либо заключения о его составляющих не представляется возможным. Плавление ДНК в присутствии двухвалентных катионов имеет некоторые особенности [172]: на начальной стадии перехода спираль-клубок, на первых появившихся небольших участках с нарушенной вторичной структурой для ионов щелочноземельных металлов открываются дополнительные места связывания с азотистыми основаниями (атомы кислорода кетогрупп и эндоциклические атомы азота) [63,172]. В облученной ДНК участки с нарушенной вторичной структурой существуют и при комнатной температуре. Можно предположить, что связывание ионов Mg^{2+} с азотистыми основаниями на одноцепочечных участках приводит к дополнительной дестабилизации вторичной структуры, облученной ДНК, и, как следствие, переход спираль-клубок становится многостадийным. Также в присутствии двухвалентных катионов увеличивается вероятность возникновения в ДНК сшивок под действием облучения, и, следовательно, появляются более тугоплавкие участки в макромолекуле. Совместное влияние указанных факторов, вероятно, и дает в результате наблюдаемую форму кривых плавления в облученных растворах с $MgCl_2$.

Несколько максимумов на кривой $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ наблюдается и для ДНК, облученной в дозе 100 Гр при $\mu=0.15$ М NaCl (Рис 5.7.в). В этих условиях можно также предположить образование сшивок (как между двумя комплиментарными нитями, так и между удаленными по цепи участками ДНК) в процессе облучения. Как уже упоминалось, объём клубка ДНК при $\mu=0.15$ М NaCl примерно в 2 раза меньше, чем при $\mu=0.005$ М NaCl [159]. Размер мишени уменьшается, но плотность ДНК в клубке возрастает, что повышает вероятность образования и сшивок, и кластеров повреждений [49,73,173]. Кластеры повреждений (два и более одиночных

повреждения, находящиеся в пределах ~ 10 пар оснований) могут быть результатом как прямого, так и косвенного действия радиации; вероятность их появления возрастает с ростом дозы облучения [13,49,73,173]. Например, если появились два близко расположенных одонитевых разрыва в одной из комплиментарных нитей ДНК, то этот участок макромолекулы "расплавится" при более низкой температуре [142]. Таким образом, можно заключить, что наличие нескольких максимумов на дифференциальной кривой плавления свидетельствует о накоплении в ДНК значительного количества радиационных повреждений. Более четкие выводы требуют дополнительных исследований всех возможных типов радиационных повреждений ДНК в данных системах.

В Табл. 5.1 приведены значения температуры плавления ДНК (T_m) в исследованных системах, концентрация неразрушенных а.о. (С), молярный коэффициент экстинкции ϵ_{260} ДНК, гиперхромный эффект δ и степень ренатурации ДНК после плавления при быстром охлаждении (θ). Совокупность этих данных позволяет судить о количестве разрушенных а.о. и о нарушении вторичной структуры ДНК под действием облучения. Метод плавления ДНК позволяет получить интересную информацию о состоянии первичной и вторичной структуры ДНК, и он будет применен в данной работе при исследовании радиационных повреждений в ДНК, вызванных облучением протонами высоких энергий. Несмотря на то, что, в ряде случаев, интерпретация кривых плавления может быть неоднозначной, тем не менее величина температуры плавления может служить вполне надежным критерием радиочувствительности. Другим важным параметром, по которому можно судить о степени радиационного повреждения ДНК, является относительное снижение количества а.о. (хромофоров) в облученной ДНК по отношению к необлученной $\left(\frac{C_0 - C}{C_0}\right)$. Как уже было указано ранее, определенная по методу Спирина концентрация а.о. в облученных растворах позволила вычислить радиационно-химический выход G разрушенных а.о., и полученные значения хорошо согласуются с имеющимися литературными данными для γ -облученной ДНК. Этот подход будет применен в дальнейшем при исследовании действия протонного излучения на ДНК.

Табл 5.1 Температура плавления ДНК (T_m), концентрация неразрушенных а.о. (С), относительное снижение количества а.о. в облученных растворах ($\frac{\Delta C}{C_0}$), молярный коэффициент экстинкции ДНК ε_{260} , гиперхромный эффект δ и степень ренатурации ДНК после плавления при быстром охлаждении (θ_R).

Условия	$(T_m \pm 1),$ °C	$(\Delta T_m \pm 2),$ °C	$(C \pm 0.5) \cdot 10^{-3},$ г/л	$\frac{\Delta C}{C_0} \cdot 10^{-3}$	$(\varepsilon_{260} \pm 100),$ $M^{-1} \text{ см}^{-1}$	$(\delta \pm 0.5),$ %	$(\theta_R \pm 0.5),$ %
<u>5mM Na⁺</u> D=0	57		46.1		6300	28.2	31.1
D=30 Gy	51	6	45.8	6.5±0.2	6900	30.0	22.4
D=50 Gy	47	10	42.5	78±2	7100	26.2	20.7
D=100 Gy	–	–	40.9	113±3	7700	14.5	19.0
<u>3mM Na⁺ +</u> <u>2mM Mg²⁺</u> D=0	81		45.0		6200	40.9	66.9
D=30 Gy	77**	4	44.0	22.2±0.5	6200	37.9	60.0
D=50 Gy	69**	12	41.8	71±2	6600	33.4	53.6
D=100 Gy	59	22	38.1*	101±3	7600	18.7	43.0
<u>0.15M Na⁺</u> D=0	84		45.5		6400	36.7	67.8
D=30 Gy	78	6	44.3	26.4±0.5	6300	35.6	56.6
D=50 Gy	73	11	43.6	42±1	6400	33.7	54.3
D=100 Gy	–	–	42.3	70±2	6800	26.4	47.1

* $C_0 = 42.4 \cdot 10^{-3} \text{ г/л}$

** За T_m принято положение главного максимума на дифференциальной кривой плавления.

5.2. Сравнение влияния высокоэнергетичных протонов и гамма-квантов на структуру ДНК

Метод Спирина, показавший результаты, хорошо согласующиеся с известными данными для выхода разрушенных а.о. при γ -облучении ДНК, был применен для исследования разрушения а.о. под действием протонного излучения [174–176]. Была определена концентрация а.о. в растворах ионной силы 5мМ NaCl и 0.15М NaCl, подвергнутых облучению протонами с энергией 1ГэВ. На Рис 5.9 показаны зависимости относительного изменения концентрации а.о. от дозы радиации в результате облучения растворов ДНК протонами (мощность дозы составляла 4 Гр/мин) и γ -квантами (мощность дозы 100 Гр/мин). Концентрация ДНК в исходных облучаемых растворах была постоянной и равной (0.045 ± 0.003) г/л. Видно, что и при малой, и при большой концентрации электролита протоны вызывают большее разрушение а.о. ДНК, чем такие же дозы γ -излучения. Интересно отметить, что линии, полученные при экстраполяции данных для $\frac{\Delta C}{C} = f(Dose)$ при больших дозах γ -облучения (из п.3.1 данной работы) идут ниже, чем зависимости, полученные при малых дозах γ -облучения. Как уже упоминалось, в литературе есть данные о том, что ОБЭ излучения зависит от дозы (Рис 3.14) [110]. Можно предположить, что меньшая эффективность более высоких доз объясняется тем, что при больших дозах происходит накопление активных радикалов в облучаемых растворах, и это увеличивает вероятность их рекомбинации друг с другом. Таким образом, при больших дозах на долю ДНК приходится меньшая доля радикалов (нормированная на общее количество радикалов, образовавшихся в растворе при данной дозе). Можно заключить, полученные данные согласуются с известной зависимостью ОБЭ от дозы облучения. На основании данных полученных на Рис 5.9 были рассчитаны значения радиационно-химического выхода G разрушенных а.о. (Рис 5.10). Интересно отметить, что вид этой зависимости для раствора 5мМ NaCl, облученного протонами, аналогичен зависимости, полученной для γ -облученных растворов малых ионных сил (Рис 5.4.б).

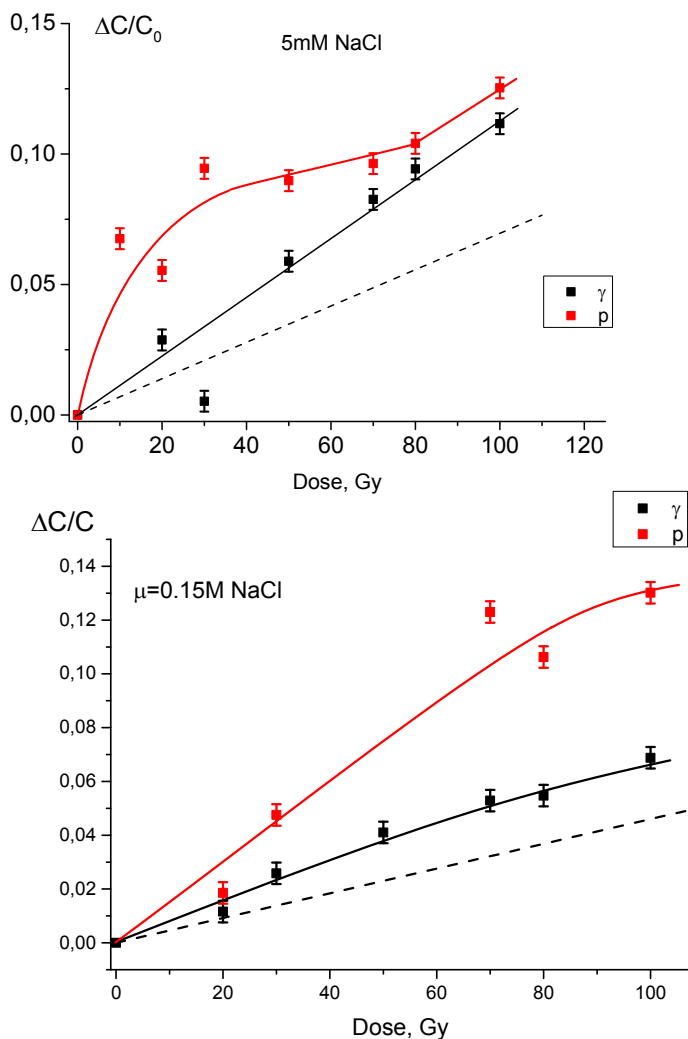
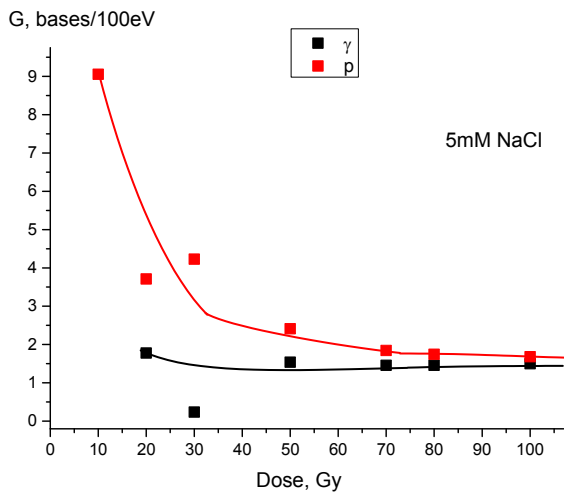


Рис 5.9 Дозовые зависимости относительного уменьшения концентрации а.о. ДНК при протонном (p) и γ -облучении (γ) в растворах 5mM и 0.15M NaCl. Пунктирные линии – результат экстраполяции данных, полученных в данной работе при больших дозах γ -облучения (п.3.1).

а



б

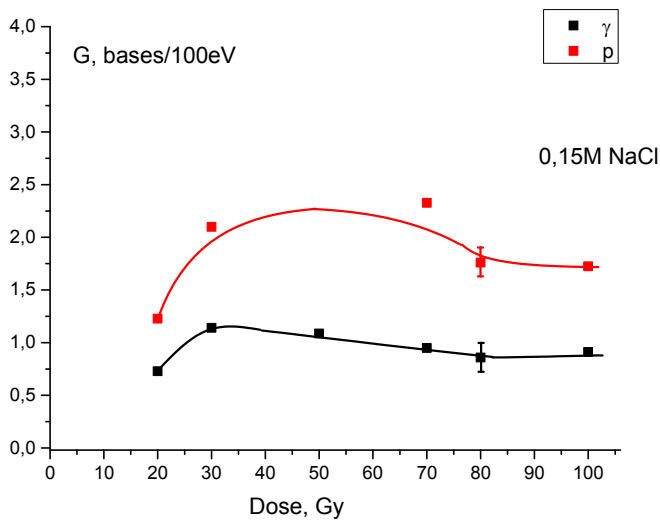


Рис 5.10 Дозовые зависимости радиационно-химического выхода разрушенных а.о. при протонном и γ -облучении.

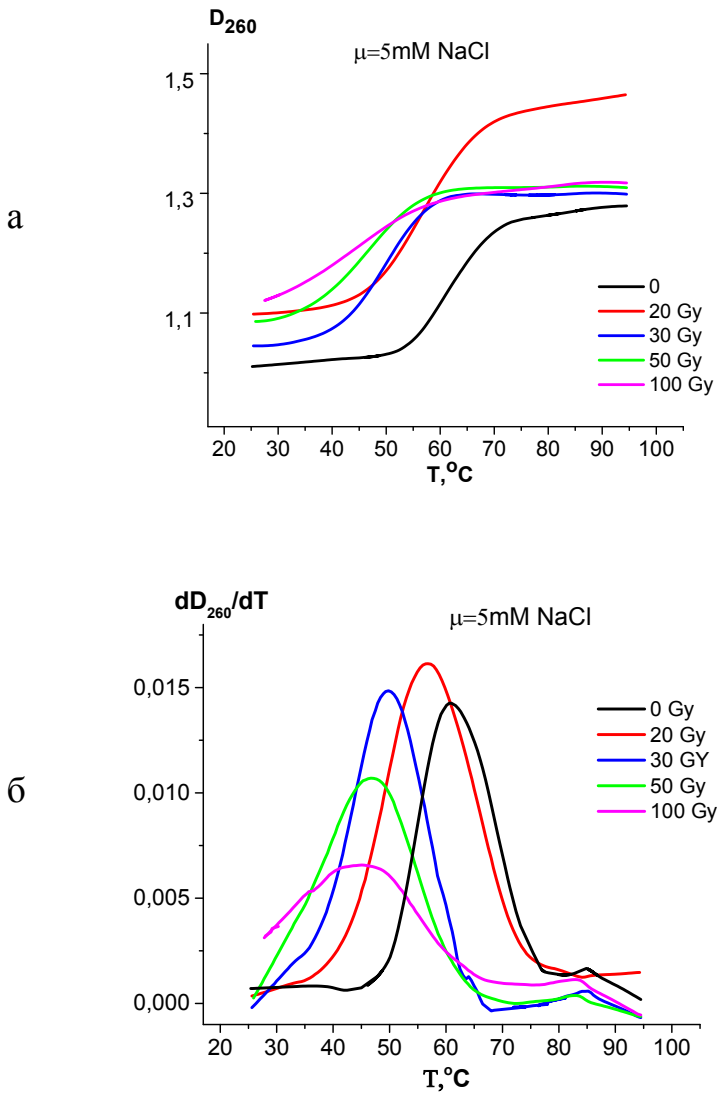
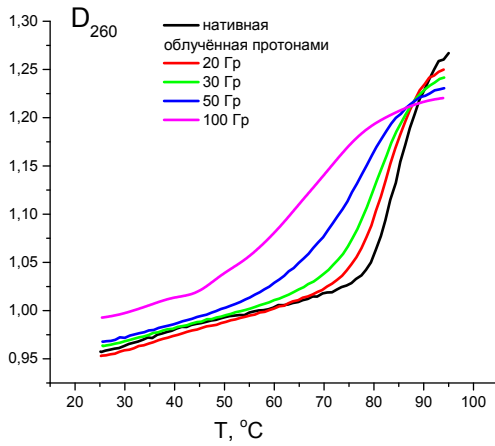


Рис 5.11. Кривые плавления ДНК, облученной протонами 1ГэВ в растворе 5мМ NaCl. Дозы облучения указаны на графиках.

а



б

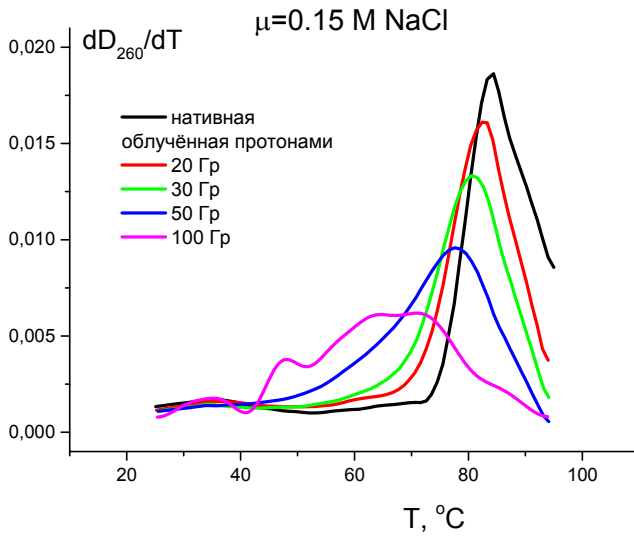


Рис 5.12. Кривые плавления ДНК, облученной протонами 1ГэВ в растворе 0.15 М NaCl. Дозы облучения указаны на графиках.

Результаты измерения температуры плавления ДНК в растворах, облученных высокоэнергетичными протонами, показаны на Рис 5.11, Рис 5.12. Интересно отметить, что при $\mu=5\text{мМ NaCl}$ удалось получить значение температуры плавления ДНК, облученной протонами дозой 100 Гр (в отличие от ДНК в 5мМ NaCl, γ -облученной той же дозой (см. Рис 5.7.а). Так же, как и при γ -облучении в дозе 100 Гр в растворе 0.15 М NaCl (Рис 5.7.в), наблюдается несколько максимумов на кривой $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ для ДНК, облученной протонами в дозе 100 Гр при той же ионной силе (Рис 5.12.б). В этих условиях можно также предположить образование сшивок (как между двумя комплиментарными нитями, так и между удаленными по цепи участками ДНК) в процессе облучения.

С ростом дозы протонного облучения заметно снижение температуры плавления ДНК и уширение интервала перехода спираль-клубок. Кривые плавления (Рис 5.11, Рис 5.12.а) также позволяют заметить снижение гиперхромного эффекта в облученной ДНК. На Рис 5.13 даны дозовые зависимости гиперхромного эффекта δ в изучаемых системах. В растворе 0.15М NaCl (Рис 5.13.б) гиперхромный эффект монотонно снижается с ростом дозы облучения, причем данные, полученные при протонном и γ -облучении ложатся на одну зависимость. Однако, в растворе 5мМ NaCl после протонного облучения в дозах 10 и 20 Гр гиперхромизм заметно возрос, и достиг значений, даже превышающих δ нативной ДНК. Снижение гиперхромизма объясняется нарушениями во вторичной структуре ДНК при облучении (рост величины $D_{260}^{25^\circ\text{C}}$) и, одновременно, снижением количества хромофоров (уменьшение величины $D_{260}^{98^\circ\text{C}}$); эта тенденция особенно хорошо заметна на кривых плавления на Рис 5.12.а. Радиационные нарушения во вторичной структуре ДНК (частичную денатурацию) можно фиксировать по величине молярного коэффициента экстинкции ДНК ϵ_{260} , сосчитанного с учетом концентрации а.о. в облученном растворе, определенной по методу Спирина (Рис 5.14). Из этих графиков видно, что ϵ_{260} монотонно возрастает с ростом дозы облучения, причем примерно одинаково в случае протонного и γ -облучения. Итак, разрушения хромофоров при протонном облучении больше, чем при γ -облучении, а радиационная денатурация примерно одинакова.

Чем же можно объяснить рост гиперхромного эффекта при дозах 10 и 20 Гр протонного облучения в растворе 5мМ NaCl (Рис 5.13.а)? Можно предположить, что в этих системах при нагревании до 98°C происходит более полное нарушение стэкинг-взаимодействий между а.о. ДНК, чем при тех же условиях в нативной макромолекуле. Это может осуществляться, если при нагревании происходит не только расхождение комплементарных нитей, но и фрагментация одиночных нитей. Подобная фрагментация при нагревании может происходить, если в ДНК было некоторое количество одонитевых разрывов. Это предположение согласуется с литературными данными о том, что протонное излучение с ЛПЭ≈0.3кэВ/мкм производит как минимум в 2 раза больше ОР и примерно в 6 раз больше ДР в цепи ДНК, чем γ -излучение [111,115–119]. При дозах протонного облучения больше 40Гр гиперхромизм ДНК уже не превышает значения δ нативной ДНК, вероятно, из-за того, что рост δ из-за фрагментации ДНК компенсируется падением δ вследствие нарастания других радиационных эффектов: снижения количества хромофоров и частичной денатурации ДНК. Интересно отметить, что такое аномальное поведение δ наблюдается только в растворе малой ионной силы. В 0.15М NaCl дозовые зависимости δ монотонны и одинаковы для протонного и γ -излучения. Имеющихся данных недостаточно для обоснованного и однозначного заключения о причинах наблюдаемого эффекта, можно лишь высказать предположения. Возможно, наблюдаемое отличие в поведении $\delta=f(\text{Dose})$ в растворах 5мМ и 0.15М NaCl связаны с разным объемом макромолекул-мишеней в этих системах. Отметим также, что при дозах протонного и γ -облучения менее 100 Гр в растворах 0.15М NaCl вторичная структура ДНК более устойчива к действию радиации, чем в растворах 5мМ NaCl (менее резкий рост ε_{260} и менее значительное падение δ с ростом дозы как протонного, так и γ -облучения (Рис 5.13, Рис 5.14), тогда как разрушение оснований находится на одинаковом уровне для растворов 5мМ и 0.15М NaCl. Однако, при дозах γ -облучения свыше 100Гр было обнаружено, что дозовые зависимости ε_{260} одинаковы для $\mu=5\text{мМ}$ $\mu=0.15\text{М NaCl}$ (см. Рис 5.4).

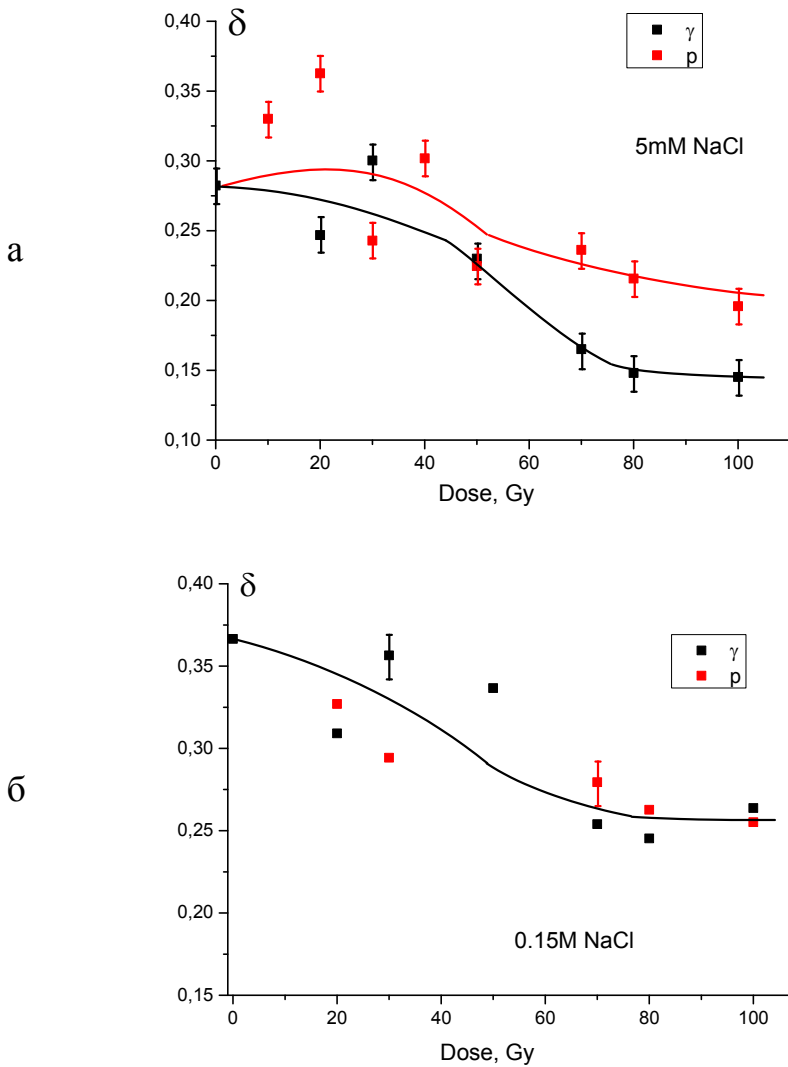


Рис 5.13 Дозовые зависимости гиперхромного эффекта ДНК, облученной протонами 1ГэВ и γ -квантами.

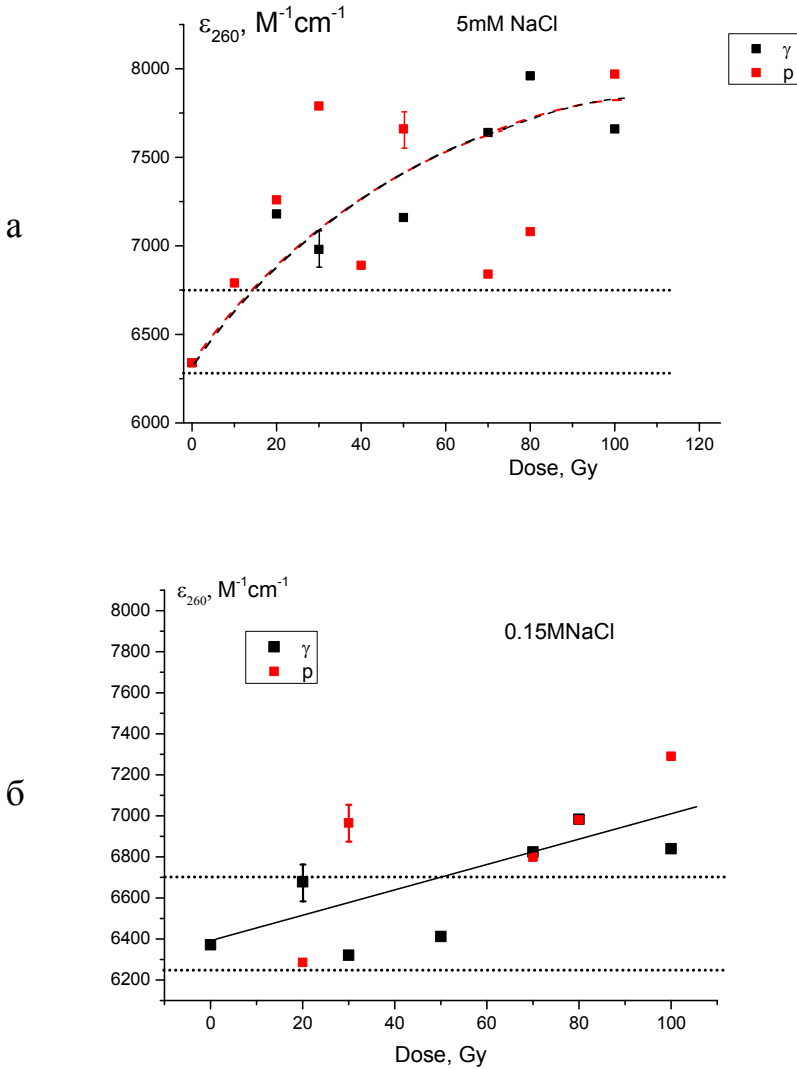


Рис 5.14 Дозовые зависимости молярного коэффициента экстинкции ДНК ε_{260} , облученной протонами 1ГэВ и γ -квантами в растворе 5мМ NaCl (а) и 0.15М NaCl (б). Пунктиром показана область значений ε_{260} , допустимых для нативной ДНК.

По-видимому, эта разница в действии больших и малых доз радиации, также, как и в других биологических эффектах (Рис 5.9, [110]) может объясняться различием в пространственном распределении активных радикалов в облучаемых растворах.

На Рис 5.15 показаны дозовые зависимости снижения температуры плавления ДНК, облученной протонным и γ -излучением: $\Delta T = T_{m0} - T_m$ (где T_{m0} – температура плавления нативной ДНК, T_m – температура плавления облученной ДНК). Опыт показывает, что протонное облучение вызывает меньшее падение T_m ДНК, чем γ -облучение в растворе 0.15M NaCl при дозах 0–100Гр и в растворе 5мМ NaCl при дозах 70–100Гр. Принимая во внимание, что нарушения вторичной структуры ДНК в растворах, облученных протонами и γ -квантами, одинаковы (Рис 5.14), а выход разрушенных хромофоров при протонном облучении больше (Рис 5.9, Рис 5.10), приходится допустить, что на величину T_m оказывают влияние факторы, которые в явном виде не обнаружены в эксперименте, и о них можно лишь высказывать некоторые предположения. В частности, на температуру плавления влияет распределение дефектов первичной и вторичной структуры ДНК. Его, в свою очередь, определяет структура трека и распределение ионизаций и возбужденных молекул на пути ионизирующей частицы, и эти параметры, очевидно, различаются для γ -излучения и высокоэнергетичных протонов.

Чтобы исследовать вклад прямого и косвенного действия радиации в структурные повреждения ДНК, были проведены исследования зависимости радиационных эффектов от концентрации ДНК в облучаемом растворе (C_0) ионной силы 5мМ NaCl. На Рис 5.16 показаны полученные зависимости выхода G разрушенных а.о. при облучении растворов ДНК протонами и γ -квантами в дозе 50Гр. На кривой, полученной для γ -облученных систем, наблюдается плато в области $18 \cdot 10^{-4} \text{ г/дл} < C_0 < 70 \cdot 10^{-4} \text{ г/дл}$, которое свидетельствует о том, что при этих условиях наблюдаемые повреждения обусловлены косвенным действием радиации. Подобные плато на зависимости $G(C_0)$ при облучении растворов биологических макромолекул рентгеновским и γ -излучением хорошо известны в литературе и носят название "эффект Дейла" или "эффект разбавления" [177].

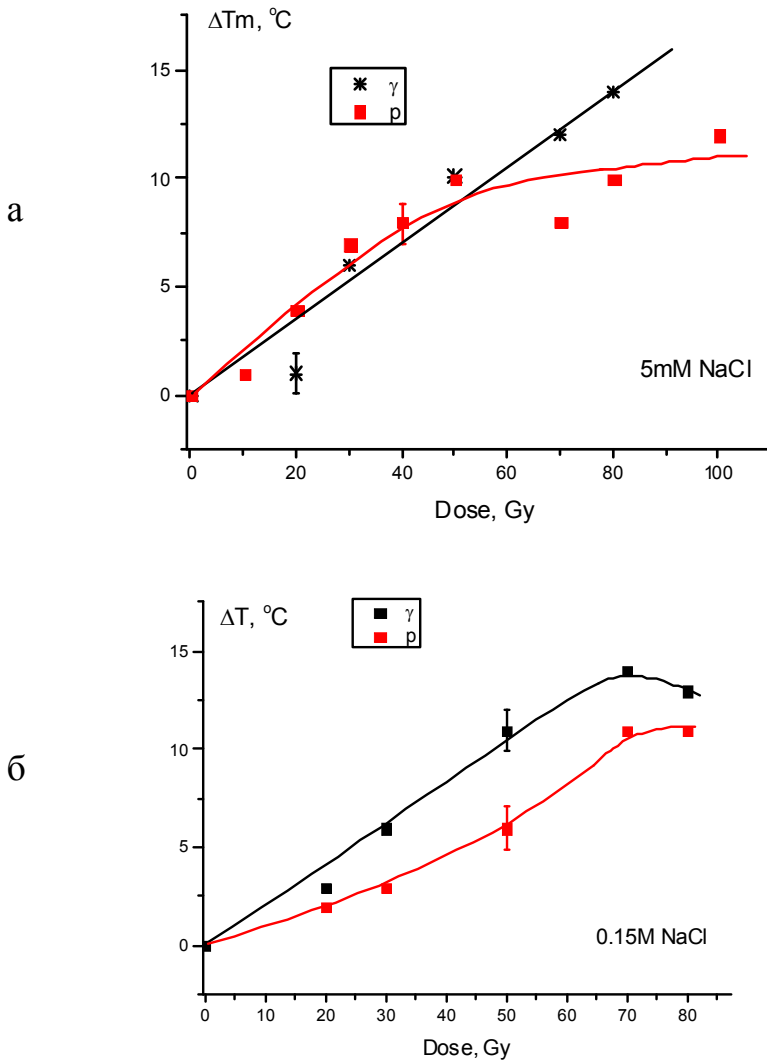
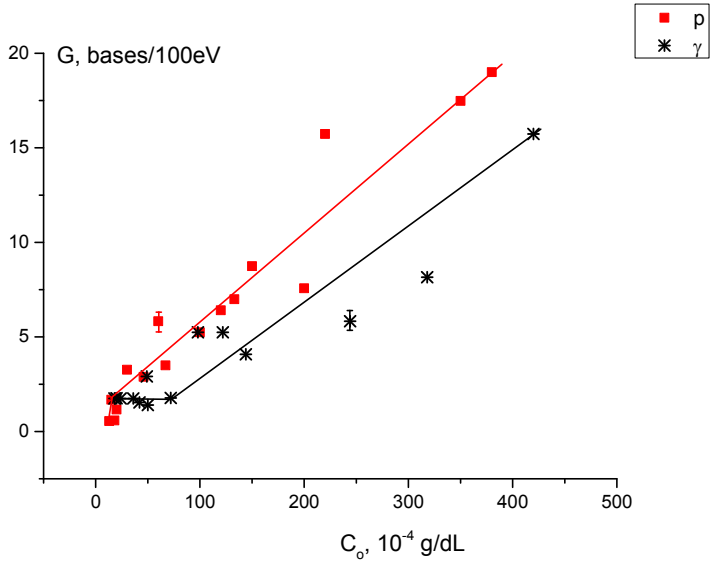


Рис 5.15 Дозовые зависимости снижения температуры плавления ΔT ДНК, подвергнутой облучению протонами и γ -квантами.

а



б

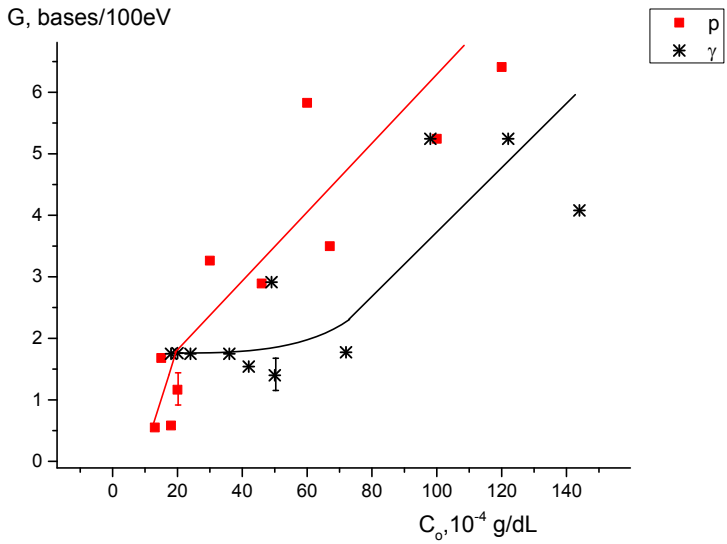


Рис 5.16 Зависимости радиационно-химического выхода разрушенных а.о. от концентрации ДНК в облучаемом растворе при протонном и γ -облучении в дозе 50 Гр, $\mu=5\text{мМ}$ NaCl, на рис.(б) показан начальный ход зависимости.

Если повреждение молекул в растворе является результатом косвенного действия радиации (вследствие взаимодействия с активными продуктами радиолиза воды), то при фиксированной дозе облучения в некотором диапазоне концентраций выход повреждений не зависит от количества молекул-мишеней. Лишь при очень низких концентрациях, когда число мишеней меньше числа продуктов радиолиза, приращение концентрации приведет к увеличению абсолютного числа пораженных молекул [177]. Но когда количество мишеней становится равно количеству активных радикалов (которое лимитировано дозой радиации и, в случае рентгеновского и фотонного излучения, распределено в растворе практически равномерно [85]), дальнейший рост концентрации мишеней не приведет к увеличению выхода повреждений. В диапазоне концентраций, соответствующему плато на зависимости $G(C_0)$ количество повреждений остается неизменным и определяется количеством возникших в растворе свободных радикалов. При концентрациях ДНК в облучаемом растворе $C_0 > 70 \cdot 10^{-4}$ г/дл G растет с ростом C_0 . Это говорит о том, что дополнительный вклад в повреждение ДНК начинает вносить прямое действие радиации. Качественно иной ход зависимости наблюдается для радиационно-химического выхода разрушенных а.о. от C_0 при облучении протонами. Здесь отсутствует плато, и G растет монотонно с ростом концентрации мишеней в облучаемом растворе. Это свидетельствует о преимущественном вкладе прямого действия радиации в повреждение ДНК протонами.

Полученные зависимости температуры плавления ДНК от концентрации ДНК в облучаемом растворе (Рис 5.17) также демонстрируют различное поведение для систем, подвергнутых протонному и γ -облучению. При уменьшении C_0 температура плавления ДНК, облученной протонами, растет, и даже достигает значений, характерных для нативной макромолекулы. Напротив, в γ -облученных растворах при уменьшении C_0 T_m заметно снижается. При $C_0 > 0.01$ г/дл обе зависимости выходят на насыщение $T_m \approx 57^\circ\text{C} = \text{const}$ ($\Delta T = 6^\circ\text{C}$). Необходимо подчеркнуть, что радиационно-химический выход G показывает абсолютное число повреждений в образце на 100 эВ поглощенной энергии, тогда как T_m ДНК дает значение, усредненное по всем макромолекулам в растворе.

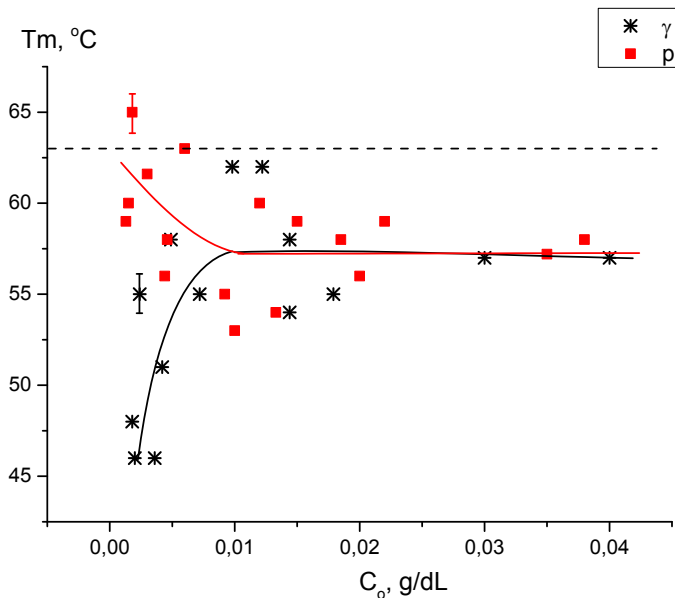


Рис 5.17 Зависимость температуры плавления ДНК, облученной протонным и γ -излучением, от концентрации ДНК в облучаемом растворе. Доза облучения 50Гр, ионная сила раствора 5mM NaCl.

Результат этого усреднения, естественно, зависит от общего числа молекул в ансамбле и определяется долей поврежденных участков ДНК. Таким образом, мы видим, что при малой концентрации ДНК в облучаемом растворе доля поврежденных сайтов в случае протонного облучения очень мала, а в случае γ -облучения, наоборот, довольно велика. Выход поврежденных оснований при малых C_0 при протонном облучении также ниже, чем при γ -облучении (Рис 5.16). Это подтверждает сделанный ранее вывод о том, что γ -облучение повреждает ДНК преимущественно по косвенному механизму, причем поражающие ДНК активные ионы и радикалы равномерно распределены в растворе [85]. В случае же прохождения протонного пучка акты ионизации и возбуждения в растворе и образование активных радикалов происходит в узкой области вдоль трека протона (см. Рис 3.3). Таким образом, при малой C_0 вероятность поражения при γ -облучении оказывается выше, чем при облучении протонами.

Для всех исследованных систем были определены молярный коэффициент экстинкции ϵ_{260} и степень ренатурации θ ДНК (Рис 5.18). Определение этих параметров также предполагает усреднение по всем макромолекулам, имеющимся в растворе. Степень денатурации ДНК (Рис 5.18.а) в γ -облученных растворах имеет наибольшее значение при малых C_0 , монотонно снижаясь с ростом общего числа макромолекул в растворе. В растворах, облученных протонами, при малых C_0 радиационная денатурация незначительна (Рис 5.18.а) (что коррелирует с малым выходом поврежденных оснований и высокими значениями T_m (Рис 5.16, Рис 5.17)), однако растет с ростом C_0 . Максимум на кривой $\epsilon_{260} = f(C_0)$ отражает борьбу факторов, вносящих противоположный вклад в определяемую величину ϵ_{260} . С одной стороны, с ростом C_0 увеличивается вероятность прямого поражения ДНК протонным излучением и дестабилизация вторичной структуры ДНК; мы видим одновременно увеличение выхода разрушенных а.о. и снижение T_m ДНК (Рис 5.16, Рис 5.17). Этим обусловлен рост ϵ_{260} . С другой стороны, возрастает общее число макромолекул в растворе, и при усреднении в величину ϵ_{260} вносят все более заметный вклад участки с ненарушенной вторичной структурой.

Способность ДНК к ренатурации при охлаждении до 25°C после нагревания до 98°C зависит от многих факторов. Как уже упоминалось, полная ренатурация высокомолекулярной ДНК невозможна даже при очень медленном отжиге из-за того, что каждая одиночная нить ДНК после расхождения оказывается свернутой в клубок, что делает крайне маловероятным обратную самосборку полностью комплиментарных двунитевых структур. Разрушение и модификация а.о. затрудняет процесс ренатурации. Однако другие виды радиационных повреждений – одно- и двунитевые разрывы, межнитевые сшивки – повышают вероятность обратной самосборки комплиментарных последовательностей при отжиге. На Рис 5.18.б мы видим результат суммирования вкладов перечисленных факторов: величина θ ДНК, облученной протонами и γ -квантами, в основном лежит ниже значения $\theta=0.31$, полученного для нативной ДНК, однако, в некоторых случаях превышает его. Тенденция к росту степени ренатурации наблюдается при увеличении C_0 , что, возможно, отражает увеличение вероятности образования сшивок в этих условиях как при протонном, так и при γ -облучении.

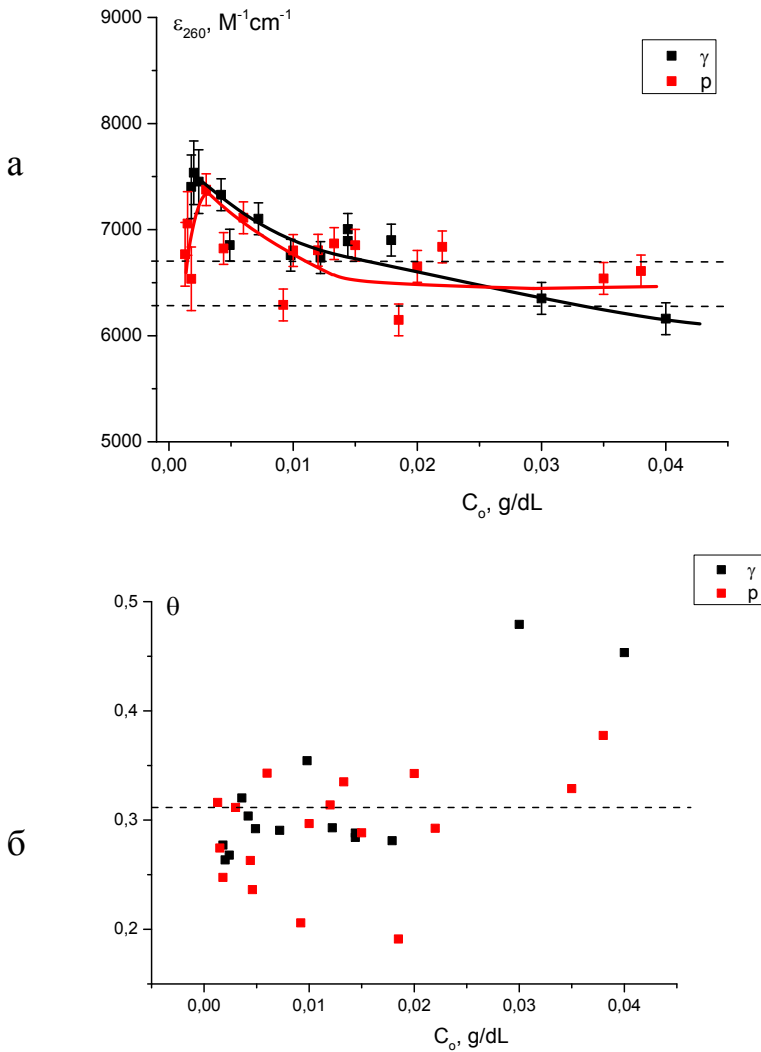


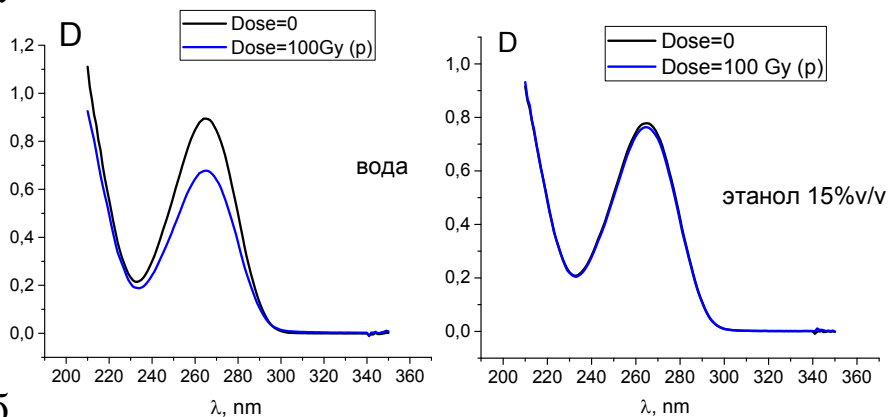
Рис 5.18 Зависимости молярного коэффициента экстинкции ε_{260} и степени ренатурации θ ДНК от концентрации ДНК в облучаемом растворе C_0 при облучении протонным и γ -излучением. Доза облучения 50Гр, ионная сила раствора 5mM NaCl.

Было проведено исследование радиационных повреждений под действием протонного и γ -излучения в более простых системах – водных растворах нуклеотида тимидина. Тимидин – нуклеозид, входящий в состав ДНК, он проявляет наибольшую радиочувствительность по-сравнению с другими нуклеозидами в составе ДНК [81]. Разрушение тимидина под действием радиации можно фиксировать по его поглощению. Зная молярный коэффициент экстинкции тимидина ($\epsilon_{265}(\text{Thym, water})=9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{265}(\text{Thym, 15\% этанол})=7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) можно определить концентрацию тимидина в растворе после облучения и рассчитать выход его разрушения. Был определен выход G разрушения тимидина при облучении протонами и γ -радиацией в водном растворе и в растворе, содержащем 15об.% этанола (Рис 5.19, Табл 5.2). Этанол является перехватчиком ОН-радикалов и широко используется в экспериментах для выявления роли этих активных продуктов радиолиза в радиационном поражении различных биообъектов [177,178]. Значение $G=1.60$ молекул/100эВ для тимидина, γ -облученного в воде, согласуется с имеющимися данными [81]. Опыт показал, что выход разрушения тимидина при облучении протонами выше, чем при облучении γ -квантами (Табл 5.2). В присутствии этанола разрушение тимидина как протонным, так и γ -излучением заметно снижается: для протонного излучения фактор уменьшения дозы $\frac{G(w)}{G(eth)} = 12$, для γ -излучения $\frac{G(w)}{G(eth)} = 15$. По-видимому, основная причина ослабления радиационного эффекта – это перехват этанолом наиболее активного продукта радиолиза воды – ОН-радикала. Однако, следует отметить, что в водно-этанольном растворе усиливается ассоциация между молекулами тимидина, то есть его распределение в растворе становится менее однородным [179]. Это может привести к дополнительному снижению радиационного эффекта при протонном облучении, которое характеризуется также высокой степенью неоднородности распределения ионов и радикалов в облучаемом образце. Таким образом, опыт показал, что удаление из раствора ОН-радикалов менее эффективно защищает тимидин от разрушения при протонном облучении, чем при γ -облучении. Это свидетельствует о том, что вклад прямого действия радиации на тимидин в водной среде в случае протонного излучения выше, чем в случае γ -излучения.

Табл 5.2 Радиационно-химический выход разрушения тимидина при протонном и γ -облучении.

Вид излучения	Состав растворителя	$G \pm 0.02$, молекул/100эВ
p	вода	2.19
γ	вода	1.60
p	15об.% этанола	0.18
γ	15об.% этанола	0.11

а



б

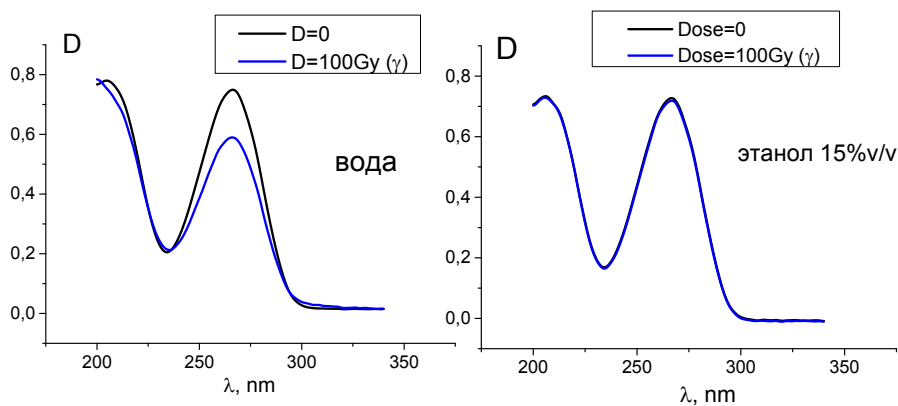


Рис 5.19 Спектры поглощения тимидина, облученного протонным (а) и γ -излучением в дозе 100Гр.

5.3. Влияние катехина в процессе повреждения ДНК высокоэнергетичными протонами и γ -излучением.

Катехин относится к группе биофлавоноидов – полифенолов растительного происхождения. Структурная формула катехина представлена на Рис 5.20. Для катехинов характерна способность к легкому окислению. Под действием солнечных лучей или при слабом нагревании они приобретают окраску, что связано с окислением кислородом воздуха части фенольных гидроксильных групп [180]. Катехин содержится в чае, кофе, фруктах и ягодах [181].

Благотворное влияние чая на организм человека во многом обусловлено присутствием в нем большого количества катехинов [181–183]. Гидроксильные группы катехина являются донорами водорода, и поэтому он способен инактивировать свободные радикалы [181,184–186]. Известно, что катехины проявляют радиопротекторные свойства при УФ и γ -облучении биологических систем разного уровня организации [186–189]. В данной работе исследовали влияние катехина на радиационное повреждение ДНК в растворе при облучении высокоэнергетичными протонами и γ -излучением [190].

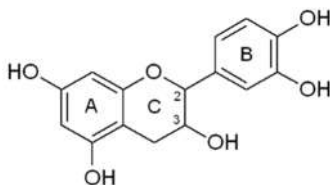


Рис 5.20 Структурная формула катехина [181].

Спектр поглощения катехина в воде показан на Рис 5.21. Он перекрывается со спектром поглощения ДНК, его максимум находится при $\lambda=280\text{nm}$. Как уже упоминалось, катехин при нагревании окисляется, его спектр при этом претерпевает изменения. Поэтому применение процедуры гидролиза для определения

концентрации ДНК в растворах, содержащих катехин, может дать не вполне корректные результаты. Принимая это во внимание, для регистрации радиационного поражения ДНК в растворах с катехином приходится ограничиться данными метода плавления ДНК. При нагревании раствора катехина до 98°C его поглощение на длине волны 260 нм (при которой регистрируется поглощение в методе плавления ДНК) меняется незначительно (Рис 5.21).

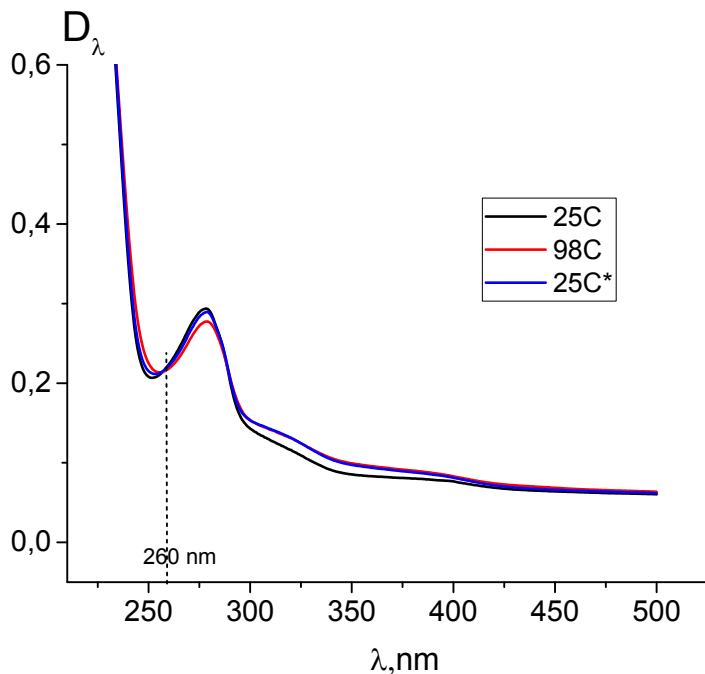


Рис 5.21 Спектр поглощения катехина в воде. На графике указаны температуры, при которых зарегистрированы спектры, * – спектр раствора, нагретого до 98°C, а затем охлажденного до 25°C.

В данном эксперименте был использован образец ДНК с молекулярной массой $(11.2 \pm 0.6) \cdot 10^6 Da$. Для нативной ДНК в растворе 5 мМ NaCl было получено значение $T_{m0} = 69^\circ C$. Кроме того, для этого образца ДНК удалось получить значение T_m после γ -облучения в дозе 100 Гр.

В дальнейшем исследование влияния катехина на радиационное поражение ДНК под действием протонного и γ -излучения проводилось при фиксированной дозе облучения 100Гр (чтобы наблюдаемый эффект был как можно более заметным) при варьировании концентрации катехина в облучаемом растворе. Концентрация ДНК в растворе составляла 0.004г/дл, ионная сила растворов 5мМ NaCl.

На [Рис 5.22](#) показаны кривые плавления нативной ДНК, а также ДНК, подвергнутой облучению протонами 1ГэВ и γ -радиацией в дозе 100 Гр в водно-солевом растворе $\mu=5\text{мМ NaCl}$ в отсутствие катехина. Видно, что облучение как протонами, так и γ -квантами вызывает значительное снижение T_m и уширение интервала перехода спираль-клубок. Эти эффекты уже наблюдались в данной работе (п.3.1,3.2).

На [Рис 5.23](#), [Рис 5.24](#) приведены кривые плавления ДНК, облученной протонами и γ -квантами в растворах, содержащих катехин. На [Рис 5.25](#) показана зависимость температуры плавления ДНК от концентрации катехина в необлученных растворах (контроль) и в растворах, подвергнутых протонному и γ -облучению. В присутствии катехина температура плавления ДНК в необлученных растворах не меняется в пределах погрешности эксперимента. Это согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что катехин слабо связывается с ДНК, вероятно посредством гидрофобных и гидрофильных взаимодействий. Предпочтительные места связывания катехина – в бороздках двойной спирали, при этом вторичная структура ДНК не нарушается [[187,191,192](#)].

С ростом концентрации катехина в облучаемом растворе наблюдается увеличение температуры плавления ДНК, а также сужение интервала плавления, как для систем, облученных протонами, так и для γ -облученных. В диапазоне $0 < C(\text{Cat}) < 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ T_m облученной ДНК резко возрастает ([Рис 5.25](#)), и затем при $C(\text{Cat}) > 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ выходит на насыщение. При этом T_m γ -облученной ДНК практически достигает значений, полученных для необлученной ДНК, тогда как T_m ДНК в растворах, облученных протонами, оказывается существенно ниже T_{m0} ([Рис 5.25](#)).

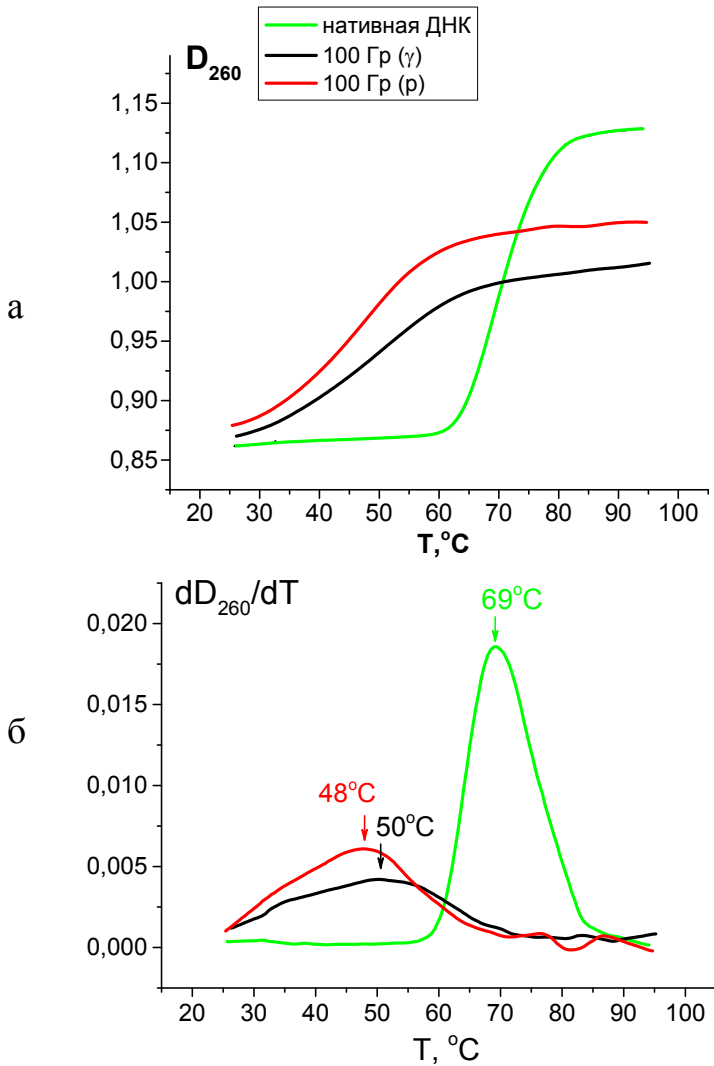


Рис 5.22 Кривые плавления (а) и их первая производная по температуре (б) для нативной ДНК и ДНК, подвергнутой протонному и γ -облучению в дозе 100 Гр в водно-солевом растворе $\mu=5\text{мМ NaCl}$. Температуры плавления указаны на графике.

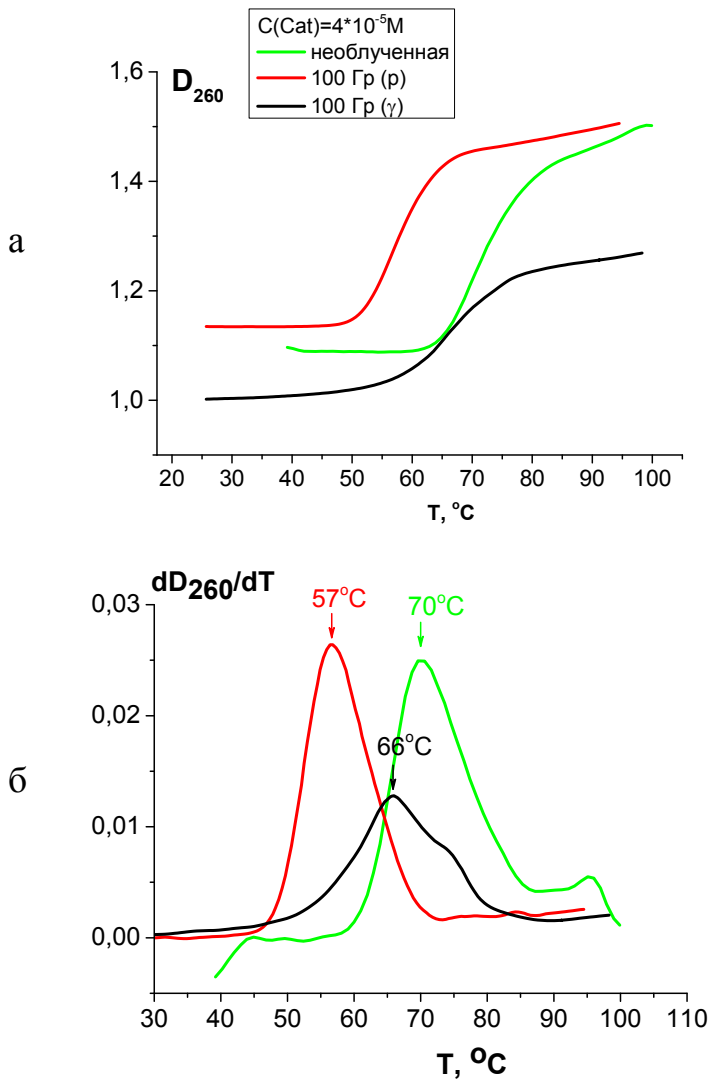


Рис 5.23 Кривые плавления (а) и их первая производная по температуре (б) для необлученной ДНК и ДНК, подвергнутой протонному и γ -облучению в дозе 100 Гр в растворе, содержащем $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ катехина. Температуры плавления указаны на графике.

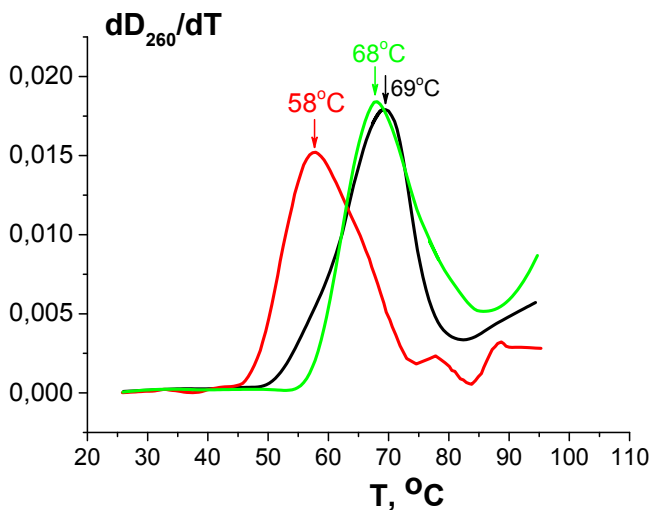
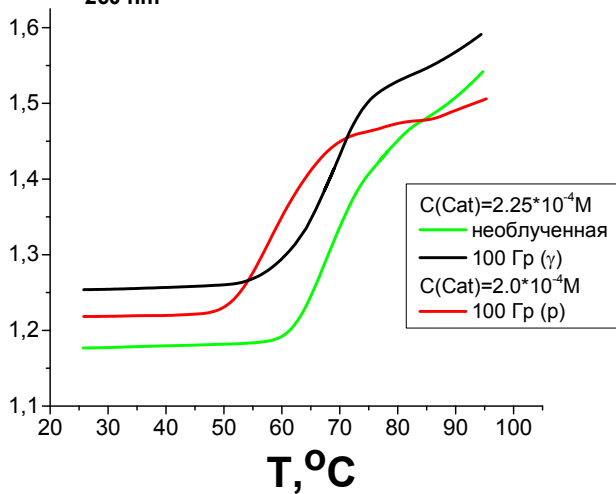


Рис 5.24 Кривые плавления (а) и их первая производная по температуре (б) для необлученной ДНК и ДНК, подвергнутой протонному и γ -облучению в дозе 100 Гр в растворе, содержащем $2.25 \cdot 10^{-5}$ М катехина. Температуры плавления указаны на графике.

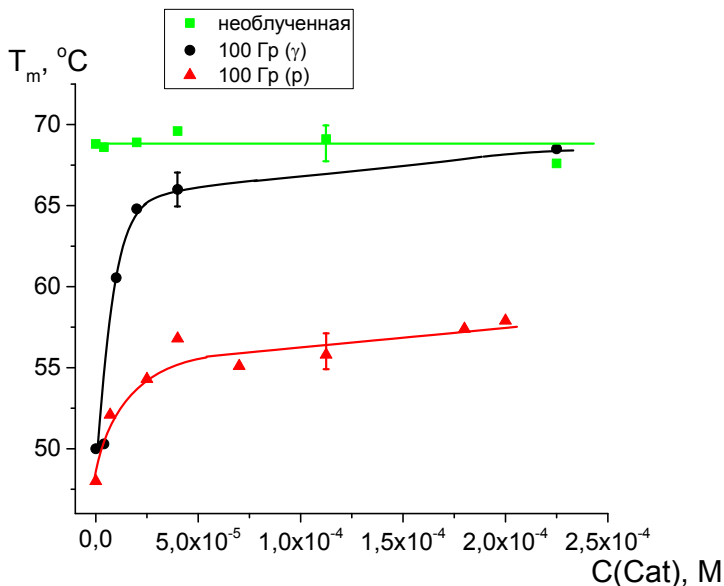


Рис 5.25 Зависимость температуры плавления ДНК от концентрации катехина в необлученных растворах (контроль) и в растворах, подвергнутых протонному и γ -облучению в дозе 100 Гр.

Можно заключить, что радиопротекторные свойства катехина проявляются в гораздо большей степени при γ -облучении растворов ДНК, чем при облучении протонами. Так как радиопротекторный эффект катехина обусловлен перехватом активных окислительных радикалов, то полученные данные подтверждают сделанный ранее в работе вывод о том, что в поражение ДНК высокоэнергетичными протонами существенный вклад вносит прямое действие радиации. Таким образом, можно сделать предположение, что многие традиционные протекторы-перехватчики свободных радикалов, которые используются для защиты от фотонного излучения, окажутся менее эффективными для защиты организма от поражения протонами высоких энергий.

Заключение

С целью моделирования действия высокоэнергетичной протонной компоненты космического излучения на структуру ДНК был использован моноэнергетический пучок протонов с энергией 1 ГэВ, получаемый на синхротроне Петербургского института ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт» СЦ-1000, и соответствующий максимуму энергии протонов первичного космического излучения.

В работе проводили спектральные исследования модельных водных растворов ДНК, подвергнутых облучению высокоэнергетичными протонами доз 0–100 Гр. Для сравнения радиационного эффекта использовали γ -излучение ^{60}Co , имеющее то же значение ЛПЭ=0.3кэВ/мкм, что и исследуемое протонное излучение. Для определения радиационно-химического выхода (G) разрушенных азотистых оснований ДНК впервые был применен метод Спирина спектрофотометрического определения концентрации нуклеиновых кислот. Для систем, подвергнутых γ -облучению, этот метод дал результаты, согласующиеся с имеющимися в литературе данными, полученными с помощью других физико-химических методов.

Основные результаты и выводы:

- 1) Обнаружено снижение радиационного эффекта с ростом ионной силы (μ) облучаемого раствора при дозах γ -облучения до 1000 Гр, которое можно объяснить уменьшением размера мишени, а также изменением структуры и состава гидратной оболочки ДНК.
- 2) Впервые получены значения G разрушенных азотистых оснований ДНК, а также температуры плавления и параметров вторичной структуры ДНК в растворах, облученных протонами с энергией 1 ГэВ в диапазоне поглощенной дозы 0–100 Гр, при варьировании условий облучения (концентрации электролита и ДНК). Обнаружено, что выход разрушенных азотистых оснований ДНК и нуклеозида тимидина в

растворе под действием протонного излучения выше, чем γ -излучения ^{60}Co . Полученная в работе зависимость G от концентрации мишеней и опыт с использованием перехватчика OH -радикалов (этанола) показали, что вклад прямого действия радиации на ДНК и тимидин в водной среде в случае протонного излучения выше, чем в случае γ -излучения.

- 3) Измерены дозовые зависимости температуры плавления ДНК, облученной высокоэнергетичными протонами и γ -квантами при $\mu=5\text{ММ}$ и $\mu=0.15\text{M NaCl}$. Обнаружено монотонное снижение T_m с ростом дозы облучения, а также уширение температурного интервала перехода спираль-клубок, свидетельствующее о повышении гетерогенности структуры ДНК. При дозе 100 Гр наблюдаются признаки образования межнитевых сшивок.
- 4) Исследовано влияние известного антиоксиданта катехина на радиационные повреждения ДНК с использованием величины температуры плавления (T_m) в качестве критерия радиочувствительности. Получены зависимости T_m от концентрации катехина в облучаемом растворе. Обнаружено, что при концентрации катехина свыше $2.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ T_m γ -облученной ДНК практически полностью восстанавливает значение, полученное для нативной ДНК (T_{m0}), тогда как T_m ДНК, облученной протонами с энергией 1 ГэВ составляет $0.85T_{m0}$. Это подтверждает сделанный в работе вывод о большем вкладе прямого действия радиации в повреждения ДНК при протонном облучении. Полученные результаты показывают, что традиционные протекторы-перехватчики свободных радикалов, которые используются для защиты от фотонного излучения, окажутся менее эффективными для защиты организма от поражения протонами высоких энергий.

Список сокращений и обозначений

ЛПЭ - Линейная передача энергия

G - радиационно-химический выход

T_m - температура плавления ДНК

ПИЯФ СЦ - Синхроциклотрон Петербургского института ядерной физики

НИЦ -КИ - Национальный исследовательский центр- Курчатовский институт

LBL - Лаборатория Лоуренса Беркли

SOBP - пик Брэгга

ОБЭ - относительная биологическая эффективность

LINAC - линейный ускоритель

РНЦ РХТ - Российский научный центр радиологии и хирургических технологий

e – заряд электрона,

v – скорость частицы,

$\beta = \frac{v}{c}$ – отношение скорости заряженной частицы к скорости света,

I_0 – средний потенциал ионизации атомов вещества

c - скорость света

D_{37} – это доза радиации, при которой выживает (остаются не инактивированными) 37% объектов

e_{aq} - гидратированный электрон

ОР - односторонний разрыв

ДР - двусторонний разрыв ДНК

ЛМП - локальные множественные повреждения

ДНК-БС - ДНК-белковых сшивок

Cat -катехин

ϵ - молярный коэффициент экстинкции

КД - Круговой дихроизм

LCPL - левый круговой поляризованный свет

RCPL - правый круговой поляризованный свет

а.о. - азотистые основания

δ - гиперхромный эффект

ϑ - степень ренатурации ДНК после плавления при быстром охлаждении

Список литературы

1. Kim M.H.Y., Rusek A., Cucinotta F.A. Issues for simulation of galactic cosmic ray exposures for radiobiological research at ground-based accelerators // Front. Oncol. 2015. Vol. 5, № JUN. P. 1–14.
2. Durante M., Cucinotta F.A. Physical basis of radiation protection in space travel // Rev. Mod. Phys. 2011. Vol. 83, № 4.
3. Valdés-Galicia J.F., González L.X. Solar modulation of low energy galactic cosmic rays in the near-earth space environment // Adv. Sp. Res. COSPAR, 2016. Vol. 57, № 6. P. 1294–1306.
4. M. Tanabashi et al. (Particle Data Group). RPP-29. Cosmic Rays // Phys. Rev. D. 2018. Vol. 98, № October 2017. P. 030001.
5. Hasan Murshed. Fundamentals of Radiation Oncology: Physical, Biological, and Clinical Aspects. 3rd ed. Academic Press, 2019. 743 p.
6. Paganetti H. Proton therapy physics. CRC press, 2018.
7. William R. Hendee. Proton and Carbon Ion Therapy // CRC press / ed. Ma C. -m. C., Lomax T. 2012.
8. WILSON R.R. Radiological use of fast protons. // Radiology. 1946.
9. TOBIAS C.A., ANGER H.O., LAWRENCE J.H. Radiological use of high energy deuterons and alpha particles. // Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med. 1952.
10. Ashikawa J.K. et al. Acute effects of high-energy protons and alpha particles in mice. // Radiat. Res. Suppl. 1967.

11. Lawrence J.H. Proton irradiation of the pituitary // *Cancer*. 1957.
12. Breuer H., Smit B.J. Proton Therapy and Radiosurgery. Springer Science & Business Media, 2001.
13. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) // Издательство “Физматлит.” 2004. 448 / 443 p.
14. Podgorsak E. B. Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005. 485–505 p.
15. Paganetti H. et al. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002.
16. Gerweck L.E., Kozin S. V. Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy // *Radiotherapy and Oncology*. 1999.
17. Britten R.A. et al. Variations in the RBE for Cell Killing Along the Depth-Dose Profile of a Modulated Proton Therapy Beam // *Radiat. Res.* 2013.
18. Matsumoto Y. et al. Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: In vitro study // *J. Radiat. Res.* 2014.
19. Dalrymple G. V. et al. The Relative Biological Effectiveness of 138-Mev Protons as Compared to Cobalt-60 Gamma Radiation // *Radiat. Res.* 1966.
20. Larsson B., Kihlman B.A. Chromosome aberrations following irradiation with high-energy protons and their secondary radiation: A study of dose distribution and biological efficiency using root-tips of vicia faba and allium cepa // *Int. J. Radiat. Biol.* 1960.
21. Dalrymple G. V. et al. Some Effects of 138-Mev Protons on Primates // *Radiat. Res.* 1966.

22. LAWRENCE J.H. et al. Heavy-particle irradiation in neoplastic and neurologic disease. // J. Neurosurg. 1962.
23. Levin W.P. et al. Proton beam therapy // Br. J. Cancer. 2005. Vol. 93, № 8. P. 849–854.
24. Levitt SH, Purdy JA, Perez CA V.S. Technical basis of radiation therapy: practical clinical applications. 4th revise. New York: Springer, 2006.
25. Lin R. et al. Conformal proton radiation therapy of the posterior fossa: A study comparing protons with three-dimensional planned photons in limiting dose to auditory structures // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2000.
26. St. Clair W.H. et al. Advantage of protons compared to conventional X-ray or IMRT in the treatment of a pediatric patient with medulloblastoma // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
27. Suit H. et al. Proton Beams to Replace Photon Beams in Radical Dose Treatments // Acta Oncologica. 2003.
28. Yock T. et al. Proton radiotherapy for orbital rhabdomyosarcoma: Clinical outcome and a dosimetric comparison with photons // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005.
29. Weber D.C. et al. A treatment planning comparison of intensity modulated photon and proton therapy for paraspinal sarcomas // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
30. Chan A.W., Liebsch N.J. Proton radiation therapy for head and neck cancer // Journal of Surgical Oncology. 2008.
31. Lee M. et al. A comparison of proton and megavoltage X-ray treatment planning for prostate cancer // Radiother. Oncol. 1994.

32. Lomax A.J. et al. A treatment planning inter-comparison of proton and intensity modulated photon radiotherapy // *Radiother. Oncol.* 1999.
33. Glimelius B M.A. Proton beam therapy do we need the randomized trials and can we do them? // *Radiother. Oncol.* 2007.
34. Goitein M., Cox J.D. Should randomized clinical trials be required for proton radiotherapy? // *Journal of Clinical Oncology.* 2008.
35. Goitein M. Trials and tribulations in charged particle radiotherapy // *Radiotherapy and Oncology.* 2010.
36. Brada M., Pijls-Johannesma M., De Ruyscher D. Current clinical evidence for proton therapy // *Cancer Journal.* 2009.
37. Granov A.M. et al. The results of proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas // *Vopr. Onkol.* 2013.
38. Гранов А.М. et al. Сорокалетний опыт клинического применения синхроциклотрона Петербургского Института. 2016. Р. 10–17.
39. Karlin D.L., Konnov B.A., Nizkovolos V.B. The state and prospects in the development of the medical proton tract on the synchrocyclotron in Gatchina // *Meditsinskaya Radiol.* 1983. Vol. 28, № 3.
40. Abrosimov N.K. et al. 1000 MeV Proton beam therapy facility at Petersburg Nuclear Physics Institute Synchrocyclotron // *Journal of Physics: Conference Series.* 2006.
41. Н.К.Абросимов, А.А.Воробьев, В.А.Елисеев, Е.М.Иванов, Г.Ф.Михеев, Г.А.Рябов, Е.А.Жербин, Д.Л.Карлин, Б.А.Коннов, Л.А.Мельников. Современное состояние медицинского протонного тракта

синхроциклотрона ЛИЯФ АН СССР // Вопросы атомной науки и техники, серия «Электрофизическая аппаратура». 1987. № 23. Р. 61–66.

42. Н.К.Абросимов, А.А.Воробьев, В.А.Елисеев, Е.М.Иванов, Г.Ф.Михеев, Г.А.Рябов, Е.А.Жербин, Д.Л.Карлин, Б.А.Коннов, В.Н.Кузьмин, В.Б.Низковолос, К.Я.Сеничев, Л.А.Мельников, Б.В.Виноградов. Клинические и физико-технические исследования на синхроциклотроне Ленинградского института ядерной физики // АН СССР, Медицинская радиология. 1987. Vol. 8. Р. 10-16.
43. Ермаков К.Н., Иванов Н.А., Котиков Е.А., Лобанов О.В., Найденов А.Ф., Пашук В.В. Т.М.. Абсолютный ионизационный монитор с функцией профилометра // Вопросы Атомной Науки и Техники, серия “Физика радиационного воздействия на радиоэлектронную аппаратуру”, Научно-технический сборник, выпуск 1. 2011. Р. 37–42.
44. Иванов Н.А., Лобанов О.В., Пашук В.В. Абсолютный ионизационный монитор пучков протонов © 2009. 2009. № 6. Р. 5–10.
45. 16 I.R. ICRU Report 16: Linear energy Transfer // J. Int. Comm. Radiat. Units Meas. 1970.
46. Л.Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. “Теоретическая физика”, том II, Теория поля. М.: Физматлит, 2012. 536 с. р.
47. Кабакчи С.А., Булгакова Г.П. Радиационная химия в ядерном топливном цикле (учебное руководство). 1997. Р. 104с.
48. Nikjoo H. et al. Can Monte Carlo track structure codes reveal reaction mechanism in DNA damage and improve radiation therapy? // Radiat. Phys. Chem. 2008. Vol. 77, № 10–12.
49. Clemens von Sonntag. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. 1st

ed. Springer, 2006. 528 p.

50. Kudryashov Yu. B. RADIATION BIOPHYSICS (IONIZING RADIATION). New York: Nova: Science Publishers, 2008.
51. Coggle J.E. The effect of radiation at the tissue level." Biological effects of radiations. London: Taylor & Francis Ltd, 1983.
52. Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Basic radiation oncology // Basic Radiation Oncology. 2010.
53. Thomas D. P W.C.E. Cell Biology. Philadelphia: Saunders, 2007. 20–47 p.
54. Gunderson L. L, Tepper J. E. The biologic basis of radiation oncology: // Clin. Radiat. Oncol. Philadelphia Elsevier. 2016. Vol. 4th ed. P. 2–40.
55. Hall E.J. Radiobiology for the Radiologist 6th edition // tp1. 2006.
56. Perez C. A, Brady L. W. Biologic basis of radiation therapy: principles and practice of radiation oncology // Balt. MD Lippincott Williams Wilkins. 2013. № 6th ed. P. 61–88.
57. Hall, Eric J., and David J. Brenner. Radiobiology of low-and high-dose-rate brachytherapy." Technical Basis of Radiation Therapy // Springer, Berlin, Heidelberg,. 2006. P. 291–308.
58. Savage, John R.K. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations // Environ. Mol. Mutagen. 1993.
59. Olive P.L. The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation // Radiat. Res. 1998.
60. Calini V., Urani C., Camatini M. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells // Cell Biol.

Toxicol. 2002. Vol. 18, № 6. P. 369–379.

61. Annunziato A.T. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin // Nature Education. 2008.
62. Cells and DNA. Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services. 2020.
63. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. 1987. 584 p.
64. Deckbar D., Jeggo P.A., Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2011. Vol. 46, № 4. P. 271–283.
65. Pawlik T.M., Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004.
66. Cancer Information & supportNetwork.
67. Goodarzi A.A., Jeggo P., Lobrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax // DNA Repair (Amst). Elsevier B.V., 2010. Vol. 9, № 12. P. 1273–1282.
68. IAEA. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students // IAEA Training Course Series. 2010.
69. Pauwels E.K.J. Radioactivity Radionuclides Radiation // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2005.
70. Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the radiologist: Seventh edition // Radiobiology for the Radiologist: Seventh Edition. 2012.

71. Le Caër S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation // *Water*. 2011. Vol. 3, № 1. P. 235–253.
72. GOODHEAD D.T. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations. // *J. Radiat. Res.* 1999. Vol. 40, № Suppl. P. 1–13.
73. Газиев А.И. Повреждение ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1999. Vol. 39, № № 6. P. с.630– 638.
74. Van der Schans G.P. Gamma-ray induced double-Strand breaks in DNA resulting from randomly-inflicted single-strand breaks: Temporal local denaturation, a new radiation phenomenon? // *Int. J. Radiat. Biol.* 1978. Vol. 33, № 2. P. 105–120.
75. Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation // *Radiother. Oncol.* 1989. Vol. 14, № 4. P. 307–320.
76. Jeggo P.A., Löbrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? // *Oncogene*. 2007. Vol. 26, № 56. P. 7717–7719.
77. Magnander K., Elmroth K. Biological consequences of formation and repair of complex DNA damage // *Cancer Letters*. 2012. Vol. 327, № 1–2. P. 90–96.
78. Ahnström G., Bryant P.E. DNA double-Strand breaks generated by the repair of x-ray damage in chinese hamster cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1982. Vol. 41, № 6. P. 671–676.
79. Bonura T., Smith K.C. Enzymatic production of deoxyribonucleic acid double strand breaks after ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* K 12 // *J. Bacteriol.* 1975. Vol. 121, № 2. P. 511–517.
80. Whiteman M. et al. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with

reactive oxygen species: Implications for assessment of oxidative damage in vivo
// Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 296, № 4.

81. Савич А. В., Шальнов М.И., Тимофеев-Ресовский Н. В. Введение в молекулярную радиобиологию. М., Медицина, 1981. 321 p.
82. Scholes G., Ward J.F., Weiss J. Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids // J. Mol. Biol. 1960. Vol. 2, № 6.
83. Leuchtenberger, A. Effect of ionizing radiation on DNA. Physical, chemical and biological aspects / ed. herausgegeben von AJ Bertinchamps, J. Hüttermann W.K. und R.T. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1978.
84. Falk M., Lukášová E., Kozubek S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 2008. Vol. 1783, № 12.
85. Пикаев А.К., Кабакчи С.А., Макаров И.Е. Высокотемпературный радиолиз воды и водных растворов // Энергоатомиздат Москва. 1988.
86. Рябченко Н. И. Радиация и ДНК. М. Атомиздат, 1979.
87. Федоренко Б. С. Радиобиологические эффекты корпускулярных излучений: Радиационная безопасность космических полетов. М.: Наука, 2006. 189 p.
88. Durante M., Manti L. Human response to high-background radiation environments on Earth and in space // Adv. Sp. Res. 2008. Vol. 42, № 6.
89. Snigiryova G.P., Novitskaya N.N., Fedorenko B.S. Cytogenetic examination of cosmonauts for space radiation exposure estimation // Adv. Sp. Res. 2012. Vol. 50, № 4.
90. Walsh L. et al. Research plans in Europe for radiation health hazard assessment

in exploratory space missions // *Life Sci. Sp. Res.* 2019. Vol. 21.

91. Cortese F. et al. Vive la radiorésistance!: Converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 18.
92. Norbury J.W. et al. Galactic cosmic ray simulation at the NASA Space Radiation Laboratory // *Life Sci. Sp. Res.* 2016. Vol. 8. P. 38–51.
93. Sihver L., Mortazavi S.M.J. Radiation Risks and Countermeasures for Humans on Deep Space Missions // *IEEE Aerosp. Conf. Proc. IEEE*, 2019. Vol. 2019-March. P. 1–10.
94. Miousse I.R. et al. Changes in one-carbon metabolism and DNA methylation in the hearts of mice exposed to space environment-relevant doses of oxygen ions (16O) // *Life Sci. Sp. Res.* 2019. Vol. 22.
95. Katz R., Cucinotta F.A., Zhang C.X. The calculation of radial dose from heavy ions: Predictions of biological action cross sections // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*. 1996. Vol. 107, № 1–4. P. 287–291.
96. De Vera J.P. et al. Supporting Mars exploration: BIOMEX in Low Earth Orbit and further astrobiological studies on the Moon using Raman and PanCam technology // *Planet. Space Sci.* 2012. Vol. 74, № 1. P. 103–110.
97. Cucinotta F.A., Dicello J.F. On the development of biophysical models for space radiation risk assessment // *Adv. Sp. Res.* 2000. Vol. 25, № 10. P. 2131–2140.
98. Kennedy A.R., Wan X.S. Countermeasures for space radiation induced adverse biologic effects // *Advances in Space Research*. 2011. Vol. 48, № 9.
99. Lu T. et al. Detection of DNA damage by space radiation in human fibroblasts

flown on the International Space Station // Life Sci. Sp. Res. 2017. Vol. 12.

100. Backhaus T. et al. DNA damage of the lichen *Buellia frigida* after 1.5 years in space using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique // Planet. Space Sci. 2019. Vol. 177.
101. Moreno-Villanueva M., Wu H. Radiation and microgravity – Associated stress factors and carcinogenesis // REACH. 2019. Vol. 13.
102. Kokhan V.S. et al. An investigation of the single and combined effects of hypogravity and ionizing radiation on brain monoamine metabolism and rats' behavior // Life Sci. Sp. Res. 2019. Vol. 20.
103. Blakely E.A., Chang P.Y. A review of ground-based heavy-ion radiobiology relevant to space radiation risk assessment. Part II: Cardiovascular and immunological effects // Adv. Sp. Res. 2007. Vol. 40, № 4.
104. Blakely E.A., Chang P.Y. A review of ground-based heavy ion radiobiology relevant to space radiation risk assessment: Cataracts and CNS effects // Adv. Sp. Res. 2007. Vol. 40, № 9.
105. Antonelli F. et al. DNA fragmentation induced by Fe ions in human cells: Shielding influence on spatially correlated damage // Adv. Sp. Res. 2004. Vol. 34, № 6.
106. Jones B. A simpler energy transfer efficiency model to predict relative biological effect for protons and heavier ions // Front. Oncol. 2015. Vol. 5, № Aug.
107. Jones B. Clinical radiobiology of proton therapy: modeling of RBE // Acta Oncol. (Madr). 2017. Vol. 56, № 11.
108. Cucinotta F.A. et al. Space radiation risk limits and Earth-Moon-Mars environmental models // Sp. Weather. 2010. Vol. 8, № 12.

109. Sage E., Shikazono N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 107, № December 2016. P. 125–135.
110. Paganetti H. Proton relative biological effectiveness-uncertainties and opportunities // *Int. J. Part. Ther.* 2018. Vol. 5, № 1. P. 2–14.
111. Friedland W. et al. Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № February. P. 1–15.
112. Sakata D. et al. Evaluation of early radiation DNA damage in a fractal cell nucleus model using Geant4-DNA // *Phys. Medica.* 2019. Vol. 62.
113. de la Fuente Rosales L. et al. Accounting for radiation-induced indirect damage on DNA with the Geant 4-DNA code // *Phys. Medica.* 2018. Vol. 51.
114. Lee, Brian Hee Eun, Wang, C. K.Chris. A cell-by-cell Monte Carlo simulation for assessing radiation-induced DNA double strand breaks // *Phys. Medica.* 2019. Vol. 62.
115. Klimczak U. et al. Irradiation of plasmid and phage DNA in water-alcohol mixtures: Strand breaks and lethal damage as a function of scavenger concentration // *Int. J. Radiat. Biol.* 1993. Vol. 64, № 5.
116. Pogożelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. Quantitative Assessment of the Contribution of Clustered Damage to DNA Double-Strand Breaks Induced by 60 Co Gamma Rays and Fission Neutrons // *Radiat. Res.* 1999. Vol. 151, № 4.
117. Herskind C. Single-Strand breaks can lead to complex configurations of plasmid DNA in vitro // *Int. J. Radiat. Biol.* 1987. Vol. 52, № 4.
118. Peak J.G. et al. DNA damage produced by exposure of supercoiled plasmid DNA

to high- and low-LET ionizing radiation: Effects of hydroxyl radical quenchers // Int. J. Radiat. Biol. 1995. Vol. 67, № 1.

119. Ito T, Baker SC, Stickley CD, Peak JG P.M. Dependence of the yield of strand breaks induced by gamma-rays in DNA on the physical conditions of exposure: water content and temperature. // Int J Radiat Biol. 1993. Vol. 63, № 3. P. 289-96.
120. Mehta A. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Derivation of Beer-Lambert Law [Electronic resource] // Pharmaxchange.info. 2012.
121. Spirin AS. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. // Biokhimiia (Moscow, Russ. 1958. Vol. 23(5). P. 656–662.
122. Cantor C.R., Schimmel P.R. Part II: Techniques for the study of biological structure and function // Biophysical Chemistry. 1980.
123. YU.S. Iazurkin, M.D. Frank-Kamenetskii, and E.N. Trifonov. Melting of DNA: Its Study and Application as a Research Method. 1970. Vol. 9. P. 1263–1306.
124. А.А. Веденов, А.М. Дыхне М.Д. Франк-каменецкий. ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ - КЛУБОК В ДНК // УФН. 1971. Vol. т.105, № вып.3. P. 479–519.
125. Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis // Biophys. Chem. 2005. Vol. 117, № 3. P. 207–215.
126. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // J. Mol. Biol. 1962.
127. Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D. Enthalpy of helix-coil transition of dna: Dependence on na^+ concentration and gc-content // J. Biomol. Struct. Dyn. 1990. Vol. 8, № 1. P. 131–138.

128. Gawronski J., Skowronek P. Electronic circular dichroism for chiral analysis // *Chiral Anal.* 2006. P. 397–459.
129. Martin S.R., Schilstra M.J. *Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules* // *Methods in Cell Biology.* 2008.
130. Alison Rodger; Bengt Nordén. *Circular Dichroism and Linear Dichroism.* Oxford University Press., 1997.
131. Yang G. et al. The chirality induction and modulation of polymers by circularly polarized light // *Symmetry.* 2019. Vol. 11, № 4.
132.
https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD_Chem_107B%3A_Physical_Chemistry_for_Life_Scientists/Chapters/7%3A_Spectroscopy/7.9%3A_Optical_Rotatory_Dispersion_and_Circular_Dichroism [Electronic resource].
133. Neidig M.L. et al. Kinetic and spectroscopic studies of N694C lipoyxygenase: A probe of the substrate activation mechanism of a nonheme ferric enzyme // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 24. P. 7531–7537.
134. Gray D.M., Ratliff R.L., Vaughan M.R. Circular dichroism spectroscopy of DNA // *Methods Enzymol.* 1992. Vol. 211, № C. P. 389–406.
135. Lee A.J., Wallace S.S. Visualizing the search for radiation-damaged DNA bases in real time // *Radiat. Phys. Chem.* 2016. Vol. 128.
136. Su Y. et al. Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system // *Exp. Dermatol.* 2010. Vol. 19, № 8.
137. Ticli G., Prosperi E. In situ analysis of dna-protein complex formation upon

radiation-induced dna damage // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 22.

138. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A.R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2009. Vol. 674, № 1–2.
139. Cadet J., Wagner J.R. Radiation-induced damage to cellular DNA: Chemical nature and mechanisms of lesion formation // *Radiat. Phys. Chem. Elsevier*, 2016. Vol. 128. P. 54–59.
140. Rafi A., Weiss J.J., Wheeler C.M. Effect of γ -radiation on aqueous solutions of DNA's of different base composition // *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.* 1968. Vol. 169, № 1.
141. Trumbore C.N. et al. Ultraviolet difference spectral studies in the gamma radiolysis of DNA and model compounds. I. Aqueous solutions of DNA bases // *Int. J. Radiat. Biol.* 1989. Vol. 56, № 6. P. 923–941.
142. C.R.Cantor, P.R. Schimmel. *Biophysical Chemistry. Part 2,3.* W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
143. Minsky A. The chiral code: From DNA primary structures to quaternary assemblies // *Chirality.* 1998. Vol. 10, № 5.
144. Tunis-Schneider, Mary Jane B., Maestre, Marcos F. Circular dichroism spectra of oriented and unoriented deoxyribonucleic acid films-A preliminary study // *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 52, № 3.
145. Kypr J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA // *Nucleic Acids Research.* 2009. Vol. 37, № 6.
146. Ivanov V.I. et al. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism // *Biopolymers.* 1973. Vol. 12, № 1.

147. Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В. Исследование молекулярного механизма взаимодействия ДНК с двухвалентными ионами металлов // Молек. биология. 1989. Vol. т.23, № вып.4. Р. с.835-841.
148. Касьяненко Н.А., Бартошевич С.Ф. Исследование влияния pH среды на конформацию молекулы ДНК. // Молекулярная биология. 1985. Vol. т.19, № вып. 5. Р. с. 1386-1393.
149. Ramm E.I. et al. Circular Dichroism of DNA and Histones in the Free State and in Deoxyribonucleoprotein // Eur. J. Biochem. 1972. Vol. 25, № 2.
150. Uyesugi D.F., Trumbore C.N. The effect of low ionic strength on the radiation chemistry and physical properties of calf thymus DNA // Int. J. Radiat. Biol. 1983. Vol. 44, № 6.
151. Paston S. V., Zamotin V. V. Conformational changes of DNA γ -irradiated in the presence of aliphatic alcohols in solution // J. Struct. Chem. 2009. Vol. 50, № 5.
152. Eichhorn G.L., Shin Y.A. Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. The Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity // J. Am. Chem. Soc. 1968. Vol. 90, № 26.
153. Lando D.Y. et al. Theoretical and experimental study of dna helix-coil transition in acidic and alkaline medium // J. Biomol. Struct. Dyn. 1994. Vol. 12, № 2.
154. Vardevanyan P.O. et al. Joint interaction of ethidium bromide and methylene blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34, № 7.
155. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S. V. Application of spectral methods for studying DNA damage induced by gamma-radiation // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V., 2018. Vol. 200. P. 85–92.

156. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S. V. DNA Damage Induced by Gamma-Radiation Revealed from UV Absorption Spectroscopy // Journal of Physics: Conference Series. Institute of Physics Publishing, 2018. Vol. 1038, № 1.
157. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S.V., Helix – coil transition in DNA with defects of primary structure // In Book of Abstracts of 9th International Symposium “Molecular Mobility and Order in Polymer Systems”, St.-Petersburg, June 19-23. 2017. P. P-059.
158. W. Saenger. Principles of Nucleic Acid Structure. Springer Advanced Texts in Chemistry. 1984. 574 p.
159. Kas'yanenko N.A. Conformational changes of DNA molecules in interactions with bioactive compounds. I. Influence of metal ions on the conformation of DNA molecules in solution // J. Struct. Chem. 2006. Vol. 47, № 1.
160. Feig M., Pettitt B.M. Sodium and chlorine ions as part of the DNA solvation shell // Biophys. J. 1999. Vol. 77, № 4.
161. Fenley M.O., Manning G.S., Olson W.K. Approach to the limit of counterion condensation // Biopolymers. 1990. Vol. 30, № 13–14.
162. Frisman E., Zarubina O. Effect of γ -irradiation on the conformation of the native DNA molecule // Biophys. Chem. 1993. Vol. 46, № 1.
163. Grygoryev D., Moskalenko O., Zimbrick J.D. Effect of sodium and acetate ions on 8-hydroxyguanine formation in irradiated aqueous solutions of DNA and 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate // Int. J. Radiat. Biol. 2011. Vol. 87, № 9. P. 974–983.
164. Cadet J., Douki T., Ravanat J.L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA // Free Radic. Biol. Med. Elsevier Inc., 2010. Vol. 49, № 1. P. 9–21.

165. Н.А.Касьяненко, Г.Сэلمان-Хусейн Соса, В.Н.Уверский, Э.В.Фрисман. Исследование влияния ионов Mn^{2+} и Mn^{2+} на конформацию молекулы ДНК // Молекулярная биология. 1987. Vol. т.21, № вып.1. P. 140-146.
166. Wanek J., Rühli F.J. Risk to fragmented DNA in dry, wet, and frozen states from computed tomography: a comparative theoretical study // Radiat. Environ. Biophys. 2016. Vol. 55, № 2.
167. Eschenbrenner A. et al. Strand breaks induced in plasmid DNA by ultrasoft X-rays: Influence of hydration and packing // Int. J. Radiat. Biol. 2007. Vol. 83, № 10.
168. Swarts S.G. et al. Radiation-Induced DNA Damage as a Function of Hydration: I. Release of Unaltered Bases // Radiat. Res. 1992. Vol. 129, № 3.
169. Falcone J.M. et al. Products of the reactions of the dry and aqueous electron with hydrated DNA: Hydrogen and 5,6-dihydropyrimidines // Radiat. Phys. Chem. 2005. Vol. 72, № 2–3.
170. Milano M.T., Bernhard W.A. The Effect of Packing and Conformation on Free Radical Yields in Films of Variably Hydrated DNA // Radiat. Res. 1999. Vol. 151, № 1.
171. Lando D.Y. et al. Melting of cross-linked dna: Ii. influence of interstrand linking on dna stability // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. Vol. 15, № 1.
172. Duguid J.G. et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. II. The thermal denaturation of DNA in the presence of Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} // Biophys. J. Elsevier, 1995. Vol. 69, № 6. P. 2623–2641.
173. Georgakilas A.G., O'Neill P., Stewart R.D. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? // Radiat. Res. 2013. Vol. 180, № 1. P. 100–109.

174. O.M. Kotb, S.V.Paston., DNA damage in aqueous solutions as a result of indirect action of ionizing radiation // в Сб. тезисов VIII Международной молодежной научной школы-конференции “Современные проблемы физики и технологий”, МИФИ, 15-20 апреля, Москва. 2019. P. 55-56.
175. O.Kotb, S.Tankovskaia., Comparative Study of the DNA Irradiated with Proton Particles and Gamma Radiation // in: Int. Stud. Conf. Science and Progress-2017"-SPb.: SOLO, 13-17 November,. 2017. P. 272 pp. p. 219.
176. Kotb O.M., Paston S.V., Ezhov V. F., Gulevich E.P., Brozhik D.S., Karlin D.L., Pak F.A.3, Khalikov A.I. DNA STRUCTURAL ALTERATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS INDUCED BY HIGH ENERGY PROTON BEAM RADIATION // in: 15th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists “Modern Problems of Polymer Science”, 28 – 31 October. Saint Petersburg, 2019. P. 4-O-13, 195.
177. Kudryashov Yu. RADIATION BIOPHYSICS (IONIZING RADIATION). New York: Nova: Science Publishers, 2008.
178. Шарпатый В. А. Радиационная химия биополимеров. Москва : Энергоизда: Москва. Энергоизда, 1981. 168 с р.
179. Nikolaev A.I., Paston S. V. Solvent type influence on thymidine UV-sensitivity // J. Phys. Conf. Ser. 2015. Vol. 661, № 1.
180. Janeiro P., Oliveira Brett A.M. Catechin electrochemical oxidation mechanisms // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 518, № 1–2.
181. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. М., «Наука», 1964.
182. Hamer M. The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from in vitro, animal, and human research // Nutrition Research. 2007. Vol. 27, № 7.

183. Yam T.S., Shah S., Hamilton-Miller J.M.T. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. Vol. 152, № 1.
184. Heijnen C.G.M. et al. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups // *Toxicol. Vit.* 2001. Vol. 15, № 1.
185. Iwai K. et al. Effect of tea catechins on mitochondrial DNA 4977-bp deletions in human leucocytes // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2006. Vol. 595, № 1–2.
186. Dale G. Nagle, Daneel Ferreira, and Yu-Dong Zhou. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives // *Phytochemistry.* 2006. Vol. 67, № 17. P. 1849–1855.
187. Ershov DS, Paston SV, Kartsova LA, Alekseeva AV, Ganzha OV K.N. Investigation of the radioprotective properties of some tea polyphenols(Article) // *Struct. Chem.* 2011. Vol. 22, № 2. P. 475–482.
188. Richi B., Kale R.K., Tiku A.B. Radio-modulatory effects of Green Tea Catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage // *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2012. Vol. 747, № 1. P. 62–70.
189. Clarke K.A. et al. Green tea catechins and their metabolites in human skin before and after exposure to ultraviolet radiation // *J. Nutr. Biochem.* 2016. Vol. 27. P. 203–210.
190. Котб О.М., Пастон С.В., Гулевич Е.П., Брожек Д.С., Карлин Д.Л., Пак Ф.А., Халиков А.И. Исследование повреждений молекулы ДНК, вызванных облучением протонами и гамма-квантами // В СБОРНИКЕ НАУЧНЫХ ТРУДОВ VI СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ РОССИИ, Сочи, 16–21 сентября. 2019. P. 231.

191. Kuzuhara T. et al. DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281, № 25. P. 17446–17456.
192. Chanphai P., Tajmir-Riahi H.A. Structural dynamics of DNA binding to tea catechins // Int. J. Biol. Macromol. 2019. Vol. 125. P. 238–243.