

В-762

19-2003-222

На правах рукописи

ВОСКАНЯН
Каринэ Шаваршовна

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ И ЛАЗЕРНЫХ
ИЗЛУЧЕНИЙ НА КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

3499

Обнинск 2003
[Дубна]

Работа выполнена в Объединенном институте ядерных исследований
(г. Дубна, РФ)

Официальные оппоненты

Доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН

Корогодин Владимир Иванович

Доктор биологических наук, профессор

Веселовский Владимир Александрович

Доктор биологических наук

Ульяненко Степан Евгеньевич

Ведущая организация

Государственный научный центр - Институт биофизики Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится “___” “_____” 2004г. в “-----” часов
на заседании диссертационного совета Д 001.011.01 при
государственном учреждении Медицинском радиологическом научном
центре РАМН (249036, г. Обнинск Калужской области, ул. Королева, 4)
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Медицинского
радиологического научного центра Российской академии медицинских
наук.

Автореферат разослан “___” “_____” 2003г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

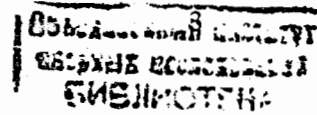
В.А. Куликов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Начиная с первых минут своего существования все живые организмы подвергаются воздействию разных видов излучений и поэтому исследование воздействия этих излучений на биологические объекты представляет большой интерес.

Известно, что человек находящийся в средних широтах на уровне моря, подвергается воздействию отдельных видов лучистой энергии в следующих количествах: инфракрасной радиации около 0,5-0,7 кал /см².мин; видимого света – порядка 20000-30000 лк или около 0,4 кал /см².мин; ультрафиолетовой радиации – около 50-60 мкал /см². мин, и наконец, радиоактивных излучений в пределах 100-118 мрад/год или 30-60 мкрад/ч. Защита живых организмов от повреждающего действия этих излучений является одной из актуальных и чрезвычайно сложных проблем в современной биологии и радиобиологии, в частности. Оценка радиационной опасности космического излучения представляет сложную и многогранную задачу. Трудности ее решения, обусловлены с одной стороны, отсутствием достаточно полных данных о стохастических и нестохастических эффектах, обусловленных отдельными видами космического излучения, а с другой стороны, чрезвычайно высокими материальными затратами. Это особенно касается излучений видимого и инфракрасного диапазонов светового спектра (область от 0,38 - 10 мкм). Литературных данных по действию этих излучений на биологические объекты мало, они не систематизированы, выполнены на различных биологических объектах, что существенно затрудняет их анализ, механизмы их воздействия непонятны. Между тем, именно такого характера сведения необходимы для разработки и обеспечения допустимых уровней воздействия различных видов излучения на организм человека. Кроме того, актуальность изучения биологических эффектов, обусловленных воздействием электромагнитных



излучений различных спектральных диапазонов, определяется широким кругом и практических задач в таких областях науки как общая радиобиология, фотобиология, радиология, генетика, радиационная гигиена, лазерная медицина, космическая биология и др.

Необходимо отметить, что появление оптических квантовых генераторов открыло широкие возможности для проведения исследований по биологическому воздействию широкого спектра электромагнитных излучений. Лазеры представляют собой удобный инструмент для осуществления оптического воздействия на живую материю. Современные лазерные установки дают возможность получить оптическое излучение нужного спектрального диапазона, варьировать мощностью излучения, частотой повторения импульсов, их длительностью, размером сечения лазерного пучка и т.д. Лазерное излучение может использоваться как для стимулирования жизненно важных процессов в клетках и организмах, так и для их подавления. Последствия таких воздействий исследуются различными методами современной биологии и медицины. Начиная с 1965 года, начался буквально шквал работ по исследованию действия лазерного излучения на различные биологические объекты. В конце 60-х годов в СССР зародилось и в дальнейшем получило широкое применение лазеров в медицине. Сейчас трудно найти такую область медицины, где не применялись бы лазерные установки. Лазеры широко используются также в различных областях науки и техники, и в связи с этим, значительно увеличилось количество людей работающих с лазерами. В настоящее время, исследования биологического действия лазерных излучений разных длин волн представляют научный интерес не только как фундаментальные и прикладные исследования, но и как фактор воздействия, требующего обеспечения безопасности людей работающих с лазерами. Важнейшими областями таких исследований, на наш взгляд, являются исследования по летальному, мутагенному и канцерогенному действию лазерных излучений. О способности УФ света оказывать на клетки летальное, мутагенное и канцерогенное воздействие известно давно, чего нельзя сказать об излучениях видимого и инфракрасного диапазонов. Долгое время считалось, что эти

излучения могут оказать летальное и мутагенное воздействие на биологические объекты только по механизму фотодинамического эффекта при наличии фотосенсибилизаторов. Результаты исследований последних лет, в частности экспериментальные материалы полученные нами, показали, что видимый свет разных длин волн, а также инфракрасное излучение способны оказать биологическое воздействие на живые организмы также путем прямого фотовозбуждения, без присутствия фотосенсибилизаторов.

Большой интерес представляют также исследования по фоторадиационным воздействиям. В литературе данных по комбинированным и одновременным облучениям биологических объектов ионизирующими излучениями и излучениями в диапазоне оптических частот очень мало. Исключение составляют исследования с использованием широкого спектра УФ излучения. Это проблема имеет особое значение в тех случаях, когда биологический объект оказывается в естественном комбинированном поле излучений с различными физическими свойствами.

Нам представляется, что одним из путей понимания механизмов биологического воздействия излучений различных спектральных областей (в том числе и лазерных излучений) является поиск общих закономерностей действия всего спектра электромагнитных излучений на биологические объекты. Сопоставление эффектов ионизирующего излучения и света с различной длиной волны существенно расширит границы наших представлений о механизмах, лежащих в основе реакции клеток на воздействие излучений. Для этого необходимо проведение систематических исследований действия ионизирующих и оптических излучений на одном определенном биологическом объекте. Прежде всего, необходимо детально исследовать воздействие излучений видимого и инфракрасного диапазонов на биологические объекты, поскольку, как уже отмечалось выше, о воздействии излучений именно этих спектральных областей на биологические объекты известно очень мало.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось выявление общих закономерностей действия на клетки бактерий ионизирующих излучений и лазерных излучений различных спектральных областей. При выполнении работы было необходимо решить следующие задачи:

- исследовать радиобиологическое действие гамма лучей и альфа-частиц на клетки бактерий *E.coli K-12* разных генотипов;
- исследовать биологическое действие лазерных излучений видимой (633 нм, 532 нм), ультрафиолетовой (270 нм, 216 нм) и инфракрасной (1220 - 1320 нм) областей на клетки *E.coli K-12* разных генотипов;
- определить зависимости биологического действия лазерных излучений различных спектральных областей на клетки *E.coli K-12* от дозы и мощности дозы облучения;
- изучить последовательное и одновременное действие ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий *E.coli K-12* разных генотипов;
- проверить предположение о том, что при биологическом действии на бактерии *E.coli* видимого излучения первичными фоторецепторами являются клеточные цитохромы, входящие в дыхательную систему этих клеток.
- сопоставить результаты по действию ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий *E.coli K-12* разных генотипов с целью выявления общих закономерностей их действия

Научная новизна и практическое значение работы

1. Впервые проведены систематизированные исследования по биологическому действию ионизирующих и лазерных излучений на одном биологическом объекте.

2. Впервые показано, что лазерные излучения видимой спектральной области (532 нм и 633 нм) оказывают на клетки бактерий *E.coli K-12* разных генотипов летальное и мутагенное воздействие.
3. Установлено, что облучение клеток бактерий *E.coli K-12* лазерным излучением с длиной волны 633 нм приводит к задержке первого после облучения деления клеток: время задержки зависит от дозы облучения.
4. Впервые обнаружено, что кривые частоты мутирования клеток бактерий ($lac^+ \rightarrow lac^-$ мутации) в случаях их облучения видимым (532 и 633 нм) и УФ (270 и 216 нм) излучениями имеют одинаковую форму.
5. Показано, что эффективность воздействия всех исследованных видов лазерных излучений на клетки бактерий *E.coli K-12* генетически детерминирована - зависит от репарационного генотипа клеток.
6. Впервые проведены эксперименты по последовательному и одновременному облучению клеток бактерий *E.coli K-12* лазерным излучением с длиной волны 633 нм и ионизирующими излучениями, показывающие, что результаты фоторадиационных воздействий зависят от варианта комбинации, дозы каждого вида излучения и временного интервала между этими облучениями.
7. Впервые установлено, что предварительное, последующее и одновременное с ионизирующим излучением облучения клеток бактерий *E.coli K-12* разных генотипов лазерными излучениями видимого диапазона (633 и 532 нм) снижают повреждающее действие ионизирующих излучений.
8. Впервые показано, что лазерные излучения ближней инфракрасной области света (1220 – 1320 нм) оказывают на клетки бактерий летальное воздействие, которое максимально эффективно при длине волны излучения 1270 нм (соответствующему главному максимуму поглощения молекулярного кислорода). Эффективность лазерного воздействия зависит от мощности дозы и генотипа клеток.

9. Впервые выявлены некоторые общие закономерности действия ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий.

Результаты проведенных исследований важны для обеспечения радиационной безопасности людей, представляют большой научный интерес для понимания механизмов и закономерностей биологического действия электромагнитных излучений видимой и ИК областей спектра. Полученные результаты могут быть использованы в лазерной медицине, радиационной защите, микробиологии, в области космической биологии и медицины, в различных областях народного хозяйства. Они также могут быть использованы при разработке вопросов санитарно-гигиенического нормирования для лиц, работающих с лазерами в профессиональных условиях.

Объем работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав и выводов; изложена на 243 страницах машинописного текста, иллюстрируется 29 рисунками и 8 таблицами. Список литературы содержит 325 наименований.

Апробация работы.

Научные результаты и выводы, сформулированные в диссертации докладывались на первой (г. Дубна, Россия, 1997) и второй (г. Дубна, Россия, 2001.) международных конференциях «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», на III (Будапешт, Венгрия, 1989), VII (Стреза, Италия, 1997), VIII (Гранада, Испания, 1999) и IX-ом (Лилхаммер, Норвегия, 2001) конгрессах Европейского общества по Фотобиологии, на Европейской Неделе Биомедицинской Оптики (EBIOS 2000, Амстердам, Нидерланды), на международных конференциях «Лазеры 97» (Нью-Орлеан, США), «Лазеры 95» (Чарлстон, США), «Лазеры 94» (Кьюбек, Канада), «Лазеры 93» (Невада, США), «Лазеры 90» (Болгария), на 4-ом симпозиуме по Биохимии (Айзенах, Германия, 1988) и на многих других международных конференциях. Результаты работы докладывались также на научных семинарах Объединенного института ядерных исследований, на ежегодных конференциях НПО «Лазерная техника»

Ереванского государственного университета, на семинарах Лаборатории радиационной биофизики Ереванского физического института.

На защиту выносятся:

- Результаты экспериментов по действию ионизирующих излучений на клетки бактерий *E. coli K-12* разных генотипов.
- Результаты опытов по действию лазерных излучений видимого диапазона (633 нм и 532 нм) на клетки бактерий *E. coli K-12* разных генотипов.
- Результаты фоторадиационных воздействий ионизирующих излучений и лазерных излучений видимой области на клетки бактерий *E. coli K-12* разных генотипов.
- Экспериментальные результаты по действию лазерных УФ излучений с длинами волны 216 нм и 270 нм клетки бактерий *E. coli K-12*.
- Результаты исследований по действию лазерных излучений ИК области (1220-1320 нм) на клетки бактерий *E. coli K-12* разных генотипов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

1. Штаммы. - В работе использованы следующие штаммы бактерий *Escherichia coli K-12*: дикий тип АВ 1157 (thr-1 leu-6 pro-A2 his-4 arg E3 lac Y1 gal K2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 str A31 sup E37); γ - резистентный мутант BL 1114 (Gam^r 444); радиочувствительные мутанты АВ 2463 (rec A 13 ⁻) и P 3478 (pol A 1⁻) а также штамм Hfr *E. coli K-12 H* (все штаммы из коллекции ЛИЯФ РАН).

2. Среды. - Использовали среды – МПА (мясо - пептонный агар производства Института микробиологии им. Гамалеи, г. Москва) и голодный агар (агар – агар –

10 г/л). Разведение клеточной суспензии проводили в физиологическом растворе (0,85 % NaCl).

3. Источники излучений - Для решения поставленных перед настоящим исследованием задач были использованы разные типы лазеров, источник α - частиц и рентгеновская установка.

Лазерное облучение - Были использованы гелий-неоновые лазеры непрерывного действия ЛГ-52-3 и ЛГ-75 с мощностями излучения 2 мВт и 4,8 мВт соответственно. Длина волны излучения 633 нм. Использовался также лазер ЛТИ-501 с длиной волны 1060 нм. Для получения излучения с длиной волны 532 нм (частота повторения импульсов 7 кГц, диаметр пучка 6 мм) излучение этого лазера преобразовывалось с помощью нелинейного кристалла LiO_3 . Мощность излучения измеряли с помощью прибора ИМО-2Н. Энергию считали умножением средней мощности на время облучения, плотность энергии – делением энергии на площадь сечения пучка. В качестве источника УФ излучения использовали пикосекундный Иттриум алюминат Nd лазер с двумя усилителями и преобразованием частоты в четвертую ($\lambda = 270$ нм) и пятую гармоники ($\lambda = 216$ нм). Используемое УФ излучение имело следующие параметры: энергия одного импульса $E = 0,1 - 1$ мДж, длительность импульса $\tau = 15$ пс, частота повторения импульсов $f = 2$ Гц. При исследовании мутагенного действия лазерных излучений видимого диапазона использовали непрерывный гелий-неоновый лазер ЛГ-75 (Львов, Украина) с длиной волны $\lambda = 633$ нм и квазинепрерывный лазер ЛТИ-702 (г. Саратов, НПО “Полярон“, Россия) с длиной волны $\lambda = 532$ нм (длительность импульса $\tau = 175$ нс). В качестве источника ИК излучения использовали ПГС (параметрический генератор света) на LiNbO_3 накачиваемый излучением второй гармоники NdYAG лазера. Длина волны излучения $\lambda = 1220 - 1320$ нм, длительность импульса $\tau = 15$ нс, мощность дозы 24 мВт или 40 мВт. Облучение клеток лазерным излучением проводили в монослое на поверхности “голодного” агара. Размер облучаемой клеточной суспензии ($0,07 \text{ см}^2$) всегда был меньше размера сечения лазерного пучка.

α - облучение - В качестве источника α - частиц использовали плоский, толстый α - источник ^{239}Pu . Облучение клеток проводили на поверхности “голодного” агара. Расстояние между источником и монослоем клеток составляло 4,5 мм, энергия частиц – 5, 5 МэВ, значение ЛПЭ – 101 КэВ/мкм, мощность дозы – 0,35 Гр/с.

Рентгеновское облучение - Облучение клеток рентгеновскими лучами проводили с использованием аппарата РУП-200-20-5 (нефильтрованное излучение, напряжение на трубке – 200 кВ, сила тока – 14 мА, мощность дозы – 0,58 Гр/с).

4. Определение радиочувствительности - Выращивание бактериальных культур проводили на полноценной питательной среде МПА до стационарной фазы роста. Облучение клеток бактерий проводилось при комнатной температуре в монослое на поверхности “голодного” агара. Разведения клеточной суспензии для облучения и контроля готовили с таким расчетом, чтобы в каждой чашке выросло от 100 до 300 колоний. Выживаемость клеток определяли подсчетом макроколоний, вырастающих через 2 суток при 37°C . Каждый опыт повторялся 5-10 раз. Стандартная ошибка определения средних значений выживаемости клеток при усреднении результатов разных опытов, как правило, не превышала 5 %.

5. Комбинированное облучение - В экспериментах по последовательному облучению клеток бактерий ионизирующим и лазерным излучениями временной интервал между этими видами облучения не превышал 120 с. Одновременное облучение клеток лазерным и α - излучениями осуществляли следующим образом: облучаемые пробы бактерий помещали в камеру α - источника, куда призмой направлялся лазерный пучок.

6. Определение частоты мутирования - Для определения мутированных клеток использовали так называемый метод “бутербродного посева”. Облученные образцы бактерий смывались с поверхности твердого агара с помощью физиологического раствора и сеялись на чашки Петри заполненные 12 мл селективной среды МПА (для получения селективной среды в среду МПА добавляли 50 мл трифенилтетразолинхлорида до автоклавирования и 50 мл 20 %

лактозы на 1 литр селективной среды после нее). Затем чашки Пери заливались вторым слоем питательной среды в количестве 10 мл при температуре агара 42 °С. Параллельно осуществляли посев клеток для определения выживаемости. Растущие на полной питательной среде клетки *E.coli* восстанавливают бесцветный тетразолий до ярко-красного формазана. При низких значениях pH, при сбраживании лактозы, биологическое восстановление тетразолия подавляется. В результате на такой среде (в присутствии лактозы) колонии *lac*⁺ имеют белый цвет, а колонии *lac*⁻ - ярко красный. Счет мутированных колоний проводили с помощью микроскопа МВС-9. Для подсчета колоний под микроскопом использовали специально изготовленную сетку, разделенную на 287 квадратов размером 5x5 мм. Частоту мутирования определяли как соотношение числа мутированных колоний (N_m) к числу выживших клеток (N). Число спонтанных мутаций определенных по той же методике в контрольной (необлученной) культуре было в среднем равно 10^{-7} . Проводилось 5-7 независимых экспериментов, и стандартная ошибка для каждой экспериментальной точки не превышала 5 %.

7. Регистрация времени задержки первого деления клеток. - Для регистрации времени задержки деления контрольные и облученные клетки рассевали на лавсановые ядерные фильтры (диаметр пор 0,53 мкм), нанесенные на поверхность твердой питательной среды, и помещали в термостат при 37 °С. Через определенные сроки клетки смывали с пленок и высевали на твердую питательную среду. О делении судили по увеличению числа колониеобразующих клеток. Каждый опыт повторялся 5-10 раз. Стандартная ошибка, определения средних значений колониеобразующих клеток при усреднении результатов опытов, как правило, не превышала 5 %.

8. Статистическая обработка результатов - Результаты экспериментов обрабатывали на вычислительном комплексе Искра-1256 с использованием метода наименьших квадратов и *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Действие ионизирующих излучений с разными ЛПЭ на клетки бактерий

Escherichia coli K-12 разных генотипов.

Кривые выживания клеток 4-х штаммов бактерий *E.coli* K-12 при облучении их рентгеновскими лучами и α -частицами приведены на рис.1 и 2. Форма представленных кривых хорошо совпадает с формой кривых выживания клеток этих штаммов, описанных в литературе: наибольшей чувствительностью к рентгеновским лучам обладают клетки *gcs* A⁻ и *pol* A⁻ - мутантов. Высокая радиочувствительность *gcs* A⁻ - мутанта связана с тем, что продукт гена *gcs* A необходим для регулирования процесса деградации в дорепликативной репарации ДНК. При подавлении *gcs* A функции наблюдается резкое возрастание деградации ДНК. Однако быстрая система репарации у этого штамма функционирует столь же эффективно, как и у клеток "дикого" типа. Радиочувствительность *pol* A⁻ - мутанта обусловлена недостаточностью ДНК полимеразы I, которой принадлежит ведущая роль в инцизионном репарационном пути (быстрая репарация).

Известно, что облучение ионизирующим излучением клеток, относящихся к разным таксономическим группам, может привести к временной задержке их первого пострадиационного деления. Результаты наших опытов с выдерживанием клеток бактерий *E.coli* K-12 "дикого" типа на поверхности твердой питательной среды при температуре 37 °С показали, что интактные клетки делятся примерно через 1,5 часа после посева, в то время как клетки бактерий облученные α - частицами в дозе 210Гр делятся только через 2,5 часа.

Действие ионизирующих излучений на клетки бактерий *E.coli* K-12 хорошо изучено, и для сравнения полученных данных при использовании других видов излучения всегда можно найти для этого литературные источники. Исходя из таких соображений, мы ограничились вышеприведенными экспериментами действия ионизирующих излучений на эти клетки.

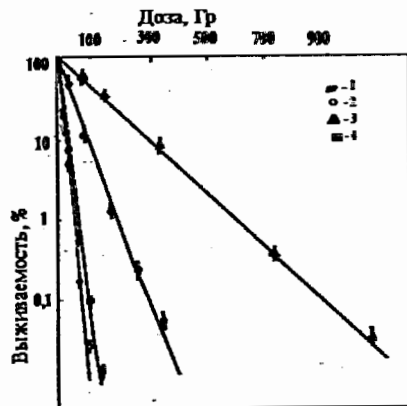


Рис. 1. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (1), Р 3478 (2), BL 1114 (3) и АВ 2463 (4), облученных рентгеновскими лучами. По оси абсцисс – доза облучения, Gr; по оси ординат – выживаемость, %.

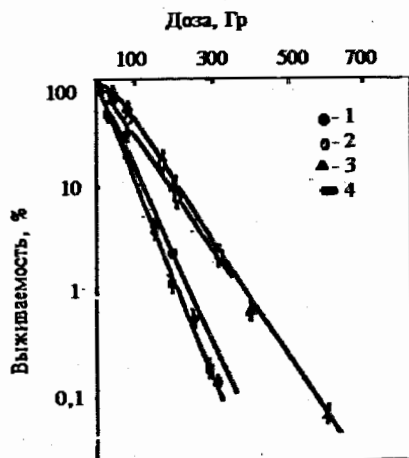


Рис. 2. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (1), Р 3478 (2), BL 1114 (3) и АВ 2463 (4), облученных α -частицами. По оси абсцисс – доза облучения, Gr; по оси ординат – выживаемость, %.

2. Действие лазерных излучений видимого диапазона на клетки бактерий

E.coli K-12 разных генотипов.

Для изучения биологического воздействия лазерных излучений видимого диапазона, нами были выбраны две длины волны – $\lambda = 633$ нм и $\lambda = 532$ нм. Выбор наш пал на эти длины волны не случайно. В клинической практике получило широкое применение низкоинтенсивное излучение He-Ne лазера ($\lambda = 632,8$ нм), которое, несомненно, является успешным в лечении ряда заболеваний, где традиционное медикаментозное лечение является малоэффективным. Однако, систематические исследования (зависимости от длины волны, дозы, интенсивности) о воздействии низкоинтенсивного видимого монохроматического света на клеточном уровне практически отсутствуют. Вторая длина волны – 532 нм была выбрана с целью проверки имеющегося в литературе предположения о том, что клеточные цитохромы, входящие в дыхательную систему бактерий *E.coli*, могут быть первичными фоторецепторами ответственными за биологические эффекты, вызванные излучением с длиной волны 633 нм. На наш взгляд, такой выбор позволяет исследовать закономерности воздействия лазерных излучений видимой области на клетки бактерий, одновременно получая информацию, которая может быть очень полезной для лазерной медицины.

На рис.3 показана зависимость выживаемости клеток 4-х штаммов бактерий *E.coli* K-12 от дозы их облучения гелий-неоновым лазером. Как следует из рис.3, чувствительность клеток к лазерному излучению в ряде исследованных штаммов уменьшается в следующем порядке: радиочувствительные мутанты, дикий тип, суперрезистентный мутант, т.е. чувствительность клеток изученных нами штаммов *E.coli* K-12 к редкоионизирующему излучению и к излучению с длиной волны 633 нм описываются сходной по направленности картиной.

При количественном изучении биологического действия радиации обычно исследуют зависимость биологического эффекта от дозы облучения. Однако, для ряда реакций эффект облучения зависит и от мощности дозы. Эта зависимость характеризуется в радиобиологии понятием “фактор времени”. Для того чтобы выяснить играет ли существенную роль “фактор времени” в условиях наших экспериментов, нами были проведены эксперименты по изучению влияния

мощности излучения гелий-неонового лазера на выживаемость клеток *E.coli K-12* “дикого” типа (при комнатной температуре 25 °С). Результаты экспериментов показали, что эффект, вызванный данной дозой, определяется только величиной этой дозы, интенсивность излучения не играет практически никакой роли.

Были проведены также исследования по влиянию излучения гелий-неонового лазера на срок деления клеток бактерий *E.coli K-12*. Они показали, что облучение клеток лазерным излучением приводит к задержке деления. Контрольные клетки, так же, как и клетки облученные лазерным излучением в дозе $1,3 \cdot 10^2$ мДж/см², делились через 1,5 часа, а клетки, подвергнутые лазерному воздействию в большей дозе делились только через 2,5 ч.

Эти результаты указывают на существование некоторых общих закономерностей действия ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий. Поэтому можно было предположить, что в случае лазерного облучения клеток гибель их тоже связана с повреждениями молекул ДНК. Если такое предположение верно, то лазерное облучение должно привести также к образованию мутаций в клетках бактерий.

В связи с этим, нами были проведены эксперименты по исследованию образования прямых мутаций в лактозном опероне (*lac*⁺ - *lac*⁻ мутации) клеток *E.coli K-12* штаммов Hfr H и P 3478. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 4 и 5. Видно, что излучение с длиной волны $\lambda = 633$ нм оказывает на клетки бактерий не только летальное, но и мутагенное воздействие. Для обоих штаммов наблюдается одинаковая по форме кривая частоты мутирования – при плотности энергии равной $3,2 \cdot 10^4$ мДж/см² наблюдается максимум частоты мутирования, затем кривая идет на спад, а при более высоких дозах снова наблюдается рост частоты мутирования.

Объяснить механизмы летального и мутагенного воздействия излучения с длиной волны $\lambda = 633$ нм очень трудно, т.к. известно, что ни белки, ни нуклеиновые кислоты не поглощают в данной спектральной области. Очевидно, что воздействие носит опосредованный характер. Предполагается, что первичными фоторецепторами при таком воздействии могут являться

клеточные цитохромы, входящие в дыхательную систему клеток бактерий и имеющие максимум поглощения в красной области спектра. Если на самом деле первичными фоторецепторами в данном случае являются цитохромы, то подобные эффекты должны наблюдаться при облучении клеток зеленым светом, который, как известно, также поглощается цитохромами.

Для проверки этого предположения нами были проведены исследования по летальному и мутагенному воздействию зеленого света с длиной волны $\lambda = 532$ нм на Hfr H штамм клеток бактерий *E.coli*. Исследовалось возникновение тех же *lac*⁺ → *lac*⁻ мутаций. Результаты этих экспериментов, приведенные на рис.6, показывают, что свет с длиной волны $\lambda = 532$ нм также оказывает на клетки летальное и мутагенное воздействие. Если сравнить кривые выживания клеток этого штамма при действии на них красного и зеленого света, то можно заметить, что зеленый свет обладает более сильным летальным воздействием, чем красный. Летальная доза для 50 % выживаемости (LD_{50}) при $\lambda = 633$ нм составляет $6,4 \cdot 10^4$ мДж/см², а для излучения с $\lambda = 532$ нм - $2 \cdot 10^4$ мДж/см². Необходимо отметить, что хотя в последнем случае применялся лазер другой мощности, наблюдаемый эффект не может быть связан с этим обстоятельством. В пользу такого утверждения свидетельствуют результаты наших опытов по зависимости летального воздействия излучения $\lambda = 532$ нм от мощности лазера. Они показали, что при изменении мощности лазера на порядок – не наблюдается зависимость эффекта от мощности.

Полученные результаты показывают, что клеточные цитохромы, входящие в дыхательную систему клеток бактерий, могут являться первичными фоторецепторами для излучений с длинами волн $\lambda = 633$ нм и $\lambda = 532$ нм.

3. Фоторадиационные воздействия ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий *E.coli K-12*

Фоторадиационные исследования представляют большой интерес, т.к. биологические объекты могут находиться под такими воздействиями как в природных условиях, так и в производственных. Кроме того, из научной

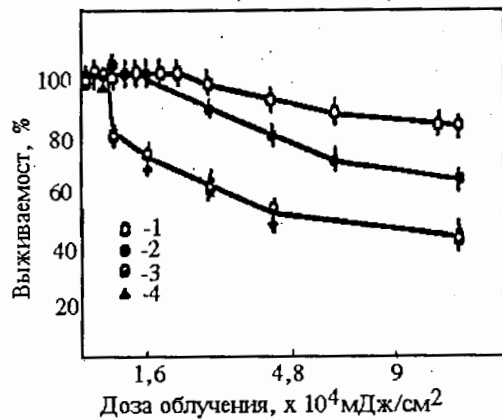


Рис.3. Кривые выживания клеток бактерий E.coli K-12 таммов AB 1157 (2), R 3478 (4), BL 1114 (1) и AB 2463 (3) облученных лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по оси ординат – выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 2 мВт.

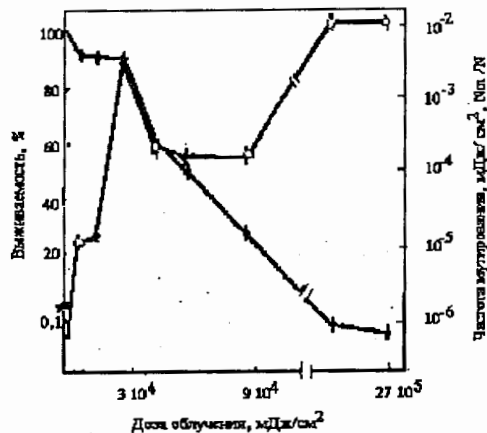


Рис. 4. Кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий E.coli K-12 Nfg H при их облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по осям ординат – частота мутирования (●); - выживаемость (○), %. Мощность лазерного излучения 10 мВт.

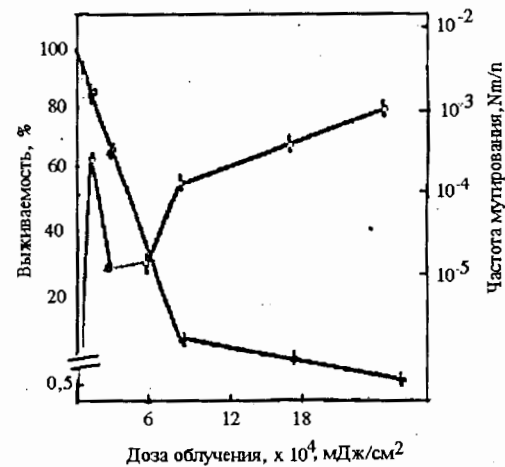


Рис. 5. Кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий E.coli K-12 R3478 при их облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по осям ординат – частота мутирования (●); - выживаемость (○), %. Мощность лазерного излучения 25 мВт.

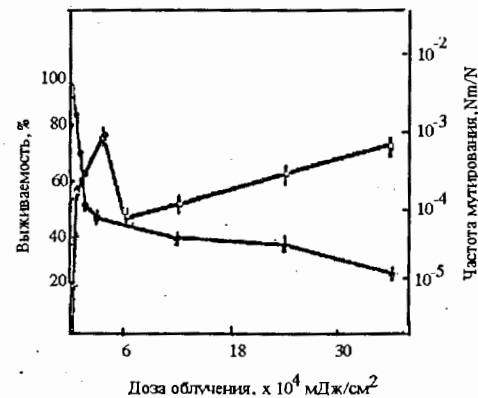


Рис. 6. Кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий E.coli K-12 Nfg H при их облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 532$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по осям ординат – частота мутирования (●); - выживаемость (○), %. Мощность лазерного излучения 25 мВт.

литратуры известно, что при определенных условиях облучения излучение с длиной волны 633 нм может быть использован как радиопротектор.

Нами были проведены исследования по последовательному и одновременному облучению клеток бактерий *E.coli K-12* разных генотипов ионизирующими излучениями (рентгеновскими лучами и α - частицами) и излучением гелий-неонового лазера. Для того чтобы исследовать возможность радиозащитного воздействия лазерного излучения, при комбинированных облучениях нами брались дозы лазерного излучения, не приводящие к летальному эффекту (рис. 3). На рис.7 и 8 приведены кривые выживания клеток бактерий *E.coli K-12* при лазерном воздействии в разных экспозициях до и после рентгеновского облучения. Из рисунков видно, что как предварительное, так и последующее облучение клеток лазерным излучением уменьшает повреждающее действие рентгеновских лучей (антагонистическая реакция). В обоих случаях комбинированного облучения и для всех штаммов оптимальная доза лазерной экспозиции, приводящая к максимальному уменьшению повреждающего эффекта рентгеновских лучей наблюдается при плотности энергии $8 \cdot 10^2$ мДж/см². Можно полагать, что излучение гелий-неонового лазера активирует репарационные системы клетки, и поэтому при совместном действии рентгеновского и лазерного излучений повреждающее действие рентгеновского излучения снижается.

Было также изучено влияние комбинированного облучения клеток бактерий излучением гелий-неонового лазера и α - частицами. В этих экспериментах также брались лазерные экспозиции, не приводящие к летальному эффекту. На рис. 9 и 10 приведены кривые выживания клеток бактерий *E.coli K-12* разных генотипов, подвергшихся лазерному воздействию в разных экспозициях до и после их облучения α - частицами. Из рисунков видно, что выживаемость клеток, подвергнувшихся комбинированным α - и лазерному облучению выше, чем выживаемость клеток, облученных только α - частицами. В обоих вариантах комбинированных облучений и для всех исследованных штаммов, оптимальная доза лазерной экспозиции, приводящая к максимальной фотопротекции или к фотореактивации, как и при комбинированных лазерном и

рентгеновском облучениях соответствует плотности энергии $8 \cdot 10^2$ мДж/см². Из рисунков видно также, что модификация повреждающего действия α - частиц с помощью малых доз лазерного облучения зависит от генотипических особенностей клеток.

При изучении летального и мутагенного воздействия лазерных излучений видимого диапазона с длиной волны 633 нм и 532 нм на клетки бактерий, нами были получены результаты в пользу предположения о том, что первичными фоторецепторами при воздействии этих излучений на клетки бактерий могут быть клеточные цитохромы. В таком случае, возможно, что лазерное излучение с длиной волны 532 нм тоже способно оказать на клетки бактерий фотопротекцию и фотореактивацию. На рис. 11 приведены кривые зависимости эффективности радиозащитного действия предварительного и последующего лазерного облучения (с длиной волны 532 нм) на клетки бактерий, подвергнутых воздействию α - частиц в дозе 210 Гр. Видно, что как предварительное, так и последующее лазерное облучение уменьшают повреждающее действие α - частиц. В обоих вариантах облучения максимальный радиозащитный эффект наблюдается при плотности энергии $3,6 \cdot 10^2$ мДж/см².

На рис.12 приведены кривые выживания клеток бактерий, облученных только α - частицами, а также комбинированно облученных лазерным излучением и α - частицами. Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие лазерного излучения с длиной волны 532 нм уменьшает чувствительность клеток к α - частицам, т.е. в этом случае также наблюдается антагонистическая реакция.

Выше нами проводились исследования по выяснению результатов фоторадиационных воздействий на выживаемость клеток бактерий. Было интересно также выяснить, как влияют фоторадиационные облучения на сроки первого пострадиационного деления клеток бактерий. Для этого нами были проведены исследования по комбинированному облучению клеток бактерий *E.coli* штамма *AB 1157* α - частицами (в дозе 210 Гр) и лазерным излучением с длиной волны 633 нм (в дозе $8 \cdot 10^2$ мДж/см²). Результаты этих экспериментов показали, что клетки бактерий подвергнутые лазерному воздействию до или

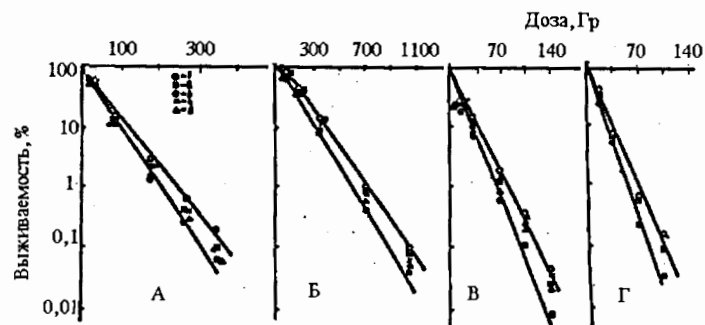


Рис.7. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (А), ВL 1114 (Б), АВ 2463 (В) и Р 3478 (Г) при комбинированных облученных лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм и рентгеновскими лучами. 1- рентгеновские лучи; 2-5 – лазерное облучение в дозах $4 \cdot 10^2$ мДж/см², $8 \cdot 10^2$ мДж/см², $16 \cdot 10^2$ мДж/см², $32 \cdot 10^2$ мДж/см² соответственно + рентгеновское облучение. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 2мВт.

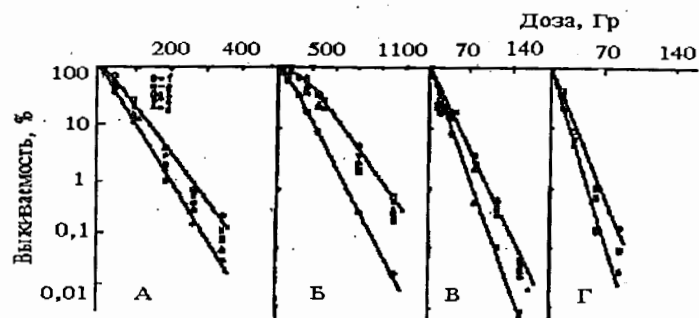


Рис. 8. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (А), ВL 1114 (Б), АВ 2463 (В) и Р 3478 (Г) при комбинированных облученных рентгеновскими лучами и лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм. 1 - рентгеновские лучи; 2-5 – рентгеновское облучение + лазерное облучение в дозах $4 \cdot 10^2$ мДж/см², $8 \cdot 10^2$ мДж/см², $16 \cdot 10^2$ мДж/см², $32 \cdot 10^2$ мДж/см² соответственно. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 2мВт.

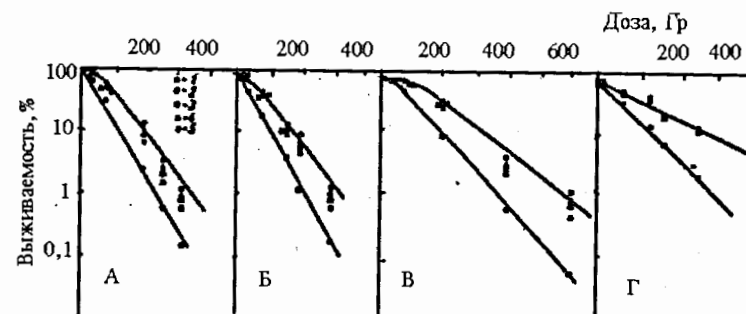


Рис.9. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (А), ВL 1114 (Б), АВ 2463 (В) и Р 3478 (Г) при комбинированных облученных лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм и α -частицами. 1- α - частицы; 2-5 – лазерное облучение в дозах $4 \cdot 10^2$ мДж/см², $8 \cdot 10^2$ мДж/см², $16 \cdot 10^2$ мДж/см², $32 \cdot 10^2$ мДж/см² соответственно + α - облучение. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 2мВт.

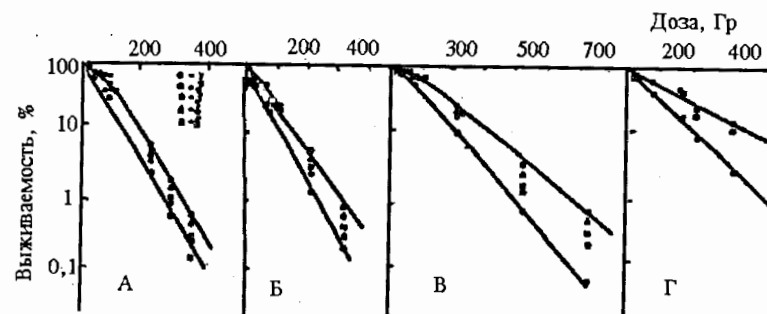


Рис. 10. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (А), ВL 1114 (Б), АВ 2463 (В) и Р 3478 (Г) при комбинированных облученных α -частицами и лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 633$ нм. 1- α -частицы; 2-5 – α - облучение + лазерное облучение в дозах $4 \cdot 10^2$ мДж/см², $8 \cdot 10^2$ мДж/см², $16 \cdot 10^2$ мДж/см², $32 \cdot 10^2$ мДж/см² соответственно. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 2мВт.

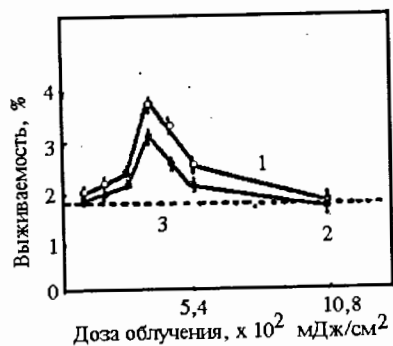


Рис. 11. Кривые зависимости эффективности радиозащитного действия лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 532$ нм на клетки бактерий *E.coli* K-12 штамма АВ 1157 при комбинированном облучении клеток лазерным излучением и α -частицами.

1 - α -частицы + лазерное излучение, 2 - лазерное излучение + α -частицы, 3 - α -частицы в дозе 210 Гр.
По оси абсцисс - доза облучения, мДж/см²; по оси ординат - выживаемость, %.

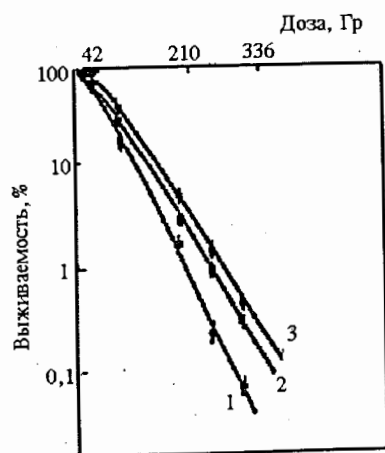


Рис. 12. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штамма АВ 1157 при комбинированном облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 532$ нм и α -частицами.

1 - α -частицы, 2 - лазерное излучение + α -частицы, 3 - α -частицы + лазерное излучение.
По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, %.

после облучения их α -частицами, делятся через 2,5 часа. Ранее нами было показано, что интактные клетки исследованного штамма делятся через 1,5 часа после их посева, а клетки, облученные α -частицами в дозе 210 Гр - через 2,5 часа. Было также показано, что при облучении клеток излучением с длиной волны 633 нм в дозах $3,2 \cdot 10^2$ мДж/см² и больше, первое деление клеток бактерий происходит через 2,5 часа.

Следовательно, можно сказать, что при данных комбинированных облучениях также наблюдается антагонистическая реакция.

Имеющиеся в литературе экспериментальные данные по комбинированному фоторадиационным воздействиям ионизирующих излучений и лазерного света касаются лазерного воздействия на клетки до или после их лучевого поражения. Интересно было выяснить, реакцию клеток на одновременное их облучение лазерным и ионизирующим излучениями, когда лазерное воздействие продолжается в течение всего периода облучения клеток ионизирующим излучением. Нами была исследована реакция клеток бактерий на одновременное облучение лазерным и α -излучениями. Времена экспозиций лазерного и α -облучений во всех случаях были одинаковыми. Оказалось, что выживаемость клеток, подвергшихся облучению лазерным и α -излучениями, существенно превышает выживаемость клеток, облученных только α -частицами (антагонистическая реакция), и что уменьшение повреждающего действия α -частиц зависит от генотипических особенностей клеток.

При одновременном лазерном и α -облучениях клеток бактерий антагонистическая реакция наблюдалась как при нелетальных, так и при летальных дозах лазерного облучения. Мы решили проверить, будет ли зарегистрирован, по аналогии с одновременным облучением, радиозащитный эффект летальных доз лазерного излучения в случае последующего лазерного облучения клеток.

Кроме того, в этих опытах мы использовали лазерные излучения разных мощностей с целью исследования "фактора времени" на эффективность модифицирующего действия одной и той же дозы лазерного излучения.

Проведенные исследования по зависимости выживаемости клеток бактерий при последовательном α - и лазерном облучении от дозы лазерного излучения показали, что при малых дозах лазерного облучения (дозы не летальные для исследованных клеток) наблюдается антагонистическая реакция клеток на облучение. Снижение поражающего действия α - частиц лазерным воздействием регистрируется в интервале плотностей энергии до $\sim 16 \cdot 10^3$ мДж/см². При этом максимальное увеличение радиорезистентности клеток не зависит от мощности лазера и наблюдается при плотности энергии $8 \cdot 10^2$ мДж/см². При больших же экспозициях лазерного облучения (при экспозициях приводящих к летальному эффекту) поражения, вызванные α - частицами и лазерным излучением, суммируются (аддитивная реакция). Это регистрируется при всех использованных нами мощностях лазерных излучений.

4. Действие лазерного УФ излучения на клетки бактерий *E.coli* K-12

Известно, что ультрафиолетовый свет обладает мощным летальным и мутагенным воздействием на биологические объекты. Литературных данных по воздействию УФ излучений на клетки бактерий *E.coli* K-12 очень много. Однако, мы посчитали необходимым проводить свои исследования, при тех же условиях и на тех же штаммах бактерий, для того, чтобы можно было сравнить полученные данные при действии ионизирующих излучений и видимого света с данными полученными при УФ воздействии. Кроме того, большинство исследований по индуцированному УФ излучением мутагенезу получены при использовании света с $\lambda \geq 240$ нм, хотя область 185-240 нм представляет особый интерес, т. к. в этой области располагаются полосы поглощения белков, а также один из пиков поглощения ДНК. Сейчас проведение таких экспериментов стало возможным благодаря развитию лазерной техники.

Нами были проведены исследования по летальному и мутагенному воздействию излучений с длинами волн 216 нм и 270 нм на клетки бактерий *E.coli* K-12. Исследования проводились на штамме Нгг Н. Для выявления прямых

$lac^+ \rightarrow lac^-$ мутаций применялась та же методика, что и в случаях облучения видимым светом.

На рисунках 13 и 14 приведены кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий при их облучении светом с длинами волн 270 и 216 нм.

Из рисунков видно, что в обоих случаях облучение оказывает на клетки бактерий как летальное, так и мутагенное действие. Похожие кривые были получены нами при облучении этих же клеток бактерий светом с длинами волн 633 нм и 532 нм. Такая схожесть видимо свидетельствует в пользу того, что при индуцированном мутагенезе характер кривой частоты мутирования определяется не первичными фоторецепторами и не конкретными фотоповреждениями приводящими к возникновению мутаций, а какими-то общими для всех случаев явлениями.

Хорошо известно, что необлученные клетки бактерий *E. coli* способны образовать филаменты. Частота возникновения филаментов зависит от условий культивирования клеток. В условиях наших экспериментов (рост на полноценной твердой питательной среде при 37 °С) частота образования филаментов может достигнуть 30 %. Предполагается, что fil^+ ген не затрагивает процессы репарации ДНК, но увеличивает чувствительность клеток к радиации.

Учитывая все это, можно предположить, что кривые частоты мутирования клеток бактерий, полученные нами при действии видимого и УФ излучений, состоят из двух компонент: компоненты радиочувствительных филаментов (область малых доз) и компоненты нормальных клеток (большие дозы облучения). Количественные характеристики этих кривых приведены в таблице 1. В той же таблице приведены параметры кривых, полученных нами для видимой области. Видно, что УФ свет обладает очень высокой относительной биологической эффективностью.

Таблица 1

Параметры кривых выживания и частоты мутирования клеток бактерий *E.coli* K-12 HfH.

D_m - доза облучения для индукции 10^{-3} мутаций. LD_{50} - доза облучения, приводящая к 50 % выживаемости.

λ , нм	LD_{50} , мДж/см ²	D_m , мДж/см ²
216	3	26,5
270	1	130
532	$2 \cdot 10^4$	$32 \cdot 10^4$
633	$6,4 \cdot 10^4$	$16 \cdot 10^4$

5. Действие ближнего ИК излучения на клетки бактерий *E. coli* K-12 разных генотипов.

Как уже отмечалось, лазерное излучение широко применяется в медицине. Это касается также лазерного излучения ближней – инфракрасной области. В литературе много работ по терапевтическому влиянию инфракрасного излучения на различные органы и ткани. Часто такое воздействие связывают с нагреванием ткани при облучении. Некоторые авторы с нагреванием связывают также летальное воздействие ИК излучения. Однако есть также данные, которые свидетельствуют о том, что возможны также другие механизмы летального воздействия - в частности образование синглетного молекулярного кислорода, подобно механизму фотодинамического эффекта.

Путем измерения люминесценции 1O_2 была доказана способность мономерных молекул бактериохлорофиллов и бактериофеофитинов (эти соединения являются основными пигментами фотосинтетического аппарата

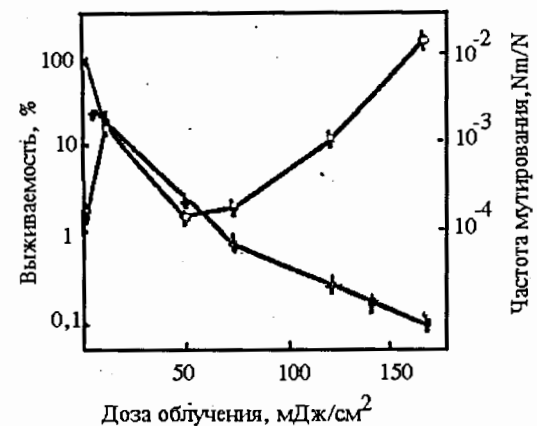


Рис. 13. Кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий *E.coli* K-12 HfH при их облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 270$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по осям ординат – частота мутирования (о); - выживаемость (•), %.

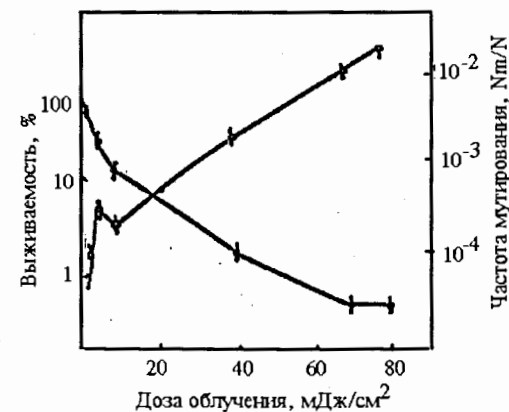


Рис. 14. Кривые выживания и частоты мутирования клеток бактерий *E.coli* K-12 HfH при их облучении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 216$ нм. По оси абсцисс – доза облучения, мДж/см²; по осям ординат – частота мутирования (о); - выживаемость (•), %.

бактерий и обладают максимумом поглощения в ближней ИК – области) эффективно генерировать 1O_2 при их облучении ближним ИК излучением.

Исходя из всего этого, мы предположили, что прямую генерацию синглетного кислорода можно получить при облучении бактерий излучением с длиной волны 1270 нм (где наблюдается один из пиков поглощения молекулярного кислорода).

Кроме этого, приобретение бактериями резистентности по отношению к антибиотикам становится одним из возрастающих проблем современной медицины. В связи с этим рассматриваются возможности применения различных других методов для получения бактерицидного действия. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия.

Проведенные нами исследования по действию на выживаемость клеток бактерий штамма АВ 1157 разных длин волн лазерного ИК облучения (1, 22 - 1, 32 мкм) показали, что самое эффективное летальное воздействие оказывает излучение с длиной волны 1,27 мкм.

На рис. 15 приведена зависимость летальной дозы для 50 % выживания клеток (LD_{50}) от длины волны лазерного излучения. Полученная кривая также свидетельствует в пользу предположения о том, что летальное воздействие лазерного излучения связано с образованием синглетного кислорода. Если бы гибель клеток была связана с нагреванием клеток, то с увеличением длины волны эффект нагревания должен был быть меньше и следовательно летальный эффект должен был быть меньше. В таком случае значение LD_{50} с увеличением длины волны должно было расти.

Далее нами были проведены эксперименты по облучению трех штаммов бактерий *E.coli* K-12: АВ 1157, АВ 2463 и Р3478, лазерным излучением с длиной волны 1270 нм (рис.16). В этой серии экспериментов использовалось лазерное излучение с мощностью примерно в 2 раза больше (40 мВт), чем в вышеприведенных экспериментах (24 мВт). Такая мощность была необходима для определения зависимости летального воздействия лазерного излучения от его мощности. В таблице 2 приведены значения LD_{50} для случаев облучения этих клеток рентгеновскими лучами и лазерным излучением с длиной волны 1270 нм

при разных мощностях дозы. Нетрудно заметить, что относительная чувствительность этих штаммов к рентгеновским лучам схожа их относительной чувствительности к лазерному излучению и, что последняя зависит от мощности дозы облучения.

Таблица 2.

Значения LD_{50} при облучении клеток лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 1270$ нм и рентгеновскими лучами.

Штаммы бактерий	Лазерное облучение		Рентгеновские лучи, LD_{50} , Гр
	мощность, мВт	LD_{50} , м Дж/см ²	
АВ 1157	40	$0.3 \cdot 10^3$	50
	24	$1.0 \cdot 10^3$	50
АВ 2463	40	$0.15 \cdot 10^3$	20
Р 3478	40	$0.15 \cdot 10^3$	20

ВЫВОДЫ

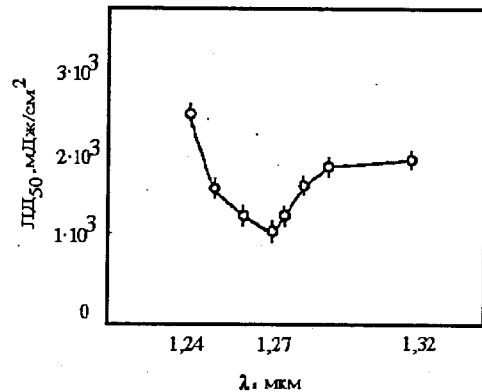


Рис. 15. Зависимость LD₅₀ клеток бактерий *E.coli* K-12 штамма АВ 1157 от длины волны облучения.

По оси абсцисс — длина волны излучения, мкм; по оси ординат — LD₅₀, мДж/см². Мощность лазерного излучения 24 мВт.

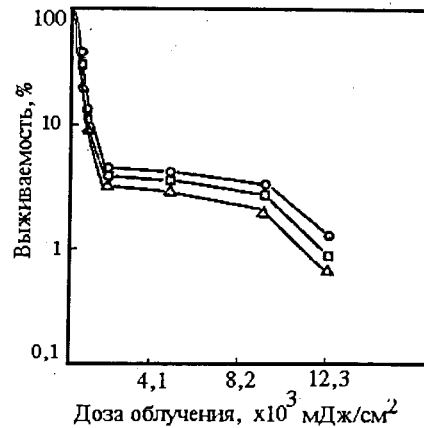


Рис. 16. Кривые выживания клеток бактерий *E.coli* K-12 штаммов АВ 1157 (O), АВ 2463 (□) и Р 3478 (Δ) при их облучении ИК излучением с длиной волны $\lambda = 1,27$ мкм.

По оси абсцисс — доза облучения, мДж/см²; по оси ординат — выживаемость, %. Мощность лазерного излучения 40 мВт.

1. Впервые показано, что чувствительность клеток к лазерному излучению видимой области (532 нм и 633 нм) в ряде исследованных штаммов бактерий *E.coli* K-12 уменьшается в следующем порядке: радиочувствительные мутанты, дикий тип, суперрезистентный мутант, т.е. чувствительность клеток изученных нами штаммов *E.coli* K-12 к редкоиницирующим и лазерным излучениям описываются сходной по направленности картиной. Кривые выживания клеток бактерий состоят из двух участков: участка малых доз и участка больших доз. На участке малых доз летальный эффект лазерного излучения не обнаруживается. На участке больших доз с увеличением дозы облучения выживаемость клеток снижается (экспозиционные дозы лазерного облучения порядка 10^4 мДж/см).
2. Облучение клеток бактерий *E.coli* K-12 лазерным излучением с длиной волны 633 нм приводит к задержке первого после облучения деления клеток: время задержки зависит от дозы облучения. Контрольные клетки, так же, как и клетки, облученные лазерным излучением в дозе $1,3 \cdot 10^2$ мДж/см², делятся через 1,5 часа, в то время как клетки, подвергнутые лазерному воздействию в большей дозе ($3,2 \cdot 10^2$ мДж/см², $16 \cdot 10^2$ мДж/см² и $32 \cdot 10^2$ мДж/см²) делятся только через 2,5 ч. Этот результат представляет большой интерес в связи с тем, что деление клетки не задерживается более, чем на 2,5 ч., а этот срок соответствует сумме времен, необходимой для осуществления медленной репарации клеток бактерий и лаг-фазы. Заслуживает внимания тот факт, что при данных дозах лазерной экспозиции, приводящих к задержке деления клеток, летальный и мутагенный эффекты облучения не наблюдаются.
3. Проведено сравнение частоты мутирования клеток бактерий *E.coli* K-12 (*lac*⁺ → *lac*⁻ мутации) в случаях их облучения видимым (532 и 633 нм) и УФ (270 и 216 нм) излучениями. Показано, что во всех исследованных случаях кривые частоты мутирования имеют одинаковую форму. В области малых доз наблюдается пик частоты мутирования, далее кривая идет на спад, а при

больших дозах облучения снова наблюдается рост частоты мутирования. Такая схожесть может свидетельствовать в пользу того, что при индуцированном этими излучениями мутагенезе характер кривой частоты мутирования определяется не первичными фоторецепторами и не конкретными фотоповреждениями, приводящими к возникновению мутаций, а какими-то общими для всех случаев явлениями. Можно предположить, что кривые частоты мутирования клеток бактерий *E.coli*, полученные нами при действии на них видимого и УФ излучений, состоят из двух компонент: компоненты радиочувствительных филаментов (область малых доз) и компоненты нормальных клеток (большие дозы облучения).

4. Впервые продемонстрировано, что эффективность летального воздействия лазерного излучения ближней инфракрасной области (1220 – 1320 нм) зависит от мощности дозы лазерного излучения, генотипа клеток и максимально эффективна при длине волны излучения 1270 нм. Эта длина волны соответствует одному из максимумов поглощения молекулярного кислорода.
5. Результаты фоторадиационных воздействий комбинированного облучения клеток бактерий *E.coli K-12* лазерным излучением с длиной волны 633 нм и ионизирующими излучениями зависят от варианта комбинации и дозы каждого вида излучения, входящего в использованные комбинации излучений. При нелетальных дозах предварительного и последующего лазерного облучения наблюдается антагонистическая реакция клеток на фоторадиационное воздействие, однако, величина модификации радиационного поражения клеток в случае последующего лазерного облучения больше, чем в случае предварительного облучения. При использовании летальных доз последующего лазерного облучения поражения клеток, вызываемые ионизирующим и лазерным излучениями суммируются, т.е. наблюдается аддитивная реакция клеток на облучение.
6. Впервые показано, что нелетальные дозы излучения гелий-неонового лазера оказывают на клетки бактерий *E.coli K-12* радиозащитное влияние при их облучении рентгеновскими лучами и α - частицами, как при предварительном, так и при последующем лазерном воздействии. Радиозащитное действие

лазерного излучения проявляется в определенном, довольно узком интервале экспозиционных доз с максимальной эффективностью при плотности энергии $8 \cdot 10^2$ мДж/см² независимо от генотипа клеток и мощности лазера. Эффективность радиозащитного действия лазерного излучения для клеток всех исследованных штаммов бактерий при последующем лазерном облучении больше, чем при предварительном.

7. Радиозащитное действие излучения гелий-неонового лазера наблюдается также в проведенных впервые исследованиях по одновременному облучению клеток бактерий *E.coli K-12* излучением лазера и α - частицами. При одновременном лазерном (633нм) и α - облучении клеток бактерий радиозащитный эффект лазерного излучения наблюдается как при нелетальных, так и при летальных его дозах.
8. Многие известные радиозащитные вещества вводятся в организм только перед облучением, введение протекторов в пострadiационный период неэффективно. В случае же лазерного облучения защитный эффект наблюдается как при предварительном, так и при последующем лазерном облучении. Кроме того, защитный эффект радиопротекторов зависит от ЛПЭ ионизирующих излучений: многие протекторы эффективно защищают клетки от поражающего действия рентгеновских лучей, но при α - облучении тех же клеток оказываются неэффективными. Радиозащитный эффект лазерного облучения клеток, в отличие от химических протекторов, универсален: лазерная обработка эффективна для всех исследованных штаммов бактерий *E.coli K-12*, для случаев предварительного и последующего лазерного облучения, при использовании как редкоионизирующих, так и плотноионизирующих излучений. Все эти свойства являются преимуществами применения лазерной обработки клеток в целях получения радиозащитного эффекта по сравнению с химическими протекторами. Кроме того, известно, что получение радиопротекторов, эффективных после радиационного поражения биологических объектов является одной из актуальных задач радиационной защиты.

9. Радиозащитное действие излучения гелий-неонового лазера на клетки бактерий *E.coli K-12* разных генотипов (после их облучения рентгеновскими лучами или α - частицами) наблюдается во временном интервале до четырех часов пострадиационного выдерживания клеток при комнатной температуре, на поверхности "голодного" агара. Это характерно для всех исследованных штаммов бактерий. Однако необходимо отметить, что эффективность радиозащитного действия лазерного излучения зависит от интервала времени между двумя видами облучений: максимальный радиозащитный эффект для всех исследованных штаммов наблюдался в течение первого часа пострадиационного выдерживания клеток, а дальше постепенно уменьшается.
10. Исследования по летальному, мутагенному и радиозащитному действию лазерного излучения с длиной волны 532 нм показали, что это излучение способно оказать на клетки бактерий *E.coli K-12* такое же биологическое воздействие, как и излучение с длиной волны 633 нм. Этот факт свидетельствует в пользу существующего в научной литературе предположения о том, что клеточные цитохромы, входящие в дыхательную систему клеток бактерий *E.coli*, могут являться первичными фоторецепторами при воздействии на них оптического излучения видимого диапазона.
11. Использованный при проведении исследований подход поиска общих закономерностей действия всего спектра электромагнитных излучений на биологические объекты и сопоставление эффектов ионизирующего излучения и света с различной длиной волны позволили существенно расширить границы наших знаний о реакции клеток бактерий *E.coli K-12* на воздействие лазерных (оптических) излучений. Существующие ранее литературные данные по действию видимого и инфракрасного лазерных излучений на биологические объекты касались только их стимулирующего влияния на различные метаболические процессы. Это, вероятно, было связано с тем, что самыми доступными для проведения биологических экспериментов оказались низкоинтенсивные лазеры, а для получения летального и мутагенного эффекта с их помощью нужны были очень длительные лазерные экспозиции.

1. Полученные данные по летальному и мутагенному действию лазерного излучения с длиной волны 633 нм очень важны для лазерной терапии. Эти данные указывают на то, что при проведении терапии с помощью этого лазера обязательно необходимо установить и строго придерживаться предписанной дозы облучения (с учетом индивидуальной чувствительности пациента), т.к. повышение дозы облучения может привести к негативным последствиям.
2. Лазерное излучение с длиной волны 216 нм, которое обладает очень высоким мутагенным воздействием, можно использовать в микробиологии для селекции штаммов бактерий с различными генетическими свойствами, необходимыми в различных областях науки и народного хозяйства.
3. Приобретение бактериями резистентности по отношению к антибиотикам уже давно стало серьезной проблемой современной медицины. В связи с этим рассматриваются возможности применения других методов для достижения бактерицидного действия. Инфракрасное лазерное излучение, с длиной волны 1270 нм, подходит для применения как бактерицидное средство в медицине, различных областях техники и народного хозяйства. Это излучение может быть использовано в качестве метода защиты от микроорганизмов также в условиях космического полета. Известно, что свойство микробов, обитающих на космических аппаратах, вызывать разрушающее действие, которое ухудшает качество материалов, применяемых для обеспечения безопасности космических полетов, и даже приводит к неисправности бортовых приборов, стало одним из актуальных проблем космической биологии.
4. Лазерное излучение с длиной волны 1270 нм можно использовать в фотодинамической терапии опухолей. Очевидным преимуществом этого излучения является то, что при его использовании нет необходимости использовать фотосенсибилизаторы, что обычно делается при использовании излучений других длин волн.
5. Излучение гелий-неонового лазера можно использовать в радиационной защите как радиозащитное средство, т.к. в научной литературе есть данные о

радиозащитном действии этого излучения на животных и человека, а проведенные нами исследования показывают его универсальность. Излучение с длиной волны 633 нм можно также использовать в медицинской радиологии для обработки (или профилактики образования) ожогов кожи пациентов, которые нередко наблюдаются при радиотерапии.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян, Ц.М. Авакян, А.Г. Арутюнян - Влияние излучения гелий-неонового лазера на чувствительность клеток бактерий *E.coli K-12* к ионизирующему излучению. - Тезисы докладов XII Всесоюзной конференции по когерентной и нелинейной оптике, Москва, 1985, с.179-180.
2. К.Ш. Восканян, Ц.М. Авакян, А.Г. Арутюнян, Н.В. Симонян - Влияние излучения гелий-неонового лазера на чувствительность клеток бактерий *E.coli K-12* к рентгеновским лучам. - Радиобиология, том.25, вып.4, 1985, с.557-559.
3. Ц.М. Авакян, К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян - Модификация радиочувствительности клеток бактерий при одновременном облучении их лазерным и α -излучениями. - Материалы совещания научного совета СССР на тему "Модификация радиочувствительности биологических объектов и ее значение для практики", г.Эчмиадзин, Армения, 1985, с.45-46.
4. К.Ш. Восканян, Ц.М. Авакян, Н.В. Симонян - Модификация повреждающего действия α -частиц на клетки бактерий *E.coli K-12* с помощью низкоинтенсивного лазерного излучения. - Радиобиология, том.26, вып.3, 1986, с. 375-377.
5. Ц.М. Авакян, К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян - Комбинированное действие лазерного и ионизирующих излучений на выживаемость радиочувствительного мутанта бактерий *E.coli K-12*. - Биологический Журнал Армении, т. XXXIX, №3, 1986, с. 200-203.

6. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян - Генетическая детерминированность модификации радиационного повреждения бактерия *E.coli K-12* с помощью лазерного излучения. - Тезисы II республиканской конференции посвященной проблемам физико-химической биологии, Ереван, Армения, 1986, с. 200-203.
7. Карагезян К.Г., Гурздян Г.Г., Захарян Р.А., Испирян Р.К., Варданян М.К., Восканян К.Ш., Овакимян С.С. - Лазерно - индуцированное изменение проницаемости мембран клеток костного мозга. - Тезисы II республиканской конференции посвященной проблемам физико-химической биологии, Ереван, Армения, 1986, с. 68-69.
8. Восканян К.Ш., Симонян Н.В. - Генетическая детерминированность модификации радиационного поражения клеток бактерий *E.coli K-12* с помощью лазерного излучения. - Тезисы II республиканской конференции посвященной проблемам физико-химической биологии, Ереван, Армения, 1986, с.83.
9. Т. М. Avakian, K.S. Voskanyan, N.V. Simonyan - The influence of combines helium-neon laser and ionizing radiation at the sensitivity of *E.coli K-12* - Abstracts of the 14th Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Los-Angeles, USA, 1986, p.275.
10. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян, Ц.М. Авакян - Радиозащитное действие гелий-неонового лазерного света на клетки бактерий при одновременном облучении их ионизирующим и лазерным излучениями. - *Studia Biophysica*, vol.116, №2, 1986, p. 101-106.
11. Ц.М. Авакян, К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян - Эффективность воздействия излучения гелий-неонового лазера на клетки бактерий *E.coli K-12* в зависимости от мощности лазера. - Биологический Журнал Армении, т.40, №2, 1987, с. 101-105.
12. Т. М. Avakian, K.S. Voskanyan, N.V. Simonyan - Simultaneous irradiation of bacteria cells with helium-neon laser and α -particles. - Abstracts of the 15th Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Sheraton Bal Harlour, USA, 1987, p. 129.

13. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян, Ц.М. Авакян, Г.М. Авакян – Эффективность радиозащитного действия излучения He-Ne лазера на клетки бактерий в зависимости от интервала времени между двумя видами облучения. - Радиобиология, т.27, №5, 1987, с.305-308.
14. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян, Ц.М. Авакян – О некоторых общих закономерностях действия на клетки лазерного излучения и ионизирующей радиации. - Доклады АН Арм. ССР, том LXXXVI, №1, 1988, с. 32-35.
15. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян - Влияние излучения He-Ne лазера на сроки деления клеток бактерий. - Радиобиология, т.28, №2, 1988, с.262-264.
16. К.Ш. Восканян, Н.В. Симонян, Ц.М. Авакян Эффективность воздействия лазерного излучения на клетки бактерий в зависимости от мощности лазера - Studia Biophysica, vol. 128, №1, 1988, p. 21-25.
17. G.G. Gurzadian, R.K. Ispiryan, K.S. Voskanyan - Two-quantum photoprocesses in DNA and water at picosecond laser UV 216 and 270 nm irradiation. - Abstracts of the IV symposium of photochemistry. Auzenac, Germany, 1988, p. 217.
18. Г.Г. Гурзядян, К.Ш. Восканян - Применение лазеров в биологии. - Жур. "Наука и техника" АН Армении, Сентябрь, 1989, с. 26-29.
19. K. S. Voskanyan - Some generale regularities of laser and ionizing radiation action on bacteria cells. - Abstracts of the III congress of the European society for photobiology, Budapest, Hungary, 1989, p. 186.
20. K. S. Voskanyan, A.H. Harutunian, G.A. Paitian, R.K. Ispiryan, A.A. Papanyan- Photobiological action effects of laser radiation on bacteria cells. - Abstracts of the International Conference on Lasers 90, Bulgaria, 1990, p.129.
21. Voskanyan K.Sh. - 633 nm light induces mutations. - Studia Biophysica, v.139, 1, 1990, p.43-46.
22. G.G. Gurzadian, R.K. Ispiryan, K.S. Voskanyan – Two-quantum photoprocesses in DNA and water at picosecond UV irradiation. - Journal of Photochemistry and Photobiology, №11, 1991, p. 269-275.
23. K. S. Voskanyan - Laser light induced bacteria mutagenesis. - Abstracts of the International conference on "Lasers' 93", Nevada, USA 1993.

24. К.Ш. Восканян – Новое радиозащитное средство. - Жур. "Наука и техника" АН Армении, декабрь, 1993, с. 17-19.
25. K. S. Voskanyan, G.M. Arzumnyan - 532nm light radioprotective action - Abstracts of the International Conference on "Lasers' 94", Quebec, Canada, 1994, p. 148.
26. K. S. Voskanyan - UV and visible light induced mutations in *Escherichia coli* - Abstracts of the International Conference on "Lasers' 95", Charleston, USA, 1995, p.216.
27. К.Ш. Восканян, Г.М. Арзуманян - Радиозащитное действие лазерного излучения с длиной волны 532нм.- Радиационная биология, радиоэкология, т.36, вып.5, 1996, с. 731-733.
28. K. S. Voskanyan, A.H. Harutunyan and A.A. Melkonyan - Near IR radiation action on bacteria. - Abstracts of the International Conference "Lasers '97". New Orleans, USA, 1997, p.84.
29. K. S. Voskanyan, G.M. Arzumnyan - Some general regularities of ionizing and 632nm laser radiation action on bacteria - Abstracts of the 7th Congress of the European Society for Photobiology, Stresa, Italy, 1997, p.103.
30. К.Ш. Восканян, Г.М. Арзуманян - О радиозащитном действии видимого света. - Сборник трудов Международной конференции "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии", Дубна 1997, том. II, с.128-132.
31. G.M. Arzumanyan, K.S. Voskanyan, E.A. Krasavin and A.V. Rzyanina- Lethal and mutagenic effects of gamma- rays and alpha-particles on yeast cells. - Abstracts of the 29th Meeting of the European Society for Radiation Biology, Capri, Italy, 1998, p.53.
32. K. S. Voskanyan, G.M. Arzumnyan - Peculiarities of the radioprotective effect of visible light. - Abstracts of the 8th Congress of the European Society for Photobiology, Granada, Spain, 1999, p.155.
33. K. S. Voskanyan - Modification of the damaging effect of ionizing radiation on cells by low intensity visible light. - Abstracts of the EOS/SPIE/ELA European Biomedical Optics Week- EBIOS 2000, Amsterdam, Netherlands, 2000, p.146.
34. K. S. Voskanyan - Laser light induced mutations in *Escherichia coli*. - Труды второй международной конференции «Проблемы биохимии, радиационной и

космической биологии» памяти академика Н.М. Сисакяна. 2001, г. Дубна, Россия, том I, с. 130-136.

35. K. S. Voskanyan, A.H. Arutunyan, A.A. Melkonyan. - Near IR radiation action on bacteria. - Abstracts of the 9th Congress of the European Society for Photobiology, 2001, Lillehamer, Norway, p.72.
36. К.Ш. Восканян - Бактерицидное действие лазерного ИК излучения. – Авиакосмическая и экологическая медицина, т. 36, № 5, 2002, с. 42-45.

Получено 12 декабря 2003 г.