

Б-33

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ СССР  
ПО ПРОДОВОЛЬСТВУ И ЗАКУПКАМ  
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ РАДИОЛОГИИ

На правах рукописи

19-91-472

БАША  
Сергей Григорьевич

ЗАКОНОМЕРНОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ  
ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ НА КЛЕТКИ  
SALMONELLA TYPHIMURIUM  
В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ РАДИОМОДИФИКАТОРОВ

Специальность: 03.00.01 - радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

Обнинск 1991

Работа выполнена в Объединенном институте ядерных исследований,  
Дубна.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Е. А. Красавин

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук В. Г. Петин

кандидат биологических наук С. А. Гераськин

Ведущая организация - Институт цитологии АН СССР, Ленинград.

Защита диссертации состоится "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1991 года на  
заседании специализированного Совета по радиобиологии А 120.81.01  
при Всесоюзном научно-исследовательском институте сельскохозяй-  
ственной радиологии Госкомиссии СССР по продовольствию и закупкам  
(Москва, Волков переулок, д. 4).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всесоюзного  
научно-исследовательского института сельскохозяйственной радиоло-  
гии. Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 249020,  
Калужская обл., г. Обнинск, ВНИИСХР, Спецсовет.

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1991 г.

Ученый секретарь специализированного Совета

кандидат биологических наук

Н. И. Санжарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В связи с глобальным ухудшением экологи-  
ческой обстановки, возникновением радиозоологических аномалий пробле-  
ма малых доз облучения в настоящее время приобрела особую остроту.  
Одним из подходов к решению этой проблемы является изучение законо-  
мерностей и механизмов мутагенного действия излучений, различающихся  
по физическим характеристикам, на клетки различного генотипа. Уста-  
новлено, что специфика мутагенеза, индуцированного излучениями с  
различной линейной передачей энергии (ЛПЭ), обуславливается влиянием  
факторов физической и биологической природы. Важнейшим биологическим  
фактором являются системы репарации повреждений ДНК, физическим -  
пространственное распределение энергии в генетических структурах кле-  
ток. Наиболее полно механизмы репарации ДНК и их роль в мутационном  
процессе изучены у бактериальных клеток. С учетом этого обстоятель-  
ства можно полагать, что специфику мутагенного действия излучений  
широкого диапазона ЛПЭ детально можно установить прежде всего в  
исследованиях на клетках прокариот. Особый интерес в этой связи  
представляют штаммы с известной молекулярной природой нарушений  
структуры генов, обуславливающих мутантный фенотип (тест-штаммы  
Эймса).

Одним из подходов к установлению механизмов действия ионизирующих  
излучений на генетический аппарат клеток являются исследования законо-  
мерностей индуцированного радиацией мутагенеза в условиях влияния  
модифицирующих факторов. Показано, что важную роль в формировании ген-  
ных мутаций у прокариот при действии ионизирующих излучений разного  
качества играют "комплексные повреждения" ДНК, восстанавливаемые лишь  
в процессе *recA-lexA*-зависимой репарации (Козубек С. и соавт., 1989).  
Выход таких повреждений с ростом ЛПЭ увеличивается, а их модифицируе-  
мость различными химическими радиомодификаторами, судя по результатам  
летального действия излучений на клетки, снижается (Амиртаев К. Г. и  
соавт., 1985). С учетом изложенного представляется важным изучить влия-  
ние различных радиомодифицирующих агентов (протекторов и сенсibiliза-  
торов) на индукцию мутаций у штаммов с различной природой премутацион-  
ных нарушений в генах при действии ионизирующих излучений, различа-  
ющихся по физическим характеристикам. Однако такие исследования до  
последнего времени проведены не были.



Цель и задачи работы. Исходя из изложенного, целью настоящей работы являлось изучение влияния радиопротекторов различных классов, аноксии и аноксического сенсibilизатора на индукцию мутаций у различных штаммов *Salmonella typhimurium* при действии ионизирующих излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне. Для реализации указанной цели необходимо было решить следующие основные задачи:

-изучить закономерности летального действия излучений с разной ЛПЭ на клетки *S. typhimurium* в условиях влияния различных радио-модификаторов;

-изучить закономерности модифицирующего действия радиопротекторов на частоту образования мутаций у различных штаммов *S. typhimurium* при облучении ионизирующими излучениями, различающимися по ЛПЭ;

-исследовать влияние аноксии на частоту образования мутаций у штаммов с различной молекулярной природой премутационных повреждений при  $\gamma$ -облучении и действии ускоренных тяжелых ионов;

-изучить закономерности модифицирующего влияния аноксического сенсibilизатора на частоту образования мутаций у различных штаммов *S. typhimurium* при действии излучений с разной ЛПЭ.

Научная новизна и практическая ценность работы. В результате проведенных исследований впервые получены следующие новые факты, которые выносятся на защиту:

-установлено, что зависимость эффективности мутагенного действия ионизирующих излучений от величины ЛПЭ определяется характером премутационных повреждений ДНК;

-выявлено, что модифицирующее влияние глицерина и цистеина на радиационно-индуцированный мутагенез у клеток *S. typhimurium*, различно. Глицерин уменьшает мутагенное действие  $\gamma$ -излучения, цистеин является малоэффективным агентом;

-показано, что с ростом ЛПЭ излучений, защитное действие глицерина на частоту мутирования клеток снижается;

-установлено, что модифицирующее влияние аноксии на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез клеток *S. typhimurium* определяется характером премутационных нарушений ДНК. Реверсии, обусловленные заменами в Т-А и G-C парах оснований, являются соответственно зависимыми и независимыми от кислорода;

-показано, что аноксический сенсibilизатор TAN, вызывает резкое повышение частоты мутирования клеток при  $\gamma$ -облучении в условиях аноксии. Степень сенсibilизации зависит от характера нарушений, определя-

ющих мутантный фенотип. С повышением ЛПЭ излучения сенсibilизирующее влияние TAN снижается.

Материалы, полученные при выполнении диссертационной работы, имеют важное значение для радиобиологии и радиационной генетики. Они могут быть использованы при дальнейшей разработке вопросов механизма мутагенного действия излучений разного качества, проведении оценок генетической опасности ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками.

#### Объем работы

Диссертация состоит из введения, 4-х глав и выводов; изложена на 120 страницах машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 159 наименований, из них 39 работ на русском языке.

#### Апробация

Материалы диссертации доложены: на Биофизических семинарах ОИЯИ (Дубна, 1989, 1990, 1991), Международном рабочем совещании по генетическому действию корпускулярных излучений (Дубна, 4 - 6 октября 1989), Международном рабочем совещании по исследованию механизмов радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК (Дубна, 12-14 июня 1990), 9-м Конгрессе по радиационным исследованиям (Торонто, 7-12 июля 1991), 4-м Рабочем совещании по биологическому действию тяжелых заряженных частиц (Дармштадт, 23-25 сентября 1991).

Диссертационная работа апробирована на Биофизическом семинаре Объединенного института ядерных исследований (18 июня 1991 г.) и на семинаре ВНИИ сельскохозяйственной радиологии Госкомиссии СССР по продовольствию и закупкам (15 сентября 1991 г.).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Источники ионизирующих излучений

В экспериментах применяли ионизирующие излучения широкого диапазона ЛПЭ. Были использованы ионы дейтерия, гелия и углерода, полученные на изохронном двухметровом ускорителе многозарядных ионов У-200 Объединенного института ядерных исследований. В качестве "стандартного" источника применяли  $\gamma$ -излучение  $^{137}\text{Cs}$ . Физические характеристики излучений представлены в табл.1.

Таблица 1. Физические характеристики использованных излучений

Вид излучения	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	Мощность дозы, Гр/с	Источник
$\gamma$ -излучение	-	0,3	0,4	$^{137}\text{Cs}$
$^2\text{D}$	7,5	5	3,2	$\gamma$ -200
$^2\text{D}$	6,3	8	5,1	-
$^4\text{He}$	8,3	20	9,3	-
$^4\text{He}$	5,2	38	5,4	-
$^4\text{He}$	4,7	40	6,2	-
$^4\text{He}$	2,8	50	7,6	-
$^4\text{He}$	1,5	80	12,9	-
$^{12}\text{C}$	7,6	220	1,5	-

#### Штаммы

В работе использовали тест штаммы Эймса *Salmonella typhimurium*: TA98, TA100, TA102. Штаммы были получены от Б.Эймса (отдел биохимии, Калифорнийский университет, Беркли, США).

Тест штаммы Эймса имеют *his*<sup>-</sup> фенотип с различными типами мутаций в гистидиновом опероне (Maron, Ames, 1983). Так, штамм TA98 несет мутацию *hisD3052* в гене *hisD*. Этот штамм сконструирован для выявления мутагенов, действие которых обусловлено сдвигом рамки считывания в последовательности, состоящей из 8 оснований -GC-. Мутация *hisG46* штамма TA100 предназначена для выявления агентов, вызывающих замену G-C пары оснований. Штамм TA102 несет *ochre* мутацию в *hisG* гене и отличается от остальных штаммов тем, что мутация *hisG428* введена в плазмиду pAQ1, в результате чего в клетке имеется в среднем 30 копий мутантного гена. Штаммы TA98 и TA100 являются дефектными по эксцизионной репарации. Все использованные штаммы несут плазмиду pKM101, содержащую гены *musA* и *musB*, кодирующих синтез белков, аналогичных белкам *umuC* и *umuD* клеток *E. coli*.

#### Среды

Клетки *S. typhimurium* выращивали в питательной среде Oxoid No2. Для ресуспендирования, разведения и облучения клеток использовали M9 буфер (19,7 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 43,7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 23,2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 9 мМ NaCl, pH 7,6). Тестирование обратных мутаций осуществлялось на чашках с "минимальным" агаром (15 г/л агар-агара, 0,5 мг/л

натрий лимоннокислый и 50 мл/л 40% глюкозы). На поверхность "нижнего" агара заливали "верхний" агар (6 г/л агар-агара и 5 г/л NaCl) с суспензией тестируемых клеток (Maron, Ames, 1983).

#### Радиомодификаторы

В качестве радиопротекторов в работе использовали два класса соединений: цистеамин - представитель класса аминокислот и глицерин - представитель класса многоатомных спиртов. Цистеамин ( $\beta$ -меркаптоэтиламин) производства фирмы Sigma применяли в концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  М, глицерин (фирма Serwa) - в концентрации 1 М. В качестве аноксического сенсibilизатора использовали нитрокислородный стабильный радикал TAN (2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон-N-оксил), полученный из Института химической физики АН СССР г. Москва. TAN применяли в концентрации  $10^{-3}$  М, при концентрации клеток в суспензии  $10^9$  кл/мл.

#### Методика выявления реверсий у клеток *S. typhimurium*

Культуру клеток выращивали в питательной среде Oxoid No2 при 37°C и интенсивной аэрации до плотности  $(2-3) \cdot 10^9$  клеток/мл. Для предотвращения потери плазмид в питательную среду добавляли 25 мкг/мл ампицилина и 2 мкг/мл тетрациклина (TA102). После выращивания клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в M9 буфере. Перед облучением к части образцов добавляли радиомодификатор и инкубировали в течении 20 мин при 37°C. Облучение на  $\gamma$ -установке проводили при 0°C. Для достижения аноксии суспензию клеток в течении 20 мин барботировали азотом.

Облучение ускоренными ионами проводили на лавсановых фильтрах (производства Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ) с диаметром пор  $\approx 0,5$  мкм. Для достижения аноксии при облучении многозарядными ионами применяли специально разработанную методику, позволяющую облучать клетки в суспензии. После барботации азотом 10 мкл клеточной суспензии наносили в стеклянные камеры глубиной 300 мкм, затем камеры накрывали лавсановой пленкой толщиной 15 мкм и уплотняли гайкой с резиновой прокладкой. Все операции проводили в боксе в атмосфере азота. После облучения тестируемые клетки смывали M9 буфером. Параллельно проводили эксперименты в идентичных условиях на  $\gamma$ -установке.

#### Спонтанный мутагенез у тест штаммов *S. typhimurium*

Количество спонтанных ревертантов в наших экспериментах определяется двумя слагаемыми: числом спонтанных ревертантов, возникающих в процессе роста ночной культуры в суспензии ( $N_1$ ) и в процессе роста культуры на чашках после облучения ( $N_2$ ). Суммарное количество

спонтанных ревертантов можно определить при подсчете ревертантных колоний на чашках, не подвергавшихся облучению. Значение  $N_2$  определяется методом подсчета ревертантных колоний на чашках после облучения дозой летальной, для всех имеющихся в суспензии ревертантов, но не вызывающей гибели достаточного для дальнейшего размножения числа аукотрофных клеток.

#### Расчет выхода индуцированных ревертантов

Величину выхода индуцированных ионизирующим излучением ревертантов ( $N_m$ ) определяли по формуле:

$$N_m(D) = M(D) - N_1 \cdot S(D) - N_2, \quad (1)$$

где  $M(D)$  — общее количество ревертантов на чашку,  $S(D)$  — выживаемость,  $N_1$  и  $N_2$  — количество спонтанных ревертантов, возникающих в процессе роста ночной культуры в суспензии и в процессе роста культуры на чашках после облучения, соответственно.

#### Методы статистического анализа

Частоту мутирования клеток определяли как отношение числа индуцированных мутантов  $N_m(D)$  к количеству выживших клеток  $N_0 \cdot S(D)$ . Полученные результаты подвергали статистической обработке. Зависимость  $N_m/N(D)$  аппроксимировали степенной функцией:

$$N_m/N(D) = k \cdot D^{\alpha}, \quad (2)$$

где  $D$  — доза облучения. Параметры  $\alpha$  и  $k$  определяли методом минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических величин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Летальное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки *S. typhimurium*

На рис.1 представлены результаты экспериментов по летальному действию различных типов ионизирующих излучений на клетки *S. typhimurium* TA98 и TA100. Значения радиочувствительности у штаммов TA98 и TA100 при облучении различными типами излучений совпадают, поскольку используемые штаммы изогенны. Зависимость  $D_0^{-1}(L)$  описывается кривой с максимумом (рис.2), это связано с тем, что с ростом ЛПЭ излучений выход прямых двуниевых разрывов (ПДР), являющихся летальными повреждениями для клеток с одной хромосомой, резко возрастает, между тем как выход энзиматических двуниевых разрывов (ЭДР) ДНК снижается (Красавин Е.А., 1989). Максимальное значение ОБЭ составило  $1,4 \pm 0,3$  при облучении

ионами гелия ( $L=50$  кэВ/мкм).

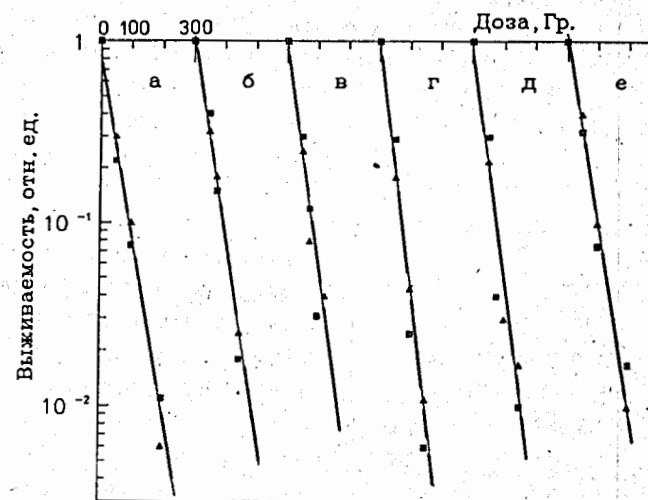


Рис.1. Кривые выживания клеток *S. typhimurium* TA98 ( $\blacktriangle$ ) и TA100 ( $\blacksquare$ ) при облучении различными типами излучений:  $\gamma$ -лучи (а), ионы дейтерия 5 кэВ/мкм (б) и 8 кэВ/мкм (в), ионы гелия 50 кэВ/мкм (г) и 80 кэВ/мкм (д), ионы углерода 220 кэВ/мкм (е). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: фракция выживших клеток, отн. ед.

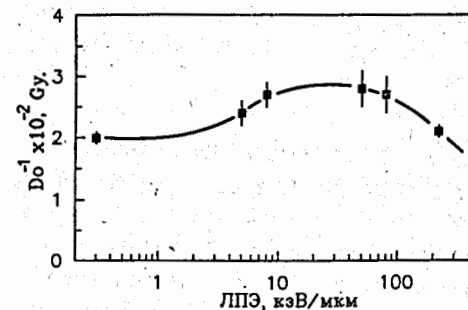


Рис.2. Зависимость радиочувствительности ( $D_0^{-1}$ ) клеток *S. typhimurium* TA98 и TA100 от ЛПЭ излучений. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: радиочувствительность, Гр $^{-1}$ .

### Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки *S. typhimurium*

Использование штаммов Эймса с различной природой нарушений структуры генов, обуславливающих мутантный фенотип, оказалось весьма эффективным при анализе закономерностей мутагенного действия ионизирующих излучений с разной ЛПЭ. На рис.3 представлены зависимости относительной генетической эффективности (ОГЭ) для штаммов TA98 и TA100 от ЛПЭ излучений. Видно, что для штамма TA98 наблюдается ниспада-

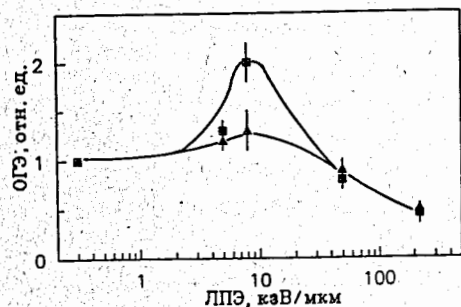


Рис.3. Зависимость ОГЭ от ЛПЭ для клеток *S. typhimurium* TA98 (▲) и TA100 (■): По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: ОГЭ, отн. ед.

дающая зависимость ОГЭ(L), для TA100 - зависимость с максимумом. Зависимость ОГЭ(L) с максимумом является следствием того, что премутационным повреждением для клеток TA100 являются комплексные повреждения (КП) ДНК (Козубек С. и соавт., 1989), выход которых увеличивается с ростом ЛПЭ. Выявлено, что такие повреждения являются также SOS-индуцируемыми. Эти обстоятельства объясняют характер зависимости ОГЭ от ЛПЭ с локальным максимумом. Для штамма TA98 ниспадающий ход зависимости связан с тем, что премутационными повреждениями в этом случае являются повреждения оснований (ПО) ДНК, выход которых с ростом ЛПЭ снижается.

### Модифицирующее влияние радиопротекторов на выживаемость и мутагенез клеток *S. typhimurium* при действии излучений с разной ЛПЭ

В работах ряда авторов было установлено, что в условиях влияния перехватчиков  $\text{OH}^\circ$ -радикалов существенно снижается выход радиационно-индуцированных повреждений ДНК (Alper, 1979), часть которых может являться премутационными. В связи с этим представляется важным изучить специфику модифицирующего влияния перехватчика  $\text{OH}^\circ$ -радикалов - глицерина на мутагенез штаммов Эймса при действии излучений с разной ЛПЭ.

На рис.4 представлены зависимости радиочувствительности изогенных

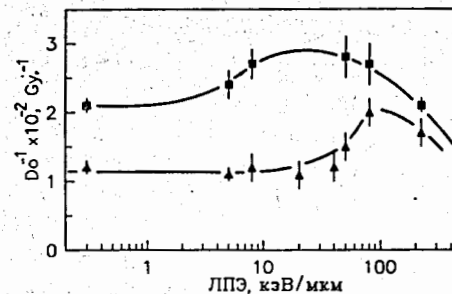


Рис.4. Зависимость радиочувствительности ( $D_0^{-1}$ ) клеток *S. typhimurium* TA98 и TA100 от ЛПЭ при облучении с глицерином (▲) и в нормальных условиях (■). По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: радиочувствительность,  $\text{Gr}^{-1}$ .

штаммов TA98 и TA100 от ЛПЭ при облучении с глицерином и в нормальных условиях. Видно, что защитное действие глицерина наиболее эффективно проявляется при облучении частицами с ЛПЭ, не превышающими значения 20 кэВ/мкм. Это может объясняться снижением числа односторонних разрывов (ОР) ДНК за счет перехвата  $\text{OH}^\circ$ -радикалов глицерином, которые в обычных условиях в процессе репарации трансформируются в ЭДР ДНК. При больших ЛПЭ определяющую роль в гибели клеток играют ПДР ДНК, поэтому защитное действие глицерина уменьшается.

Результаты экспериментов по мутагенезу клеток *S. typhimurium* при облучении многозарядными ионами свидетельствуют о том, что зависимость ОГЭ(L) для штамма TA100 в присутствии глицерина описывается кривой с максимумом, сдвинутой в область меньших ЛПЭ по отношению к кривой, полученной в нормальных условиях (рис.5). По-видимому, это связано с тем, что при облучении с глицерином меняется спектр индуцированных повреждений ДНК.

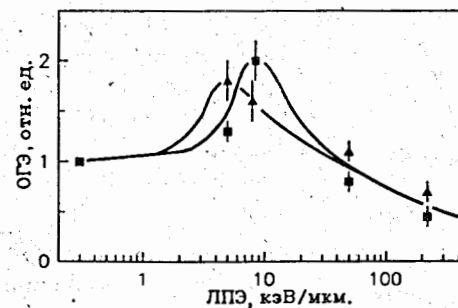


Рис.5. Зависимость ОГЭ от ЛПЭ излучений при облучении клеток TA100 с глицерином (▲) и в нормальных условиях (■). По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: ОГЭ, отн. ед.



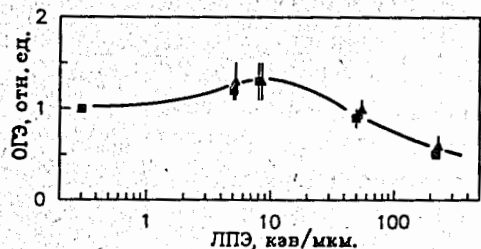


Рис.6. Зависимость ОГЭ от ЛПЭ излучений при облучении клеток TA98 с глицерином (▲) и в нормальных условиях (■). По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: ОГЭ, отн. ед.

Наличие глицерина в момент облучения клеток штамма TA98 фактически не влияет на значения ОГЭ при различных ЛПЭ излучений (рис.6). Вероятно, модификация спектра первичных повреждений ДНК за счет перехвата глицерином  $\text{OH}^\bullet$ -радикалов не приводит к изменению числа ПО, которые являются премутационными повреждениями для данного штамма.

Помимо глицерина в качестве представителя другого класса радиопротекторов в нашей работе был использован цистеамин. В отличие от многоатомных спиртов, проявляющих радиопротекторные свойства на первичном физико-химическом уровне, при введении аминотиолов в клетках происходит, как показано многими авторами, изменение активности ряда

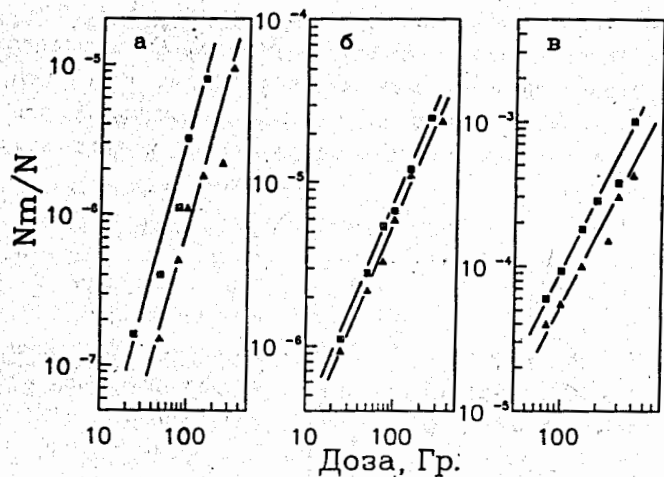


Рис.7. Зависимость частоты мутирования клеток *S. typhimurium* от дозы  $\gamma$ -облучения: TA98 (а), TA100 (б) и TA102 (в) при облучении с цистеамином (▲) и в нормальных условиях (■). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: частота мутирования, отн. ед.

ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК (Бреслер С.Е., Носкин Л.А., 1978). Изменение баланса между ферментативными системами клеток, отвечающих за деградацию и ресинтез ДНК, снижает выход энзиматических ДР ДНК и тем самым обуславливает защитное влияние цистеамин от летального действия ионизирующих излучений.

Как видно из рис.7 модифицирующее влияние цистеамин на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез клеток *S. typhimurium* фактически отсутствует. Это связано с тем, что ферменты, активность которых изменяется благодаря влиянию цистеамин, по-видимому играют незначительную роль в мутагенной репарации, закрепляющей определенный класс повреждений ДНК в мутации.

Влияние кислорода на радиочувствительность и индуцированный мутагенез у клеток *S. typhimurium*

Известно, что одним из наиболее эффективных радиомодификаторов является кислород. Ионизирующие излучения индуцируют широкий спектр первичных повреждений, которые в зависимости от их модифицируемости кислородом можно разделить на кислородзависимые и кислороднезависимые повреждения ДНК (Эйдус Л.Х. Корыстов Ю.Н., 1984).

На рис.8 представлены кривые выживания при  $\gamma$ -облучении в нормальных условиях и в аноксии. Видно, что кислородный эффект для всех использованных штаммов *S. typhimurium* составляет  $\approx 2$ . Представленные на рис.9 зависимости частоты мутирования от дозы  $\gamma$ -облучения в нормальных

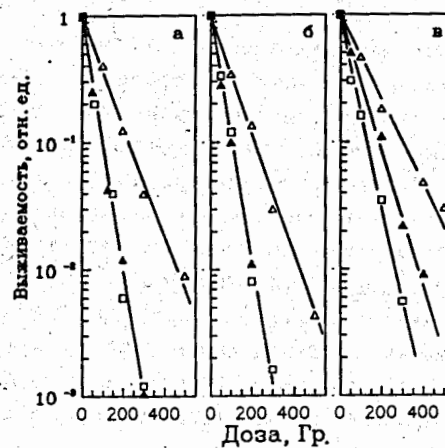


Рис.8. Кривые выживания клеток *S. typhimurium* TA98 (а), TA100 (б) и TA102 (в) при  $\gamma$ -облучении в нормальных условиях (□), в аноксии (Δ) и в аноксии в присутствии TAN (▲). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: фракция выживших клеток, отн. ед.

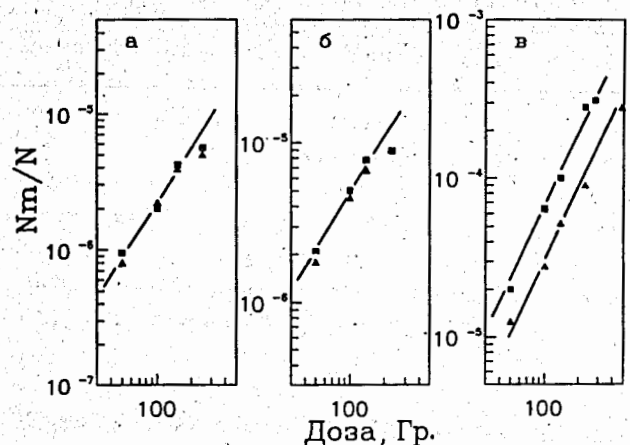


Рис.9. Зависимость частоты мутирования клеток *S.typhimurium* TA98 (а), TA100 (б) и TA102 (в) от дозы  $\gamma$ -облучения в аноксических (▲) и в нормальных условиях (■). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: частота мутирования, отн. ед.

условиях и в аноксии свидетельствуют о том, что влияние аноксии на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез у TA98 и TA100 штаммов отсутствует, ФИД штамма TA102 составляет величину  $1,6 \pm 0,2$ .

Как отмечалось выше, замена G-C пары оснований у штамма TA100, происходит в результате образования премутационного повреждения типа КП ДНК. В работе (Амиртаев К.Г. и соавт., 1985) было показано, что КП ДНК являются кислороднезависимыми повреждениями. Это обстоятельство объясняет отсутствие модифицирующего влияния кислорода на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез штамма TA100. Молекулярной основой инсерции одного нуклеотида, приводящей к сдвигу рамки считывания в гистидиновом опероне у штамма TA98, является ПО. Известно (Teoul, 1987), что среди продуктов радиолитиза оснований существуют как кислороднезависимые так и кислородзависимые повреждения. Отсутствие кислородного эффекта у штамма TA98 свидетельствует о том, что премутационными событиями в данном случае являются кислороднезависимые повреждения оснований.

Модифицирующее влияние аноксии на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез у штамма TA102 (рис.9в), по-видимому, связано с участием в мутагенезе продуктов радиолитиза тимина, возникающих только в присутствии кислорода

(Teoul, 1987). Наличие подобных повреждений, вероятно, приводит к замене А-Т пары оснований, тестируемых штаммом TA102. Поскольку квадратичная зависимость частоты мутирования штамма TA102 свидетельствует о двухударном механизме мутагенеза, можно полагать, что возникновение мутации в *his*-опероне происходит в результате двух повреждений ДНК: одно повреждение формирует премутационное событие (в данном случае повреждение тимина в -ТАА- нонсенс кодоне штамма TA102); другое - запускает SOS - систему. Показано, что SOS - индуцирующие повреждения являются кислороднезависимыми. Таким образом, кислородный эффект у штамма TA102 связан с характером молекулярного нарушения ДНК, обуславливающего мутантный фенотип.

При облучении штамма TA100 ионами гелия с ЛПЭ=38 кэВ/мкм модифицирующее действие аноксии на мутагенез отсутствует (рис.10). Это, по-видимому, связано с тем, что при действии заряженных частиц с большей вероятностью индуцируются кислороднезависимые премутационные повреждения ДНК.

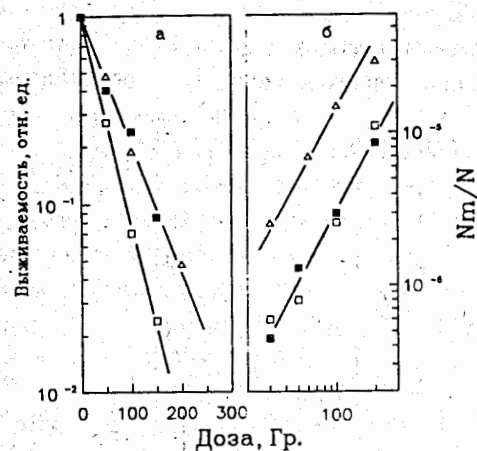


Рис.10. Зависимость выживаемости (а) и частоты мутирования (б) клеток TA100 от дозы облучения ионами гелия (L = 38 кэВ/мкм). Облучение проводили в нормальных условиях (□), в аноксии (■) и в аноксии в присутствии TAN (Δ). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: (а) фракция выживших клеток, отн. ед., (б) частота мутирования, отн. ед.

Влияние аноксического сенсibilизатора TAN на индукцию мутаций излучениями с разной ЛПЭ

Известно, что в условиях аноксии ряд агентов химической природы эффективно сенсibilизирует клетки к летальному действию излучений. Установлено, что нитроксильные стабильные радикалы способны образовывать ковалентные связи с радикалами азотистых оснований, что меняет



исходную структуру повреждений и препятствует репарационному синтезу ДНК (Nohman et al., 1976). С учетом этого нами было выдвинуто предположение о том, что представитель группы N-оксидов - TAN (2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон-N-оксил) может существенно модифицировать мутационный процесс.

На рис. 8 представлены кривые выживания использованных штаммов при  $\gamma$ -облучении в нормальных условиях, в аноксии и в присутствии аноксического сенсibilизатора. Видно, что TAN оказывает на выживаемость клеток TA98 и TA100 выраженное сенсibilизирующее действие. Для штамма TA102 сенсibilизирующее влияние меньше, величина ФИД равна  $1,3 \pm 0,1$ . Различная степень сенсibilизации, по-видимому, обуславливается тем, что клетки штаммов TA98 и TA100 являются дефектными по *uvrB*-зависимой эксцизионной репарации.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что  $\gamma$ -индуцированный мутагенез у аноксических клеток *S. typhimurium* в значительной мере зависит от присутствия TAN в процессе облучения (рис. 11). Модифицируемость  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у различных штаммов Эймса аноксическим сенсibilизатором TAN объясняется влиянием двух факторов. Во-первых, TAN в условиях аноксии, взаимодействуя с радиационно-

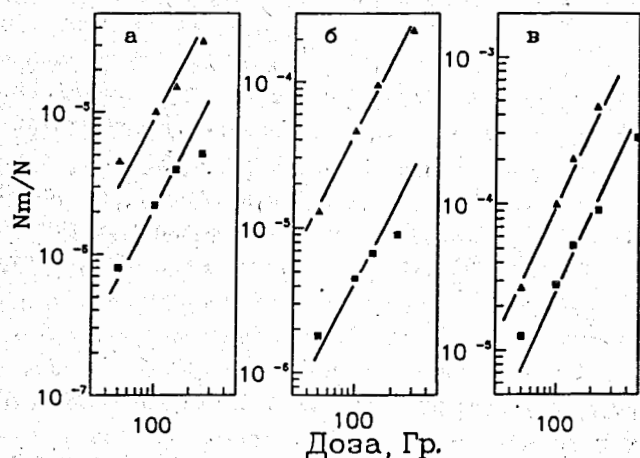


Рис. 11. Зависимость частоты мутирования клеток *S. typhimurium* TA98 (а), TA100 (б) и TA102 (в) от дозы  $\gamma$ -облучения в аноксии (■) и в аноксии в присутствии TAN (▲). По оси абсцисс: доза облучения, Гр.; по оси ординат: частота мутирования, отн.ед.

индуцированными радикалами ДНК, образует аддукты с основаниями ДНК, прежде всего с пиримидинами (Frank et al., 1985). Причем, эксцизионная *polA*-зависимая репарация ДНК не в состоянии восстановить повреждения такого типа, и в этом случае требуется индукция медленной мутагенной репарации. Во-вторых, известно, что TAN резко увеличивает SOS - ответ аноксических клеток *E. coli* при  $\gamma$ -облучении (Комова О. В. и соавт., 1990). Модификация радиационно-индуцированных радикалов пиримидина и активация ошибочной репарации в присутствии TAN, по-видимому, ведет к значительному увеличению мутагенеза у штаммов TA98 и TA100.

Существенно меньшее влияние TAN на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез клеток TA102 (ФИД<sub>1</sub> =  $2,1 \pm 0,2$ ) связано, по-видимому, со свойствами мишени ревертирования, ведущей к замене А-Т пары оснований. Известно, что N-оксиды эффективно взаимодействуют с радикалами тимина, причем, некоторые повреждения тимина, ведущие к замене А-Т пары оснований (гидропероксиды тимина и продукты их деградации), могут возникать только в присутствии кислорода (Teoule, 1987). Участие таких повреждений в мутагенезе подтверждает наличие КЭ у штамма TA102. Таким образом, небольшой модифицирующий эффект  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у штамма TA102, обусловленный TAN, связан с характером конкретного молекулярного нарушения ДНК.

Сравнивая модифицирующее влияние TAN на мутагенез штамма TA100 при действии  $\gamma$ -лучей и ионов гелия (рис. 10) выявлено, что величина ФИД<sub>1</sub> при увеличении ЛПЭ излучения уменьшается, что по-видимому, свидетельствует об увеличении выхода повреждений слабо модифицируемых TAN. Как мы указывали, данными повреждениями могут быть комплексные повреждения ДНК, которые сами по себе, без модификации TAN, являются премутационными событиями.

Таким образом, совокупность полученных нами материалов свидетельствует о том, что специфика мутагенного действия ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками на клетки прокариот определяется характером премутационных повреждений ДНК. Это обстоятельство в свою очередь находит подтверждение в особенностях модифицирующего влияния агентов различной природы.

## ВЫВОДЫ:

1. Зависимость эффективности мутагенного действия ионизирующих излучений от величины ЛПЭ определяется характером премутационных повреждений ДНК.

2. Модифицирующее влияние глицерина и цистеина на радиационно-индуцированный мутагенез у клеток *S.typhimurium* различно. Глицерин уменьшает мутагенное действие  $\gamma$ -излучения, цистеин является малоэффективным агентом.

3. С возрастанием ЛПЭ излучений защитное действие глицерина на частоту мутирования клеток снижается.

4. Модифицирующее влияние аноксии на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез у клеток *S.typhimurium* определяется характером премутационных нарушений ДНК. Реверсии, обусловленные заменами в А-Т и G-C парах оснований, являются соответственно зависимыми и независимыми от кислорода.

5. Аноксический сенсibilизатор TAN вызывает резкое повышение частоты мутирования клеток при  $\gamma$ -облучении в условиях аноксии. Степень сенсibilизации зависит от характера нарушений, определяющих мутантный фенотип. С повышением ЛПЭ излучений сенсibilизирующее влияние TAN снижается.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Козубек С., Красавин Е.А., Амиртаев К.Г., Баша С.Г., Токарова Б. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки салмонеллы (штаммы Эймса) I. Индукция ревертантов у клеток *S.typhimurium* при  $\gamma$ -облучении. // Труды рабочего совещания по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна. ОИЯИ. Д19-89-143. 1989. С.15-27.
2. Козубек С., Красавин Е.А., Амиртаев К.Г., Баша С.Г., Токарова Б. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки салмонеллы (штаммы Эймса) II. Индукция ревертантов у клеток *S.typhimurium* при действии тяжелых ионов. // Труды рабочего совещания по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна. ОИЯИ. Д19-89-143. 1989. С.28-39.
3. Баша С.Г., Красавин Е.А., Козубек С., Амиртаев К.Г. Влияние глицерина на  $\gamma$ -индуцированный мутагенез у клеток *S.typhimurium*. // Радиобиология. 1990. Т.30. Вып.2. С.185-189.

4. Баша С.Г., Красавин Е.А., Козубек С., Амиртаев К.Г. Модификация  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у тест-штаммов Эймса. I. Влияние радиопротекторов на мутагенез у клеток *S.typhimurium*. // Труды рабочего совещания по исследованию механизма радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК. Дубна. ОИЯИ. Д19-90-457. 1990. С.30-38.
5. Баша С.Г., Красавин Е.А., Козубек С., Амиртаев К.Г. Модификация  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у тест-штаммов Эймса. II. Влияние TAN на мутагенез у клеток *S.typhimurium*. // Труды рабочего совещания по исследованию механизма радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК. Дубна. ОИЯИ. Д19-90-457. 1990. С.39-45.
6. Krasavin E.A., Basha S.G., Kozubek S. The modification of mutagenesis induced by heavy ions in Salmonella tester strains. // Extended abstracts fourth workshop on heavy charged particles in biology and medicine. GSI-91-29 Report. September 1991. E10. P.1-3.
7. Basha S.G., Krasavin E.A., Kozubek S. The effect of anoxic radiosensitizing agent TAN on induction of revertants by  $\gamma$ -rays and helium ions in Salmonella tester strains. // Mutat.Res. 1991. (принято в печать).
8. Basha S.G., Krasavin E.A., Kozubek S. Radioprotective action of glycerol and cysteamine on inactivation and mutagenesis in Salmonella tester strains after gamma and heavy ions irradiation. // Mutat.Res. 1991. (принято в печать).
9. Kozubek S., Krasavin E.A., Horneck G., Amirtaev K.G., Tokarova B., Basha S.G., Komova O.V., Ogievetskaja M.M., Soska J. A radiobiological model on cellular damage induced by ionizing radiation and its repair in bacteria. // Mutat.Res. 1991. (принято в печать).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Амиртаев К.Г. и соавт. *Studia biophysica*. 1985. Т.106. С.131-142.
2. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология. 1978. Т.18. С.548-555.
3. Комова О.В. и соавт. Труды рабочего совещания по исследованию механизма радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК. Дубна. 1990. С.49-58.
4. Красавин Е.А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М. Энергоатомиздат. 1989.
5. Эйдус Л.Х., Корыстов Ю.Н. Кислород в радиобиологии. М. Энергоатомиздат. 1984.

6. Alper T. Cellular radiobiology. Cambridge- L.- N. I.- Melbourn. Cambridge University Press. 1979.
7. Frank E.H. et al. Can. J. Chem. 1985. Vol.63. No.15. P.15-23.
8. Hohman W.F. et al. Int. J. Radiat. Biol. 1976. Vol.30. No.3. P.247-261.
9. Maron D.M., and Ames B.N. Mutation Res. 1983. Vol.113. P.173-215.
10. Teoul R. Int. J. Radiat. Biol. 1987. Vol.51. P.573-589.

Рукопись поступила в издательский отдел  
31 октября 1991 года.