

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМ. М. В. ЛОМОНОСОВА**

19-2005-175

На правах рукописи  
УДК 577.391

**БОРЕЙКО**  
Алла Владимировна

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ  
УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ ИОНОВ**

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва 2005

**Работа выполнена в Объединенном институте ядерных исследований**

**Научный консультант**

доктор биологических наук,  
профессор

Красавин Евгений Александрович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор

Виктор Константинович Мазурик

доктор биологических наук,  
профессор

Станислав Алексеевич Гераськин

доктор биологических наук,  
профессор

Владислав Георгиевич Петин

**Ведущая организация:**

ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН

Защита состоится \_\_\_\_\_ декабря 2005 г. \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д.501.001.65 на биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Ленинские горы, биологический факультет. Диссертационный совет Д.501.001.65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ. Отзывы на автореферат просим высылать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета

доктор  
биологических наук,  
профессор О.Р. Кольс

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Более полувека тяжелые заряженные частицы привлекают внимание специалистов-радиобиологов как эффективный инструмент при решении фундаментальных вопросов, связанных с выяснением механизмов, лежащих в основе индуцированного мутационного процесса. На необходимость и плодотворность применения ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками в изучении механизмов генетического действия радиации указывали Н.В. Тимофеев-Ресовский, Д.Е. Ли, Л.Г. Циммер. Результаты исследований биологических эффектов, вызываемых тяжелыми заряженными частицами, использовались классиками радиационной генетики при обосновании фундаментального методологического принципа радиобиологии - «принципа попадания».

Последние десятилетия выдвинули ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия тяжелых ионов высоких энергий. Одна из них связана с проблемами космической радиобиологии. Увеличение дальности и длительности космических полётов выдвинули на первый план проблему оценки опасности биологического действия высокоэнергетичных тяжелых ионов и разработку мер радиационной безопасности экипажей кораблей. В ходе реализации межпланетных пилотируемых полётов, прежде всего, к Марсу, экипажи будут подвергаться воздействию тяжелых ядер высоких энергий, исходящих из глубин Галактики. Как известно, в спектре Галактического космического излучения (ГКИ) преобладают ядра группы углерода и железа. Энергетический спектр ядер ГКИ весьма широк и такие частицы с высокой эффективностью могут индуцировать мутации, инициировать развитие онкологических заболеваний, вызывать другие неблагоприятные последствия. В последние годы стало возможным моделировать генетическое действие тяжелых ядер ГКИ высоких энергий благодаря созданию ускорителей тяжелых ионов, способных ускорять ядра тяжелых элементов до космических энергий. Такие ускорители успешно функционируют в России (Дубна), США (Брукхэвен), Германии (Дармштадт), Японии.

Ускоренные тяжелые ионы (преимущественно ядра углерода с энергией 200-300 МэВ/нуклон) начали успешно применяться при лечении онкологических заболеваний. Оптимальное распределение поглощенной дозы излучения в опухоли при облучении тяжелыми ионами делает этот вид лучевого воздействия весьма перспективным в клинике лучевой терапии. С учетом этого обстоятельства, задача детального изучения механизмов генетического действия тяжелых ионов также весьма актуальна.

Важным остаётся решение вопросов нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений, что также связано с изучением стохастических эффектов радиационного воздействия, индуцируемых излучениями, различающимися по величине линейной передачи энергии (ЛПЭ).

При решении проблемы генетических эффектов тяжелых заряженных частиц крайне важными представляются данные о закономерностях и механизмах их мутагенного действия на клетки с различным уровнем организации генетического аппарата. При этом необходимо иметь информацию не только о суммарном выходе различного типа мутаций в облученных клетках, но исключительный интерес представляют данные о частоте образования как генных, так и структурных мутаций. Механизмы образования генных мутаций у прокариот (бактерии *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ детально изучены ранее <sup>1</sup>/Красавин Е.А., Козубек С., 1991/. Однако до настоящего времени совершенно не исследованы закономерности образования структурных мутаций у бактерий при действии ускоренных тяжёлых ионов. У клеток высших эукариот изучение дозовых зависимостей выхода точковых и структурных мутаций при действии ионизирующих излучений широкого диапазона ЛПЭ является весьма непростой задачей, требующей привлечения сложных молекулярно-биологических методов, выполнения большого объема работ. Получение такого рода информации значительно облегчается в экспериментах на клетках прокариот.

Характер повреждений ДНК, образующихся при действии тяжелых заряженных частиц, существенно отличается от таковых при облучении  $\gamma$ -

квантами. Ускоренные тяжелые ионы, в отличие от  $\gamma$ -квантов, индуцируют в ДНК повреждения преимущественно кластерного типа <sup>2</sup>/Michalik, 1992/, <sup>3</sup>/Chatterje and Holley, 1993/. Такие повреждения представляют собой комбинацию одномоментно возникающих нарушений участка ДНК, с образованием одностранных разрывов, модификацией оснований, модификацией сахара. События такого рода являются результатом локального выделения большого количества энергии при прохождении тяжелой заряженной частицы через нить ДНК. Показано, что одностранные разрывы кластерного типа, обуславливают специфику индукции генных мутаций у бактерий. Значимость кластерных повреждений ДНК в образовании структурных мутаций у клеток прокариот не изучена.

Решающая роль в образовании структурных мутаций у клеток про- и эукариот, как известно, принадлежит двунитевым разрывам (ДР) ДНК. Вместе с тем информация, касающаяся индукции ДР ДНК ускоренными тяжелыми ионами различных энергий весьма ограничена и часто противоречива. Ещё более скудны данные о закономерностях репарации этих повреждений клетками с различным генотипом при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ. Совершенно не изучены закономерности образования и репарации кластерных одно- и двунитевых разрывов ДНК, индуцируемых тяжелыми заряженными частицами высоких энергий.

Перечисленные выше факты свидетельствуют о недостаточной разработке проблемы генетического действия тяжелых заряженных частиц в широком диапазоне ЛПЭ. Отсутствие данных о соотношении выхода генных и структурных мутаций у клеток с различным генотипом при действии тяжелых заряженных частиц, недостаточная информация о закономерностях образования и репарации повреждений ДНК требуют тщательного изучения этих вопросов. Провести детальное сравнительное исследование закономерностей образования генных и структурных мутаций при действии излучений разного качества можно на клетках бактерий. У бактерий хорошо изучена структурно-функциональная организация генетического аппарата, получены различные репарационно-дефицитные мутанты. Наряду с этим, в последние годы разработаны эффективные методы исследования повреждений структуры ДНК, адекватные способы оценки эффективности

репарации этих повреждений. Изложенные выше обстоятельства и обусловили проведение настоящего исследования.

Целью работы является: исследование генетического действия тяжелых заряженных частиц с различной энергией и величиной ЛПЭ. Было сформулировано несколько конкретных задач, в рамках которых проводились исследования:

- изучить закономерности образования мутаций у спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов в широком диапазоне ЛПЭ. Исследовать влияние генов, контролирующих различные пути репарации повреждений ДНК, на радиационно-индуцированный мутационный процесс у вегетативных клеток *Bacillus subtilis*;
- провести исследование закономерностей индукции прямых генных мутаций у клеток *Escherichia coli* одновременно по двум генам излучениями, различающимися по ЛПЭ в широком диапазоне;
- изучить закономерности образования делеционных мутаций у клеток *Escherichia coli* при действии тяжелых заряженных частиц, различающихся по величине ЛПЭ и энергетическим характеристикам;
- исследовать механизмы точной эксцизии транспозонов у бактерий *Escherichia coli* при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов с разными физическими характеристиками.
- изучить роль генов, контролирующих SOS-репарацию, в процессе точной эксцизии транспозонов;
- изучить закономерности образования двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека при действии высокоэнергетичных тяжелых ионов. Исследовать кинетику репарации ДР ДНК в лимфоцитах человека, облученных высокоэнергетичными тяжелыми ионами;

- построить молекулярную модель образования генных мутаций у бактерий *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений.

Научная новизна. В работе впервые проведено исследование закономерностей и механизмов образования генных мутаций у различных штаммов вегетативных клеток спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* при действии ионизирующих излучений широкого диапазона ЛПЭ, исследована роль репарационных генов в индуцированном мутационном процессе. Изучены закономерности и механизмы образования генных мутаций одновременно по двум генам при облучении бактерий *Escherichia coli* тяжелыми заряженными частицами с различной величиной энергии и ЛПЭ. Проведено сравнительное изучение закономерностей образования генных и делеционных мутаций у клеток *Escherichia coli* при действии ускоренными тяжелыми ионами с различной ЛПЭ. Исследованы закономерности образования структурных мутаций у бактерий *Escherichia coli* по критерию индукции транспозонов при действии ультрафиолетового света и ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Изучено влияние мутаций генов *hcs*-семейства на частоту эксцизии транспозонов. В широком диапазоне ЛПЭ ускоренных тяжелых ионов исследованы закономерности точной эксцизии транспозона Tn10. Разработана молекулярная модель формирования генных мутаций у бактерий *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений. Изучены закономерности образования двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при облучении высокоэнергетичными ионами углерода. Определена кинетика репарации двунитевых разрывов ДНК при действии ионов углерода высоких энергий и  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$ .

Практическая и научная ценность работы. При решении многих научно-практических задач радиационной генетики необходимо иметь информацию не только о суммарном выходе различного рода мутаций в клетках, облученных тяжелыми заряженными частицами с разными физическими характеристиками, но

особый интерес представляют сравнительные данные о частоте образования как генных, так и структурных мутаций в клетках с различным генотипом. Получение такого рода данных представляется весьма важным не только для объяснения механизмов мутационного процесса в клетках с различным уровнем организации генетического аппарата, но они необходимы и для решения многих практических задач. К ним, прежде всего, относятся вопросы нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений. Решение их, как известно, требует тщательного изучения стохастических эффектов радиационного воздействия, индуцируемых излучениями, различающимися по величине ЛПЭ. Изучение генетических эффектов тяжелых заряженных частиц крайне актуально при решении задач, связанных с проблемами космической радиобиологии. Увеличение дальности и длительности космических полётов выдвинули на первый план проблему оценки опасности биологического действия высокоэнергетичных тяжелых ионов и разработку мер радиационной безопасности экипажей кораблей. Космический «радиационный барьер», обусловленный в значительной степени наличием в открытом космосе тяжелых ядер Галактического космического излучения, может быть одним из основных препятствий при осуществлении длительных пилотируемых полётов вне магнитосферы Земли. В последние годы ускоренные тяжелые ионы, и, прежде всего, пучки ионов углерода, начали успешно применяться при лечении онкологических заболеваний. С учетом этих обстоятельств, задача детального изучения механизмов генетического действия тяжелых ионов становится всё более актуальной и результаты, полученные при выполнении настоящего диссертационного исследования, могут быть использованы при разработке нормативных документов, связанных с обеспечением радиационной безопасности лиц, находящихся в условиях многокомпонентного радиационного воздействия.

#### Положения, выносимые на защиту.

1. Установлено, что эффективность генетического действия тяжелых заряженных частиц на клетки с различным генотипом, оцениваемая на основе



различных критериев радиационного воздействия (летального эффекта, индукции генных и делеционных мутаций, эксцизии транспозонов, образования двунитевых разрывов ДНК), определяется особенностями микрораспределения энергии излучений в генетических структурах, влияющих на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью систем репарации клеток, направленных на восстановление нарушенных структур.

2. Показано, что закономерности и механизмы образования генных и делеционных мутаций у клеток при действии излучений с разными физическими характеристиками, различны. Квадратичная компонента дозовой зависимости частоты образования генных мутаций, формирующихся с участием индуцибельной, склонной к ошибкам ветви SOS-репарации, сохраняется при действии всех видов использованных излучений. Частота образования делеционных мутаций линейно связана с дозой облучения клеток  $\gamma$ -квантами и тяжелыми заряженными частицами. Различия в характере дозовых зависимостей мутагенеза для генных и делеционных мутаций при облучении обусловлены разными типами повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс (кластерных одонитевых разрывов ДНК при формировании генных мутаций и двунитевых разрывов ДНК при образовании делеций) и разными репарационными механизмами, участвующими в индуцированном мутагенезе.

3. Установлено, что точная эксцизия транспозонов, индуцированная излучениями с разными физическими характеристиками, являясь делеционным процессом по молекулярной природе, зависит от уровня экспрессии генов, контролирующей SOS-репарацию. Детерминированность точной эксцизии транспозонов индуцибельной системой SOS-репарации и степенной характер дозовой зависимости этого процесса при действии  $\gamma$ -квантов и тяжелых заряженных частиц, обусловлены индукцией близких по молекулярной природе повреждений ДНК, участвующих в формировании генных мутаций и точной эксцизии транспозона.

4. Величина относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных тяжелых ионов, изученная на основе различных критериев радиационного воздействия: летального эффекта, индукции генных и делеционных мутаций, точной эксцизии транспозона, образования двунитевых разрывов ДНК, зависит от ЛПЭ тяжелых заряженных частиц. Показано, что с увеличением ЛПЭ коэффициенты ОБЭ тяжелых ионов, оцениваемые по летальному действию, индукции генных и делеционных мутаций, точной эксцизии транспозона, возрастают. Величина ЛПЭ ( $L_{max}$ ), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ, варьирует в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного эффекта: для генных мутаций и индукции точной эксцизии транспозона значения  $L_{max}$  реализуются в области ЛПЭ существенно меньших, чем для летальных эффектов облучения и индукции делеционных мутаций. Различия в положении  $L_{max}$  для изученных радиационно-индуцированных эффектов определяются различным типом повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс.

5. Показано, что высокоэнергетичные ионы углерода индуцируют двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах человека с эффективностью, сравнимой с действием  $\gamma$ -квантов. Кинетика репарации ДР ДНК при действии высокоэнергетичных тяжелых заряженных частиц близка к таковой при  $\gamma$ -облучении. Малая величина биологической эффективности этого вида излучения обусловлена низкими значениями линейной передачи энергии, реализуемой ускоренными ионами углерода высоких энергий.

6. Молекулярная модель, описывающая основные механизмы формирования генных мутаций у бактерий *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений. В основу модели положено представление о решающей роли мутагенной ветви SOS-репарации в закреплении премутационных повреждений ДНК в мутацию. Ключевым звеном в этом процессе является формирование мультиферментного индуцибельного комплекса – ДНК-полимеразы V, ведущей синтез ДНК на матрице с поврежденными основаниями. Модель позволяет осуществить математическое

описание мутационного процесса на основе параметров, имеющих реальную биофизическую интерпретацию.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на: 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Stockholm, Sweden, 1993; International Symposium "Radiation Biology and its Application in Space Research", Brno, Czech Republic, 1994; Congress proceedings "Tenth International Congress of Radiation Research", Wurzburg, Germany, 1995; Международная конференция «Проблемы радиационной генетики на рубеже веков», Москва, 2000; International conference "Modern problems of radiobiology, radioecology and evolution", Dubna, 2000; International workshop on "Higher-order structure of cell nuclei and genetic effects of radiation", Czech Republic, Valtice, 2000; II Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» Дубна, 2001; IV съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), Москва, 2001; Труды «II Международного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии»», Дубна, 2002; 32<sup>nd</sup> Annual meeting of the European Society for Radiation Biology", Liege, Belgium 2002.

Публикации. Основные результаты исследований, представленные в диссертационной работе изложены в 19 публикациях. Из них 10 работ опубликованы в виде научных статей в ведущих российских и зарубежных научных изданиях.

#### Структура работы.

Диссертация состоит из шести глав, которым предшествует введение, заключения, выводов и списка литературы. Первая глава посвящена анализу литературных материалов и формулировке задач исследований. Во второй главе описаны материалы и методы исследования, в последующих главах излагаются результаты и проводится обсуждение собственных экспериментальных и

теоретических исследований. Диссертация содержит 345 страниц текста, 51 рисунок и 14 таблиц. Список литературы включает 573 наименований. Среди них 62 работы на русском языке и 511 работ зарубежных авторов.

## Материалы и методы исследования

Источники излучения. При проведении экспериментальных исследований с бактериальными объектами и лимфоцитами периферической крови человека использовали ускорители многозарядных ионов Лаборатории ядерных реакций им. академика Г.Н. Флёрва У-200, У-400М и пучки высокоэнергетичных ионов, генерируемые ускорителем релятивистских тяжелых ядер «Нуклотрон» Лаборатории высоких энергий им. академиков В.И. Векслера и А.М. Балдина Объединенного института ядерных исследований. Облучение биообъектов на пучках ускорителей тяжелых ионов У-200 и У-400М проводили на установке «Геном». В экспериментах с высокоэнергетичными тяжелыми ионами, генерируемыми ускорителем «Нуклотрон» на сверхпроводящих магнитах, использовали специально созданную установку с комплексом электронно-физической аппаратуры. При облучении биологических объектов использовали геометрию «широкого пучка» для обеспечения однородности дозы в пределах области облучения образцов. В качестве излучений электромагнитной природы при проведении экспериментов с бактериальными клетками использовали  $\gamma$ -кванты  $^{137}\text{Cs}$  установки «Свет». В экспериментах по облучению лимфоцитов периферической крови человека использовали  $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$  терапевтической установки «Рокус». Физические характеристики использованных излучений представлены в таблице.

Бактериальные штаммы. В экспериментах были использованы разные виды и штаммы бактериальных клеток. Спорообразующие бактерии были представлены клетками *Bacillus subtilis*: BS 168 (hisA, trpC2), rec H (hisH, recH342), gsy 908 (argF4, hisA1, recE4), gsy2258 (hisH, metB5, add5), HA 101 (his, met, leu), HA 101F

Физические характеристики использованных излучений.

Вид излучения	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	Мощность дозы, Гр/с	Источник Излучения
$^4\text{He}$	8,0	20	1,5	У-200
$^4\text{He}$	3,5	42	1,5	У-200
$^4\text{He}$	1,0	95	1,5	У-200
$^4\text{He}$	1,7	72	1,5	У-200
$^4\text{He}$	3,8	50	1,5	У-200
$^{12}\text{C}$	7,5	200	1,5	У-400М
$^{12}\text{C}$	480	10,6	0,002	Нуклотрон
$\gamma$ -кванты $^{60}\text{Co}$	-	0,3	0,3	Рокус
$\gamma$ -кванты $^{137}\text{Cs}$	-	0,3	0,43	Свет
УФ-излучение	-	-	0,1 Дж/м <sup>2</sup> /с	ДБ 30-1

(*polA1*, *his*, *met*, *leu*), полученные из коллекции А.А.Прозорова, Институт общей генетики РАН, Москва. Основной объём экспериментальных исследований был выполнен на бактериях *Escherichia coli*: В, W3110 (дикий тип) и X7026 (дикий тип) из коллекции ИЦ РАН и ПИЯФ РАН; T20 (*colB-k260*), M32-T19 (*colM-k260*), C600(*colD*) из коллекции А.А.Прозорова, Институт общей генетики РАН, Москва. Штаммы AFT 228 (*ArgA81::Tn10*), SP256 (*TyrA16::T10 recN262*), ENZ 280 (*SfiA11::Tn10A recA306*), RDK 1541 (*RecO1504::Tn5*), ABU 57 (*RecQ::Tn3*), DB 5872 (*CysC95::Tn10*), GA120 (*Trp::Tn1*). были любезно предоставлены музеем бактериальных штаммов Отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ РАН, ВНИИ «Генетика», а также Институтом иммунологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея.

Методы работы с бактериальными клетками. В экспериментах с бактериями *Vacillus subtilis* готовили ночные культуры, выращивая их при 37<sup>0</sup> С в NB-среде (питательный бульон “Difco” 8 г, NaCl 4 г на 1 л дистиллированной воды) до

стационарной фазы ( $10^8$  клеток /мл). Суспензию клеток отмывали центрифугированием и ресуспендировали в буферном растворе следующего состава: 0,01 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 М  $\text{NaCl}$ . Облучение клеточных суспензий  $\gamma$ -квантами проводили в стеклянных пробирках при температуре  $4^\circ\text{C}$ . После облучения клеточные суспензии десятикратно концентрировали путем центрифугирования и рассеивали на чашки Петри с минимальной твердой питательной средой Спицайзена. Мутантные  $\text{his}^- \rightarrow \text{His}^+$  колонии ревертантов подсчитывали через 72 ч инкубации при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Для определения выживаемости клеток аликвоты суспензии, после соответствующего разведения, рассеивали на LB - агар. Колонии подсчитывали через 15 ч инкубации при температуре  $37^\circ\text{C}$ .

В опытах по индукции генных и делеционных мутаций у клеток *E.coli* использовали штаммы *E.coli* дикого типа В, W3110, X7026 и продуценты колицинов - штаммы *E.coli* T20 (colB-K260), M32-T19 (colM-K260), C600 (colD), а также бактериофаг  $\phi 80v$ . В экспериментах использовали лизат вирулентного фага  $\phi 80$ , имеющий титр не менее  $1 \cdot 10^{10}$  фаговых частиц/мл. Была отработана методика и подобраны оптимальные условия получения колициновых препаратов. Обратные мутации к  $\text{tonB}^+$ -фенотипу определяли путем высева  $\text{tonBtrp}^-$ -мутантных клеток на M56+Тгр+Сг. Для этого засеивали их в среду LB и инкубировали до стационарной фазы роста (концентрация  $\approx 2 \times 10^9$  клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием, отмывали в M56 буфере, после чего высевали их по  $(2-5) \times 10^8$  клеток на чашки с селективной средой с M56+Тгр+Сг. Клетки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 36-40 ч. Полное отсутствие обратных мутаций расценивали как свидетельство наличия делеционных мутаций.

Индукцию точной эксцизии транспозонов УФ-светом проводили по стандартной методике /Aleshkin et. al., 1998/. Ночную культуру клеток разводили жидкой питательной средой LB и подращивали до концентрации  $\approx 10^9$  клеток в 1 мл. Затем осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в жидкой питательной среде M56 без витаминов и микроэлементов. Облучение бактериальных клеток  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  проводили в

стеклянных пробирках, а ускоренными тяжелыми ионами на поверхности ядерных фильтров. Облученные клетки высевали на среду LB и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Выживаемость определяли методом макроколоний. Относительную частоту точной эксцизии транспозонов определяли по числу колоний, выросших на чашках со средой M56. Инкубирование клеток на минимальной питательной среде M56 осуществляли в течение 72 ч.

Для статистической обработки экспериментальных данных и построения дозовых зависимостей использовали графические программы "Sigma Plot" и "Origin Pro70".

Методы работы с лимфоцитами человека. В экспериментах с клетками человека лимфоциты выделяли из свежей цельной гепаринизированной (15 ед/мл) донорской крови. Кровь (7-10 мл) смешивали с равным объемом питательной среды RPMI 1640 или фосфатного буфера (PBS) и наносили смесь на поверхность изотонического раствора фиколла (фиколл + вирографин,  $\rho = 1,077$  г/мл) <sup>5</sup>/В.А. Тронов, И.И. Пелевина, 1996/, доводя концентрацию до  $2 \times 10^6$  кл/мл. Облучение  $\gamma$ -квантами на установке «Рокус» и на нуклотроне проводили в пластиковых пробирках объемом 1,5 мл при 0° С. Для получения тонких гель-слайдов использовали методы, разработанные ранее <sup>5</sup>/В.А.Тронов, И.И.Пелевина, 1996/. Электрофорез нейтрально лизированных клеток проводили в низкосолевым ТАЕ – буфере (рН 8,3): 10 мМ Трис-НСl, 25 мМ ЕДТА Na<sub>2</sub>. Для визуализации комет полученные слайды прокрашивали иодистым пропидием. Для регистрации изображений комет использовали флуоресцентный микроскоп "Axiolab" фирмы Carl Zeiss с цифровой Color chilled CCD камерой фирмы Hamamatsu. С каждого слайда регистрировали 100-200 комет. Каждую комету характеризовали общепринятыми параметрами: интегральной флуоресценцией  $M_c$ , эквивалентной содержанию ДНК в комете, и моментом хвоста кометы  $m_t$ , являющимся произведением доли ДНК в хвосте ( $F_t$ ) и его медианы ( $X_m$ ). Параметры вычисляли по формулам:

$$mt = X_m \cdot Ft,$$

$$X_m = \left[ \sum_t (I_i \cdot X_i) \right] / \sum_t I_i, \quad (1)$$

$$Ft = \left( \sum_t I_i \right) / \left( \sum_c I_i \right).$$

где  $I_i$  - интенсивность флуоресценции в точке  $i$ ,  $X_i$  - расстояние от медианы головы кометы до точки  $i$ . Индексы под знаком суммы обозначают область суммирования:  $t$  - суммирование проводится только в пределах хвоста кометы,  $c$  - суммирование в пределах всей кометы.

Результаты измерений переводили в Excell – таблицу, на основании которой рассчитывали среднее значение ( $\bar{x}$ ), стандартное отклонение ( $STDEV$ ):

$$STDEV = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}, \quad (2)$$

где  $n$  - число измерений.

Дозовые зависимости и гистограммы строили с помощью программы OriginPro70.

## Результаты исследований и обсуждение

### 1. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки *Bacillus subtilis*.

В первых разделах главы 3 рассмотрены особенности организации мутагенной SOS-системы репарации у бактерий *Bacillus subtilis* и закономерности летального действия на вегетативные клетки и споры излучений с разными физическими характеристиками. Анализ результатов современных исследований, касающихся организации системы репарации у бактерий *Bacillus subtilis* свидетельствует о том, что система восстановления повреждений ДНК у этих клеток имеет много общих черт с бактериями *Escherichia coli*. У *Bacillus subtilis*



эффективно функционирует репарационный механизм, связанный с участием урацил N-гликозилазы. Эксцизионная *polA*-зависимая репарация с участием ДНК-полимеразы, кодируемой геном *polA*, выполняет функции аналогичные *polA*-зависимой репарации у бактерий *E.coli*. Система SOS-репарации у клеток *Bacillus subtilis* не является узко специфичной для УФ-повреждений и качественно не отличается от SOS-системы бактерий *E.coli*. Было установлено, что SOS-система *Bacillus subtilis* организована более сложно, чем у клеток *E.coli*. Рекомбинационный путь репарации повреждений ДНК у клеток *Bacillus subtilis* осуществляется с участием группы *rec*-генов: *addA*, *addB*, *recA*, *recB*, *recD*, *recF*, *recU*, *recH*, *recL*, *recP*, *recR* и *recS*. Эти гены принимают участие в репарации повреждений ДНК вместе с ДНК-полимеразами, SSB-, Mfd-, Hbsu-белками, ДНК-лигазой, топоизомеразами и другими продуктами. У *B.subtilis* эти гены объединены в пять эпистатических групп:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$ . Центральная роль в этом типе репарации, как и у клеток *E.coli* принадлежит *RecA*-белку, кодируемому геном *recE*, являющимся аналогом гена *recA* у клеток *E.coli*. *Rec A*-белок у *B.subtilis*, также как и *Rec A*-белок в активированной форме у *E.coli*, расщепляет *Lex A*-репрессор. *LexA*-белок по своим функциям аналогичен *LexA*-протеину у клеток *E.coli*.

В работе исследовано влияние различных репарационных генов на радиочувствительность и частоту мутирования клеток при  $\gamma$ -облучении (рис.1). Из представленных материалов видно, что блокирование различных репарационных генов приводит к повышению радиочувствительности клеток. В наибольшей степени это проявляется у клеток *recE* и *polA* мутантов. Мутации в генах, контролирующих различные репарационные пути, по разному отражается на частоте мутирования клеток. Как видно, мутации в генах *recE4* и *recH* практически полностью подавляют мутационный процесс, и, наоборот, частота мутирования у штаммов *polA*, *add5* и *recP* существенно превышает значения, выявляемые при облучении клеток дикого типа. В диссертации подробно рассматриваются молекулярные механизмы, приводящие к повышению радиочувствительности бактерий *Bacillus subtilis* и модификации мутационного процесса при

блокировании изученных репарационных генов.

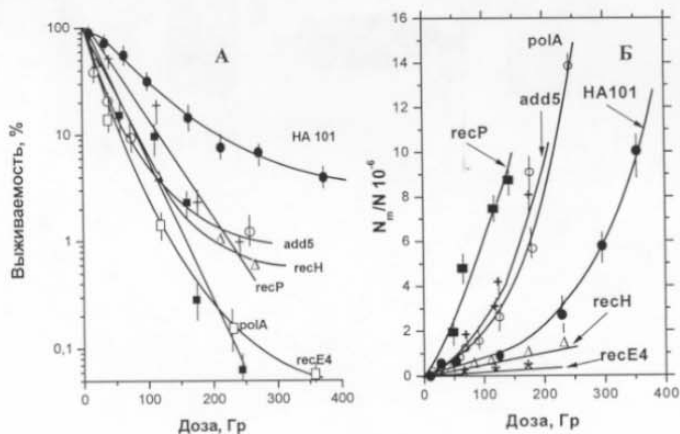


Рис.1. Влияние мутаций в различных генах, контролирующих репарацию ДНК, на выживаемость (А) и мутагенез (Б) клеток *Bacillus subtilis* при  $\gamma$ -облучении.

На рис.2 представлены кривые выживания клеток *Bacillus subtilis* при действии ускоренных ионов гелия с ЛПЭ, равными 20, 50 и 78 кэВ/мкм. При действии тяжелых ионов отмечается исчезновение плеча на кривой выживания, наблюдаемое при  $\gamma$ -облучении, и увеличение угла наклона кривой с ростом ЛПЭ. Следует заметить, что резистентный участок дозовой кривой сохраняется и при облучении клеток ускоренными тяжелыми ионами. Возрастающее биологическое действие тяжелых заряженных частиц с ростом их ЛПЭ отчетливо видно на рис.3, где отражена зависимость ОБЭ от ЛПЭ по критерию летального действия излучений, вычисленная на уровне 37% выживаемости клеток. Коэффициенты ОБЭ ионов гелия с ЛПЭ 20, 40 и 78 кэВ/мкм, рассчитанные как  $OBE = D_{0\gamma}/D_{0x}$ , где  $D_{0\gamma}$  - средняя летальная доза при  $\gamma$ -облучении,  $D_{0x}$  - средняя летальная доза при действии тяжелых ионов, соответственно составляют  $1,4 \pm 0,1$ ,  $2,4 \pm 0,2$ ,  $2,3 \pm 0,2$ . Как можно видеть, максимальные значения ОБЭ частиц в этом случае локализуются в области ЛПЭ  $\approx 70$  кэВ/мкм. Близкие значения получены и в экспериментах на клетках *E.coli*. С учетом результатов наших исследований можно прийти к заключению, что закономерности летального действия излучений с высокой ЛПЭ на вегетативные клетки *Bacillus subtilis* и бактерии *E.coli*, близки между собой.

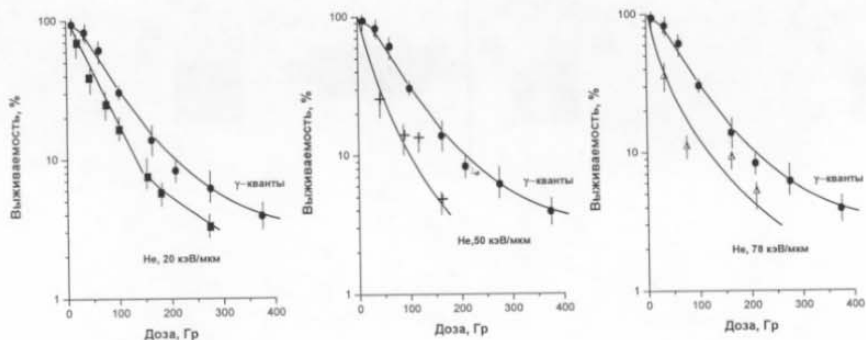


Рис. 2. Выживаемость вегетативных клеток *Bacillus subtilis* при действии ускоренных ионов гелия с различной величиной ЛПЭ (20, 50 и 78 кэВ/мкм).

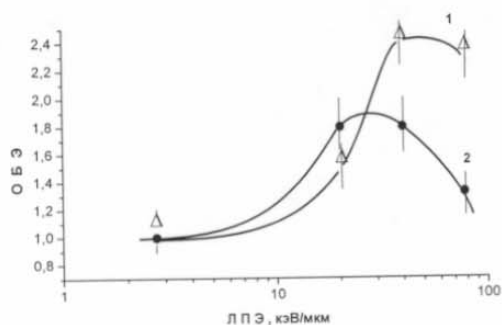


Рис. 3. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ по критерию летального (1) и мутагенного (2) эффектов облучения вегетативных клеток *Bacillus subtilis*.

Механизмы, определяющие зависимость радиочувствительности клеток *E.coli* от ЛПЭ, были изучены в работах <sup>6</sup>/Е.А.Красавин, 1989/. Было показано, что при действии  $\gamma$ -квантов радиочувствительность клеток определяется эффективностью их репарационных систем. Чувствительность клеток к облучению тяжелыми заряженными частицами детерминирована лишь физическими свойствами излучений и характер зависимости  $D_0^{-1}(L)$  обуславливается степенью чувствительности клеток к  $\gamma$ -квантам.

В последующих разделах третьей главы диссертации рассматриваются закономерности и механизмы мутагенного действия излучений широкого диапазона ЛПЭ на клетки *Bacillus subtilis*. На рис.4 приведены

зависимости частоты образования  $his^- \rightarrow His^+$  мутаций у клеток дикого типа при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для вегетативных клеток *Bacillus subtilis* характерна линейно-квадратичная зависимость мутагенеза. Линейно-квадратичный характер кривых мутагенеза у клеток *E. coli* и *S. typhimurium*, как известно, связывается с реализацией двух главных механизмов, определяющих линейный и степенной компоненты кривой мутагенеза. Линейный компонент зависимости  $N_m/N(D)$ , по-видимому, связан с повреждениями, которые закрепляются в процессе конститутивной репарации или в процессе репликации ДНК. Квадратичный участок кривой мутагенеза у клеток *E. coli* обусловлен функционированием индуцибельной *umuCD*-зависимой ветви SOS-репарации. Аналогичные причины, по-видимому, обуславливают квадратичный характер зависимости  $N_m/N(D)$  и у клеток *Bacillus subtilis*.

Квадратичный характер кривых  $N_m/N(D)$  при достаточно высоких дозах облучения сохраняется и при действии ускоренных тяжелых ионов. Это дает возможность вычислить коэффициенты относительной генетической эффективности (ОГЭ) тяжелых заряженных частиц как отношение доз  $\gamma$ -излучения и ионов гелия при одинаковой частоте мутирования клеток. Коэффициенты ОГЭ частиц с указанными значениями ЛПЭ соответственно составляют  $1,8 \pm 0,2$ ,  $1,7 \pm 0,2$  и  $1,3 \pm 0,1$ . Зависимости ОБЭ от ЛПЭ, вычисленные для летального и мутагенного эффектов облучения вегетативных клеток *B. subtilis* приведены на рис.3. Как можно видеть, в обоих случаях значения коэффициентов ОБЭ по указанным критериям облучения увеличиваются с ростом ЛПЭ, однако зависимость, отражающая мутагенный эффект облучения, достигает максимума при меньших значениях ЛПЭ по сравнению с летальным действием. Действительно, если величина ОБЭ по мутагенному эффекту облучения достигает максимума при ЛПЭ  $\approx 30$  кэВ/мкм ( $L_{max}$ ), то по летальному действию значение  $L_{max}$  примерно равно 60 кэВ/мкм.

Различие в положении максимумов зависимостей ОБЭ(ЛПЭ) по летальному и мутагенному эффектам облучения связано с характером молекулярных

нарушений, обуславливающих возникновение леталей и мутаций у бактериальных клеток. Показано <sup>6</sup>/Е.А.Красавин, 1989/, что положение  $L_{max}$  для летальных эффектов у клеток *E. coli* обусловлено индукцией двух типов двунитевых разрывов ДНК: прямых и энзиматических. Это обстоятельство определяет величину  $L_{max}$  по летальному действию излучений у бактерий *E.coli* в пределах 60-120 кэВ/мкм. Выход «кластерных» однонитевых разрывов ДНК максимален при значительно меньших величинах ЛПЭ <sup>2</sup>/Michalik, 1992/, чем для прямых

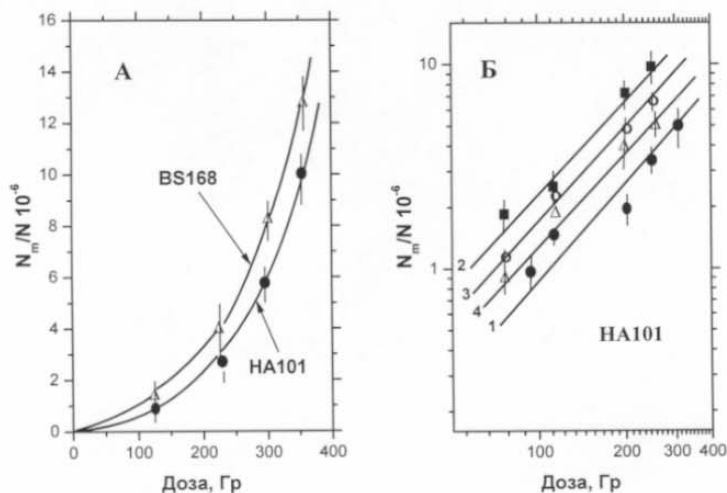


Рис. 4. Зависимость частоты мутирования  $his^- \rightarrow His^+$  клеток *Bacillus subtilis* HA101 и BS168 от дозы облучения  $\gamma$ -квантами (А) и ионами гелия (Б) с разной ЛПЭ (1 –  $\gamma$ -кванты; 2 – 22 кэВ/мкм; 3 – 42 кэВ/мкм; 4 – 72 кэВ/мкм). По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – частота мутирования.

двунитевых разрывов ДНК, что обуславливает сдвиг максимума зависимости ОБЭ (ЛПЭ) для мутагенных эффектов облучения в область меньших значений ЛПЭ.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что закономерности мутагенеза у вегетативных клеток *B. subtilis*, индуцированного ионизирующими излучениями с разной линейной передачей энергии, весьма

близки к тем, которые выявляются при облучении бактерий *E. coli* и *Salmonella typhimurium*.

## 2. Индукция генных и делеционных мутаций в клетках *Escherichia coli* ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками

В главе 4 рассматриваются закономерности и механизмы образования генных и делеционных мутаций у бактерий *E. coli* при облучении  $\gamma$ -квантами и действием ускоренных тяжелых ионов в широком диапазоне ЛПЭ. Как известно, исследования закономерностей образования структурных мутаций у бактериальных клеток сопряжено с определенными методическими трудностями. Существует несколько подходов к изучению проблемы индукции структурных мутаций у прокариот. Один из них основан на определении делеций непосредственно в бактериальной хромосоме, другой - на изучении формирования делеций в искусственно сконструированных, с использованием плазмид и эписом, тест-системах. В первом случае можно использовать два критерия определения делеций: неспособность образовывать обратные мутации или определять одновременное образование мутаций в двух соседних генах. Полное отсутствие ревертантов, в первом случае, расценивают как показатель наличия делеции. Образование же обратных мутаций служит показателем точечной природы мутаций, вне зависимости от того, что явилось причиной обратной мутации - восстановление исходного генотипа или супрессорная мутация. В наших экспериментах была использована тест-система, основанная на определении делеционных мутаций, затрагивающих два фланкирующих гена: *tonB* и *trp*. Использование её позволило выявлять в ходе эксперимента как точковые, так и структурные мутации.

В первых разделах главы рассмотрены литературные данные, касающиеся индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* излучениями электромагнитной природы, а также особенности организации *tonB* гена. Последующие разделы посвящены изложению собственных экспериментальных исследований, касающихся летальных и мутагенных эффектов облучения клеток *E. coli* тяжелыми заряженными частицами. На рис.5 представлены зависимости выживаемости

бактерий *E.coli* X7026 при действии излучений с разными физическими характеристиками. Как можно видеть, при  $\gamma$ -облучении клеток *E.coli* дикого типа

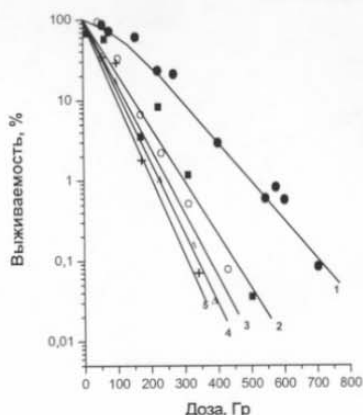


Рис.5. Выживаемость бактерий *E.coli* дикого типа (X7026) при  $\gamma$ -облучении (1), при действии ускоренных ионов углерода (2) и гелия с различной энергией (3 – 20 кэВ/мкм; 4 – 42 кэВ/мкм; 5 - 72 кэВ/мкм).

штамма X7026 наблюдается плечо на кривой выживания в начальном её участке, которое исчезает при действии ускоренных тяжелых ионов с возрастающими значениями ЛПЭ. При этом можно заметить возрастание угла наклона кривых выживания при облучении ионами гелия с увеличением значений их ЛПЭ до  $\approx 70$  кэВ/мкм, а затем уменьшение угла наклона при действии на клетки ускоренных ионов углерода с ЛПЭ = 200 кэВ/мкм. Такая трансформация кривых выживания обусловлена влиянием факторов как физической, так и биологической природы.

В следующем разделе диссертации, касающемся изучения закономерностей и механизмов образования генных мутаций у клеток *E.coli*, подвергаемых воздействию излучений широкого диапазона ЛПЭ, проведен анализ собственных экспериментальных данных и сравнение их с более ранними результатами, полученными при использовании других генетических тест-систем. На рис.6 представлены зависимости частоты образования *tonB* мутаций от дозы  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов с различной ЛПЭ. Как можно видеть, для всех видов излучений наблюдается степенная зависимость частоты образования *tonB* мутаций от дозы. В логарифмическом масштабе дозовые зависимости представляют собой прямые с тангенсом угла наклона  $\chi=1,7-1,8$ , что свидетельствует о степенном, близком к квадратичному, характере

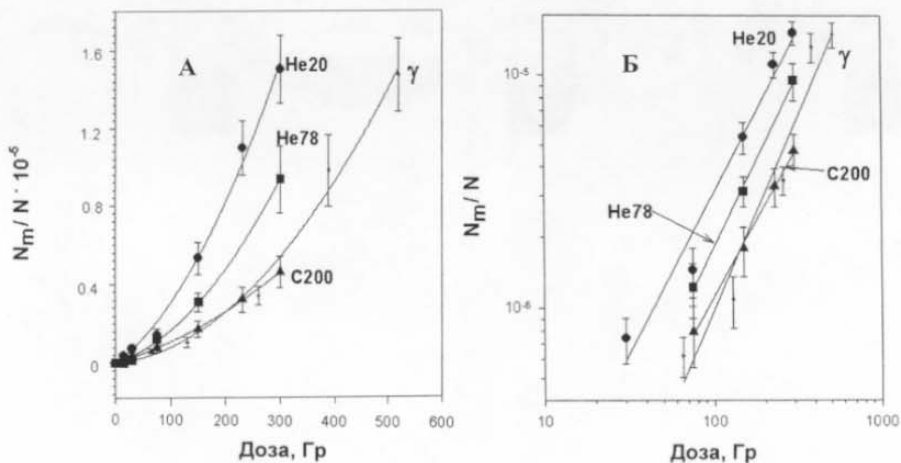


Рис.6. Частота образования topV мутаций при действии излучений с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают, соответственно, величину ЛПЭ тяжелых заряженных частиц). А – линейный масштаб; Б – логарифмический масштаб.

этих зависимостей. Наиболее высокая эффективность в индукции мутаций наблюдается в экспериментах с ускоренными ионами гелия с ЛПЭ = 20 кэВ/мкм. При действии ионов гелия с ЛПЭ = 78 кэВ/мкм и ускоренных ионов углерода мутагенная эффективность снижается. Аналогичные результаты получены и в экспериментах по определению colV мутаций в клетках, облученных тяжелыми заряженными частицами (рис.7).

Квадратичный характер кривых мутагенеза обусловлен тем, что для образования точковых мутаций необходима реализация двух независимых друг от друга событий “попадания” - возникновение премутационного повреждения в изучаемом локусе, во-первых, и наличие повреждения, индуцирующего систему SOS-репарации, которая и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций, во-вторых. Анализируя материалы, представленные на рис. 6-7, необходимо заметить, что характер дозовых кривых мутагенеза сохраняется при возрастании ЛПЭ частиц. Сохранение квадратичного характера зависимости частоты мутирования от дозы облучения при действии тяжелых заряженных



частиц обусловлено рядом обстоятельств. Микродозиметрический анализ выявляемых закономерностей свидетельствует о том, что при действии разных доз ионизирующих излучений в облученной популяции можно выделить

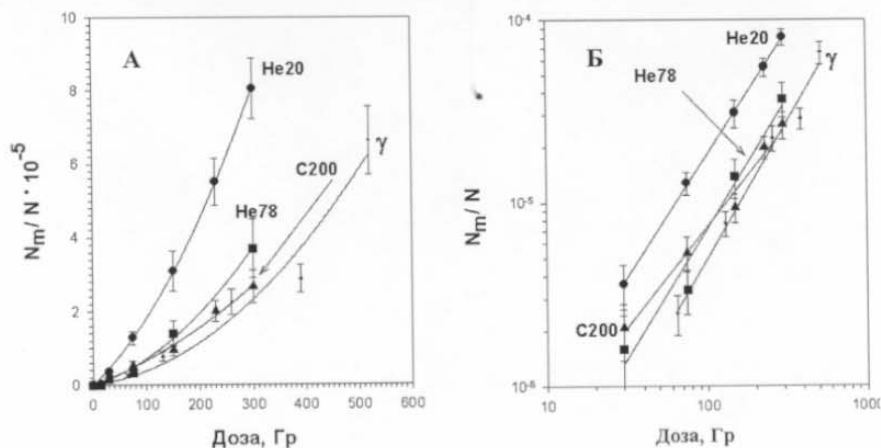


Рис.7. Частота образования colV мутаций при действии  $\gamma$ -квантов и тяжелых ионов с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают, соответственно, величину ЛПЭ). А – линейный масштаб; Б – логарифмический масштаб.

три типа субпопуляций клеток: неповрежденные выживающие клетки; летально поврежденные не выживающие клетки; "умеренно" поврежденные клетки, которые после завершения процесса репарации также составляют класс выживающих клеток. При увеличении ЛПЭ излучений возрастает доля неповрежденных клеток, а уменьшается доля летально поврежденных, через которые прошли частицы сердцевинной трека. В результате этого мутации образуются преимущественно в субпопуляции, поврежденной прохождением  $\delta$ -электронов, и в той небольшой фракции клеток, через которые прошли одна и большее количество частиц сердцевинной трека при условии, что эти клетки смогли отрепарировать возникшие повреждения и не погибли. На основании этого можно объяснить сохранение характера зависимостей  $N_m/N(D)$  при действии излучений,

различающихся по ЛПЭ. Так как характер передачи энергии  $\delta$ -электронов веществу при действии электромагнитных и корпускулярных излучений не различается между собой, вид зависимости  $N_m/N(D)$  при действии излучений разного качества остается неизменным. Следовательно, при действии тяжелых заряженных частиц с высокими значениями ЛПЭ ( $ЛПЭ_{\infty} \geq 100$  кэВ/мкм), когда при прямом прохождении треков частиц через чувствительные структуры, клетки преимущественно погибают, в выживающих клетках имеет место так называемый « $\delta$ -электронный» мутагенез. При действии же на клетки ускоренных лёгких ионов или ускоренных тяжелых заряженных частиц высоких энергий с  $ЛПЭ_{\infty} \leq 100$  кэВ/мкм, когда чувствительные структуры испытывают прямое взаимодействие треков, имеет место «сердцевинно-трековый мутагенез» <sup>7</sup>/Kozubek et al.,1995/. С учётом вышеизложенного, становится понятным сохранение характера дозовых кривых мутагенеза при возрастании ЛПЭ частиц. Такие закономерности, как мы показали ранее, имеют место не только у бактерий *E.coli*, но и у клеток *Bacillus subtilis*.

С учетом того, что квадратичный характер кривых мутагенеза отражает участие системы SOS-репарации в мутационном процессе, которая является необходимым фактором реализации репаративного мутагенеза, в диссертации подробно рассмотрены современные молекулярные механизмы организации SOS-системы у бактерий *E.coli*. На основе анализа собственных и литературных данных была разработана модель формирования генных мутаций у клеток *E.coli* при действии ионизирующих излучений. Общая схема модели представлена на рис.8. Главные её положения, базирующиеся на экспериментально полученных данных, сводятся к следующему. При действии ионизирующего излучения в ДНК клеток, как известно, с некоторой частотой образуются прямые двунитевые разрывы (ПДР) ДНК, приводящие к летальному для клетки событию, и широкий спектр первичных повреждений ДНК ( $\gamma$ -сайты). Первичные  $\gamma$ -сайты включают в себя разрывы фосфодиэфирных связей с разными концевыми группами, модификации азотистых оснований, АП-сайты, сшивки ДНК-ДНК, ДНК-белок. ОР ДНК, имеющие 3'ОН-5'PO<sub>4</sub> концы восстанавливаются ДНК-лигазой. Разрывы с 3'



(ПММ). С другой стороны, такие повреждения являются также и основным типом нарушений структуры ДНК, участвующим в формировании SOS-сигнала (SOS-сигнал) в облученных клетках. Формирование SOS-сигнала также происходит и из части *polA*-зависимых повреждений, которые не смогли быть восстановлены этим типом репарации и стали объектом атаки экзонуклеазных активностей различных ферментов. КП подвергаются медленной репарации с участием *hcsA-lexA* генов. Из неотрепарированных данным типом репарации КП и повреждений, которые не смогли быть отрепарированы *polA*-зависимой и *hcsA-lexA*-зависимой репарационными системами, формируются энзиматические двунитевые разрывы (ЭДР) ДНК. ЭДР вместе с ПДР ДНК являются летальными событиями для клеток.

Возникновение SOS-повреждения в клетке активирует конститутивный *RecA*-белок в *RecA*-протеазу (*RecA*<sup>\*</sup>). Повышение уровня *RecA*-протеазы приводит к дерепрессии индуцибельных генов, и прежде всего генов *hcsA*, *umuD*, *umuC*, а также *lexA* и других генов. Увеличение экспрессии *lexA*-гена не приводит к повышению уровня *LexA*-белка, поскольку он сразу расщепляется *RecA*-протеазой. *RecA* протеаза в ходе SOS ответа расщепляет *UmuD* белок, переводя его в активную *UmuD'* форму. *UmuD'* тесно связывается с *UmuC*-белком в стабильный *UmuD'*<sub>2</sub>*C* комплекс (*Pol V*). Этот комплекс, обладая выраженной полимеразной активностью, преодолевает различные ДНК-аддукты, делая ошибочные подстановки оснований<sup>8</sup>/Reuven et al., 1999/. Деградация мутагенной активности *UmuD'* субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы *V* позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. *UmuD'*<sub>2</sub>*C* комплекс (*UmuD'*<sub>2</sub>*C*), включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии SOS-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс *translesion synthesis* (TSL). Комплекс *UmuDD'*<sub>2</sub>*C* играет ингибирующую роль в SOS-мутагенезе, секвестрируя *UmuD'* активности. Участие ДНК-полимеразы III или некоторых её субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Её участие может реализовываться либо на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует «протягиванию» комплекса

UmuC, UmuD', RecA, SSB через сайты с повреждениями.

Таким образом, в предложенной схеме закрепление премутационного повреждения в мутацию точкового типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных энзиматических механизмов, и в том числе, как одного из главных - мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V (UmuD'<sub>2</sub>C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. Предложенная схема реализации индуцибельного мутационного процесса у клеток E.coli отражает, по-видимому, лишь главные, магистральные пути индуцированного мутагенеза, но она позволяет осуществить математическое описание мутационного процесса у клеток E.coli, индуцированного ионизирующей радиацией.

В заключительном разделе настоящей главы представлены результаты наших исследований, касающиеся закономерностей индукции делеционных мутаций у бактерий E.coli излучениями широкого диапазона ЛПЭ и зависимости биологической эффективности тяжелых заряженных частиц от их ЛПЭ, оцениваемой по различным критериям лучевого воздействия: летальному эффекту, индукции генных и делеционных мутаций. На рис.9 представлена зависимость частоты образования tonVtrp' мутаций от дозы различных видов излучений:  $\gamma$ -квантов, ускоренных ионов гелия с разной ЛПЭ (20, 50 и 78 кэВ/мкм), а также ускоренных ионов углерода с ЛПЭ, равной 200 кэВ/мкм. Как можно видеть из материалов, в исследованном диапазоне доз частота образования делеционных мутаций линейно возрастает с дозой для всех видов использованных в экспериментах излучений. Следует заметить, что наклоны полученных дозовых зависимостей для  $\gamma$ -квантов и тяжелых заряженных частиц, различны. Наибольшей эффективностью по частоте индукции делеционных мутаций обладают ионы гелия с ЛПЭ  $\approx 50$  кэВ/мкм. Ускоренные ионы углерода вызывают меньший биологический эффект.

Следовательно, характер дозовых зависимостей по критерию индукции делеционных мутаций у клеток E.coli совершенно отличается от ранее рассмотренных нами зависимостей, полученных для генных мутаций. В последнем

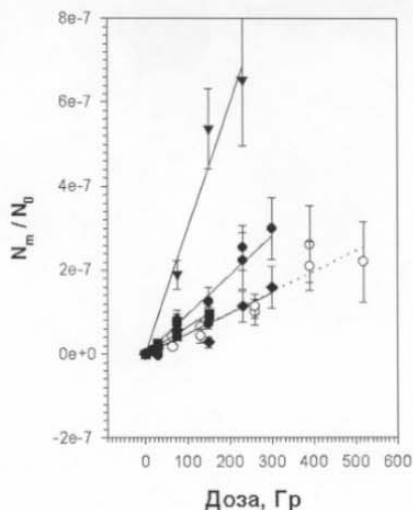


Рис.9. Зависимость частоты образования tonBtrp' мутаций от дозы излучений с разной ЛПЭ (о -  $\gamma$ -лучи; ● - ионы He (20 кэВ/мкм); ▼ - ионы He (50 кэВ/мкм); ■ - ионы He (78 кэВ/мкм); ♦ - ионы  $^{12}\text{C}$  ions (200 кэВ/мкм).

случае для всех использованных излучений был выявлен степенной, близкий к квадратичному характер зависимости  $N_m/N(D)$ . Дозовые зависимости индукции делеционных мутаций, описываемые линейными функциями, обусловлены другими механизмами их формирования в отличие от генных мутаций. Образование делеций у бактерий *E.coli* связывается с формированием двунитевых разрывов ДНК. В работе <sup>9</sup>/Sargentini, Smith, 1992/ была определена зависимость между репарацией  $\gamma$ -индуцированных ДР ДНК и индукцией длинных делеций в специально сконструированной с использованием эписомы, интегрированной в бактериальную ДНК, системе. Было показано, что в диапазоне доз 25-200 Гр, частота образования делеций линейно возрастает с дозой облучения, как и индукция ДР ДНК. В то же время дозовая зависимость мутаций типа замены оснований и "сдвига рамки считывания" описывается нелинейной функцией. С учетом этого предполагается, что линейный характер зависимости образования делеций при  $\gamma$ -облучении бактериальных клеток обусловлен тем, что в отличие от генных мутаций, молекулярной основой

первичных повреждений, ведущих к образованию делеций, являются не повреждения оснований, а двунитевые разрывы ДНК. Для реализации пермутационных повреждений данного типа в структурную мутацию не требуется индукции системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль, как мы показали ранее, в формировании генных мутаций.

Линейный тип дозовых зависимостей для делеционных мутаций и одинаковый характер квадратичного участка кривых  $N_m/N(D)$ , описывающих генные мутации, при действии всех использованных видов излучений, позволяет вычислить величины ОБЭ для регистрируемых мутаций. На рис.10 приведены зависимости ОБЭ от ЛПЭ частиц для различных радиационно-индуцированных эффектов: летального действия излучений, индукции генных и делеционных мутаций. Как видно из представленных материалов, все зависимости описываются кривыми с локальным максимумом. При этом необходимо заметить, что положение максимумов для рассматриваемых эффектов облучения не является инвариантным. Это важное обстоятельство требует специального рассмотрения.

Для летальных эффектов облучения клеток *E.coli* наибольшие значения ОБЭ наблюдаются при действии частиц с ЛПЭ  $\approx 100$  кэВ/мкм. По критерию индукции генных *tonB* и *colB* мутаций, как это видно из материалов представленных на рис.10, величина максимума приходится на значения ЛПЭ  $\approx 20$  кэВ/мкм. Аналогичные результаты были получены, как мы уже указывали ранее, в экспериментах по индукции *lac<sup>-</sup>* мутаций у клеток *E.coli* и индукции *his<sup>-</sup>*  $\rightarrow$  *His<sup>+</sup>* ревертантов у бактерий *Salmonella typhimurium*<sup>10</sup>/Kozubek et al., 1989/.

Механизм летального действия излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне, на клетки *E.coli*, как мы отмечали выше, у прокариот во многом обусловлен соотношением вклада в летальный эффект облучения прямых двунитевых разрывов ДНК и ДР энзиматической природы. В настоящее время можно с уверенностью утверждать, что различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ(ЛПЭ) для летальных и мутагенных эффектов облучения обусловлены разным характером повреждений ДНК, участвующих в реализации генного мутагенеза и летальных эффектов. В первом случае ими являются

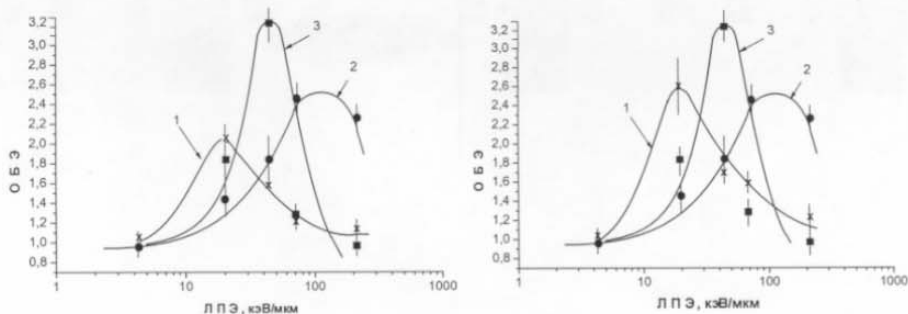


Рис.10. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучений по критерию индукции tonB (1, А) colV мутаций (1, Б), летальному действию излучений (2) и tonBtrp<sup>-</sup> делеций (3)

преимущественно поврежденные основания, во втором - двунитевые разрывы ДНК. Микродозиметрический анализ выхода кластерных ОР и ДР ДНК в зависимости от ЛПЭ, как уже отмечалось, свидетельствует о том, что оба типа зависимостей описываются кривыми с локальным максимумом <sup>2</sup>/Michalik, 1992/. Однако для кластерных ОР положение максимума сдвинуто почти на порядок в область меньших значений ЛПЭ. Если максимальный выход прямых ДР ДНК на единицу поглощенной дозы излучения наблюдается при значениях ЛПЭ  $\approx 200$  кэВ/мкм, то максимальный выход кластерных одонитевых повреждений реализуется при значениях ЛПЭ  $\approx 30-50$  кэВ/мкм. Это обстоятельство может объяснять различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ для летальных эффектов облучения и индукции генных мутаций.

В рамках развитых представлений находит своё объяснение положение максимума на кривой, описывающей зависимость ОБЭ от ЛПЭ для делеционных мутаций. Из рис.10 видно, что в отличие от аналогичной зависимости для генных мутаций эта зависимость сдвинута в область больших значений ЛПЭ также как и кривая, характерная для летальных эффектов облучения. Это обстоятельство может указывать на однотипность повреждений, участвующих в реализации



делеционных мутаций и летальных эффектов у клеток *E.coli*, а именно – двунитевых разрывов ДНК. Отсутствие полного совпадения положения максимумов указанных зависимостей, по-видимому, отражает различный вклад энзиматических ДР ДНК в формировании летальных и мутагенных эффектов облучения. Чем меньший вклад в летальный эффект облучения вносят прямые ДР ДНК, и, соответственно, больший вклад вносят ДР энзиматической природы, тем в меньшую область значений ЛПЭ будет сдвинут максимум зависимости радиочувствительности клеток от ЛПЭ и наоборот. Анализируя результаты наших экспериментов, можно полагать, что вклад ДР ДНК энзиматической природы в реализацию делеционных мутаций проявляется в большей степени по сравнению с их вкладом в летальный эффект облучения. Это обстоятельство, по-видимому, отражается в отсутствии полного совпадения максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ по летальному эффекту облучения и индукции делеционных мутаций.

### 3. Закономерности эксцизии транспозонов в клетках *Escherichia coli* при действии излучений с разной ЛПЭ

Структурные мутации в клетках *E.coli* с высокой частотой возникают при транспозиции мобильных элементов. Точная эксцизия транспозонов является SOS-индуцибельным процессом, осуществляемым по «мишенному» механизму. Такие события, реализуемые в ходе SOS-ответа, приводят к образованию делеций. В отличие от генных, структурные мутации у клеток прокариот, как мы указывали выше, формируются в результате возникновения двунитевых разрывов ДНК. Соотношение выходов прямых ДР, как результат разрыва опозитных нитей ДНК при прохождении ионизирующей частицы и энзиматических ДР, возникающих в ходе SOS-репарации, может обуславливать специфику формирования мутаций делеционного типа при действии излучений с разной ЛПЭ. С учетом этого, исследование эксцизии транспозонов при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ может дать важную информацию об особенностях индукции структурных мутаций у бактерий ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками. Принимая во внимание вышеизложенное, было

проведено исследование закономерностей и механизмов точной эксцизии транспозонов у бактерий *Escherichia coli* при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов с разными физическими характеристиками.

На рис.11 представлена зависимость относительной частоты эксцизии транспозона Tn10 от дозы облучения  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  клеток дикого типа и мутантов *recA* и *recN*. Мутация *recN*, как известно, обуславливает высокий индуцибельный и конститутивный уровень продукта гена *recA* и вследствие этого мутанты *recN* имеют значительно сниженную частоту эксцизии транспозона Tn10 [Chan et. al., 1994/]. Видно, что для клеток дикого типа в диапазоне доз

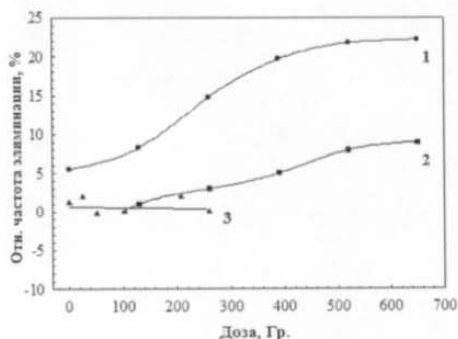


Рис.11. Дозовая зависимость относительной частоты эксцизии транспозона Tn10 при  $\gamma$ -облучении: 1 – клетки дикого типа, 2 – *recN* мутант, 3 – *recA* мутант.

от 0 до 600 Гр характерна кривая с областью плато, наблюдающимся при дозах, превышающих 400 Гр. В клетках, несущих мутацию *recA*, индукция эксцизии транспозона Tn10 не обнаружена.

На рис.12 представлены зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона Tn10 при действии  $\gamma$ -квантов и ускоренных тяжелых ионов. С ростом дозы облучения ускоренными ионами гелия  $^4\text{He}$  с ЛПЭ: 20, 50 и 100 кэВ/мкм частота формирования делеций, вызванных точной эксцизией мобильного элемента, как это видно из рис.12 (кривые 1,2,3), описывается степенными зависимостями. Эти зависимости можно описать следующей

функцией:  $\frac{N_R}{N} = 10^{\kappa D + c}$ , где отношение числа реверсий ( $N_R$ ) к числу выживших

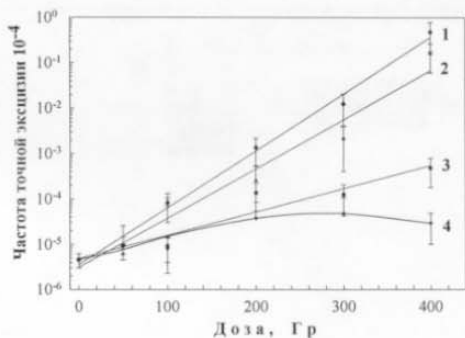


Рис.12. Дозовая зависимость относительной частоты точной эксцизии транспозона Tn10 при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ: 1 – ионы гелия  $^4\text{He}$ , 20 кэВ/мкм; 2 – ионы гелия  $^4\text{He}$ , 50 кэВ/мкм; 3 – ионы гелия  $^4\text{He}$ , 100 кэВ/мкм; 4 – ионы углерода  $^{12}\text{C}$ , 200 кэВ/мкм.

клеток ( $N$ ), является относительной частотой точной эксцизии транспозона Tn10. Показатель функции подбирается таким образом, чтобы он был безразмерной отрицательной величиной в диапазоне от  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$ . Установлено, что максимальной генетической эффективностью по критерию точной эксцизии Tn10, обладают ускоренные ионы  $^4\text{He}$  с ЛПЭ  $\approx 20$  кэВ/мкм (рис.13).

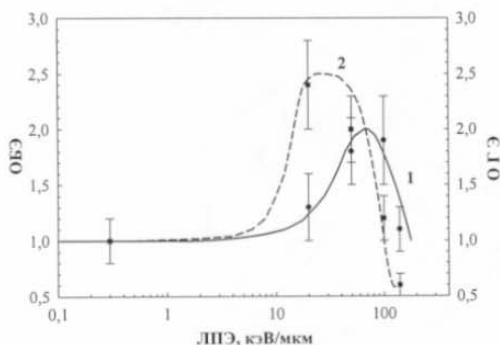


Рис.13. Зависимости ОБЭ от ЛПЭ по критерию летального эффекта облучения (1) и индукции точной эксцизии транспозона Tn10.

Относительная биологическая эффективность, определенная по критерию летального действия на клетки *E. coli* имеет максимум при облучении ускоренными ионами гелия  $^4\text{He}$  с ЛПЭ 80 - 100 кэВ/мкм. В отличие от нее, максимум зависимости ОГЭ, определенной по критерию точной эксцизии транспозона Tn10 локализуется в диапазоне ЛПЭ от 20 до 40 кэВ/мкм. Высокая биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц по исследованному

критерию, как и в случае индукции генных мутаций у клеток *E.coli*, обусловлена двумя обстоятельствами. Точная эксцизия транспозона, являясь с одной стороны делеционным событием, с другой - обусловлена SOS-зависимыми механизмами. В основе инициации этого процесса лежит формирование односторонних шпилек в его последовательности, образующихся в ходе репарации повреждений ДНК, и формирование повреждения, запускающего SOS-ответ клетки, в результате чего происходит эксцизия транспозона. Различие в характере премутационных повреждений, являющихся молекулярным субстратом при формировании генных и структурных мутаций, как мы показали выше, отражается на характере зависимостей ОБЭ(ЛПЭ). Молекулярной основой эксцизии транспозона могут являться кластерные повреждения одной нити ДНК, возникающие на фоне клеточного SOS-ответа. Данное обстоятельство находит своё подтверждение в степенном характере дозовой зависимости индукции мобильных элементов излучениями с разными физическими характеристиками, а также положением локального максимума зависимости ОБЭ(ЛПЭ) по данному критерию, коррелирующим с аналогичной зависимостью для генных мутаций.

#### 4. Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии тяжелых заряженных частиц высоких энергий

При анализе генетических эффектов, вызванных излучениями с разными физическими характеристиками, весьма важно иметь информацию об особенностях индукции и репарации повреждений ДНК, инициирующих мутационный процесс. В главе 6 рассматриваются закономерности и молекулярные механизмы индукции и репарации различных повреждений ДНК в клетках млекопитающих и человека. Двунитевые разрывы ДНК, как известно, относятся к наиболее тяжелым повреждениям генома. Они являются молекулярным субстратом формирования различного вида структурных мутаций генов, аббераций хромосом, участвуют в инициации клеточной трансформации.

ДР образуются при действии ионизирующих излучений, различных химических мутагенов и канцерогенов. Кроме того, они могут возникать в ходе репликации ДНК, когда репликативный комплекс встречает односторонний разрыв, а также образуются как интермедиат в процессе сайт-специфической рекомбинации. Сведения, касающиеся закономерностей образования ДР ДНК в клетках различных организмов при действии высокоэнергетичных тяжелых ионов, крайне ограничены. Большинство данных было получено при облучении клеток различными типами ускоренных тяжелых ионов низких энергий. Представляется весьма актуальным изучить закономерности образования ДР ДНК при облучении клеток тяжелыми заряженными частицами с энергиями, достигающими нескольких сотен МэВ/нуклон. Важность получения такого рода информации обусловлена необходимостью решения ряда практических задач, и, прежде всего, связанных с защитой экипажей космических кораблей при осуществлении полётов вне магнитосферы Земли и терапевтическим использованием ускоренных тяжелых ионов при лечении онкологических заболеваний.

Для определения закономерностей индукции и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками использовали метод ДНК-комет. На рис.14 приведены зависимости частоты образования двунитевых разрывов ДНК от дозы облучения  $\gamma$ -квантами и ускоренными ионами углерода с энергией 480 МэВ/нуклон, полученные при использовании данного метода. Видно, что для обоих видов излучений с увеличением дозы выход ДР ДНК линейно возрастает. Полученные нами данные по частоте образования ДР ДНК в  $\gamma$ -облученных клетках методом ДНК-комет согласуются с результатами исследований других авторов, использовавших иные методы определения двунитевых разрывов. При действии высокоэнергетичных ионов углерода с ЛПЭ, равной 10,6 кэВ/мкм, выход ДР ДНК достоверно не отличается от выхода, наблюдаемого при  $\gamma$ -облучении. Установлено, что частота образования ДР как у прокариот, так и у клеток млекопитающих возрастает до максимальных значений при ЛПЭ  $\approx 200$  кэВ/мкм<sup>12</sup>/Christensen et al., 1972/, <sup>13</sup>/Kampf and Eichhorn, 1983/. Возрастание выхода ДР ДНК с ростом ЛПЭ

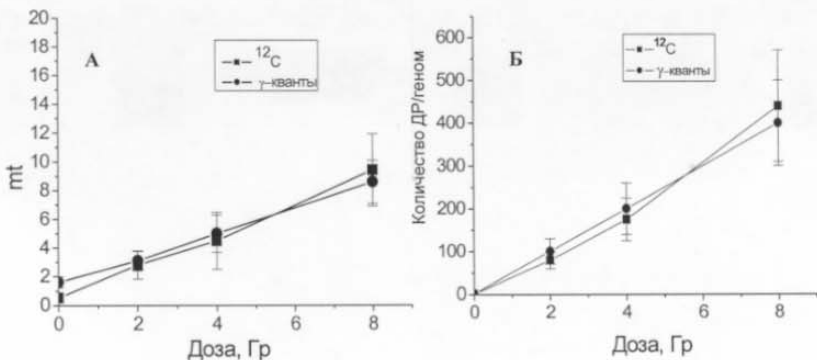


Рис.14. Индукция двуниевых разрывов ДНК в клетках лимфоцитов крови человека при облучении  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  и ускоренными ионами углерода с энергией 480 МэВ/нуклон. А – зависимость параметра mt от дозы облучения. Б – зависимость количества ДР ДНК на геном от дозы облучения.

излучений обусловлено характером микрораспределения энергии тяжелых заряженных частиц в генетических структурах. Пересечение треком тяжелого иона двух опозитных нитей ДНК, как известно, с большой вероятностью приводит к формированию прямого двуниевового разрыва. В наших экспериментах использовались ускоренные ионы углерода высоких энергий с относительно малой величиной ЛПЭ частиц. Данные о выходе ДР ДНК, полученные в экспериментах с лёгкими заряженными частицами низких энергий (ионами гелия, лития, бериллия), свидетельствуют о том, что биологическая эффективность частиц с ЛПЭ  $\approx 10$  кэВ/мкм слабо отличается от эффективности при  $\gamma$ -облучении <sup>13</sup>/Kampf and Eichhorn,1983/. Наши результаты, полученные с использованием высокоэнергетичных ионов углерода, обладающих сравнительно малыми значениями ЛПЭ, также свидетельствуют о том, что ионы углерода индуцируют ДР ДНК с эффективностью, близкой к наблюдаемой при  $\gamma$ -облучении клеток.

Важным является вопрос о кинетике репарации ДР ДНК у клеток различного происхождения при действии плотноионизирующих излучений.

Имеются указания на то, что репарация протекает либо с одинаковой скоростью <sup>14</sup>/Maki et al., 1986/, либо замедлена. При этом фракция невосстановленных разрывов после воздействия плотноионизирующих излучений оказывается существенно большей <sup>15</sup>/Peak et al.,1991/ по сравнению с воздействием редкоионизирующих излучений. На рис.15 приведена кинетика репарации ДР ДНК при  $\gamma$ -облучении дозой 80 Гр и действии ионов углерода 480 МэВ/нуклон дозой 6 Гр. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что кинетики репарации ДР ДНК при  $\gamma$ -облучении и действии высокоэнергетичных ионов близки между собой. Репарация ДР ДНК протекает по экспоненциальной кинетике и значительная часть разрывов после облучения клеток  $\gamma$ -квантами

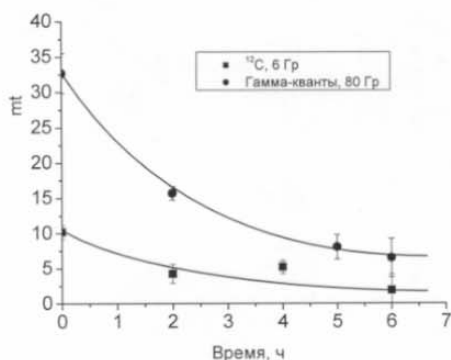


Рис.15. Кинетика репарации ДР ДНК при  $\gamma$ -облучении и действии ускоренных ионов углерода с энергией 480 МэВ/нуклон.

восстанавливается спустя 4-6 ч. При действии ускоренных ионов углерода, репарация ДР ДНК в облученных клетках осуществляется также эффективно. Видно, что кинетические кривые репарации ДР имеют сходный характер, что может объясняться низкими значениями ЛПЭ ионов углерода с энергией 480 МэВ/нуклон.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, представленные материалы впервые позволили установить закономерности и механизмы индукции генных и структурных мутаций у

бактериальных клеток с различным генотипом при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ. На основании экспериментов с использованием ускоренных тяжелых ионов различных энергий сделан вывод о том, что эффективность мутагенного действия тяжелых заряженных частиц на клетки с различным генотипом, оцениваемая на основе различных критериев, определяется особенностями микрораспределения энергии излучений в генетических структурах, влияющих на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью конститутивных и индуцибельных систем репарации клеток. Относительная биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц, оцениваемая по различным критериям генетических эффектов облучения: летальному действию, индукции генных и делеционных мутаций, эксцизии транспозонов, возрастает с увеличением ЛПЭ частиц до определённых значений. Величина ЛПЭ ( $L_{max}$ ), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ, варьирует в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного эффекта. Для генных мутаций и индукции точной эксцизии транспозона значения  $L_{max}$  реализуются в области ЛПЭ существенно меньших, чем для летальных эффектов облучения и индукции делеционных мутаций. Различия в положении  $L_{max}$  для изученных генетических эффектов облучения определяются различным типом повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс.

При действии на клетки высокоэнергетичных тяжелых ионов формирование двуниевых разрывов ДНК зависит от величины ЛПЭ тяжелых заряженных частиц. Эффективность тяжелых ионов высоких энергий с низкими значениями ЛПЭ по данному критерию облучения близка к таковой при действии  $\gamma$ -квантов. Рассмотрены перспективы дальнейших генетических исследований с тяжелыми заряженными частицами высоких энергий, что позволит решить многие практические вопросы, стоящие перед космической радиобиологией, радиационной генетикой и медициной.



## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально показано, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с различным генотипом, оцениваемая по летальному действию, индукции генных и делеционных мутаций, точной эксцизии транспозонов, детерминирована особенностями передачи энергии излучений, влияющими на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации клеток. Возрастание относительной биологической эффективности тяжелых заряженных частиц обусловлено увеличением выхода повреждений ДНК, участвующих в формировании радиационно-индуцированных эффектов, и повышением эффективности индуцибельных систем репарации.
2. В сравнительных экспериментах по индукции обратных  $his^- \rightarrow His^+$  генных мутаций у вегетативных клеток спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и прямых  $tonB$  и  $colB$  мутаций у клеток *Escherichia coli* установлено, что закономерности и механизмы мутационного процесса, индуцированного излучениями с разной ЛПЭ, у этих видов бактерий близки между собой. Частота мутирования клеток при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ зависит от эффективности индуцибельной системы репарации и величины ЛПЭ тяжелых заряженных частиц. Для клеток *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* выявлено наличие квадратичной компоненты дозовой зависимости выхода точковых мутаций, формирующихся с участием ошибочной ветви SOS-репарации при  $\gamma$ -облучении и действии тяжелых ионов. Одинаковый характер дозовых кривых мутагенеза при действии  $\gamma$ -квантов и тяжелых ионов обусловлен участием  $\delta$ -электронного компонента треков заряженных частиц в формировании генных мутаций.
3. Показано, что закономерности индукции генных и делеционных мутаций в клетках *Escherichia coli* при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ,

различны. Для генных мутаций характерна линейно-квадратичная дозовая зависимость, выход делеционных мутаций линейно связан с дозой облучения. Характер зависимостей  $N_m/N(D)$  для этих типов мутаций не меняется с возрастанием ЛПЭ излучений. Выявленные особенности дозовых кривых мутагенеза для генных и делеционных мутаций обусловлены разным характером повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс и участием разных систем репарации в образовании точковых и структурных мутаций.

4. Установлено, что тяжелые заряженные частицы в широком диапазоне ЛПЭ индуцируют эксцизию транспозонов у клеток *Escherichia coli*. Показано, что процесс эксцизии мобильных элементов, делеционный по молекулярной природе, определяется эффективностью функционирования генов гессемейства, участвующих в индуцибельной SOS-репарации. С ростом дозы облучения ускоренными тяжелыми ионами в диапазоне ЛПЭ, равном 20-100 кэВ/мкм, частота формирования делеций, вызванных точной эксцизией транспозона, описывается степенной зависимостью. Определяющее влияние индуцибельной SOS-репарации на процесс эксцизии мобильных элементов и степенной характер дозовой зависимости этого процесса, указывают на однотипный характер молекулярных нарушений структуры ДНК, участвующих в образовании генных мутаций и точной эксцизии транспозонов у бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разными физическими характеристиками.
5. Показано, что биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц, оцениваемая по критерию летального действия, индукции генных и делеционных мутаций, точной эксцизии транспозонов увеличивается с ростом величины их линейной передачи энергии. Установлено, что величина ЛПЭ ( $L_{max}$ ), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ по использованным критериям облучения, варьирует в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного

эффекта. Показано, что для генных мутаций и индукции точной эксцизии мобильных элементов значения  $L_{\max}$  реализуются в области ЛПЭ, равных  $\approx 20$  кэВ/мкм. Для летальных эффектов облучения и индукции делеционных мутаций величина  $L_{\max}$  составляет  $\approx 50$  и  $100$  кэВ/мкм, соответственно. Различия в положении  $L_{\max}$  для изученных радиационно-генетических эффектов определяются различным типом повреждений ДНК, участвующих в мутационном процессе.

6. Установлено, что частота образования двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови человека в зависимости от дозы ускоренных ионов углерода с энергией  $480$  МэВ/нуклон описывается линейной функцией. Биологическая эффективность высокоэнергетичных ионов углерода не превышает значений, выявляемых при облучении клеток  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ . Кинетика репарации двунитевых разрывов ДНК при действии высокоэнергетичных тяжелых ионов близка к таковой при  $\gamma$ -облучении. Одинаковые значения биологической эффективности ускоренных ионов углерода и  $\gamma$ -квантов обусловлены низкими значениями ЛПЭ тяжелых заряженных частиц высоких энергий.
7. Предложена молекулярная модель образования генных мутаций в клетках *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений. В рамках модели рассматриваются основные радиационные повреждения ДНК и магистральные пути их репарации. В основу положено представление о решающей роли мутагенной, склонной к ошибкам ветви SOS-репарации в фиксации премутационных повреждений ДНК в точковые мутации. Показано, что центральным механизмом в этом процессе является формирование индуцибельного мультиферментного комплекса, включающего ДНК-полимеразу V (UmuD'<sub>2</sub>C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III, осуществляющего ошибочный синтез ДНК на поврежденной матрице.

- 
- 1/ Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991, 183 с.
  - 2/ Michalik V. - Int. J. Radiat. Biol., 1992, v.62, p.9-20.
  - 3/ Chatterjee, A. and W.R. Holley In Advances in Radiation Biology v.17, p.181-226. Academic Press, 1993.
  - 4/ Aleshkin G.I. et al. - Mutat. Res., 1998, v. 401, p. 179-191.
  - 5/ Тронов В.А., Пелевина И.И. - Цитология, 1996, т.38, №4/5, с.427-439.
  - 6/ Красавин Е.А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.,:Энергоатомиздат, 1989, 193 с.
  - 7/ Kozubek S. et al. - Rad. Research, 1995, v.141, p.199-207.
  - 8/ Reuven N.B. et al. - J.Biol.Chem., 1999, v.274, No45, p.31763-31766.
  - 9/ Sargentini N.J., Smith K.C - Mutat. Res., 1992, v.265, No1, p.83-101.
  - 10/ Kozubek S. et al.- Mutat. Res., 1989, v.210, p.221-226.
  - 11/ Chan A. et al. - Mut. Res., 1994, v. 325, № 2-3, p.75-79.
  - 12/ Christensen R.C. et al. - Int.J.Radiat.Biol., 1972, v.22, No5, p.457-477.
  - 13/ Kampf G., Eichhorn K. - Stud. Biophys., 1983, v.93, p.17-26.
  - 14/ Maki H. et al., 1986, - Int. J. Radiat. Biol., 1986, v.50 p. 795-810.
  - 15/ Peak M.J. et al., - Int. J. Radiat. Biol., 1991, v.60, p.891-898.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Boreyko A., Horneck G., Krasavin E., Kadyshevskaya E. Mutagenic action of radiation with different LET on *Bacillus subtilis* vegetative cells.// 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Stockholm, Sweden, 1993, p. 7-9.
2. Boreyko A.V., Krasavin E. Induction of mutations in vegetative *Bacillus subtilis* cells by radiation with different LET.// Symposium on "Radiation Biology and its Application in Space Research", Brno, Czech Republic, 1994, p. 96-102.

3. Boreyko A., Krasavin E. Mutagenesis in vegetative *Bacillus subtilis* cells induced by radiation with different LET.// Congress proceedings "Tenth International Congress of Radiation Research", Wurzburg, Germany, 1995, p. 163.
4. Борейко А.В., Красавин Е.А. Закономерности мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на клетки *Bacillus subtilis*. //Радиационная биология. Радиоэкология, 1997, т.17, вып.3, стр. 408-412.
5. Булах А.П., Борейко А.В., Красавин Е.А. Закономерности мутагенного действия  $\gamma$ -излучения на вегетативные клетки *Bacillus subtilis* с разным репарационным генотипом. // Р19-2000-110, ОИЯИ, Дубна, 2000, с. 1-10.
6. Булах А.П., Борейко А.В. Закономерности индукции делеционных мутаций у клеток *Escherichia coli* при действии  $\gamma$ -излучения. // Р-19-2000-109, ОИЯИ, Дубна, 2000, с. 1-10.
7. Булах А.П., Борейко А.В. Закономерности индукции делеционных мутаций у бактерий *Escherichia coli* излучениями с разной ЛПЭ.// Тезисы докладов Международной конференции «Проблемы радиационной генетики на рубеже веков», Москва, 2000, с. 173.
8. Boreyko A.V., Bulah A.P., Komova O.V., Krasavin E. Mutagenic action of radiation with broad region of LET on bacterial cells.// International conference "Modern problems of radiobiology, radioecology and evolution", Dubna, 2000, p. 103.
9. Krasavin E., Boreyko A.V., Bulah A.P., Komova O.V., Koltovaya N.A., Lubimova K.A. Mutagenic action of radiation with broad region of LET on microorganisms.// International workshop on "Higher-order structure of cell nuclei and genetic effects of radiation", Czech Republic, Valtice, 2000, p. 19.
10. Журавель Д.В., Борейко А.В. Закономерности индукции эксцизии транспозона Tn10 в клетках гес-мутантов бактерий *E. coli*  $\gamma$ -излучением  $^{137}\text{Cs}$ .// II Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна, 2001, с. 141.

11. Журавель Д.В., Борейко А.В. Закономерности индукции эксцизии транспозона Tn10 в клетках гес-мутантов бактерий *E. coli*  $\gamma$ -излучением  $^{137}\text{Cs}$ . // Труды«II Международного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», Дубна, 2002, с. 125-129.
12. Журавель Д.В., Борейко А.В. Закономерности эксцизии транспозона Tn10 в клетках гес-мутантов бактерий *E. coli* при  $\gamma$ -облучении.// «Радиационная биология. Радиоэкология», 2002, т.42, №6, с. 536-638.
13. Boreyko A., Bulah A., Komova O., Krasavin E. Point and deletion mutation induction in *Escherichia coli* cells by heavy ions. // "32<sup>nd</sup> Annual meeting of the European Society for Radiation Biology", 2002, Liege, Belgium, p. 374.
14. Борейко А.В., Булах А.П., Красавин Е.А. Закономерности индукции генных и структурных мутаций ускоренными многозарядными ионами у бактерий *Escherichia coli*. // Сборник статей «Избранные труды университета «Дубна», вып.1, 2004, с. 69-78.
15. Борейко А.В., Булах А.П., Красавин Е.А. Индукция генных и делеционных мутаций ускоренными тяжелыми заряженными частицами у *Escherichia coli*.// Радиационная биология. Радиоэкология, 2004, т.45, №3, с. 299-304.
16. Борейко А.В., Журавель Д.В. Закономерности точной эксцизии транспозона Tn10 в клетках *Escherichia coli* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ.// «Письма в журнал "Физика элементарных частиц и атомного ядра"», т. 2, № 4 (127), 2005, с. 107-111.
17. Boreyko A.V., Bulah A.P., Krasavin E.A. The Regularities of Formation of Gene and Structural Mutations in *Escherichia coli* Cells after Heavy-Ion Irradiation.// Part. and Nucl., Lett., 2005, No. 4(127), с. 102-106.
18. Борейко А.В., Тронов В.А. Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии высокоэнергетичных ионов углерода.// P-19-2005-166, ОИЯИ, Дубна, 2005, с. 1-10.
19. Борейко А.В., Булах А.П. Сравнительное исследование индукции генных мутаций у *Vacillus subtilis* и *Escherichia coli* при действии излучений с разной ЛПЭ.// P-19-2005-170, ОИЯИ, Дубна, 2005, с. 1-9.

Получено 9 ноября 2005 г.

Отпечатано методом прямого репродуцирования  
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 09.11.2005.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 2,75. Уч.-изд. л. 2,88. Тираж 100 экз. Заказ № 55090.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@pds.jinr.ru](mailto:publish@pds.jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)