

УДК 577.3.08 : 547.963.32.

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ АГЕНТОВ

**К. Е. Круглякова**

В обзоре представлены данные по изучению повреждения макромолекулы ДНК под действием ионизирующего излучения, УФ-света, ультразвука и химических мутагенов

Рассматривается применение методов химической кинетики и других физико-химических методов (ЭПР, хемилюминесценции, спиновых меток, электронной микроскопии и др.) к изучению механизма повреждения макромолекулы ДНК при различных воздействиях, анализируются схемы возникновения химических и структурных изменений в ДНК. Обсуждена гипотеза о свободно-радикальном характере повреждения ДНК под действием радиации и о возможности использования ингибиторов радикальных реакций в качестве радиозащитных средств и приведены доказательства ее справедливости.

Библиография — 181 ссылка.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1887
II. Изменение физико-химических свойств ДНК при действии ионизирующего излучения. Механизм защитного действия ингибиторов радикальных реакций . . . . .	1888
III. Кинетика денатурации ДНК при действии УФ-света . . . . .	1897
IV. Специфика действия ультразвука на ДНК . . . . .	1900
V. Кинетика и химизм реакции взаимодействия производных этиленimina и нитрозоалкилмочевин с ДНК . . . . .	1903

### I. ВВЕДЕНИЕ

В 1957 г. Н. М. Эмануэль предложил использовать методы физической химии и химической кинетики для изучения ряда патологических процессов, таких как лучевая болезнь, опухолевый рост, старение и др.<sup>1-5</sup> Эти процессы изучали на различных уровнях организации — молекулярном<sup>6, 7</sup>, клеточном<sup>8-10</sup> и на уровне целого организма<sup>11-14</sup>.

Исследования на молекулярном уровне включали анализ изменений таких важных биомолекул, как белки<sup>15-17</sup>, нуклеиновые кислоты<sup>18-23</sup>, липиды<sup>24-26</sup>, ферменты<sup>27-29</sup>, незначительные изменения в структуре которых могут приводить к нарушению нормальных жизненных процессов в клетке. Большое внимание было уделено анализу повреждения нуклеиновых кислот и, в частности, ДНК<sup>30, 31</sup>.

Известно, что изменение структуры ДНК при различных воздействиях легко может приводить к нарушению наследственной информации, изменению синтеза специфических белков и, в ряде случаев, к гибели клетки. Использование физико-химических методов для количественного изучения нарушений структуры ДНК при различных воздействиях в модельных экспериментах позволяет получать данные о первичных молекулярных «событиях», приводящих к повреждению макромолекулы. Эти сведения существенны для решения общей проблемы нуклеиновых кислот, связанной с процессами их функционирования в клетке (в частности, для понимания механизма возникновения мутаций или гибели клетки).

## II. ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ. МЕХАНИЗМ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ РАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Задача выяснения физико-химической сущности процессов, возникающих в облученной клетке, все еще стоит на повестке дня исследования многих ученых<sup>32-34</sup>.

Для определения закономерностей развития реакций, приводящих клетку к гибели, важно выяснить, какие структуры клетки поражаются и в какой последовательности. Многочисленными радиобиологическими исследованиями установлено, что под влиянием ионизирующего излучения поражается ядро<sup>35, 36</sup>, нарушается деление клетки<sup>37</sup>, возникают хромосомные aberrации<sup>38</sup>. Показано, что замещение тимина в ДНК на галогенированные аналоги приводит к усилению радиочувствительности клетки<sup>39, 40</sup>. Анализ процессов восстановления в облученной клетке позволил установить связь химических изменений в макромолекуле ДНК с наблюдаемым радиационным эффектом<sup>41</sup>. Эти данные указывали на то, что именно ДНК является одной из главных мишеней для радиации.

Первые исследования радиационного повреждения ДНК при высоких дозах позволили зафиксировать как химические изменения в макромолекуле (образование перекисей, выделение аммиака)<sup>42, 43</sup>, так и структурные повреждения ДНК (изменение вязкости облученных растворов)<sup>44</sup>. В более поздних работах показано, что в результате действия ионизирующего излучения на ДНК возможно возникновение одиночных и двойных разрывов в цепях макромолекулы<sup>45-48</sup>, химическая модификация оснований и сшивки между комплементарными цепями ДНК<sup>49-51</sup>.

По мере разработки новых физических, биохимических и физико-химических методов исследования биомacroмолекул удалось дифференцировать действие различных доз облучения на ДНК, что необходимо учитывать при изучении механизма радиационного повреждения клетки и организма в целом. Так, использование метода спиновых меток<sup>52</sup> для анализа повреждений в ДНК позволило обнаружить при низких дозах облучения (0,5—8 крад) конформационные нарушения в макромолекуле<sup>53</sup>. По спектрам ЭПР спин-меченой ДНК были вычислены значения  $\tau_c$  времени корреляции спиновой метки (среднее время, необходимое для поворота стабильного радикала на угол 45°), и связанной с ней обратной зависимостью частоты вращения радикала ( $\nu$ ). Эти величины дают возможность получить информацию о кинетике изменения микроокружения метки в процессе облучения. Наблюдаемое резкое уменьшение  $\tau_c$  с увеличением дозы указывает на нарушение структуры ДНК вблизи места присоединения метки (рис. 1).

Анализ кривых зависимости  $\lg \tau_c$  от  $1/T$  позволил определить температуру структурных переходов ( $T_{сп}$ ), которая сдвигается при облучении в сторону более низких температур. Это свидетельствует о появлении конформационных нарушений в макромолекуле. Было установлено, что значения  $T_{сп}$  для ДНК, выделенной из разных источников, существенно различаются. Так,  $T_{сп}$  для ДНК, выделенной из опухолевых клеток, оказалась ниже, чем для ДНК, выделенной из нормальных клеток<sup>53, 54</sup>. Наблюдаемое различие может быть обусловлено тем, что в структуре ДНК опухолевых клеток содержится больше дефектов вторичной структуры<sup>55</sup>. Справедливость этого предположения была доказана анализом дефектов вторичной структуры в ДНК, выделенной из нормальных и опухолевых клеток, кинетическим формальдегидным методом<sup>56</sup>. Применимость этого метода к анализу нарушений структуры ДНК при низких

дозах  $\gamma$ -облучения (до 5 *крад*) показана в работе<sup>57</sup>. При этом авторы обнаружили один дефект структуры на 2600 пар нуклеотидов.

Конформационные нарушения в ДНК при низких дозах были зарегистрированы также методом импульсной полярографии<sup>58</sup>. Некоторые авторы указывают на возможность повреждения оснований ДНК при низких дозах (2—10 *крад*)<sup>59</sup>.

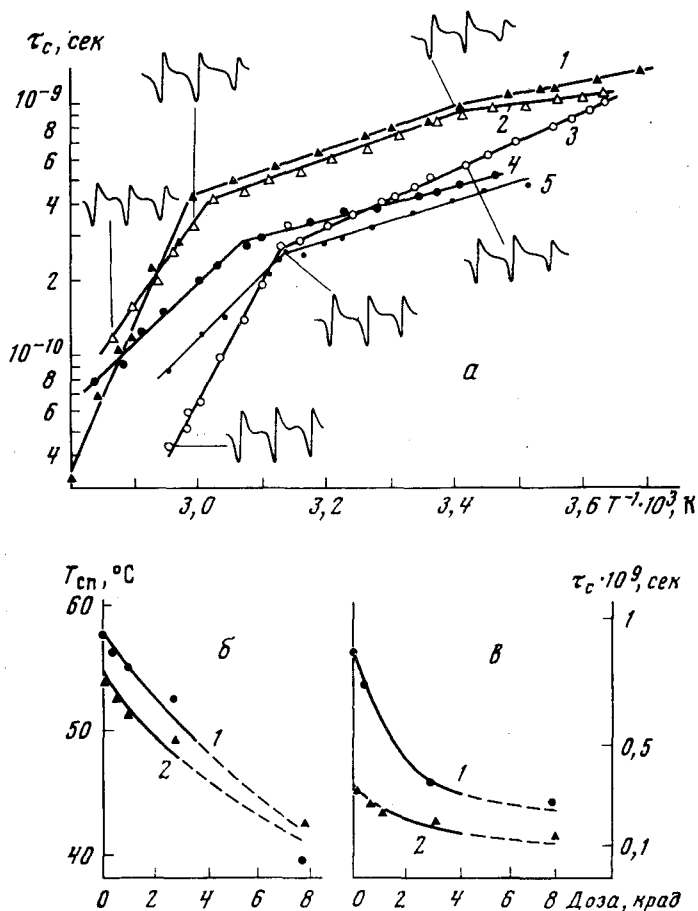


Рис. 1. Спектры ЭПР и температурная зависимость времени корреляции спин-меченой ДНК. а: 1, 2 — ДНК, выделенная из лимфоцитов крови двух здоровых коров; 3, 4, 5 — ДНК, выделенная из лимфоцитов крови трех лейкозных коров. б, в — дозовые зависимости  $T_{сп}$  и  $\tau_c$  для ДНК, выделенной из нормальных (кривые 1) и лейкозных (кривые 2) клеток

Более высокие дозы (20—100 *крад*) приводят к существенным нарушениям структуры макромолекулы (образуются одиночные и двойные разрывы) и химическим изменениям (образование гидроперекисей)<sup>60-63</sup> (рис. 2). Использование метода ИК-спектроскопии<sup>64, 65</sup> позволило обнаружить при дозах 20—100 *крад* модификацию оснований по изменению интенсивности полос в спектрах облученных растворов ДНК: дезаминирование (полосы при 3350, 3200, 1600  $см^{-1}$ ); насыщение двойных связей (полосы при 1580 и 1650  $см^{-1}$ ); нарушение вторичной структуры ДНК — разрывы водородных связей (полоса при 1700  $см^{-1}$ )

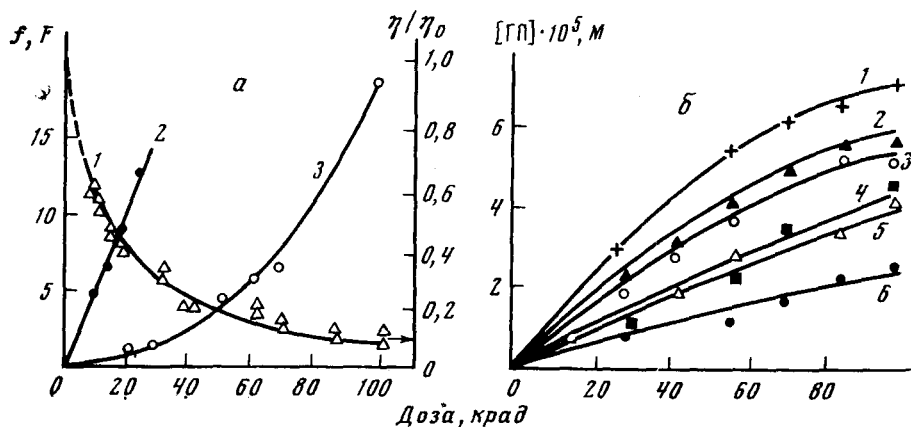


Рис. 2

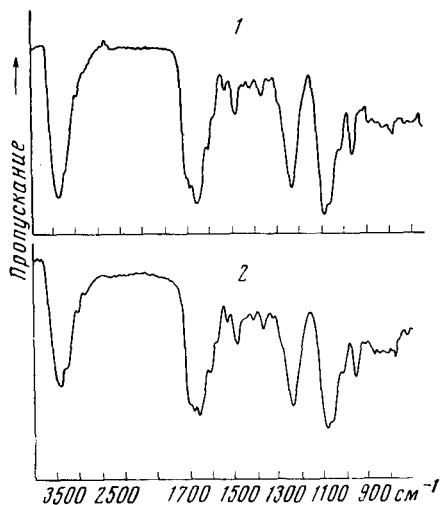


Рис. 3

Рис. 2. Изменение физико-химических (а) и химических свойств (б) ДНК при облучении различными дозами. а: 1 — приведенная вязкость в относительных единицах; 2, 3 — число одиночных (2) и двойных (3) разрывов в ДНК. б: Количество гидроперекисей ДНК, образующееся при облучении; концентрации ДНК: 1—1000; 2—700; 3—500; 4—400; 5—100; 6—50  $мкг/мл$

Рис. 3. ИК спектры пленки ДНК тимуса теленка при 32%-ной относительной влажности. 1 — нативная ДНК; 2 —  $\gamma$ -облученная ДНК (доза 55 крад)

и фосфорно-эфирных связей (полоса при  $953\text{ см}^{-1}$ ) (рис. 3). Радиационное повреждение ДНК можно наблюдать на электронномикроскопических снимках макромолекулы<sup>66, 67</sup>. Длинные линейные макромолекулы после облучения дозами 60—300 крад превращаются в короткие обрывки и клубки.

Какова же причина таких существенных изменений в молекуле ДНК и на каких стадиях многоступенчатого механизма повреждения макромолекулы необходимо внешнее воздействие, чтобы ликвидировать или приостановить процесс?

Несколько лет назад Н. М. Эмануэль на основании общих представлений химической кинетики, радиационной химии и биохимии высказал следующие соображения:<sup>68</sup>

«1. Воздействие ионизирующей радиации приводит к образованию свободно-радикальных состояний химических компонентов клетки, которые могут вызывать биохимические процессы, не свойственные живому организму в норме.

2. Развитие свободно-радикальных реакций в организме должно приводить к уменьшению количества тканевых ингибиторов подобно тому, как это имеет место при протекании радикальных химических процессов, вызванных облучением в присутствии ингибиторов. Уменьшение количества тканевых ингибиторов нарушает способность организма к правильной регуляции биохимических процессов, что может быть одной из причин возникновения сдвигов, свойственных лучевой болезни.

Выдвинутые представления сделали необходимым изучение свободно-радикальных состояний в биохимических системах и, в частности, в биомacroмолекулах — белках, липидах, нуклеиновых кислотах. Методами ЭПР<sup>69, 70</sup> и хемилюминесценции<sup>71</sup> было показано, что для повреждения структуры макромолекулы существенное значение могут иметь как первичные радикалы, образующиеся в процессе облучения ДНК, так и вторичные, возникающие в результате распада гидроперекисных соединений ДНК.

Образование и превращение радикалов ДНК удалось зафиксировать в ходе облучения водных растворов ДНК при низких температурах (77 К). В этом случае все продукты радиолиза ДНК являются стабильными<sup>72</sup>. Показано, что спектр ЭПР облученных растворов ДНК содержит линии парамагнитных частиц, образующихся из воды (радикал  $\text{OH}$  и стабилизированный электрон  $e_{\text{ст}}$ ) и макрорадикалов ДНК. При нагревании образца радикалы  $\text{OH}$  и  $e_{\text{ст}}$  исчезают, при этом проявляются линии спектров радикалов ДНК. Огибающая дублетная линия радикалов ДНК постепенно «переходит» в более сложную — квартетную, и при более высоких температурах (193 К) регистрируется 8-компонентный спектр, близкий к спектру тиминового радикала<sup>72, 73</sup>.

С увеличением концентрации ДНК в растворе и температуры облучения выход радикалов возрастает. Кинетические кривые накопления радикалов ДНК соответствуют уравнению  $c = c_{\text{ст}} \cdot (1 - e^{-kD})$ , где  $c_{\text{ст}}$  — стационарная концентрация радикалов при больших дозах облучения,  $k$  — константа скорости гибели радикалов в процессе облучения,  $D$  — доза облучения в *Мрад*.

Для того чтобы установить природу радикалов, образующихся из ДНК, и места локализации свободной валентности в макромолекуле, изучали действие радиации на соединения, моделирующие отдельные фрагменты биополимера — азотистые основания<sup>74, 75</sup>, углеводы<sup>76–80</sup> и фосфорную кислоту<sup>81</sup>. Образование свободных радикалов в азотистых основаниях изучали в различных условиях. Наиболее детально изучено образование и превращение радикалов тимина. Установлено, что процесс образования радикалов тимина происходит за счет взаимодействия электрона с молекулой тимина с возникновением анион-радикала, которому соответствует дублетная сверхтонкая структура в спектре ЭПР. Анион-радикал, реагируя с водой, превращается в радикал тимина (типа  $\text{TH}$ ) (8-компонентный спектр ЭПР). Регистрируемая сверхтонкая структура спектра обусловлена локализацией неспаренного электрона на С (5) тимина<sup>75</sup>.

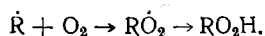
Первичной реакцией образования радикалов в сахарном фрагменте ДНК является отщепление атома Н радикалами  $\text{OH}$  и  $\dot{\text{H}}$ . Анализ спектров ЭПР облученных препаратов 2-дезоксирiboзы и других углеводов<sup>76, 80, 82</sup> позволил интерпретировать спектр ЭПР 2-дезоксирiboзы как результат наложения линий радикалов, в которых свободная валентность в основном локализована на атомах  $\text{C}'(1)$ ,  $\text{C}'(3)$ ,  $\text{C}'(5)$ .

Методом ЭПР изучены облученные замороженные растворы солей и самой фосфорной кислоты, ДНК и соединений, моделирующих ее сахарный фрагмент. В спектрах ЭПР ДНК отсутствовали линии, харак-

терные для радикалов фосфорной кислоты. Это позволило заключить, что если фосфатный фрагмент в ДНК и поражается, то в конечном итоге свободная валентность локализуется на сахарном фрагменте<sup>81</sup>.

Сравнительное изучение спектров ЭПР ДНК, 2-дезоксирибозы и азотистых оснований позволило сделать вывод, что в ДНК могут образовываться по крайней мере два типа свободных радикалов: со свободной валентностью, локализованной на сахарном фрагменте, и на азотистых основаниях. Возникновение радикалов в ДНК возможно за счет как прямого, так и косвенного действия радиации.

Образующиеся при облучении макрорадикалы ДНК ( $R'_{\text{ДНК}}$ ) в присутствии кислорода превращаются в перекисные радикалы  $RO_2^{\cdot}$ <sup>72, 73</sup> и далее — в перекисные соединения (гидроперекиси):



Гидроперекиси, как известно, являются радиотоксинами и, в свою очередь, могут распадаться с образованием радикалов, инициируя нежелательные процессы как в растворах ДНК (уменьшение молекулярного веса биополимера, образование одиночных разрывов), так и в клетке.

Образование гидроперекисей ДНК при облучении было установлено в ряде работ<sup>84, 85</sup>. Кинетический анализ процессов образования и распада гидроперекисей ДНК позволил показать<sup>86, 87, 83</sup>, что образуются гидроперекиси двух типов — мало устойчивая и более устойчивая. В общем виде константы их распада могут быть представлены в виде:

$$\begin{aligned} k_1 &= 3,6 \cdot 10^5 \exp(-13000/RT), \text{ сек}^{-1}; \\ k_2 &= 1,3 \cdot 10^{11} \exp(-23000/RT), \text{ сек}^{-1}. \end{aligned}$$

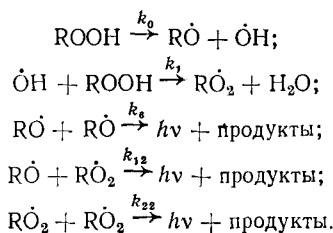
Эти значения удовлетворительно согласуются с константами распада гидроперекисей (ГП) тимина ( $k_t$ ) и цитозина ( $k_c$ )

$$\begin{aligned} k_t &= 4,5 \cdot 10^{11} \exp(-23000/RT), \text{ сек}^{-1}; \\ k_c &= 6,4 \cdot 10^5 \exp(-11500/RT), \text{ сек}^{-1}. \end{aligned}$$

Это дало основание считать, что среди ГП ДНК менее устойчивой является ГП цитозина, а более устойчивой — ГП тимина. Использование метода ингибиторных добавок<sup>88</sup> позволило установить радикальный характер распада гидроперекиси цитозина и, следовательно, менее устойчивой гидроперекиси ДНК<sup>87</sup>. Распад ГП цитозина ( $4,0 \cdot 10^{-5}$  М) замедлялся в присутствии эффективного ингибитора свободно-радикальных реакций  $\alpha$ -нафтола. Сам  $\alpha$ -нафтол расходовался со скоростью, пропорциональной скорости распада ГП, что указывало на возможность образования радикалов при распаде гидроперекиси цитозина. При изучении природы хемилюминесценции в облученных растворах ДНК было показано, что свечение обусловлено радикальным распадом гидроперекисей ДНК и, по-видимому, ГП цитозина<sup>89-92</sup>. Это следовало из ряда экспериментальных фактов (рис. 4): наблюдалась линейная зависимость интенсивности свечения от концентрации гидроперекисей; кинетическая кривая распада менее устойчивой ГП ДНК хорошо совмещалась с кинетической кривой свечения; значения величин энергии активации свечения облученных растворов ДНК  $E_{\text{хл}}$ , энергии активации распада менее устойчивой гидроперекиси  $E_1$  и гидроперекиси цитозина  $E_c$  имели близкие значения:

$$\begin{aligned} E_{\text{хл}} &= 13 \pm 1 \text{ ккал/моль}; \\ E_1 &= 13 \pm 1 \text{ ккал/моль}; \\ E_c &= 11 \pm 1 \text{ ккал/моль}. \end{aligned}$$

Общая схема распада гидроперекиси может быть представлена следующим образом<sup>22, 71</sup>:



В предположении о стационарности концентрации радикалов в системе можно записать уравнения для скорости превращения  $\text{OH}$ ,  $\text{RO}$  и  $\text{RO}_2$ , решение которых при предположении, что  $k_3 = \sqrt{k_6 k_9}$ , позволяет получить выражение для концентрации этих радикалов. Гибелью радикалов  $\text{OH}$



Рис. 4. Хемилюминесценция в реакции распада гидроперекисных соединений ДНК. *a* — изменение во времени интенсивности хемилюминесценции (кривая 1) и концентрации менее устойчивой гидроперекиси (точки на кривой) в облученном растворе ДНК при 72°. 2 — полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой 1. *б* — зависимость максимальной интенсивности свечения облученного раствора ДНК (700 мкг/мл) от начальной концентрации гидроперекисей

можно пренебречь, так как в присутствии  $\text{ROOH}$  скорость их рекомбинации на несколько порядков меньше, чем скорость их взаимодействия с  $\text{ROOH}$ <sup>93</sup>. Стационарные концентрации радикалов имеют вид:

$$\begin{aligned} [\text{RO}] &= \sqrt{\frac{k_{22}}{k_6}} [\text{RO}_2]; \\ [\text{RO}_2]^2 &= \frac{k_0 [\text{ROOH}]}{k_{22} + k_{12} \sqrt{k_{22}/k_6}}. \end{aligned}$$

Поскольку интенсивность хемилюминесценции  $I_{\text{хл.}}$  пропорциональна скорости рекомбинации свободных радикалов, на основании принятой схемы можно записать:

$$I_{\text{хл.}} = Ak_6 [\text{RO}]^2 + Bk_{12} [\text{RO}] \cdot [\text{RO}_2] + Ck_{22} [\text{RO}_2]^2.$$

С учетом выражений для  $[\text{RO}]$  и  $[\text{RO}_2]$  получаем:

$$I_{\text{хл.}} = ak_0 [\text{ROOH}] = ak_0 [\text{ROOH}]_0 e^{-kt},$$

где

$$\alpha = \frac{Ak_{22} + Bk_{12} \sqrt{k_{22}/k_6} + Ck_{22}}{k_{22} + k_{12} \sqrt{k_{22}/k_6}}.$$

Полученное выражение для  $I_{\text{хл.}}$  хорошо согласуется с экспериментальными данными<sup>22</sup>.

Таким образом, при облучении водных растворов ДНК возможно образование радикалов как в первичных стадиях облучения, так и за счет превращения химических продуктов во вторичных процессах. И те, и другие реакции могут быть первопричиной нежелательных процессов в клетке и приводить к образованию разрывов в цепи ДНК и нарушению транскрипции. Естественно было полагать, что наиболее эффективными средствами предотвращения нежелательных реакций, протекающих с участием свободных радикалов, могли бы быть ингибиторы свободно-радикальных процессов (ИРП), успешно применяемые в химии и предложенные Н. М. Эмануэлем<sup>68</sup> в качестве радиозащитных средств.

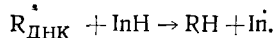
При исследовании радиозащитных свойств ИРП в модельных экспериментах с ДНК<sup>94, 95</sup> было установлено, что наиболее эффективными радиопротекторами являются производные галловой кислоты, 3-оксипиридина и фенилэтиламина. Радиозащитный эффект всех этих соединений в условиях значительного повреждения молекулы (60 крад) при их добавлении до облучения составляет 80—90%; для производных галловой кислоты и 3-оксипиридина наблюдается определенный защитный эффект (20—48%) при использовании их после облучения<sup>95</sup>. Ингибиторы радикальных реакций значительно уменьшают инактивацию трансформирующей активности ДНК при действии ионизирующего излучения<sup>96</sup>.

Обнаруженная линейная связь защитного эффекта с антирадикальной эффективностью исследованных соединений подтверждает предположение о существенной роли свободных радикалов в процессе повреждения молекулы ДНК, а наличие аналогичной зависимости в экспериментах на животных<sup>97, 98</sup> указывает на перспективность использования этих соединений в качестве радиозащитных средств.

Защитное действие ИРП при добавках их до облучения может осуществляться по двум механизмам:

1. Путем взаимодействия ингибиторов с радикалами — продуктами радиолиза воды. Это следует из того факта, что выход радикалов ДНК при облучении в присутствии пропилгаллата (ПГ) существенно уменьшается ( $G=0,1$  без ПГ и  $0,02$  с ПГ).

2. Путем восстановления радикала ДНК ингибитором до того, как этот радикал вступит в дальнейшие превращения:



Это следует из экспериментов по изучению изменения радикалов ДНК и пропилгаллата, облученных при низких температурах при разогревании образцов<sup>99</sup>. Показано, что при облучении водных растворов ДНК (5%) в присутствии пропилгаллата ( $3 \cdot 10^{-2}$  М) при 77 К образуются радикалы  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $R_{\text{ДНК}}^{\cdot}$  и  $R_{\text{ПГ}}^{\cdot}$ . Удалось установить, что с увеличением температуры образца от 77 до 123 К исчезают радикалы  $\text{OH}^{\cdot}$ , однако сумма радикалов  $R_{\text{ДНК}}^{\cdot}$  и  $R_{\text{ПГ}}^{\cdot}$  сохраняется неизменной. В дальнейшем с ростом температуры от 173 до 193 К суммарная концентрация радикалов не изменяется, но  $[R_{\text{ДНК}}^{\cdot}]$  падает, а  $[R_{\text{ПГ}}^{\cdot}]$  симбатно растет. Реализация такого механизма защиты макромолекулы, по-видимому, может



представлять интерес в плане возможных реакций восстановления при облучении в клетке.

Что касается защитного действия ингибиторов при добавлении их после облучения, то следует предположить, что в этом случае они могут взаимодействовать с радикалами, образующимися при распаде вторичных продуктов, например гидроперекисей, и тем самым ингибировать

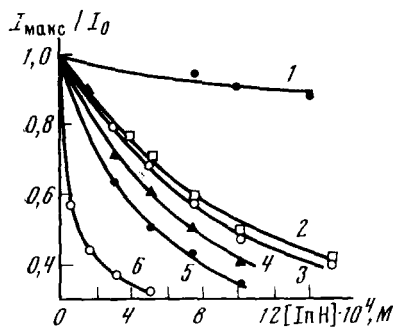


Рис. 5

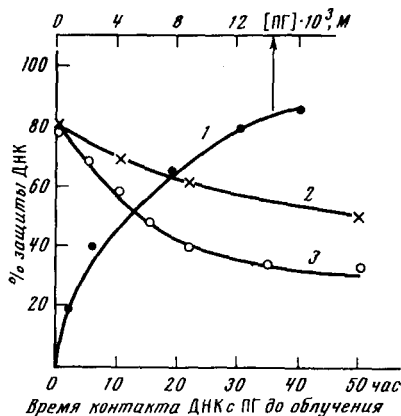


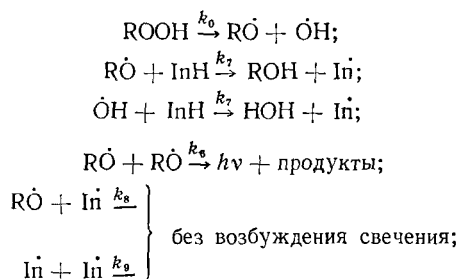
Рис. 6

Рис. 5. Кривые зависимости интенсивности хемилюминесценции (72°) растворов ДНК от концентрации ингибиторов. 1 — 4-этилфенол; 2 — гидрохинон; 3 — пирокатехин; 4 — пропилгаллат; 5 — пирогаллол; 6 — цистеин

Рис. 6. Действие пропилгаллата на разрушение ДНК при облучении. 1 — увеличение защитного действия ДНК с увеличением исходной концентрации пропилгаллата; 2, 3 — уменьшение защитного действия пропилгаллата ДНК в зависимости от времени его контакта с ДНК до облучения и степени его окисления. 2 — неокисленный пропилгаллат; 3 — пропилгаллат окисленный на 30%

реакции, протекающие при их участии. Интенсивность наблюдаемой хемилюминесценции в облученных растворах ДНК уменьшалась в присутствии различных ингибиторов, рис. 5, причем это уменьшение было тем сильнее, чем эффективнее был ингибитор<sup>90</sup>.

Схему возможных реакций в этом случае можно представить следующим образом<sup>22, 71</sup>:



Расчет этой схемы позволяет вывести зависимость интенсивности свечения ингибированного ( $I$ ) и неингибированного ( $I_0$ ) процессов от концентрации ингибитора в системе:

$$\sqrt{\frac{I_0}{I}} = 1 + \frac{k_7}{\sqrt{2k_0k_8}[\text{ROOH}]} [\text{InH}].$$

В эксперименте действительно наблюдается линейная связь  $\sqrt{I_0/I}$  с концентрацией используемого ингибитора<sup>91</sup>.

Следует, однако, иметь в виду, что превращение ингибитора с образованием свободных радикалов в ряде случаев может оказаться существенным для повреждения клеточных компонентов. В работах Липчиной, Пелевиной и др.<sup>100</sup> в экспериментах с опухолевыми клетками уста-

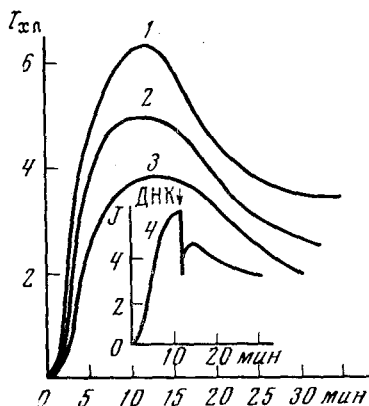


Рис. 7

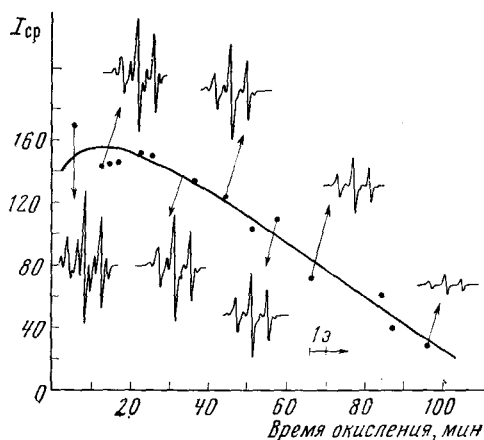


Рис. 8

Рис. 7. Кривые изменения интенсивности хемилюминесценции при окислении пропилгаллата. 1 — окисление пропилгаллата при 70°; 2, 3 — окисление пропилгаллата при добавлении разных концентраций ДНК: 2—80, 3—160 мкг/мл; 4 — изменение хемилюминесценции при добавлении ДНК (80 мкг/мл) в момент максимума интенсивности свечения

Рис. 8. Изменение интенсивности средней линии спектра ЭПР и формы спектров пропилгаллата при окислении в водно-спиртовой среде (20°, pH 11,5)

новлено, что действие наиболее эффективного ингибитора радикальных реакций — пропилгаллата — в зависимости от условий опыта может иметь двойственный характер. При добавлении ПГ к клеткам за короткое время до облучения (15 мин) обнаружен радиозащитный эффект; если же добавлять ПГ к клеткам за 18 час, наблюдается эффект радиосенсибилизации. Авторы предположили, что наблюдаемый эффект может быть связан с возможностью повреждения клеточной ДНК продуктами превращения ПГ.

Для выяснения вопроса, действительно ли продукты превращения ПГ могут реагировать с молекулой ДНК и как это будет отражаться на защитном эффекте ПГ, были проведены эксперименты на изолированной ДНК, в которых ПГ добавляли к облученным растворам ДНК в разное время до облучения и в разной степени глубины окисления<sup>101, 102</sup>. Оказалось, что при добавлении ПГ к облученному раствору ДНК непосредственно перед облучением наблюдается защитный эффект, который увеличивается с увеличением концентрации ПГ. Степень защиты уменьшается, если ПГ добавлять в окисленной форме или за несколько часов до облучения. Причем степень снижения защитного действия возрастает по мере увеличения времени контакта ПГ с ДНК до облучения (рис. 6).

Одной из возможных причин наблюдаемого эффекта могут быть повреждения структуры ДНК активными продуктами окисления ПГ задолго до облучения, которые делают молекулу более радиочувствительной во время облучения.

Известно, что в водной среде в присутствии кислорода пропилгаллат окисляется, образуя различные биологически активные продукты радикального и нерадикального характера: семихиноновые ион-радикалы, хиноны и др.<sup>103</sup>. Эти промежуточные продукты способны взаимодействовать с SH-группами белков<sup>104</sup>, подавлять активность многих ферментов<sup>105</sup>, обладать радиомиметическим действием, в частности, вызывать образование поломок хромосом<sup>106</sup>. Об образовании активных промежуточных продуктов радикальной природы свидетельствует возникновение хемилюминесценции при окислении ПГ<sup>102</sup>. Добавление ДНК в систему, как в начальный момент, так и во время, соответствующее максимальной интенсивности хемилюминесценции (рис. 7), резко снижает выход продуктов окисления и хемилюминесценцию. Методом ЭПР удалось зафиксировать свободно-радикальные продукты окисления ПГ, количество которых снижалось в присутствии ДНК (рис. 8). Эти факты указывают на то, что продукты превращения ПГ реагируют с ДНК.

В экспериментах с добавками в растворы ДНК ПГ разной степени окисленности удалось показать, что чем больше время окисления добавленного ПГ, тем сильнее нарушается структура ДНК — появляются одиночные и двойные разрывы молекул.

Таким образом, если одной из причин лучевого поражения клеток действительно является повреждение структуры ДНК, то модельные эксперименты с изолированной ДНК несомненно могут быть полезны для понимания механизма повреждения макромолекул и отыскания химических веществ для направленного изменения радиочувствительности клеток. Наиболее перспективными в этом плане могут быть ингибиторы радикальных реакций.

### III. КИНЕТИКА ДЕНАТУРАЦИИ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-СВЕТА

Известно, что УФ-излучение избирательно поглощается нуклеиновыми кислотами. Многие годы ДНК является центральным объектом исследований действия УФ-света на молекулярном уровне<sup>107–109</sup>, поскольку характер наблюдаемых изменений в клетке<sup>110</sup> при УФ-облучении — мутации, хромосомные aberrации, угнетение клеточного деления и синтеза ДНК — свидетельствуют о существенных нарушениях в ДНК.

Структурные изменения в ДНК проанализированы различными физико-химическими методами<sup>111–116</sup>. Показано, что экспоненциальному падению вязкости соответствует симбатное увеличение оптической плотности (гиперхромный эффект), причем кинетические константы этих процессов совпадают по абсолютной величине ( $7,6 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ )<sup>111</sup>. Поскольку хорошо известно, что в основе гиперхромного эффекта лежит нарушение характерной для нативной ДНК плоско-параллельной упаковки оснований, обусловленной наличием водородных связей, а также гидрофобным взаимодействием между соседними основаниями, такое совпадение констант может быть объяснено тем, что изменение вязкости происходит с нарушением именно этих связей. Таким образом, действие УФ-облучения сводится в основном к денатурации молекулы. Этот вывод подтвержден результатами седиментационного анализа растворов ДНК после УФ-облучения. Показано, что константа седиментации практически не изменялась в процессе УФ-облучения растворов ДНК ( $40 \text{ мкг/мл}$ ), что может служить указанием на отсутствие резкого изменения в молекулярном весе облученного препарата<sup>114</sup>.

Процесс УФ-денатурации молекулы ДНК наглядно виден на микро-

фотографиях,<sup>112</sup> снятых через определенные промежутки времени облучения. В течение первых 5 мин на микрофотографиях можно видеть отдельные уплотненные участки, которые становятся отчетливо видимыми после 20 мин облучения. При дальнейшем облучении (30 и 50 мин) в поле зрения наряду с длинными молекулами видны клубки, число и размеры которых увеличиваются (рис. 9).

Очевидно, процесс денатурации происходит постепенно с накоплением денатурированных участков вдоль цепи молекулы.

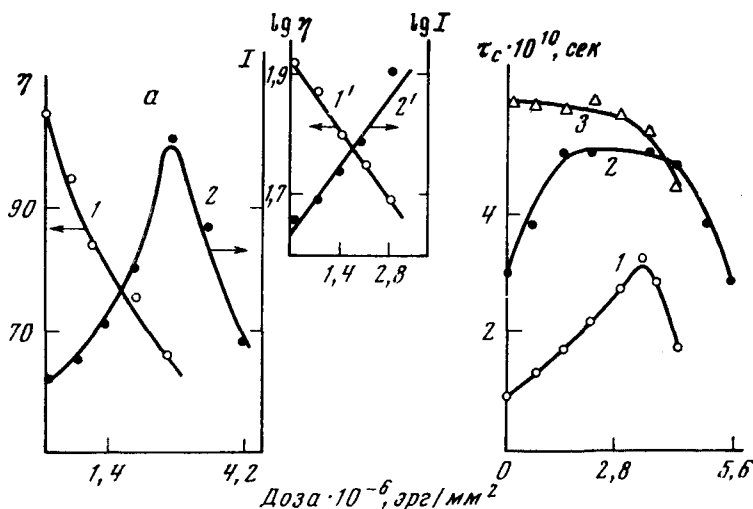


Рис. 10. Изменение вязкости и параметров спектров ЭПР спин-меченой ДНК в зависимости от дозы УФ-облучения. *a* — дозовые зависимости вязкости растворов ДНК (кривая 1) и интенсивности сигнала ЭПР (кривая 2). 1' и 2' — полулогарифмические анаморфозы кривых 1 и 2. б — дозовые зависимости времени корреляции спин-метки для разных концентраций ДНК: 1—400, 2—600; 3—900  $\mu\text{г/мл}$

Эти локальные конформационные изменения изучены методом ЭПР с использованием в качестве спиновых меток 4- $\beta$ -N-этилениминопропионил-окси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила<sup>117</sup>. Показано, что денатурация ДНК сопровождается заметным возрастанием интенсивности сигнала ЭПР связанной с ДНК метки<sup>115</sup>. Это свидетельствует о присоединении метки в первую очередь к частично расплетенным или денатурированным участкам молекулы ДНК.

По изменению интенсивности сигнала присоединенной к ДНК метки можно проследить за процессом денатурации макромолекулы. Сравнение изменения интенсивности  $I$  сигнала ЭПР метки и приведенной вязкости раствора  $\eta$  на начальном участке облучения показало, что увеличение  $I$  происходит антибатно уменьшению  $\eta$ . Изменение интенсивности сигнала метки и уменьшение вязкости одинаково характеризуют макроэффект действия УФ-облучения на растворы ДНК, т. е. процесс накопления локальных мест денатурации. Вычислены величины времени корреляции  $\tau_c$ , которое экстремально (с максимумом) изменяется с дозой облучения. При малых дозах облучения (до  $1,4 \cdot 10^6 \text{ эрг/мм}^2$  для  $c_{\text{ДНК}} = 600 \mu\text{г/мл}$ )  $\tau_c$  увеличивается, т. е. подвижность метки убывает; в интервале доз  $(1,4-3,5) \cdot 10^6 \text{ эрг/мм}^2$   $\tau_c$  остается постоянным и при более высоких дозах резко падает (рис. 10).

Уменьшение подвижности радикала может быть вызвано увеличением микровязкости внутри участка локальной денатурации. Как известно, в местах локальной денатурации идут два процесса: накапливание одичных разрывов и образование внутримолекулярных сшивок за счет димеризации тиминовых оснований. Предполагается, что происходит накопление тиминовых димеров в одном локально денатурированном участке. По-видимому, возрастание  $\tau_c$  может быть следствием увеличения выхода димеров тимина (на один разрыв полинуклеотидной цепи). Наблюдаемое в интервале доз  $(1,4-3,5) \cdot 10^6 \text{ эрг/мм}^2$  постоянство  $\tau_c$ , по-видимому, указывает на то, что соотношение димеров тимина и разрывов полинуклеотидной цепи достигает постоянной величины. При достаточно больших дозах (более  $3,5 \cdot 10^6 \text{ эрг/мм}^2$ ) поглощаемая энергия затрачивается в основном на образование клубков и глобул. В этих условиях присоединившаяся метка располагается вероятнее всего на поверхности глобулы, что и приводит к резкому увеличению подвижности метки и уменьшению  $\tau_c$ .

О структурных изменениях УФ-облученной ДНК свидетельствуют данные ИК-спектроскопии. Обнаружено<sup>118</sup>, что при УФ-облучении пленки ДНК при 32% относительной влажности дозой  $4,2 \cdot 10^6 \text{ эрг/мм}^2$  уменьшается поглощение аминогрупп оснований ~ на 10%; интенсивность полосы при  $1655 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{N}$ ) — на 10%; полосы при  $1580 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$ ) — на 25% и т. д. Наблюдаемые изменения можно объяснить протеканием таких фотохимических реакций, как димеризация тимина и дезаминирование димера цитозина с превращением его в димер урацила<sup>119</sup>. Реакция димеризации четко прослеживается в ИК-спектрах УФ-облученной однотожевой ДНК<sup>116</sup>.

При изучении процесса денатурации ДНК под действием УФ-облучения обнаружено явление ступенчатого изменения величины константы скорости ладения вязкости при изменении концентрации облучаемого раствора<sup>113</sup>. Высказано предположение о том, что наблюдаемый ступенчатый эффект обусловлен агрегацией молекул ДНК в растворе. Агрегация в какой-то степени может быть вызвана «сшивками» макромолекул, в том числе в результате димеризации тимина под действием УФ-облучения. Факторы, влияющие на агрегацию (ионная сила, температура) способствовали выявлению «ступенчатого эффекта»; снижение ионной силы приводило к его полному исчезновению. Это находится в соответствии с данными Эйгнера об агрегации молекул в растворах различной ионной силы<sup>120</sup>. Возможность этого положения вытекает также из данных Доти<sup>121</sup> о наличии димеризации тимина в молекуле ДНК в растворах умеренной ионной силы и о снижении димеризации до минимума в условиях низкой ионной силы. Ступенчатый эффект выявлялся также в растворе низкой ионной силы с добавками солей металлов ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ ), стабилизирующих молекулу ДНК.

Сравнивая эти результаты с данными по изменению  $\tau_c$  спин-меченных ДНК разных концентраций в зависимости от дозы облучения, можно видеть, что наименьшая степень повреждения препаратов ДНК имеет место при наибольшей ее концентрации (900  $\text{мкг/мл}$ ). По-видимому, это является следствием наибольшей агрегации макромолекул. Можно полагать, что агрегация (она может иметь место и в клетке) «защищает» молекулу от УФ-облучения<sup>115</sup>.

Поскольку наблюдаемые при УФ-облучении изменения в молекуле ДНК приводят к существенным нарушениям жизненных процессов в клетке, встает вопрос об отыскании эффективных путей защиты. В работе<sup>112</sup> в качестве защитных агентов исследованы химические соединения различных классов — фенолы, пиримидины, SH-содержащие соединения.

Пропилгаллат, 3-пиридинол, гидрохинон, тимин позволяли получить 40—60% защиты, а цистеин, глутатион — 15—17%. Оценка степени поглощения УФ-лучей исследуемыми соединениями позволила установить, что основной механизм защиты осуществляется за счет экранирования молекул ДНК. Аналогичный механизм защиты обнаружен при использовании глутатиона, цистеина, триптофана при УФ-облучении клеток<sup>122</sup>.

Тот факт, что защитное действие ингибиторов радикальных реакций в этих случаях состоит в экранировании, является в то же время косвенным доказательством отсутствия в системе больших концентраций свободно-радикальных состояний. Последнее находится в соответствии с данными работ<sup>123, 124</sup>, в которых показана мгновенная рекомбинация образующихся радикалов при УФ-облучении водных растворов ДНК при комнатной температуре. Отсутствие стабильных радикалов в УФ-облученных растворах ДНК показано методом ЭПР<sup>125</sup>. Установлена также преобладающая роль денатурационных эффектов в ДНК при УФ-инактивации бактериофагов<sup>126</sup>.

Таким образом, использование физико-химических методов позволило установить наличие структурных и химических изменений в УФ-облученной ДНК, которые могут быть уменьшены введением различных химических веществ, поглощающих УФ-излучение.

#### IV. СПЕЦИФИКА ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКА НА ДНК

Как известно, ультразвуковая энергия используется при получении препаратов ДНК с различным молекулярным весом для исследования физико-химических и биологических свойств ДНК<sup>127—130</sup>. Поэтому встает вопрос об установлении механизмов деполимеризации макромолекулы ДНК и выяснении относительной повреждаемости отдельных ее структурных компонентов.

Было показано<sup>131—133</sup>, что ультразвуковая деградация ДНК, как и других полимеров, имеет механическую природу. Существующие представления о действии ультразвука на макромолекулы указывают на преобладающую роль в деполимеризующем эффекте механических сил (ударные волны, гидродинамический сдвиг). Химические превращения в ДНК вызваны специфическими взаимодействиями молекулы с активированными продуктами расщепления молекул воды (свободными радикалами, ионами) в условиях кавитации<sup>131</sup>. Поскольку повреждения структуры ДНК ультразвуком могут иметь последствия на клеточном уровне, проведено исследование деструктивных изменений в ДНК. Изучены типы механической деградации ее тяжей и начальные химические превращения углевод-фосфатных групп и азотистых оснований<sup>134—136</sup>.

Анализ физико-химических характеристик однотяжевой ДНК (оДНК)<sup>137, 138</sup>, полученной из озвученного нативного препарата ДНК (нДНК) (генератор УЗГ-250, частота колебаний 750 кГц, интенсивность излучающей поверхности 8—10 Вт/см<sup>2</sup>, продолжительность озвучивания 10—50 сек), позволил установить, что деградация ДНК может идти либо путем одновременного разрыва обеих ее тяжей (рис. 11, схема I), либо путем независимого накопления разрывов в одиночных тяжях (рис. 9, схема II)<sup>131, 135</sup>.

Соотношения ожидаемых значений средневесовых молекулярных весов оДНК<sup>139</sup> и ее характеристической вязкости  $[\eta]$  в 0,01 М Na<sup>+</sup> в зависимости от предполагаемого типа деградации нДНК вычислены в работе<sup>135</sup> на основе экспериментально найденных величин  $F$  (количество симметричных разрывов при деполимеризации ДНК) при  $s=2$  (где  $s$  — наибольшее число нуклеотидов, находящихся между разрывами в

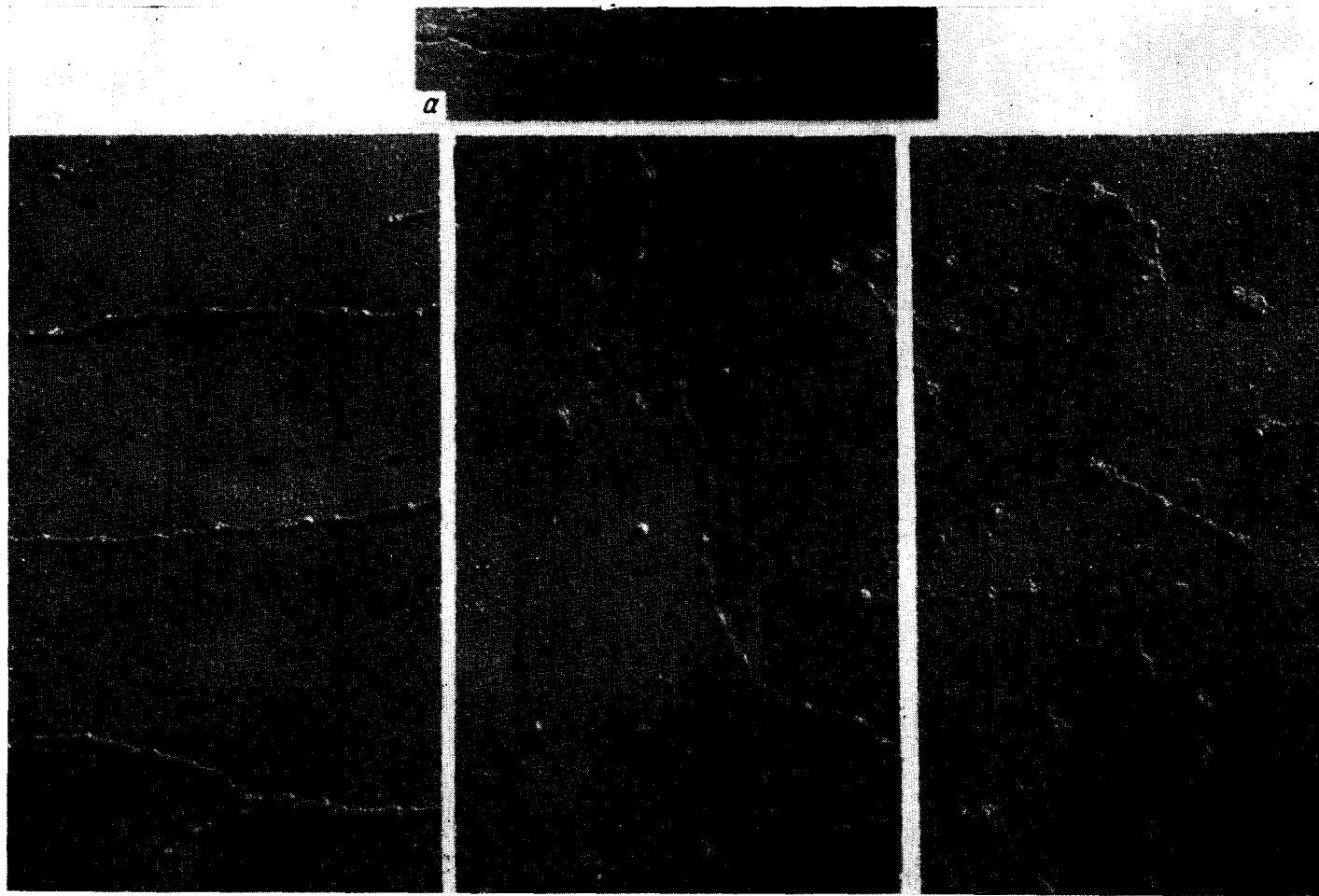


Рис. 9. Микрофотографии УФ-облученных препаратов ДНК. *a* — фрагмент молекулы нативного препарата ДНК; *б* — доза  $3,6 \cdot 10^5$  эрг/мм<sup>2</sup>; *в* — доза  $7,2 \cdot 10^5$  эрг/мм<sup>2</sup>; *г* — доза  $1,2 \cdot 10^6$  эрг/мм<sup>2</sup>. Размер, указанный на микрофотографиях, соответствует 0,5 мк

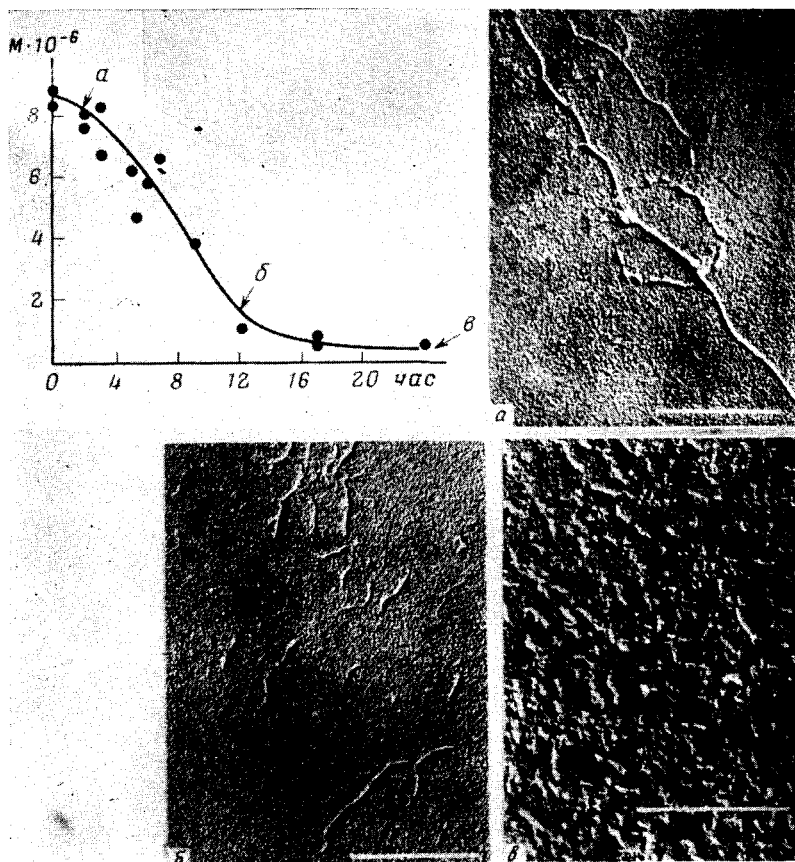


Рис. 13. Микрофотографии ДНК и кинетическая кривая изменения молекулярного веса ДНК при взаимодействии с N-АЭИ. а — 2,5; б — 12; в — 25 час



ТАБЛИЦА

Молекулярный вес ( $M$ ) и характеристическая вязкость оДНК ( $[\eta]$  в  $0,01\text{ M Na}^+$ ), выделенной из озвученной нДНК и сравнение рассчитанных по схемам (I) и (II) значений с найденными экспериментально

$F_{\text{нДНК}}$	Схема (I)		Схема (II)		Эксперимент	
	$[\eta]$	$M \cdot 10^{-6}$	$[\eta]$	$M \cdot 10^{-6}$	$[\eta]$	$M \cdot 10^{-6}$
0,28	57,3	2,29	5,6	0,22	58	2,32
0,45	53	2,12	4,46	0,18	52	2,08
0,77	46	1,85	3,48	0,14	46	1,6
2,03	31,6	1,27	2,2	0,09	23,5	0,94
3,75	22	0,88	1,6	0,06	13,7	0,55

двух тяжах ДНК). Значения  $F$  определяли по формуле:

$$F = \frac{M_0^{\text{нДНК}}}{M_t^{\text{нДНК}}} - 1$$

В таблице приведены экспериментально найденные параметры оДНК, выделенной из озвученных препаратов нДНК при данных  $F$  и величины, рассчитанные по схеме (I) или по схеме (II).

Видно, что экспериментально найденные величины совпали с рассчитанными для деградации ДНК по схеме I, т. е. в результате одновременного разрыва обоих тяжей. Накопление случайных разрывов в тяжах ДНК не происходит.

Очевидно, в отношении деполимеризующего действия ультразвука ДНК ведет себя, как однотяжевый полимер. Уравнение, связывающее кинетику деградации полимера с количеством тяжей в нем, имеет вид:

$$\lg \frac{1-B}{B} = n \lg t + \text{const},$$

$$\text{где } B = \frac{M_t^{\text{нДНК}}}{M_0^{\text{нДНК}}},$$

$n$  — количество тяжей в полимере,  $t$  — время действия деполимеризующего фактора. Как видно из рис. 12, деградация ультразвуком действи-

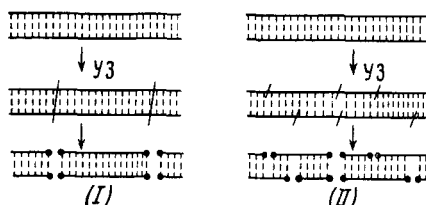


Рис. 11

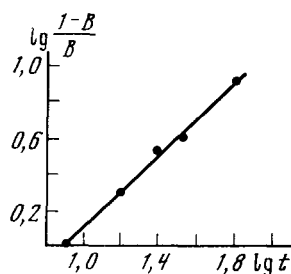


Рис. 12

Рис. 11. Схемы возможных путей деградации ДНК ультразвуком  
Рис. 12. Кинетика деполимеризации ДНК кавитационным ультразвуком

тельно идет по закону, характерному для однотожевых полимеров (с  $n=1$ ). При этом наблюдается распад ДНК с молекулярным весом ( $M$ )  $1 \cdot 10^7$  на достаточно крупные молекулы с  $M$  от  $(0,3-1,2) \cdot 10^6$  (по данным седиментационного анализа<sup>129</sup>). Ультразвуковое воздействие может быть использовано, таким образом, для получения нативных фрагментов ДНК, что расширяет область применения ультразвука в биологических экспериментах.

Следует отметить, что обнаруженная деполимеризация макромолекул осуществлялась в таких условиях озвучивания, когда еще не проявлялись связанные с кавитацией химические процессы. При более длительных экспозициях озвучивания, приводящих к увеличению  $F$ , появляется небольшое расхождение между экспериментальными и рассчитанными по схеме (I) данными (см. таблицу), что, по-видимому, связано с началом химикоакустической деструкции ДНК. С увеличением продолжительности озвучивания от 1 до 15 мин в отсутствие защитных веществ обнаруживаются определенные повреждения отдельных химических групп и связей в макромолекуле ДНК. В частности, наблюдается изменение интенсивности ряда полос поглощения в ИК-спектрах озвученной ДНК<sup>136</sup>.

В области колебаний двойных связей азотистых оснований ДНК наблюдается уменьшение интенсивности полос при  $1650$  и  $1590 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$  и  $\text{C}=\text{N}$ -связи), а в области колебаний углеводофосфатной цепи полос при  $1010 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu_{\text{сос}}$  дезоксирибозы). При этом дезоксирибоза повреждается в большей степени, чем азотистые основания: снижение интенсивности полосы при  $1010 \text{ см}^{-1}$  составляет 17%, в то время как снижение интенсивностей полос, соответствующих колебаниям хромофорных групп азотистых оснований, составляет в среднем 10% (после 10 мин озвучивания). Дезаминирование наблюдается только при более длительной ультразвуковой обработке.

Обнаруженные результаты показывают, что характер повреждений в ДНК при действии ультразвука отличается от эффектов ионизирующей радиации. В последнем случае, как указывалось выше, наблюдается дезаминирование азотистых оснований одновременно с разрушением их сопряженных связей; повреждение оснований происходит в большей степени. Такое различие обусловлено частичным сохранением нативной структуры ДНК при ультразвуковой деградации (вызванной механическими разрывами одновременно двух ее тяжей), и отсюда — меньшей доступностью для свободных радикалов оснований, расположенных внутри спирали. Деполимеризация же ДНК в результате действия ионизирующих излучений происходит путем независимого накопления одиночных разрывов в каждом тяже ДНК<sup>137, 140</sup>, что должно сопровождаться значительными нарушениями ее вторичной структуры с одновременным повреждением колец оснований.

В литературе по ИК-спектроскопии ДНК нет однозначного отнесения полос с частотами  $1060$  и  $960 \text{ см}^{-1}$  ( $970 \text{ см}^{-1}$  при 92% относительной влажности) к колебаниям индивидуальных связей  $\text{C}-\text{O}$  или  $\text{P}-\text{O}$  углеводофосфатных цепей ДНК. Обнаружена линейная корреляция между относительным уменьшением интенсивности полосы  $970 \text{ см}^{-1}$  и числом двойных разрывов в ДНК, измеренных вискозиметрически. Корреляция позволяет предположительно отнести эту полосу к колебаниям связи  $\text{C}-\text{O}$ , так как при ультразвуковой деполимеризации ДНК происходят преимущественно разрывы  $\text{C}-\text{O}$ - (90%), а не  $\text{P}-\text{O}$ -связей (10%)<sup>141</sup>. Отнесение к колебаниям  $\text{C}-\text{O}$ -связей полосы при  $1060 \text{ см}^{-1}$  является по-видимому, менее вероятным, поскольку интенсивность данной полосы не уменьшается по мере увеличения продолжительности озвучивания.

В этой же области частот на ИК-спектрах ДНК появляется новая полоса при  $1190\text{ см}^{-1}$ . При разрывах ДНК увеличивается количество концевых фосфатных групп. Полосу при  $1190\text{ см}^{-1}$  можно предположительно отнести к их колебаниям, так как для алкилфосфатов характерно поглощение в области  $1190\text{—}1140\text{ см}^{-1}$  <sup>64</sup>.

Более глубокие превращения ДНК под воздействием кавитационного ультразвука приводили к последовательному разрушению пиримидиновых и пуриновых оснований. Хроматографический анализ гидролизатов ДНК, озвученной от 2 до 3,5 часа, показал большую устойчивость к ультразвуку пуриновых оснований (аденин и гуанин) по сравнению с пиримидиновыми (цитозин и тимин) <sup>134</sup>. Эта закономерность сохраняется и в отношении повреждаемости ультразвуком свободных оснований и производных пурина и пиримидина, что может иметь определенное биологическое значение.

Полученные результаты по влиянию ультразвука на макромолекулу ДНК позволяют использовать ультразвук для направленного и избирательного изменения ее структуры. Обнаруженные нарушения ДНК могут иметь последствия на клеточном уровне, что подтверждается, например, получением при озвучивании ДНК фрагментов, обладающих трансформирующей активностью <sup>142</sup>, и результатами по влиянию ультразвука на хромосомный аппарат клеток и генетические процессы <sup>143, 144</sup>.

#### V. КИНЕТИКА И ХИМИЗМ РЕАКЦИЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ЭТИЛЕНИМИНА И НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ С ДНК

В настоящее время открыто более 200 химических мутагенов. Большой интерес к этому классу соединений обусловлен прежде всего тем, что химические мутагены позволяют получать полезные мутации у растений и микроорганизмов и в связи с этим находят практическое применение в селекции сельскохозяйственных культур и производстве антибиотиков.

С тех пор как было показано, что наследственные изменения в основном связаны с нуклеиновыми кислотами (и, в частности, с ДНК), были начаты работы по установлению возможного механизма действия химических мутагенов на ДНК. В ряде исследований установлено, что мутации могут возникать как за счет взаимодействия с ДНК (и в состоянии репликации, и в состоянии покоя), так и в результате реакции с ее предшественниками. При этом возможны реакции алкилирования оснований и фосфатных групп, замена одних оснований другими, депуринизации и т. д.

Наиболее эффективными мутагенами оказались вещества, обладающие алкилирующими свойствами (производные этиленимина, N-нитрозосодержащие соединения, производные иприта, эпоксиды и др.). Исследования в условиях *in vitro* и *in vivo* позволили установить ряд физико-химических особенностей их действия на нуклеиновые кислоты. Некоторые из мутагенов (производные этиленимина, иприт и др.) вызывают в макромолекуле изменения, сходные с действием радиации: изменение молекулярного веса, нарушение формы молекулы, образование внутри- и межмолекулярных «сшивок» и т. п. <sup>145, 146</sup>.

Поскольку одной из основных проблем современной генетики является возможность получения направленных мутаций, особое значение приобретают кинетические исследования механизма действия активных

мутагенов. Изучена реакция действия на ДНК производных этиленимина (ЭИ) N-β-этилениминэтиленметилкетона (N-β-ЭЭМК), N-ацетиэтиленимина (N-АЭИ)<sup>147-152</sup>. Показано, что эффективность изменения приведенной вязкости растворов ДНК в присутствии этих соединений увеличивается в ряду: ЭИ, N-β-ЭЭМК, N-АЭИ.

На примере N-АЭИ изучены кинетические закономерности реакции и физико-химический механизм действия на ДНК. Кинетические кривые изменения вязкости растворов ДНК в присутствии N-АЭИ имеют S-образный характер и могут быть описаны уравнением автокатализа первого порядка<sup>151, 147</sup>:

$$\lg \frac{\eta_0 - \eta_t}{\eta_t} = \lg \eta' + 0,434 \varphi t$$

$$\left( \text{при } \eta' \ll \eta_0, t > \frac{1}{0,434 \varphi} \right),$$

где  $\eta_0$  и  $\eta_t$  — вязкость растворов ДНК в начальный момент времени и в момент времени  $t$ ;  $\lg \eta'$  характеризует величину «затравки», обеспечивающей автокатализ;  $\varphi$  — фактор ускорения автокаталитической реакции. Характер изменения кинетических кривых указывает на то, что в ДНК при действии N-АЭИ происходят не только конформационные изменения молекулы, но и более глубокие нарушения с изменением молекулярного веса.

Кинетическая кривая изменения молекулярного веса ДНК может быть также описана законом автокатализа первого порядка, причем значение  $\varphi$  было близко к  $\varphi$  для изменения приведенной вязкости растворов:

$$\varphi = 0,31 \pm 0,02 \text{ час}^{-1} \text{ (по седиментации);}$$

$$\varphi = 0,28 \pm 0,02 \text{ час}^{-1} \text{ (по приведенной вязкости).}$$

В соответствии с этими наблюдениями находятся данные по изменению структуры ДНК<sup>147</sup>, полученные с помощью электронной микроскопии. Уже через 2 часа после взаимодействия N-АЭИ с ДНК на микрофотографиях можно было видеть видоизмененные молекулы ДНК (рис. 13). По утолщениям, образовавшимся на протяжении молекулы и на концах ее, можно сделать вывод, что N-АЭИ при малых временах действия приводит, по-видимому, к частичной денатурации ДНК. В этот момент изменения вязкости и молекулярного веса незначительны. Через 12 часов наблюдается появление мелких осколков молекул. К этому времени молекулярный вес ДНК резко падает. Через 25 часов на микрофотографиях видно большое количество обрывков и клубков, подобно тому, как это имеет место при действии больших доз радиации.

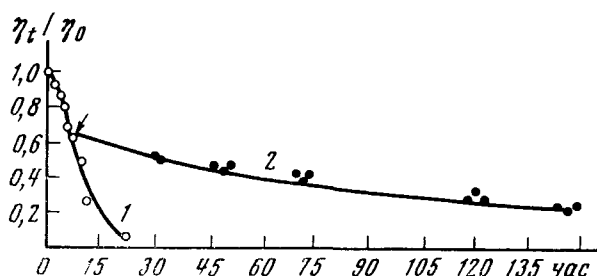
Действие N-β-ЭЭМК по своему характеру подобно действию N-АЭИ. В этом случае также наблюдается денатурация и деполимеризация молекул, однако реакция протекает с меньшей скоростью.

Действие ЭИ ( $2,3 \cdot 10^{-2}$  М) на ДНК (1000 мкг/мл) носит несколько иной характер. После 2-минутного воздействия вдоль молекулы и на ее концах появляются утолщения, свидетельствующие о частичной денатурации. Однако спустя 5 и 22 часа на микрофотографиях наряду с мелкими отдельными частицами молекул видны большие агрегаты. Детальное изучение кратковременного воздействия ЭИ ( $10^{-4}$  М) на ДНК (50 мкг/мл) проведено с использованием в качестве электронноплотной метки фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК), которая легко образует с основной группой этиленимина солеподобную связь<sup>150</sup>. Оказалось, что

после кратковременного воздействия мутагена (10 мин) плотность нитей ДНК равномерна по всей длине молекулы. Такая равномерность окрашивания, вероятно, связана с тем, что этиленмин реагирует с фосфатными группами ДНК. Это находится в соответствии с литературными данными о том, что многие из алкилирующих агентов при кратковременном воздействии на ДНК могут приводить к этерификации фосфатных групп.

При исследовании действия различных концентраций N-АЭИ ( $1,2 \cdot 10^{-2} M$ ) на ДНК<sup>147</sup> установлено, что во всех случаях сохраняется автокаталитический характер изменения вязкости растворов ДНК. Для исследованных концентраций N-АЭИ  $\lg \eta' = 1,84$ , а значения  $\varphi = 4,8 \cdot 10^{-2} \div 2,3 \cdot 10^{-1} \text{ час}^{-1}$ . Совпадение величины  $\lg \eta'$  для всех концентраций

Рис. 14. Изменение приведенной вязкости растворов ДНК при действии N-АЭИ (кривая 1) и после удаления N-АЭИ (кривая 2) («последствие»). Стрелкой указано время осаждения ДНК спиртом



мутагенов позволяет предположить, что уже в первоначальный момент времени во всех случаях в системе ДНК—N-АЭИ имеется одно и то же количество затравки. Так как во всех опытах использовался один и тот же препарат ДНК, роль затравки, очевидно, могут играть частично денатурированные молекулы ДНК, всегда присутствующие в начальный момент реакции. Это тем более вероятно, что, как известно, денатурированные молекулы более чувствительны к различного рода воздействиям, чем нативные. Справедливость высказанного предположения доказана в специальных экспериментах с использованием денатурированных молекул ДНК<sup>151</sup>.

Различной степени УФ-денатурированные молекулы ДНК добавляли в реакционную смесь ДНК с N-АЭИ и измеряли скорость реакции. Было показано, что, по мере увеличения степени денатурации молекул ДНК, уменьшался период индукции реакции, то есть увеличивалось значение  $\lg \eta'$ . Следовательно, роль денатурированных молекул ДНК действительно сводится к увеличению количества затравки, необходимой для обеспечения реакции ДНК с мутагеном.

Реакция N-АЭИ с ДНК в условиях наших опытов протекает длительное время, в течение которого сам N-АЭИ претерпевает существенные изменения. Показано, что продукты превращения мутагена также играют определенную роль в реакции. На это указывает обнаруженный после удаления мутагена эффект «последствия» (рис. 14). Использование термохимического метода анализа превращения N-АЭИ позволило обнаружить условия образования максимального количества промежуточного продукта, добавление которого ускоряло процесс<sup>149</sup>.

Реакция ДНК с N-АЭИ сопровождается хемилюминесценцией<sup>153</sup>, которая появляется через 40 мин после начала реакции и достигает максимума через 3 часа с последующим незначительным спадом свечения. Спектр свечения представляет собой широкую полосу в области 400—630 нм с максимумом при 490 нм. Кинетические кривые свечения имеют

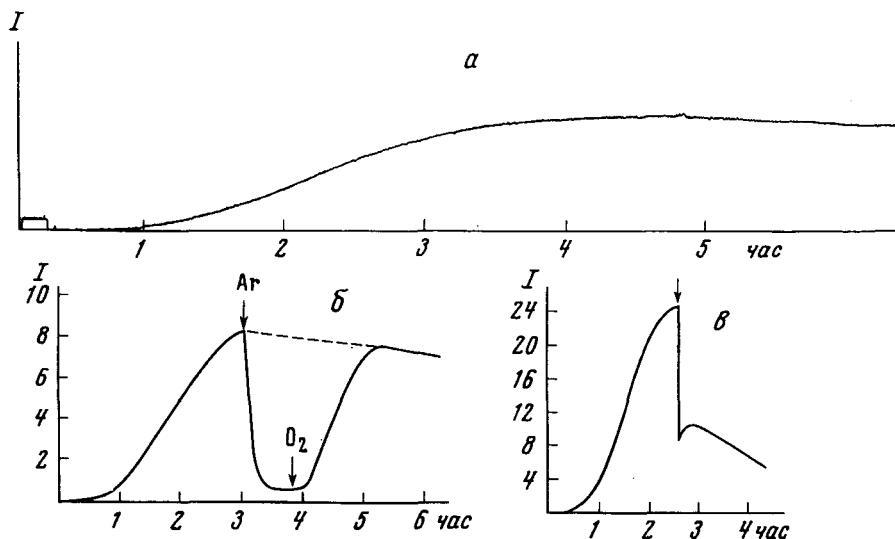


Рис. 15. Хемилюминесценция в реакции ДНК с N-АЭИ. *а* — кинетическая кривая хемилюминесценции; *б* — изменение хемилюминесценции при добавлении в реакцию аргона и кислорода; *в* — изменение хемилюминесценции при добавлении пропилгаллата в момент времени, соответствующий максимуму хемилюминесценции

S-образный характер и хорошо спрямляются в координатах  $\lg \frac{I}{I_{\text{макс}} - I}$ .

Хемилюминесценция обусловлена окислительными процессами, поскольку интенсивность ее резко возрастает в присутствии  $O_2$  и снижается в токе аргона (рис. 15). Так как изменение вязкости растворов ДНК с мутагеном также происходит только в присутствии кислорода, структурные изменения в ДНК, так же как и хемилюминесценция, являющиеся, по-видимому, следствием окислительных процессов, протекающих в системе ДНК — мутаген.

В реакциях индивидуальных оснований с N-АЭИ, свечение отсутствует, в то время как в реакциях нуклеозидов, нуклеотидов и дезоксирибозы наблюдается заметная хемилюминесценция<sup>154</sup>. Это указывает на то, что за свечение ответственны реакции 2-дезоксид-*D*-рибозы. По-видимому, хемилюминесценция возникает в результате действия N-АЭИ или продуктов его превращения на гликозидный атом углерода рибозы, с дальнейшим окислением по этому атому. Известно, что на устойчивость гликозидной связи влияет этерификация гидроксильных групп, а также природа основания, с которым связан углевод: пурин-нуклеотиды менее устойчивы, чем пиримидин, поэтому интенсивность свечения с пурин-нуклеотидами и пурин-нуклеозидами выше, чем с пиримидин-нуклеотидами. При окислении дезоксирибозы становятся лабильными углеводофосфатные связи, которые гидролизуются с разрывом главной цепи макромолекулы ДНК.

Ингибиторы радикальных реакций (пропилгаллат, гидрохинон, производные 3-оксипиридина) уменьшают интенсивность хемилюминесценции тем сильнее, чем выше антиокислительная эффективность ингибитора<sup>153</sup>.

Смотряева, Серебряный и др.<sup>155–158</sup> изучали механизм взаимодействия ДНК с N-нитрозо-N-алкилмочевинами (НАМ). Интерес к этому классу соединений не случаен, так как НАМ, являясь супермутагенами, одно-

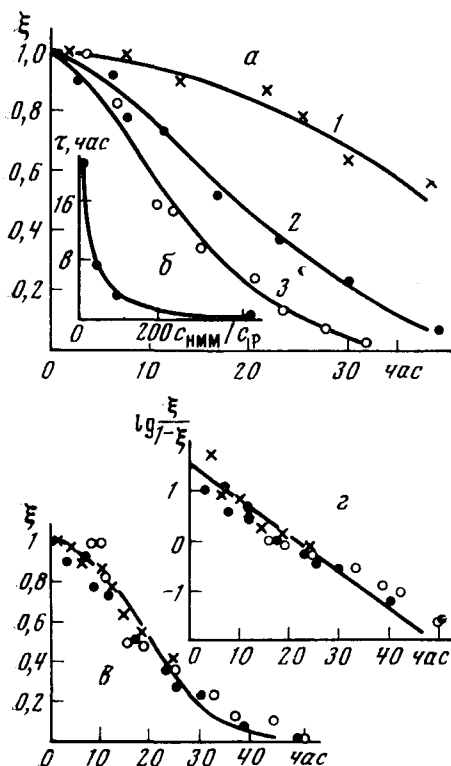


Рис. 16

Рис. 16. Кинетические кривые изменения приведенной вязкости растворов ДНК (624 мкг/мл) при действии различных концентраций НММ ( $\xi = \eta_t/\eta_0$ ). а: 1—0,02; 2—0,1; 3—0,2 М; б — изменение периода индукции реакции  $\tau$  при изменении соотношения взятых количеств НММ и ДНК. в — трансформация кинетических кривых (а) на кривую 2. г — полулогарифмическая анаморфоза кривой (в)

Рис. 17. Повреждения структуры ДНК в реакции с НММ. 1 — накопление одиночных разрывов ( $f$ ) в молекуле ДНК; 2 — накопление двойных разрывов ( $F$ )

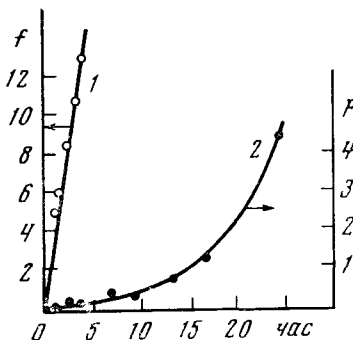


Рис. 17

временно обнаруживают как противоопухолевые<sup>159</sup>, так и канцерогенные<sup>160</sup> и мутагенные свойства<sup>161</sup>. В такой биохимической активности производных N-нитрозо-N-алкилмочевин, очевидно, определенную роль могут играть их реакции с наследственным аппаратом клетки (в частности, с молекулой ДНК и ДНП-комплексом). Один из основных физико-химических эффектов, возникающих в структуре ДНК в результате ее реакции с НАМ, выражается в резком уменьшении вязкости раствора и образовании одиночных и двойных разрывов<sup>156</sup>.

Кинетические кривые изменения вязкости растворов ДНК в процессе реакции с N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) имеют S-образный характер (рис. 16), и спрямляются в координатах  $\lg[\xi/(1-\xi)]$  — время в соответствии с уравнением автокатализа первого порядка;

$$\lg \frac{\xi}{1-\xi} = \lg \xi' + 0,434 kt, \quad t \neq 0,$$

где  $\xi$  — безразмерная координата ( $\eta_t/\eta_0$ ), характеризующая вязкость раствора ДНК,  $\lg \xi'$  и  $k$  — параметры кинетических кривых. Кинетические кривые для разных концентраций трансформируются на одну из них с  $k=0,13 \text{ час}^{-1}$ .

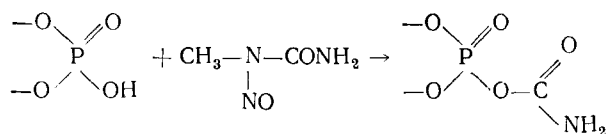
Период индукции реакции увеличивается при уменьшении соотношения [НММ]:[ДНК]. По-видимому, в течение периода индукции происходят химические изменения в ДНК, которые, накапливаясь, проявляются затем в виде одиночных и двойных разрывов цепей ДНК и уменьшения

вязкости растворов (рис. 17). Об этом свидетельствует также наблюдаемый в эксперименте эффект последействия после удаления мутагена<sup>155</sup>.

Детальное изучение инактивирующего действия НММ на различные фаги Т7, ФХ174 позволило показать, что за инактивацию может быть ответственна реакция с ДНК и, в первую очередь, процессы алкилирования оснований ДНК с последующей депуринизацией алкилированных фрагментов ДНК и деградацией. Предложена кинетическая модель инактивации фагов, позволяющая количественно оценивать действие НММ на различные фаги<sup>162</sup>.

Более сложные эффекты обнаружены при изучении действия НММ на ДНП<sup>156</sup>. Показано, что в процессе реакции изменяется прочность связи ДНК — белок и такое интегральное свойство ДНП, как нерастворимость в среде с физиологической ионной силой. Основной причиной наблюдаемого эффекта является химическая модификация групп ДНК и белка, участвующих во взаимодействии ДНК — белок и обеспечивающих целостность ДНП.

Анализ химических изменений в ДНК и ДНП показал, что основной химической реакцией, вызывающей деградацию ДНК, также является реакция алкилирования<sup>157, 163–165</sup>. Однако ряд биологических данных свидетельствует о существенном отличии механизма действия НАМ от механизма действия других алкилирующих агентов. Для объяснения этих различий Серебряный<sup>166</sup> предположил, что НАМ являются агентами комплексного действия, и их биологический эффект обусловлен суммарным действием двух химических реакций: метилирования и карбамоилирования. Использование в реакции с ДНК и ДНП меченной <sup>14</sup>СО—НММ позволило установить, что действительно имеет место перенос метки с НММ на ДНК и белок, т. е. идет реакция карбамоилирования<sup>156, 158</sup>. Направления карбамоилирования были установлены при изучении реакции НММ с нуклеотидами, гомополинуклеотидами и РНК<sup>167–169</sup>. Установлено, что у полинуклеотидов карбамоилированию в основном подвергаются фосфатные группы:

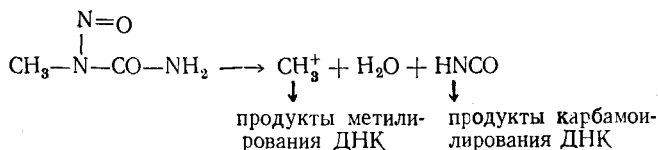


Параллельно протекает и процесс карбамоилирования оснований, основным продуктом которого является N<sub>4</sub>-карбамоилцитидин. По реакционной способности в реакции карбамоилирования нуклеотиды располагаются в следующем порядке: цитидин ≫ аденозин ≈ гуанозин, в то время как в реакции алкилирования наиболее реакционноспособен гуанозин<sup>168</sup>. При действии НММ на нуклеотидный комплекс метилированию и карбамоилированию подвергаются не только ДНК, но и белок<sup>156</sup>. Суммарный выход обеих реакций примерно одинаков; в то время как метилированию в равной мере подвергаются оба компонента ДНП, карбамоилирование направлено в основном на белок. Карбамоилирование вносит существенный вклад в общую мутагенную активность НММ, поскольку обнаружена мутагенная активность<sup>170–172</sup> карбамоилирующих агентов, таких как изоциановая кислота и ее соли. Позднее было доказано наличие у изоцианатов и канцерогенных свойств<sup>173</sup>.

Таким образом, механизм действия НММ на ДНК может быть пред-



ставлен следующей схемой:



В связи с противоопухолевыми свойствами НАМ изучались биохимические сдвиги, возникающие после их введения *in vivo*. Было установлено, что после введения НАМ наблюдается ингибирование синтеза ДНК, РНК и белка<sup>174-177</sup>. Наиболее чувствительным оказался синтез ДНК, синтез РНК тормозился в меньшей степени. При изучении причин ингибирования синтеза РНК в бесклеточной системе удалось показать, что в основе его лежат как повреждения ДНК-матрицы, так и изменение свойства РНК-полимеразы, обусловленное химической модификацией фермента. Интересно, что и продукт распада НММ, цианат калия, также способен инактивировать РНК-полимеразу<sup>178</sup>.

Первичные повреждения, вызываемые НММ *in vivo*, так же как и *in vitro*, возникают в результате реакций метилирования и карбамоилирования<sup>179-181</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Н. М. Эмануэль, В кн. Химическая кинетика и цепные реакции, «Наука», М., 1966, стр. 531.
2. Н. М. Эмануэль, В кн. Первичные механизмы биологического действия ионизирующего излучения, Изд. АН СССР, М., 1963, стр. 73.
3. Н. М. Эмануэль, Вестник АМН СССР, 1965, № 8, 86.
4. Н. М. Эмануэль, В кн. Фенольные соединения и их биологические функции, «Наука», М., 1968, стр. 311.
5. N. M. Emanuel, XIII-rd Intern. Congress of I. U. P. A., Boston, 1971.
6. Н. М. Эмануэль, В тр. V Международного биохимического конгресса, М., 1961, стр. 334.
7. N. M. Emanuel, K. E. Kruglyakova, E. B. Burlakova, I. I. Sapeshinski, N. V. Nikolaeva, W. Lusikov, Yu. Silaev. Simp. Phys. Chem. Biogen. Makromol., Berlin, v. 6, 1964, стр. 349.
8. Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, И. И. Пелевина, ДАН, 125, 2 (1959).
9. Г. В. Кукушкина, Л. Б. Горбачева, Н. М. Эмануэль, ДАН, 146, 1206 (1962).
10. Г. В. Кукушкина, Л. Б. Горбачева, Н. М. Эмануэль, ДАН, 147, 1218 (1962).
11. Н. М. Эмануэль, Л. П. Липчина, ДАН, 121, 1 (1958).
12. Н. М. Эмануэль, В кн. Пути синтеза и изыскания противоопухолевых веществ, Медгиз, М., 1962, стр. 22.
13. Н. М. Эмануэль, Л. С. Евсеев, Количественные основы клинической онкологии, «Медицина», М., 1970.
14. Н. М. Эмануэль, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 345 (1971).
15. И. И. Сапезинский, М. С. Постникова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 148, 1207 (1963).
16. И. И. Сапезинский, Ю. В. Силаев, Н. М. Эмануэль, ДАН, 151, 584 (1963).
17. И. И. Сапезинский, Н. М. Эмануэль, В сб. Биолуминесценция, «Наука», М., 1965, стр. 122.
18. К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В сб. Нуклеиновые кислоты, «Медицина», М., 1966, стр. 20.
19. Н. М. Эмануэль, Е. Б. Бурлакова, К. Е. Круглякова, И. И. Сапезинский, Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 183 (1966).
20. К. Е. Kruglyakova, Studia Bioph., 1967, 115.
21. К. Е. Kruglyakova, N. M. Emanuel, First European Biophysics Congress, v. 2 (1971).
22. К. Е. Круглякова, Радиобиология, инф. бюл., 14, 13 (1972).
23. К. Е. Круглякова, И. И. Пелевина, Радиобиология, 9, в. 3, 473 (1969).
24. Е. Б. Бурлакова, Б. Г. Дзантиев, Г. Б. Сергеев, Н. М. Эмануэль, В кн. Биохимические и физико-химические основы биологического действия радиации, Изд. МГУ, 1957, стр. 10.
25. Е. Б. Бурлакова, Б. Г. Дзантиев, Г. Б. Сергеев, Н. М. Эмануэль, Известия вузов, сер. Химия и хим. технология, 2, 253 (1959).

26. Е. Б. Бурлакова, Б. Г. Дзантиев, А. К. Зерифова, Г. Б. Сергеев, Там же, Н. М. Эмануэль, сер. Химия и хим. технология, 2, 265 (1960).
27. И. И. Пелевина, В. М. Андреев, Л. П. Липчина, Н. М. Эмануэль, ДАН, 148, 1408 (1963).
28. А. И. Агапова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 153, 204 (1963).
29. Л. С. Вартанян, Э. М. Гоникберг, Н. М. Эмануэль, Изв. АН СССР, сер. хим., № 10, 1072 (1964).
30. К. Е. Kруглякова, *Studia Biophysica*, 7, 143 (1968).
31. К. Е. Круглякова, Радиобиология, инф. бюл., 12, 55 (1969).
32. А. М. Кузин, Радиационная биохимия, Изд-во АН СССР, М., 1962.
33. Л. Х. Эйдуз, Физико-химические основы радиобиологических процессов и защита от излучений, Атомиздат, М., 1972.
34. Г. Дертингер, Х. Юнг, Молекулярная радиобиология, Атомиздат, М., 1963.
35. R. M. Drew, R. B. Painter, *Radiat. Res.*, 11, 535 (1959).
36. H. J. Burri, S. Okada, *Biophys. J.*, 8, 445 (1968).
37. E. Chargaff, S. Zamenhof, *J. Biol. Chem.*, 173, 1 (1948).
38. D. R. Davies, H. J. Evans, *Advanc. Rad. Biol.*, 2, 243 (1966).
39. G. Ragni, W. Szabalsky, *J. Mol. Biol.*, 4, 338 (1962).
40. F. Hutchinson, *Cancer Res.*, 26, 2045 (1966).
41. R. Lataryet, *Rad. Res.*, 8, 1 (1972).
42. G. Scholes, J. J. Weiss, *Biochem. J.*, 56, 65 (1954).
43. F. Scholes, J. Weiss, C. M. Wheeler, *Nature*, 178, 157 (1956).
44. O. Zimperc, W. A. Mosher, *Amer. J. Roentgenol.*, 63, 691 (1950).
45. A. R. Peacock, B. N. Preston, *J. Polymer Soc.*, 153, B, 950, 103 (1960).
46. U. Hagen, *Nature*, 197, 1004 (1963).
47. U. Hagen, *Biochim. et biophys. Acta*, 134, 45 (1967).
48. Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, Радиобиология, 3, 331 (1963).
49. Н. П. Крушинская, М. И. Шальнов, Там же, 9, 339 (1969).
50. S. Just, K. Schwarz, *Studia Biophys.*, 18, 211 (1969).
51. D. T. Kanazir, *Prog. in Nucleic Acid Research and Molecular Biol.*, v. 9, 1959, стр. 117.
52. Г. И. Лихтенштейн, Метод спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука», М., 1974.
53. Е. М. Миль, С. И. Бобович, Ю. А. Азизов, Л. А. Криницкая, В. М. Жильцова, Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, ДАН, в печати.
54. Е. М. Миль, С. К. Завриев, Г. Л. Григорян, К. Е. Круглякова, Там же, 209, 217 (1973).
55. Н. В. Николаева, К. Е. Круглякова, В кн. Химия и биохимия нуклеиновых кислот, «Медицина», Л., 1968, стр. 361.
56. Г. П. Жижина, С. И. Бобович, О. Е. Петров, К. Е. Круглякова, ДАН, 217, 722 (1974).
57. Г. С. Комолова, Э. И. Трифонов, И. А. Егоров, Там же, 207, 222 (1972).
58. E. Lukašová, E. Paleček, *Rad. Res.*, 47, 51 (1971).
59. L. Landbeck, U. Hagen, *Biochim. Biophys. Acta*, 331, 318 (1973).
60. П. И. Цейтлин, Д. М. Спитковский, Н. И. Рябченко, Биофизика, 5, 393 (1960).
61. Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, А. Г. Яскевич, Бюл. экспер. биол. и мед., 51 (1962).
62. Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, Радиобиология, 3, 153 (1963).
63. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В кн. Успехи органических перекисных соединений и аутоокисления, «Химия», М., 1969, стр. 191.
64. Г. П. Жижина, Э. Ф. Олейник, Усп. химии, 12, 474 (1972).
65. Г. П. Жижина, С. И. Бобович, К. Е. Круглякова, ДАН, 209, 1142 (1973).
66. Н. А. Киселев, Н. В. Николаева, Биохимия, 26, 956 (1961).
67. Н. В. Николаева, К. Е. Круглякова, Н. А. Киселев, Б. К. Вайнштейн, Н. М. Эмануэль, ДАН, 142, 713 (1962).
68. Н. М. Эмануэль, Тр. МОИП, 7, 73 (1963).
69. Д. Ингрэм, Электронный парамагнитный резонанс в биологии, «Мир», М., 1972.
70. Л. П. Каюшин, З. П. Грибова, О. А. Азизова, «Наука», М., 1973.
71. В. Я. Шляпнотх, О. Н. Карпунин, Л. М. Постников, И. В. Захаров, А. А. Вичутинский, В. Ф. Цепалов, Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов, «Наука», М., 1966.
72. В. А. Шарпаты, М. Т. Наджимиддинова, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 180, 412 (1968).
73. V. A. Sharpaty, *Studia Biophys.*, 8, 187 (1968).
74. В. А. Шарпаты, К. Е. Круглякова, Н. В. Николаева, Радиобиология, 8, 3 (1968).
75. В. А. Шарпаты, М. Н. Султанходжаева, А. С. Рахманов, ДАН, 203, 1126 (1972).
76. Н. М. Эмануэль, В. А. Шарпаты, М. Т. Наджимиддинова, Л. И. Кудряшов, С. М. Яровая, Н. К. Кочетков, ДАН, 177, 1142 (1967).

77. М. Т. Наджимиддинова, В. А. Шарпаты, ДАН, 180, 909 (1968).
78. И. В. Никитин, В. А. Шарпаты, Л. И. Кудряшов, Н. К. Кочетков, Н. М. Эмануэль, ДАН, 190, 635 (1970).
79. М. Т. Наджимиддинова, В. А. Шарпаты, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В материалах IV Международного биофизического конгресса, т. 1, 190 (1972).
80. В. А. Шарпаты, М. Н. Султанходжаева, ДАН, 208, 1157 (1973).
81. В. А. Шарпаты, М. Н. Султанходжаева, Изв. АН СССР, сер. хим., 1969, 1183.
82. М. Н. Султанходжаева, В. А. Шарпаты, Там же, сер. хим., 1972, 1428.
83. Н. В. Закатова, В. А. Шарпаты, ДАН, 200, 1378 (1971).
84. G. Scholes, J. Weiss, Nature, 166, 640 (1950).
85. M. Daniels, G. Scholes, J. Weiss, C. M. Wheeles, J. Chem., Soc., 1957, 226.
86. Г. П. Жижина, Д. Л. Зыбина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 158, 935 (1964).
87. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, ДАН, 180, 611 (1968).
88. Д. Г. Кнорре, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль, Там же, 123, 123 (1958).
89. Н. М. Эмануэль, К. Е. Круглякова, А. А. Вичутинский, Р. Ф. Васильев, Изв. АН СССР, сер. хим., 1963, 1143.
90. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, А. А. Вичутинский, Р. Ф. Васильев, В сб. Биоллюминесценция, «Наука», М., 1965, стр. 119.
91. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В сб. Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия, «Наука», М., 1964, стр. 14.
92. Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, ДАН 163, 931 (1965).
93. M. Anbar, P. Neta, Intern. J. et Appt. Rad. and Isotopes, 18, 493 (1967).
94. Н. В. Николаева, К. Е. Круглякова, Н. А. Киселев, Б. К. Вайнштейн, Н. М. Эмануэль, ДАН, 142, 713 (1962).
95. К. Е. Круглякова, Н. В. Николаева, Н. А. Захарова, Н. М. Эмануэль, Там же, 157, 979 (1964).
96. Г. П. Жижина, Радиобиология, 7, 155 (1967).
97. Е. Б. Бурлакова, В. Д. Гаинцева, Л. В. Слепухина, Н. Г. Храпова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 155, 1398 (1964).
98. Е. Б. Бурлакова, В. Д. Гаинцева, Л. В. Слепухина, Н. Г. Храпова, Н. М. Эмануэль, ДАН, 164, 934 (1965).
99. М. Т. Наджимиддинова, В. А. Шарпаты, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Там же, 182, 1354 (1968).
100. В. Я. Готлиб, И. И. Пелевина, Г. Г. Афанасьев, Л. П. Липчина, Там же, 192, 6 (1970).
101. К. Е. Круглякова, С. П. Одинцова, Н. М. Эмануэль, В материалах I радиобиологической конф. социалист. стран, Шпиндлерув — Млын, 1974, стр. 163.
102. С. П. Одинцова, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, ДАН, в печати.
103. Л. С. Вартанян, Л. М. Стригун, Н. М. Эмануэль, Там же, 148, 97 (1963).
104. А. И. Агатова, Л. С. Вартанян, Н. М. Эмануэль, Там же, 150, 547 (1963).
105. Л. С. Вартанян, Н. М. Эмануэль, Там же, 143, 5 (1962).
106. Г. Г. Афанасьев, И. И. Пелевина, Л. П. Липчина, Н. М. Эмануэль, Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 333 (1963).
107. Д. Шугар, В кн. Нуклеиновые кислоты, «Мир», М., 1962.
108. A. D. McLaren, D. Shugar, Photochemistry, of proteins and nuclei acids, Pergamon Press, 1964.
109. Г. Б. Завильгельский, В сб. Молекулярная биофизика, «Наука», М., 1965, стр. 137.
110. К. А. Самойлова, Действие ультрафиолетовой радиации на клетку, «Наука», Л., 1967.
111. В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Б. П. Уланов, Л. Г. Гиндин, ДАН, 164, 198 (1965).
112. В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Б. П. Уланов, Л. Г. Гиндин, Биофизика, 11, 398 (1966).
113. В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Л. Г. Гиндин, Там же, 12, 535 (1967).
114. В. М. Жильцова, Л. Г. Гиндин, К. Е. Круглякова, Тр. XIII научно-техн. конференции ВЗПИ, химия, т. IV, М., 1968, стр. 33.
115. Е. М. Миль, В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Биофизика, 19, 60 (1974).
116. В. М. Жильцова, Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, Л. Г. Гиндин, Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 342 (1973).
117. Л. Б. Шапиро, В. И. Сускина, Б. В. Разынов, Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, сер. хим. 1969, 2828.
118. Г. П. Жижина, В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Там же, сер. биол., 3, 429 (1973).
119. R. Benkers, W. Berends, Biochim. Biophys. Acta, 49, 181 (1961).
120. I. Eigner, P. Doty, J. Mol. Biol., 12, 579 (1965).
121. P. Doty, V. R. Glisin, Bioch. Bioph. Acta, 61, 458 (1962).
122. H. A. Whitehead, Science, 116, 459 (1952).
123. P. S. Pershau, R. G. Shulman, B. I. Wylida, J. Eisinger. Science, 53, 893 (1965).

124. R. O. Rahn, R. I. Shulman, I. W. Bangworn, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 893 (1965).
125. В. П. Голиков, А. Д. Златопольский, А. Э. Калмансон, Биофизика, 13, 463, 1968.
126. И. Тарьян, Д. Ронто, Биофизика, 12, 552 (1967).
127. E. P. Geiduschek, J. Mol. Biol., 4, 467 (1962).
128. Г. А. Дворкин, И. Е. Эльпнер, ДАН, 134, 702 (1960).
129. P. Doty, B. B. McGill, S. A. Rice, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 44, 432 (1958).
130. C. E. Hall, M. Litt, J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 1 (1958).
131. И. Е. Эльпнер, Биофизика ультразвука, «Наука», М., 1973.
132. A. R. Williams, Biopolymers, 19, 555 (1969).
133. W. I. Coakley, F. Dunn, J. Acoust. Soc. Amer., 50, 1539 (1971).
134. Ф. И. Брагинская, И. Е. Эльпнер, Биофизика, 9, 40 (1964).
135. Н. И. Рябченко, Ф. И. Брагинская, И. Е. Эльпнер, П. И. Цейтлин, Биофизика, 9, 162 (1964).
136. Г. П. Жижица, Р. С. Вайнштейн, Ф. И. Брагинская, ДАН, 213, 1193 (1973).
137. Н. И. Рябченко, П. И. Цейтлин, А. Г. Ясевич, Бюл. exper. биол., 8, 19 (1962).
138. Н. И. Рябченко, Д. М. Спитковский, П. И. Цейтлин, Биофизика, 8, 19 (1963).
139. D. Freifelder, P. F. Davison, Bioch. J., 2, 235 (1962).
140. J. Applequist, Arch. Bioch. Biophys., 95, 42 (1961).
141. O. C. Richards, R. B. Boyer, J. Mol. Biol., 11, 327 (1965).
142. R. A. Roosa, E. Bailey, J. Cell Physiol., 75, 137 (1970).
143. I. Slotová, Z. Karpfel, J. Hrasdara, Biol. Plant. Acad. Sci. Czechosl., 9, 49 (1967).
144. G. Yasuzumi, Bioch. biophys. acta, 16, 322 (1955).
145. P. Brookes, P. D. Lawley, Exptl Cell Res Suppl., 9, 521 (1963).
146. J. Doskočil, Z. Sormova, Biochim. Biophys. Acta, 68, 313 (1963).
147. К. Е. Круглякова, Б. П. Уланов, Д. Л. Зыбина, Н. М. Эмануэль, ДАН, 161, 718 (1965).
148. Д. Л. Зыбина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В сб. Супермутагены, «Наука», М., 1966, стр. 72.
149. К. Е. Круглякова, Д. Л. Зыбина, М. А. Смотряева, Н. П. Шувалова, Н. М. Эмануэль, Биофизика, 12, 330 (1967).
150. Б. П. Уланов, К. Е. Круглякова, Биофизика, 12, 723 (1967).
151. Д. Л. Зыбина, М. А. Смотряева, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Там же, 12, 549 (1967).
152. Д. Л. Зыбина, М. А. Смотряева, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, В сб. Специфичность химического мутагенеза, М., 1968, стр. 8.
153. Д. Л. Зыбина, К. С. Волокитина, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Молекулярная биология, 4, № 13, 3 (1970).
154. Д. Л. Лапкина, Г. П. Трошцкая, К. Е. Круглякова, Н. М. Эмануэль, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 1478.
155. М. А. Смотряева, А. М. Серебряный, К. Е. Круглякова, В сб. Химический мутагенез и создание селекционного материала, «Наука», М., 1972, стр. 81.
156. П. И. Цейтлин, К. Е. Круглякова, Н. Н. Зоз, А. М. Серебряный, А. И. Горин, М. А. Смотряева, К. Х. Рандалу, В. К. Аткочунштейн, В. С. Богданова, ДАН, в печати.
157. А. М. Серебряный, М. А. Смотряева, К. Е. Круглякова, Изв. АН СССР, сер. биол., 1969, 607.
158. А. М. Серебряный, М. А. Смотряева, К. Е. Круглякова, Р. Г. Костяновский, ДАН, 185, 847 (1969).
159. Н. М. Эмануэль, Е. М. Вермель, И. А. Рапопорт, С. А. Кругляк, Л. М. Дронова, Л. А. Островская, ДАН, 163, 483 (1965).
160. H. Druckney, R. Preussmann, D. Schmahl, M. Müller, Naturwissenschaften, 48, 165 (1961).
161. И. А. Рапопорт, ДАН, 146, 1418 (1962).
162. Gy. Rontó, M. Smotryaeva, K. Kruglyakova, N. Emanuel, I. Tarjan, Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 10, 115 (1975).
163. E. L. Uhlenhopp, A. I. Krasna, Biochem., 10, 3290 (1971).
164. K. V. Shooter, R. Howse, S. A. Shah, P. D. Lawley, Biochem. J., 137, 303 (1974).
165. I. G. Walker, D. F. Ewart, Mut. R., 19, 331 (1973).
166. А. М. Серебряный, В сб. Молекулярные механизмы генетических процессов, «Наука», М., 1972, стр. 135.
167. А. М. Серебряный, Р. М. Мнацаканян, ДАН, 199, 657 (1971).
168. А. М. Serebryanyi, R. M. Mnatsakanyan, FEBS Letters, 28, 191 (1972).
169. А. М. Серебряный, В. С. Тутлите, И. Ю. Славенас, Р. Г. Костяновский, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 1189.
170. Л. Н. Матвиенко, А. М. Серебряный, ДАН, 187, 1169 (1969).
171. В. И. Абрамов, А. М. Серебряный, Н. Н. Зоз, Цитология и генетика, 6, 525 (1972).
172. Н. Н. Зоз, А. М. Серебряный, М. Ш. Бабаев, В. И. Абрамов, П. В. Колотенков, Р. Г. Костяновский, Там же, 8, 37 (1974).

173. G. E. Moos, J. A. Mguire, T. Z. Kitchlew, W. A. Swyers, P. Z. Volk, J. R. Croft, M. J. Quigley, J. R. Fies, N. A. Oser, L. J. Anderson, *Cancer Res.*, **31**, 937 (1971).
174. Л. Б. Горбачева, Г. В. Кукушкина, И. С. Соколова, *Вопросы онкологии*, **15**, 54 (1969).
175. L. B. Gorbacheva, G. V. Kukushkina, *Bioch. Phar.*, **19**, 1561 (1970).
176. Н. М. Эмануэль, Л. Б. Горбачева, Г. В. Кукушкина, *Актуальные вопросы современной онкологии*, т. 3, Изд-во МГУ, 1973, стр. 229.
177. S. K. Carter, F. M. Schabel, L. E. Brodes, T. P. Johnston, *Advan. Cancer Res.*, **16**, 273 (1972).
178. L. B. Gorbacheva, L. I. Mitzrovich, G. V. Kukushkina, *Studia Bioph.*, **31/32**, 437 (1972).
179. G. P. Wheeler, B. J. Bowdon, I. A. Grimsley, H. H. Lloyd, *Cancer Res.*, **34**, 194 (1974).
180. Л. Ю. Дедерер, Г. В. Кукушкина, Л. Б. Горбачева, *ДАН*, **221**, 736 (1975).
181. B. B. Baril, E. F. Baril, I. Laszlo, G. P. Wheeler, *Cancer Res.*, **35**, 1 (1975).

Ин-т химической физики  
АН СССР, Москва