

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И
ВИРУСОЛОГИИ ИМ. Д.К.ЗАВОЛОТНОГО

На правах рукописи

ДЫЛЕВОЙ Михаил Васильевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОСТИ, КОМУТАГЕННОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ
В БАКТЕРИАЛЬНОМ ДНК-РЕПАРАЦИОННОМ ТЕСТЕ МЕТАЛЛОКАНЦЕРОГЕНА
БЕРИЛЛИЯ

03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Киев - 1992



Робота виконана в Івано-Франківському медичному інституті.

Научний керівник: заслужений діяч науки України,
доктор медичних наук, професор Г.А.Бабенко.

Офіційні опоненти:

член -корр. АН України,

доктор біологічних наук,

професор

Б.П.Мацелюх

старший науковий співробітник,

кандидат біологічних

наук

Т.П.Перерва

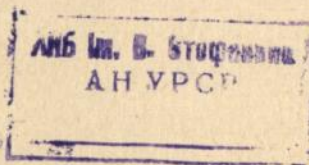
Ведуче заклад: Львівське відділення інститута
біохімії ім. А.В.Палладіна
АН України

Захист дисертації відбувається "21" X 1992 г.
в 10 годин на засіданні спеціалізованого ради Д 016.06.01
при Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного
АН України / 252143, г. Київ, ул. Заболотного, 151 /.

С дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці інститута.

Автореферат розісланий "19" IX 1992 г.

Науковий секретар
спеціалізованого ради *Жол.* - Э.А.Коваленко



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Начальным этапом злокачественного роста является трансформация нормальной клетки в раковую. Молекулярно-генетическая теория объясняет малигнизацию как результат взаимодействия канцерогенов с геномом клетки. Канцерогены вызывают хромосомные aberrации, повышают частоту сестринских хроматидных обменов, вызывают амплификацию генов, изменяют положение генов в хромосомах, вызывают анеуплоидность, индуцируют внеплановый репарационный синтез ДНК, нарушают уровень физиологического метилирования ДНК и другие регуляторные механизмы, что приводит к дестабилизации генома и активации протоонкогенов.

Наиболее аргументирована в настоящее время концепция, рассматривающая в качестве причины злокачественной трансформации клетки точковые мутации. Рядом исследований / Reddi E.P. etc., 1982; Sukumar R. etc., 1983; Sukumar R. etc., 1986 / показано, что имеются случаи, когда одной точковой мутации достаточно для злокачественной трансформации клетки в результате экспрессии онкогенов.

Бериллий по классификации Международного агенства по исследованию рака относится к группе несомненных канцерогенов / Канцерогенные вещества, 1987 /. Бериллий индуцирует хромосомные aberrации в клетках растений и млекопитающих / Никифорова, Воронин, 1989; Rosen G.V., 1954; Rosen G.V., 1957; Morary J.etc., 1963; Tellyri M.V., Gujjiani V., 1967; Larramendi M.L. etc., 1981 /, повышает частоту сестринских хроматидных обменов / Larramendi M.L. etc., 1981/, нарушает точность репликации ДНК / Luke M.L.etc., 1975; Sirover M., Loeb L.A., 1976 /, угнетает синтез ДНК в регенерирующей печени / Witschi H.P., 1968 /. Бериллий индуцирует очень низкий уровень мутаций в клетках мле-

копитающих / Miyaki M. *et al.*, 1979 /, неэффективен в тесте Эймса / Simmon V.F., 1979; Ashby J. *et al.*, 1990 /, на низших эукариотах / Simmon V.F., 1979 /, сомнительные результаты получены при испытании бериллия флукуационным тестом / Arlauskas A. *et al.*, 1985 / Противоречивые результаты получены при испытаниях бериллия в ДНК-репарационном тесте, который согласно существующим взглядам детектирует ДНК-повреждающее действие испытуемых агентов: не выявлено активности бериллия в PoI-пробе / Rosenkrantz H.S. *et al.*, 1980 /, при использовании штаммов *E. coli* с различными дефектами системы репарации повреждений ДНК / Yagi T., Nishioка H., 1977 /, в Rec-пробе / Nishioка H., 1975 /. Только в одном случае получен слабopоложительный эффект в Rec-пробе / Kanematsu N. *et al.*, 1980 /.

Цель настоящего исследования - изучение эффективности металлоканцерогена бериллия в бактериальном ДНК-репарационном тесте в зависимости от условий среды, оценка способности металла индуцировать точковые мутации или служить в качестве кофактора мутагенеза, вызванного ультрафиолетовым облучением или нитрозометилмочевинной.

В задачу исследования входило:

- поиск условий, в которых бериллий эффективен в ДНК-репарационном тесте, исследование зависимости эффективности металла от pH среды и электролитного состава;
- поиск условий, в которых элемент действует летально на бактерии;
- изучение мутагенной активности бериллия при различных способах обработки клеток;
- испытание бериллия в качестве кофактора мутагенеза, вызванного УФ-облучением и нитрозометилмочевинной.

Предполагалось, что исследование данных аспектов генотоксичности бериллия позволит познать некоторые стороны механизмов искажения генетической информации, приводящих к злокачественной трансформации клетки.

Научная новизна исследования:

- впервые получен положительный эффект при испытании бериллия в ДНК-репарационном тесте на $E. coli$;
- исследована зависимость эффективности бериллия в ДНК-репарационном тесте от условий среды: pH среды, концентрации некоторых катионов и анионов, ионной силы и осмолярности;
- подобран состав среды, удерживающий бериллий в растворенном состоянии в широком диапазоне pH;
- использовано две модификации техники выполнения ДНК-репарационного теста, позволившие повысить селективность и чувствительность метода;
- испытана способность бериллия индуцировать точечные мутации и его эффективность в качестве комутагена в условиях цитотоксического действия, согласно результатам испытаний металла при помощи ДНК-репарационного теста;
- выявлена бериллиево-тетраэтиламмониевая летальность и использована для оценки мутагенной активности бериллия;
- полученные результаты позволили дать новую интерпретацию явлениям, которые детектирует ДНК-репарационный тест в случае испытания бериллия.

Научная и практическая значимость исследования.

Настоящая работа объясняет причину противоречивость результатов испытаний бериллия в ДНК-репарационном тесте, полученных на одних и тех же штаммах бактерий / Nischioka H. , 1975; Katsmatsu N. eto., 1980 /, что связано с различиями в составах ис-

пользуемых культуральных сред: концентрация электролитов, буферная емкость, величина pH, концентрация фосфатов.

На тест-системе, состоящей из четырех штаммов *E. coli*, японскими исследователями / Yagi T., Nishioaka H., 1977 / получены отрицательные результаты при испытаниях бериллия в ДНК-репарационном тесте. В настоящей работе использовались те же штаммы / три из четырех /. Показано, что эффективность металла зависит от условий испытаний, а отрицательный результат японских исследователей объясняется тем, что они использовали среды с pH 6,8, а при использовании нами родственной техники выполнения ДНК-репарационного теста показано, что бериллий проявляет активность при pH 6,0 и ниже.

Изучена зависимость эффективности бериллия в ДНК-репарационном тесте от pH среды, концентрации некоторых электролитов, ионной силы и осмолярности. Максимальная цитотоксичность металла для штаммов *E. coli* с дефектами систем репарации повреждений ДНК проявляется при использовании среды с аммоний-цитратным буфером. Наибольшей эффективностью в отношении снижения цитотоксичности бериллия обладает ортофосфат, что, вероятно, отражает функциональную связь систем репарации ДНК с механизмами утилизации ортофосфата.

Низкий уровень соответствия положительных результатов в ДНК-репарационном тесте и мутагенности для металлов, в отличие от органических соединений, по-видимому, также связан с тем, что металлы в большинстве случаев блокируют мембранную функцию системы репарации ДНК, не затрагивая прямо ДНК.

Выявленная бериллиево-тетраэтиламмониевая летальность для *E. coli* перспективна в качестве модели для изучения некоторых сторон функциональной организации ионных каналов.

Бериллиевая культуральная среда может быть использована для характеристики мутаций генов *uvr*, *rec*, *lex* E. coli, связи их продуктов с мембранными функциями, соотношения различных мутаций с фенотипическими проявлениями.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Исследование мутагенности бериллия, а также испытание его в качестве кофактора при мутагенезе, вызванном УФ-облучением или нитрозометилмочевинной.
2. Изучение зависимости эффективности бериллия в ДНК-репарационном тесте от состава среды и оценка явлений, детектируемых ДНК-репарационным тестом.
3. Некоторые стороны взаимодействия бериллия с ионными каналами E. coli.

Апробация работы.

Результаты исследований доложены и обсуждались на конференции молодых ученых-медиков Ивано-Франковской области / 1985/, на У Украинском биохимическом съезде / Ивано-Франковск, 1987 /, на заседании Ивано-Франковского областного биохимического общества / 1990 /, на УІ съезде генетиков и селекционеров Украины / Полтава, 1992 /. По материалам диссертации опубликовано II работ.

Объем и структура диссертации.

Объем диссертации - 147 страниц машинописного текста, основной текст составляет 125 страниц.

Работа включает введение, 3 главы, содержащих обзор литературы, описание методов исследований, результаты исследований и их обсуждение, выводы, указатель литературы / 208 источников /.

Во введении показаны актуальность исследования, его цель

и основные задачи, подчеркнуты новизна, научная и практическая значимость исследования.

I-я глава посвящена анализу отечественной и зарубежной литературы, затрагивающей проблемы стабильности генома, систем защиты ДНК, зависимости мутабельности и злокачественной трансформации клетки от состояния систем репарации повреждений ДНК. Рассмотрены вопросы распространения бериллия в окружающей среде, его продвижения по трофическим цепям, взаимодействия с биологическими системами на различных уровнях организации, канцерогенные свойства бериллия, его влияние на точные матричные клеточные процессы: синтез ДНК, РНК, белка.

Во второй главе описаны методы исследований экспериментальной части работы, штаммы бактерий, составы культуральных сред, использованные реактивы, препараты и основное оборудование.

В 3-й главе представлены результаты исследований и их обсуждение: решение проблемы стабилизации бериллия в культуральной среде, исследование мутагенности и комутагенности бериллия, исследование металла с помощью ДНК-репарационного теста, а также некоторые стороны взаимодействия бериллия с ионными каналами *E. coli*.

Основные результаты исследования обобщены в выводах.

Материалы и методы исследований.

Штаммы бактерий.

Эксперименты выполнены на четырех штаммах *E. coli*, производных линии В/х : WP2 *trpE* , изолированный Witkin , WP2 *trpE uvrA* , полученный Hill , SM571 *trpE recA* и SM561 *trpE lexA* , выделенные Bridges . Все штаммы получены с коллекции Института общей генетики имени Н.И.Вавилова / Москва /.

Химреактивы и среды.

При выполнении экспериментов использовались следующие ре-

активы и препараты: пептон / производство Винницкого мяскокомбината /; бакто-агар "Тип ЮСА" / Ферак, Берлин /; трис-/ оксиметил-/аминометан / Реанал, Венгрия /; аминокептид / производства Ленинградского завода медпрепаратов /; глюкоза - фармакопейная 40%-ная, остальные реактивы производства "Союзреактив". Нитрозометилмочевину синтезировали из метиламина солянокислого / Губен, 1949 /.

Попытки ввести бериллий в стандартные среды, как, например, в среду IxА / Миллер, 1976 /, были безуспешными: металл мгновенно преципитирует при нейтральном рН среды. Не удалось стабилизировать катион и при помощи таких известных комплексонов как сульфосалициловая, ауринтрикарбонатная, этилендиаминтетрауксусная кислоты. Самыми устойчивыми оказались комплексы бериллия с цитратами, хотя этого нельзя было ожидать при сравнении констант устойчивости бериллия с указанными комплексонами из данных литературы

В жидкой среде использовались концентрации цитрата до 30 мМ, так как при превышении указанной концентрации наблюдалось образование агрегатов бактерий в виде комков и "тяжей", что, по-видимому, является признаком действия на клетки неблагоприятного фактора. При испытаниях мутагенности бериллия использовалась минимальная среда, позволяющая ввести бериллий до концентрации 30 мМ следующего состава / мМ /: цитрат натрия трехзамещенный - 30, фосфат аммония двухзамещенный - 10, трис-/оксиметил-/аминометан - 30, хлорид калия - 7, сульфат магния - I, глюкоза - II. рН среды доводился до необходимой величины I M серной кислотой или трисом. При необходимости использования концентраций бериллия превышающих 30 мМ / жидкая инкубационная среда или агаризованная среда / пропорционально увеличивалась и концентрация цитрата.

Оценка мутагенности и комутагенности бериллия.

Мутагенность бериллия испытывалась качественно по индукции кольца ревертантов к прототрофности по триптофану на чашке при локальном внесении металла и количественно - по отношению частоты индуцированных мутаций к спонтанным при обработке бактерий в различных условиях: увеличение частоты мутаций в 2 раза - мутагенная активность отсутствует, в 2 - 4 раза - сомнительный результат, в 4 - 10 раз - низкая мутагенная активность, в 10 - 100 раз - средняя активность, выше 100 - сильный мутагенный эффект / Васильева и др., 1985 /. В качестве положительного контроля использовались нитрозометилмочевина и бихромат калия.

Комутагенность испытывалась путем одновременной обработки бактерий УФ-радиацией и металлом, а также высеванием обработанных нитрозометилмочевинной клеток на бериллиевую среду.

Выполнение ДНК-репарационного теста.

Использование наиболее распространенного варианта техники выполнения ДНК-репарационного теста с аппликацией дисков фильтровальной бумаги с нанесенным испытуемым веществом на чашку Петри с высевной индикаторной культурой оказалось неприемлемым в случае забуферивания соли бериллия. Поэтому применялась следующая схема выполнения теста: в каждую чашку вносилось точно 20 мл агаризованной среды, высевалось 0,2 мл суточной культуры бактерий, в центре или в трех секторах / если предварительно было известно, что зоны ингибирования роста не перекрываются / делали лунки диаметром 6 мм. В каждую лунку вносили раствор 1 М сульфата бериллия забуференного трис-цитратом до pH равного pH среды. Мерой эффективности бериллия служили размеры зоны ингибирования роста бактерий через 24 часа.

Для оценки величины эффективной концентрации бериллия в

различных условиях металл в контролируемой концентрации вносился непосредственно в среду, чашка делилась на четыре сектора внешней меткой и в каждый сектор петлей высевалась суточная культура бактерий. Через 24 часа отмечали наличие или отсутствие роста. Мерой эффективности бериллия служила наименьшая ингибирующая рост бактерий концентрация.

Статистическую оценку достоверности результатов испытаний в ДНК-репарационном тесте проводили согласно непараметрическому критерию - критерию знаков / Лакин, 1980 /.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что некоторые мутагены эффективны только в узком диапазоне условий / Ауэрбах, 1978; Миллер, 1976 /. Учитывая неудачные попытки индуцировать бериллием точечные мутации у прокариот / *Simmon V.F.* , 1978; *Arlauskas A. eto.* , 1985; *Ashby J.* . 1990 /, значительные усилия были приложены к поиску условий для проявления активности бериллия.

Путем индукции кольца ревертантов испытывалась мутагенность бериллия, а в качестве положительного контроля - нитрозометилмочевина - сильный мутаген и бихромат калия - слабый мутаген. При таком испытании мутагенной активности выявляется как мутаген только нитрозометилмочевина.

Кратковременная / 30 мин. / обработка бериллием не повлияла на выход мутаций / табл. I, опыт I /. Пролонгированное действие металла, обеспечиваемое путем введения его в агаризованную минимальную среду также оказалось неэффективным / табл. I, опыт 2 /.

ДНК-репарационный тест, согласно существующим представлениям / *Baker R.S.U.* , 1985 ; *Kanematsu N. eto.* , 1980; *Rosenkrantz H.S. eto.* , 1980 /, выявляет ДНК-повреждающее действие

мутагенной активности металла / табл. I, опыты 3 и 4 /.

Некоторые мутагены эффективны только при высокой летальности / Миллер, 1976 /. При инкубации бактерий с забуференным бериллием / 125, 250 и 500 мМ, продолжительность инкубации 30 мин. / летальность составляет 60 - 99 % и, казалось бы, получены доказательства мутагенности бериллия / табл. I, опыт 5 /. Но вызывал сомнение тот факт, что абсолютное число мутантов на опытных чашках никогда не превышало количества мутантов в контроле. При подрачивании бактерий после обработки увеличения частоты мутаций нет. Вероятно, при инкубации с высокими концентрациями бериллия клетки получают реparableные повреждения и восстанавливаются при медленном росте на минимальной среде, а при росте на богатой среде гибнут, что приводит к ошибке при учете мутаций.

Испытание бериллия в качестве кофактора мутагенеза, вызванного УФ-облучением и нитрозометилмочевинной не позволили включить в звено канцерогенного действия бериллия модуляцию металлом мутагенной активности других канцерогенов.

Выявлено, что совместное действие бериллия и тетраэтиламмония / известный ингибитор ионных каналов / в низких концентрациях / до 10 мМ / вызывает летальность бактерий, тогда как каждый агент в отдельности неэффективен / табл. 2 /. Испытание мутагенности бериллия при различных уровнях летальности, полученных при совместном использовании бериллия и тетраэтиламмония, не дало доказательств мутагенности металла.

Таким образом, выявить мутагенность бериллия не удалось ни в условиях высокой летальности бактерий / обработка высокими концентрациями забуференного бериллия /, ни в условиях максимальной цитотоксичности металла, согласно результатам испытаний бериллия в ДНК-репарационном тесте / pH среды 5,0; аммонийно-цитратный

буфер; концентрация Be 20 мМ /.

Таблица 2.

Выживание бактерий в зависимости от концентрации в инкубационной среде бериллия и тетраэтиламмония и уровни мутагенности при обработке клеток в этих условиях.

Концентрация / мМ /:		Показатели для штаммов			
Be	ТЭА	WP2	WP2 uvrA	CM571 rec	CM561 lex
В ы ж и в а н и е / проценты /					
0	0	100	100	100	100
0	20	94	100	113	89
5	15	0,18	0,29	0,7	0,3
10	10	5,8	1,0	1,8	0,9
15	5	82	72	100	74
20	0	80	117	117	96
М у т а г е н н о с т ь / кратность к контролю /					
0	0	1,0	1,0	1,0	1,0
0	20	2,32	2,51	0,96	1,78
5	15	1,38	1,84	0,95	1,91
10	10	1,73	2,86	0,69	3,53
15	5	1,32	3,00	1,04	0,60
20	0	1,3%	3,00	1,05	0,85

Испытание бериллия в ДНК-репарационном тесте на незабуференном аминокислотном агаре дало положительный эффект / табл. 3 /, но при введении в среду буфера с pH 7,2 активность бериллия не выявляется. Анализ влияния возможных факторов привел к выявлению pH-зависимости эффективности бериллия. Введение в среду

Таблица 3.

Влияние pH и состава среды на проявление бериллия в ДНК-репарационном тесте.

Номер опыта: Состав среды с добавлением I M бериллия^ж : среды: pH : Диаметр зоны ингибирования.

			WP2 avrA	WP2 recA	CM571 lexA	CM561 lexA	
1	Аминопептидный агар	Не измер.	0 ^{жж}	19	19	19	
2	То же, но забуференный	7,2	0	0	0	0	
3	Забуференный аминопептидный агар	4,5	0	14	Не испытано		
		5,0	0	12	То же		
		5,5	0	12	То же		
		6,0	0	10,5	То же		
		6,5 ^{жжж}	0	0	То же		
4	Забуференный аминопептидный агар, обогащенный глюкозой / 0,2 % /	4,5	0	24	26	24	
		5,0	0	16	16	17	
		5,5	0	12	11	13	
		6,0	0	11	11	13	
		6,5 ^{жжж}	0	0	0	0	
5	Забуференный аминопептидный агар с глюкозой:	а/ 4,5	0	26	26	26	
		б/ 4,5	0	27	29	27	
		а/ 40 мкл Ве в лунку	в/ 4,5	0	30	28	26
		б/ 40 мкл Ве в лунку +	а/ 5,0	0	20	20	19
		40 мкл Mg в лунку	б/ 5,0	0	23	21	23
		в/ в среде 10 mM Mg	в/ 5,0	0	21	21	18
		40 мкл I M Ве в лунку	а/ 5,5	0	13	13	14
			б/ 5,5	0	15	16	14
			в/ 5,5	0	12	13	14
			а/ 6,0	0	11	12	11
			б/ 6,0	0	12	13	10
	в/ 6,0	0	12	12	9		
	а, б, в/ 6,5 ^{жжж}	0	0	0	0		

^ж В опытах I - 4 в лунку вносили 50 мкл I M раствора бериллия

^{жж} Зона ингибирования отсутствовала

^{жжж} При pH от 6,5 до 8,0 зона ингибирования отсутствовала

глюкозы увеличивает эффективность бериллия, что, вероятно, связано со способностью глюкозы репрессировать потребление аминокислот и пептидов, а снижение потребления аминокислот приводит к снижению в среде аммиака и аминов, вследствие чего повышается стабильность pH среды.

Попытка снизить цитотоксичность бериллия для штаммов с дефектами репарации ДНК дополнительным введением магния одновременно с бериллием в лунку или в среду была безуспешной / табл. 3, опыт 5 /.

pH-зависимость эффективности бериллия в ДНК-репарационном тесте объясняет причину противоречий в результатах японских исследователей, полученных на одних и тех же штаммах *Bacillus subtilis* / Nischioka H. , 1975; Kanematsu N. et al., 1980 /. Они пользовались средами с различной буферной емкостью, различными солями бериллия / сульфаты, хлориды / и положительный эффект получали тогда, когда соль бериллия могла локально сдвинуть pH среды в кислую сторону. Отрицательные результаты при испытании бериллия на *E. coli* / Yagi T. , Nischioka H. , 1977 /, по-видимому, получены по этой же причине, причем, в этом исследовании использовались те же штаммы бактерий / три из четырех /, что и в настоящей работе.

Параллелизм в поведении штаммов с различными дефектами систем репарации поврежденных ДНК свидетельствует о том, что они имеют элементы или один общий элемент чувствительные к бериллию, а pH-зависимость указывает на то, что системы репарации ДНК имеют мембранные структуры.

Использование второй модификации техники выполнения ДНК-репарационного теста позволило оценить влияние ряда факторов на эффективность бериллия и выяснить природу явлений, которые детектирует, в данном случае, ДНК-репарационный тест.

Как и в предыдущих испытаниях, эффективность бериллия зависит от pH среды, но цитотоксичность металла для клеток с дефектами репарации ДНК выявляется даже при pH 8,0 / табл. 4 /. Различия в поведении бактерий, вероятно, связаны с количеством высеваемых клеток: в последнем случае высеивается сравнительно небольшое количество клеток и поэтому они более чувствительны к неблагоприятному фактору.

Введение в среду калия или лития / катионы сильно различаются по размерам / не сказалось на чувствительности бактерий к бериллию / табл. 4, опыт 2 /, а магний снизил цитотоксичность бериллия. Натрий в концентрации 200 мМ снизил цитотоксичность бериллия, а при повышении в среде концентрации хлорида натрия до 1000 мМ токсичность бериллия не выявляется совсем / табл. 4, опыт 3 /. Повышение осмолярности среды за счет оксипролина и серина мало сказывается на цитотоксичности металла, а максимальная эффективность его проявляется на среде с аммонийно-цитратным буфером / табл. 4, опыт 4 /.

Радикальное сближение цитотоксичности бериллия для штаммов с дефектами систем репарации ДНК при введении в среду ортофосфата / табл. 4, опыт 5 /, вероятно, отражает функциональную связь, которая существует между системами репарации ДНК и механизмами утилизации ортофосфата, а селективность ответа штаммов с различными дефектами систем репарации ДНК — глубину нарушений утилизации фосфата.

Инкубация бактерий с бериллием в условиях его максимальной токсичности показала, что даже через 24 часа контакта с металлом количество жизнеспособных клеток находится на том же уровне, что при инкубации в буфере. Бактериостатичность действия бериллия также служит аргументом в пользу того, что мишени чувствитель-

Таблица 4.

Зависимость наименьшей ингибирующей рост бактерий концентрации бериллия / НИК / от pH и электролитного состава среды.

Номер: Состав буфера среды* с : pH : НИК для штаммов
 опыта: концентрациями бериллия : среды: WP2 : WP2 : CM574 : CM561
 uvrA recA lexA

1	Трис-натрий-цитрат - 30 мМ	5	> 10	0,5	0,5	0,5
	Ве - 10; 2; 1; 0,5; 0,1;	6	> 10	1	1	0,5
	0,05; 0,01; 0 мМ	7	> 10	10	10	2
		8	> 10	10	10	10
2	Литий-цитрат - 20 мМ	6	> 10	2	2	2
	Калий-цитрат - 20 мМ	6	> 10	2	2	2
	Магний-цитрат - 20 мМ	6	> 10	10	10	10
	Аммоний-цитрат - 20 мМ	6	> 10	1	1	1
	Ве - 10; 2; 1; 0,1; 0,01; 0 мМ					
3	Натрий-цитрат - 20 мМ	6	> 10	1	1	1
	То же + 200 мМ хлорида натрия	6	> 10	10	10	1
	То же + 1000 мМ хлорида натрия	6	> 10	> 10	> 10	> 10
	Ве - 10; 2; 1; 0,1; 0 мМ					
4	Аммоний-цитрат - 20 мМ	6	> 10	0,5	0,5	0,5
	Натрий-цитрат - 20 мМ	6	> 10	1	1	1
	То же + серин, 400 мМ	6	> 10	0,5	0,5	0,5
	То же + оксипролин, 500 мМ	6	> 10	1	1	1
	Ве - 10; 2; 1; 0,5; 0,1; 0 мМ					
5	Аммоний-цитрат - 20 мМ	5	> 10**	0,31	0,31	0,31
	То же + 5 мМ P _H	5	> 10	1,25	2,5	5
	То же + 10 мМ P _H	5	> 10	5	10	> 10
	Ве - 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,016; 0,008; 0 мМ					

* В среду вводили 1 % пептона, 2 % аминокислоты и 1,5 % агара

** Для штамма WP2 при pH 5,0 80 < НИК < 160 мМ Ве

P_H - ортофосфат в виде аммонийной соли.

ная к металлу находится на мембране.

Совместное действие бериллия и тетраэтиламмония приводит

к летальности бактерий / табл. 2 /. Вероятно, тетраэтиламмоний деформирует нативную конформацию некоторых ионных каналов так, что они теряют селективность, вследствие чего бериллий проникает в клетку и вызывает ее гибель. Пользуясь методом изомолярных серий, получены различные уровни летальности и показано, что действие тетраэтиламмония превалирует. Уровень летальности не зависит от состояния системы репарации повреждений ДНК. По-видимому, при проникновении в клетку бериллий поражает жизненно важные механизмы, отличные от тех, которые контролируются системами защиты ДНК или действие металла носит необратимый жесткий характер.

В эукариот основным путем проникновения бериллия в клетку служит, вероятно, эндоцитоз и металл накапливается преимущественно в лизосомах / Skilleter D.N., Price R.G. , 1979 /. Возможно, что при гибели клеток бериллий нарушает скорость и полноту лизиса ядра и фрагменты ДНК / продукт неполного нуклеолиза / могут проникать в соседние клетки, интегрироваться с их геномом, экспрессировать онкогены.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модификация культуральной среды для *E. coli*, позволяющие использовать бериллий при pH от 4,5 до 9,0, а также две модификации техники выполнения ДНК-репарационного теста.

2. Не выявлено мутагенной активности бериллия, не обнаружено модуляции металлом мутагенной активности нитрозометилмочевина и ультрафиолетовой радиации.

3. Впервые на *E. coli* выявлены условия, в которых бериллий эффективен в ДНК-репарационном тесте. Показана зависимость эффективности металла от pH среды, наличия глюкозы, концентрации электролитов, а также бактериостатический характер цитотоксичности бериллия для штаммов с дефектами систем репарации повреж-

АНБ им. В. Стефановича
АНУРСР

дений ДНК, что указывает на то, что системы репарации ДНК имеют мембранные элементы.

4. Радикальное изменение цитотоксичности бериллия для штаммов с дефектами репарации ДНК при введении в среду ортофосфата, вероятно, отражает дефект мембранной фосфатной функции, возникающий одновременно с дефектом системы репарации ДНК.

5. Выявлено бериллиево-тетраэтиламмониевую летальность для *E. coli*. Уровень летальности не зависит от состояния системы репарации ДНК. Модель перспективна для исследования некоторых сторон функционирования ионных каналов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Дылевой М.В. Влияние металлоканцерогена бериллия на репарацию ДНК кишечной палочки // 5-й съезд генетиков и селекционеров Украины / Тез. докл. Ч. 4. Медицинская генетика и генетика микроорганизмов. - Киев. - 1986. - С. 59-60.

2. Дылевой М.В. Действие бериллия на репарацию ДНК кишечной палочки // Тезисы докладов областной конференции молодых ученых-медиков. - Ивано-Франковск. - 1985. - С. 12.

3. Дылевой М.В. Генотоксичность бериллия // Микроэлементы в биологии и их применение в медицине и сельском хозяйстве / Тез. докл. X Всесоюзной научной конференции. Т. 2. - Чебоксары. - 1986. - С. 71-72.

4. Дильовий М.В. Берилій та злоякісна трансформація клітини // 5-й Український біохімічний з'їзд / Тез. допов. Ч. I. - Київ. - 1987. - С. 295-296.

5. Дылевой М.В. Специфика проявления генотоксичности бериллия для кишечной палочки с дефектами репарации ДНК // Всесоюзное общество генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. 5-й съезд / Тез. докл. Т. I. Общая и молекулярная генетика. -

М.-1987.-С.83-84.

6. Дылевой М.В. Влияние состава культуральной среды на некоторые стороны функционирования мембран кишечной палочки // 4-я Всесоюзная конференция по патологии клетки / Тез. докл., М.-1987.-С.211.

7. Гарбарец Б.А., Прохорчук Н.В., Дылевой М.В. Кюветная приставка к спектрофотометрам // Мед. техника.-1987.-№ 3.-С.55-56.

8. Дылевой М.В. Взаимодействие бериллия с ионными каналами кишечной палочки // Тезисы I-й Республиканской конференции / выездная сессия Украинского минералогического общества / по биоминералогии, посвященной 125-летию акад. В.И. Вернадского.-Льв.-1988.-С.108.

9. Дылевой М.В. Модификация метода определения генотоксичности химических соединений на бактериальных тест-системах // Новое в лабораторной диагностике болезней внутренних органов, 4-й съезд Республиканского научного общества врачей-лаборантов / Тез. докл., Ворошиловград.-1989.-С.442.

10. Дылевой М.В. Оценка ДНК-повреждающего действия металлоканцерогена бериллия с помощью бактериального репарационного теста // Микробиол. журнал.-1990.-Т.52, № 1.-С.34-38.

11. Дильовий М.В. Дослідження мутагеності, комутагеності та ефективності в ДНК-репараційному тесті металоканцерогену берилію // 6-й Український біохімічний з'їзд / Тез. допов., Ч. I., Київ.-1992.-С.33.

Подписано в печать 16.09.92г Формат 60x84/16
Бумага писчая. Усл.печ.л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ №1458
Отпечатано ЦУОП ГНПП "Плодвинконтсерв" г.Киев,Саксаганского,1

169370

№ 26.013

АВ 26.013