

**МОДИФИКАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ТИПА
ЦИКЛОБУТАНОВЫХ ПРИМИДИНОВЫХ ДИМЕРОВ
В МОЛЕКУЛЕ ДНК В ШТАММАХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*****М.М.МЕДЖИДОВ*, Р. З.ШАММЕДОВ**, Л.С.ВЕЛИЕВА*******Бакинский Государственный Университет,******Институт Генетических Ресурсов НАНА,*****e.mail: r_shammedli@rambler.ru***

УФ-облучение клеток E.coli индуцирует образование в молекуле ДНК первичных повреждений типа циклобутановых пиримидиновых димеров. Изучением антимутagenной активности препаратов из листьев чая показано, что она зависит от генотипа конкретного штамма бактериальных клеток и от компонентного состава испытываемой суммы экстрактивных веществ листьев чая, полученной с последовательных стадий их технологической обработки. Наибольшей эффективностью отличается экстракт из зеленых листьев чая, относительно меньшей - экстракт из готового черного чая.

Образование, развитие и формирование мутаций представляет собой сложный, многоэтапный, но достаточно дискретный и пролонгированный во времени и пространстве процесс [1;2]. Каждый из составляющих его этапов играет определенную роль в общем процессе мутагенеза. Тем не менее наиболее важна стадия реализации возникших первичных повреждений молекулы ДНК в конечные мутационные события. Ее ключевой характер определен тем, что приводящий к возникновению этих повреждений акт взаимодействия квантовых излучений (в случае воздействия радиации) или молекул химических мутагенов с ДНК хромосом является на данном этапе мутационного процесса лишь первым звеном в цепи последующих ферментативных реакций в клетке. Последние в конечном итоге приводят либо к фиксации первичных повреждений в необратимую форму мутаций, либо к их устранению с восстановлением исходной структуры молекулы ДНК. Поэтому неслучайно, что поиск путей коррекции заключительных этапов мутационного процесса является на сегодняшний день одним из приоритетных направлений защиты генома биологических видов в экстремальных ситуациях и в условиях изменения окружающей среды.

Цель настоящих исследований заключалась в изучении молекулярных механизмов защиты генома биологически активными веществами на заключительных этапах мутационного процесса – на базе уже возникших предмутационных изменений молекулы ДНК типа циклобутановых пиримидиновых димеров.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на штаммах клеток *Echerichia coli* дикого типа и следующих мутантных генотипов:

Штамм	Генотип
WP ₂ CM561	В/r, trpE ⁻ , дикый тип. Производный WP ₂ + lex A ⁻
К-12, AB 1157	F ⁻ , thr1, leu 86, proA2, his 4, argE3, pac 41, dalK2, ara14, xy15, mtl1, T1-S, T6-R, λ-S, st ^R , дикый тип.
AB1885 BHL 1 JC 5519 JC 9239 JC 7689	Производный AB 1157 + uvr B ⁻ Производный AB 1157 + rec A ⁻ Производный AB 1157 + rec BC ⁻ Производный AB 1157 + rec F ⁻ Производный AB 1157 + sbc B ⁻

У дефектных по определенному гену штаммов бактерий отсутствует кодируемый им в норме продукт. В результате, у мутантных штаммов подавлена та или иная функция эксцизионной или пострепликативной репарации, для осуществления которой он является необходимым.

В качестве корректоров мутационного процесса использованы водно-спиртовые экстракты из зеленых листьев чая (Эк.ЗЧ) (флешей), собранных в конце июля, а также из тех же листьев, взятых с различных последовательных стадий их технологической обработки - обезвоживания (Эк. Обез.), скручивания (Эк. Сукр.), ферментации (Эк. Ферм.), сушки (Эк. Суш), готового черного чая (Эк.ГЧЧ).

Бактериальные клетки, выращенные до стационарной фазы на среде М9 с соответствующими добавками аминокислот при 37⁰С (плотность 2.5x10⁷ кл/мл), вносили в чашки Петри и подвергали воздействию ультрафиолетового излучения (240-280нм) в течение 3 сек. двумя параллельными кварцевыми лампами БУВ-15 на расстоянии 50 см от источника облучения, интенсивность облучения 10 эрг/сек/мм². После 30-минутной инкубации клеток в водяной бане с аэрацией при 37⁰С, а также центрифугировании при 5000g в суспензию опытных партий клеток вносили, каждый в отдельности, модификаторы мутационного процесса в используемых концентрациях (0,01 мкг/мл). Опытные смеси инкубировали 30 мин. при 37⁰С на качалке, а затем пробы высевали на мясо-пептонный агар (МПА) для определения количества выживших колоний и на голодный агар для подсчета обратных мутаций от ауксотрофности по триптофану к прототрофности (штаммы клеток линий WP₂) и прямых мутаций к валиноустойчивости (штаммы *E.coli* К-12).

Результаты исследований подвергались статистическому анализу. Выживаемость вычисляли в логарифмах абсолютных величин по числу выживших колоний через 18 часов после посева клеток на чашки с МПА.

Значимость изменения эффективности мутагенеза (κ) в мутантных клетках по сравнению с клетками дикого типа или при введении экстракта оценивали при помощи критерия Стьюдента (td) [3]. Среднеквадратичные ошибки (m) вычисляли с использованием таблиц Типпета [4]. Фактор эффективности антимутагенеза (ФЭА) вычисляли как отношение разницы между индуцированным и модифицированным уровнями мутирования к индуцированному [5].

Результаты экспериментов и их обсуждение

Результаты учета жизнеспособности бактериальных клеток показали, что во всех ситуациях дефектные по репарационной активности штаммы *E.coli* оказались более чувствительными к мутагенному действию УФ-лучей, чем клетки дикого типа (рис.1). Причем, к воздействию фактору наиболее чувствительными оказались *uvrB* и *recBC*-мутанты. Некоторую резистентность проявили *recF*-мутанты, еще большую - *recA* и *lexA*-мутанты, в то время как клетки *sbcB*⁻ по чувствительности к УФ-лучам незначительно отличались от клеток дикого типа. При внесении в суспензию УФ – облученных клеток экстрактов из листьев чая с различных стадий их технологической обработки выживаемость бактериальных клеток носит избирательный характер, который зависит от генотипа используемых штаммов *E.coli* и от специфики конкретного апробируемого препарата. Так установлено, что испытываемые экстракты с разной эффективностью (в уменьшающейся последовательности: экстракт из листьев зеленого чая, экстракты со стадий обезвоживания, скручивания, ферментации, сушки и экстракт из готового черного чая) повышают подавленную УФ-лучами жизнеспособность клеток дикого типа, а также *recBC* и *sbcB* - мутантов, но не влияют на показатель выживаемости УФ-облученных клеток с генотипами *uvrB*⁻, *recA*⁻, *recF*⁻ и *lexA*. Все это

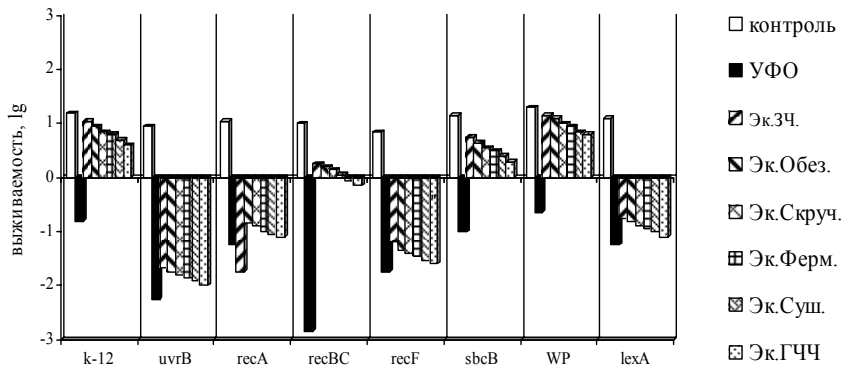


Рис.1 Выживаемость клеток *E.coli* с различными репарационными генотипами при УФ-облучении изолированно и в сочетании с испытываемыми препаратами

свидетельствует в пользу большей или меньшей степени вероятного участия апробируемых экстрактов в изменении эффективности репарации. На это, прежде всего, указывает избирательный характер их влияния на жизнеспособность клеток дикого типа (все гены у которых находятся в активном состоянии) и линий клеток с дефектами по отдельным репарационным генам, под контролем которых находятся различные пути эксцизионной и пострепликативной репарации первичных повреждений типа циклобутановых пиримидиновых димеров.

Параллельно с учетом выживаемости бактериальных клеток при их УФ-облучении и при последующей их обработке апробируемыми экстрактами производилась регистрация количества прямых и обратных мутаций в клетках дикого типа и мутантных штаммов. Результаты наблюдений интенсивности мутагенеза и антимутагенеза в этой серии экспериментов приводят-

ся для случая использования в качестве корректора мутационного процесса экстракта из зеленых листьев чая в таблице 1. Анализируя результаты интенсивности мутагенеза, следует отметить, что под воздействием УФ – лучей изменяется частота мутаций как в клетках дикого типа, так и мутантных штаммах. Как установлено, эти изменения носят разнонаправленный характер. Так, если пренебречь различиями в частоте спонтанных генных мутаций в контрольных образцах, то следует отметить, что интенсивность образования мутаций существенно возрастает в клетках дикого типа, а также в *uvrB*, *recBC*, *recF* и *sbcB* – мутантах. В то же время, в *recA* и *lexA* – мутантах частота УФ-индуцированных мутаций по сравнению с клетками дикого типа снижалась примерно на 50%-тов.

Таблица 1

Частота мутаций, индуцированных УФ-облучением в клетках *E.coli* различных генотипов и эффективность их модификации экстрактом из зеленых листьев чая

Генотип клеток	Контроль $\bar{X} \pm m$	Частота мутаций, индуцированных облучением $\bar{X} \pm m$		Изменение интенсивности мутагенеза						ФЭА
		Без экстракта	С экстрактом	По отношению к контролю			при действии экстракта			
				к	td	P	K ₁	td ₁	P ₁	
K-12	27,3±2,21	507±46	121±11	18,57	9,65	<0,001	4,19	15,05	<0,001	0,76
<i>uvrB</i> ⁻	43,0±2,36	1425±75	1428±75	33,14	12,55	<0,001	1,002	0,105	>0,05	-
<i>recA</i> ⁻	36,8±2,06	263±18	225±14	7,15	9,77	<0,001	1,17	3,21	<0,01	0,14
<i>recBC</i> ⁻	44,4±2,28	936±50	298±23	21,08	12,40	<0,001	3,14	20,58	<0,001	0,68
<i>recF</i> ⁻	42,1±1,80	1173±67	1178±66	27,86	12,32	<0,001	1,004	0,19	>0,05	-
<i>sbcB</i> ⁻	34,7±2,16	821±77	303±26	23,66	11,05	<0,001	2,71	18,79	<0,001	0,63
<i>B/r WP₂</i>	24,7±1,87	449±38	96±8	18,18	9,19	<0,001	4,68	14,15	<0,001	0,79
<i>lexA</i> ⁻	32,5±1,53	242±22	205±17	7,45	9,21	<0,01	1,18	3,21	<0,01	0,15

Такой избирательный характер проявления мутагенного действия УФ-лучей в линии клеток *E.coli* с различными репарационными генотипами обусловлен характером механизма мутагенеза, возникающего под воздействием УФ-лучей [1]. То есть участием или неучастием продуктов генов, находящихся в мутантных штаммах в подавленном состоянии, в ключевых путях эксцизионной и пострепликативной репарации потенциальных повреждений типа циклобутановых пиримидиновых димеров.

Рассматривая экспериментальные данные, отражающие антимутагенную модификацию генотоксичности УФ-лучей на примере экстракта из листьев зеленого чая (табл.1), видно, что его введение в среду культивирования бактериальных клеток после их мутагенной обработки приводит к существенному снижению интенсивности мутагенеза как в клетках дикого типа, так и в *recBC* и *sbcB* – мутантах. В случае *recA* и *lexA*-мутантов антимутагенное действие экстракта из листьев чая было заметно снижено и оно практически не наблюдалось в клетках с генотипами *uvrB*⁻ и *recF*⁻. Все это указывает на то, что проявление антимутагенного действия апробируемого экстракта не зави-

сит от аллельного состояния генов *recBC* и *sbcB*. Следовательно, кодируемые ими продукты (соответственно, экзонуклеаза V и экзонуклеаза I) не являются необходимыми для проявления генозащитного действия экстракта из зеленых листьев чая в условиях УФ-индуцированного мутагенеза. В свою очередь, заметно сниженное влияние апробируемого экстракта на мутагенез в клетках с генотипами *recA⁻* и *lexA⁻*, и тем более, отсутствие модифицирующего действия на мутагенез в *uvrB⁻* и *recF⁻* – мутантах указывает на то, что функции этих генов являются необходимыми для проявления антимуtagenного действия экстракта из листьев зеленого чая в отношении определенного типа первичных повреждений, возникающих под воздействием ультрафиолетовых излучений.

Зависимая от генотипа используемых линий *E.coli* закономерность проявления антимуtagenного действия испытываемых в работе в качестве корректоров мутационного процесса препаратов продемонстрирована и при испытании экстрактов из листьев чая на последовательных стадиях их технологической обработки. При этом, соответственно указанной последовательности установлено уменьшение эффективности антимуtagenеза в некоторых линиях используемых бактериальных клеток (таб.2). На фоне неизменного отсутствия влияния испытываемых препаратов на мутагенез в клетках с генотипами *uvrB⁻* и *recF⁻*, в клетках диких типов, а также *recBC* и *sbcB* – мутантов показатели эффективности антимуtagenеза последовательно уменьшаются, хотя даже у экстракта из готового черного чая они находятся на уровне достаточно высоких значений. В клетках с генотипом *recA⁻* низкая, однако достоверная эффективность модификации УФ-мутагенеза наблюдается у экстракта из листьев зеленого чая, также у экстрактов из тех же листьев на стадии обезвоживания, скручивания и ферментации. Экстракт же на стадии сушки и экстракт из готового черного чая не модифицируют мутагенез в клетках этого генотипа. В клетках же с генотипом *lexA⁻* также низкая, находящаяся в пределах достоверных значений, антимуtagenная активность зарегистрирована только у экстрактов из зеленых листьев чая и у экстракта на стадии их обезвоживания.

Таблица 2

Зависимость эффективности антимуtagenеза апробируемыми экстрактами в УФ-облученных клетках *E.coli* от генотипов последних

Использованные экстракты	Генотипы клеток							
	K-12	<i>uvrB⁻</i>	<i>recA⁻</i>	<i>recBC</i>	<i>recF⁻</i>	<i>sbcB⁻</i>	B/r WP ₂	<i>lexA⁻</i>
Экстракт из зеленых листьев чая	0,76	-	0,14	0,68	-	0,63	0,79	0,15
Экстракт со стадии обезвоживания	0,72	-	0,125	0,66	-	0,61	0,74	0,13
Экстракт со стадии скручивания	0,61	-	0,106	0,57	-	0,52	0,63	0,11
Экстракт со стадии ферментации	0,54	-	0,09	0,49	-	0,43	0,56	0,099
Экстракт со стадии сушки	0,47	-	-	0,38	-	0,34	0,49	-
Экстракт готового черного чая	0,36	-	-	0,31	-	0,28	0,40	-

Таким образом, при испытании апробированных в работе препаратов на фоне индукции мутаций ультрафиолетовыми излучениями установлено, что эффективность их антимуtagenного действия носит неоднозначный характер. Он зависит от специфики используемого экстракта, скорее всего от качественного и количественного содержания в них биологически активных компонентов [7] с генозащитными свойствами [2]. Кроме того, проявляемое ими антимуtagenное действие во многом зависит от аллельного состояния генов *uvrB*, *hcsA*, *hcsF* и *lexA*. Следовательно, оно связано с состоянием активности кодируемых этими генами продуктов. Если для генов *uvrB* и *hcsF* этот результат указывает на то, что антимуtagenное действие испытываемых препаратов связано с индукцией ими безошибочных путей эксцизионной и пострепликативной репарации, то для генов *hcsA* и *lexA* - с подавлением мутагенной репарации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М., Наука, 1982, 228 с.
2. Алиев А.А., Абилов З.Г. Молекулярные механизмы защиты генома. Баку, 1999, 258 с.
3. Лакин Т.Ф. Биометрия. Москва, Высшая школа, 1990, 349 с.
4. Шехтман А.Б. Методические рекомендации к определению неспецифических показателей скрытых форм инфекционного процесса. Баку, 1976, 25с.
5. Алекперов У.К. Антимуtagenез. Теоретические и практические аспекты. М., Наука, 1984, 104 с.
6. Шаммедов Р.З., Алиев А.А. Изучение эффективности модификации радиационного мутагенеза экстрактами из листьев чая с разных стадий его технологической обработки //Труды Инс.Генетики и селекции НАНА, Баку, 2000, с.
7. Багиров А.Я. Химия чая. Ленкорань, Изд.-во ЛГУ, 1998, 92 с.

***ESCHERICHIA COLI* HÜCEYRƏ ŞTAMLARINDA TSİKLOBUTAN PRİMİDİN DİMERLƏRİ TIPLİ DNT MOLEKULU İLKİN ZƏDƏLƏNMƏLƏRİNİN KORREKSİYASI**

M.M.MƏCİDOV, R.Z.ŞƏMMƏDOV, L.S.VƏLİYEVA

XÜLASƏ

Müəyyən edilmişdir ki, DNT molekulunda tsiklobutan primidin dimerləri tipli ilkin zədələnmələrin yaranması zamanı, aprobasiya olunan ekstraktların antimutagen aktivliyi bakteriya hüceyrələrinin genotipindən və ekstraktın tərkibindəki bioloji aktiv maddələrin miqdarından asılıdır. Ən yüksək effektivliyi çayın yaşıl yarpaqları ekstraktı, ən aşağı effektivliyi isə hazır qara çay ekstraktı göstərir. Eyni zamanda sübut olunub ki, UB-şüalarla induksiya olunmuş mutagenезin korreksiya mexanizmi DNT molekulunun səhsiz konstitutiv və səhvlərlə keçən indusibel reparasiya proseslərinin aktivliyinə nəzarət edən genlərin aktivlik vəziyyəti ilə əlaqədardır.

**THE CORRECTION OF THE INITIAL DAMAGES OF TETRAMETHYLENE
PYRIMIDINE DIMERS TYPE WITH DNA MOLECULE IN
THE ECHERICHIA COLI STRAIN CELLS**

M.M.MEJIDOV, R.Z.SHAMMEDOV, L.S.VALIYEVA

SUMMARY

It has been found that antimutagenous activity of tested plant extracts when forming initial damages like tetramethylene pyrimidine dimers bases depends on the genotype of the certain bacteria strain compound composition of the extracts tested. The most effectively is found for the extracts of green tea leaves, and relatively effectivity is for the extracts of brewed black tea.

It has been shown that the correction mechanism of sterol-induced mutagenesis is related to the state of active genes controlling processes of the constitutive correct and inducible reparation of DNA – molecule having affinity to errors.