

На правах рукописи

БЕЛКИНА Светлана Владимировна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СИНЕРГИЗМА
МУТАГЕННЫХ, КАНЦЕРОГЕННЫХ И ЛЕТАЛЬНЫХ
ЭФФЕКТОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ
ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

03.00.01 – радиобиология и 03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск – 2007

Диссертация выполнена в биофизической лаборатории отдела исследования комбинированных воздействий ГУ–Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Петин Владислав Георгиевич
кандидат биологических наук Комарова Людмила Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Красавин
Евгений Александрович
доктор биологических наук, профессор Сынзыныс Борис Иванович

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится 24 апреля 2007 г. в 11.00 ч на заседании диссертационного совета Д 001.011.01 при ГУ «Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук» по адресу: 249036, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королёва, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ–МРНЦ РАМН

Автореферат разослан 22 марта 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Палыга Г.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из самых острых проблем современности является борьба за чистоту окружающей среды. Живые организмы в окружающей среде постоянно подвергаются воздействию целого комплекса факторов (Виленчик М.М., 1991). Эти факторы могут встречаться в последовательной комбинации или действовать одновременно. Большую опасность представляют соединения, обладающие мутагенным действием. Кроме непосредственного отрицательного эффекта на живые организмы они вызывают отдалённые последствия, которые могут проявиться в виде раковых образований или реализоваться в последующих поколениях (Москалев Ю.И., 1991).

Многообразие воздействующих на организм агентов делает актуальной проблему изучения закономерностей комбинированных воздействий и их математического моделирования с целью прогнозирования ожидаемых последствий (Данилов-Данильян В.И., Степанов С.А., 2002). К настоящему времени в отечественной и зарубежной литературе накопились экспериментальные данные по комбинированным воздействиям в окружающей среде многих физических и химических факторов. Ситуация усложняется тем, что вредное действие некоторых агентов может не только суммироваться, но и усиливаться за счёт синергического взаимодействия. Поэтому прогнозирование мутагенных, канцерогенных и летальных эффектов при синергическом взаимодействии различных факторов окружающей среды является актуальным как для радиобиологии, так и для экологии.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является прогнозирование летальных, генетических и канцерогенных эффектов при синергическом взаимодействии различных факторов окружающей среды. Для выполнения этой цели было необходимо решить следующие задачи:

- продемонстрировать на экспериментальных данных, что характер взаимодействия агентов при комбинированных воздействиях зависит от соотношения индуцированных ими повреждений;
- сформулировать и адаптировать для генетических и канцерогенных эффектов математическую модель синергизма, ранее использованную для описания только летальных эффектов;
- проверить применимость модели синергизма для прогнозирования мутагенных эффектов на клеточном уровне;
- оценить возможность использования модели синергизма для описания канцерогенных эффектов при комбинированных воздействиях факторов окружающей среды на организменном уровне и на уровне человеческой популяции.

Научная новизна работы. В результате выполнения данной работы впервые были получены следующие новые результаты:

- математическая модель синергизма, первоначально разработанная для описания летальных эффектов на клеточном уровне, адаптирована и успешно применена для прогнозирования мутагенных эффектов у бактерий *Escherichia coli*, а также более сложных биологических организмов - растений;
- разработана модифицированная модель синергизма, учитывающая элиминацию субповреждений, которая оптимизирует и прогнозирует мутагенные эффекты комбинированного действия различных экологических агентов;
- впервые продемонстрирована возможность использования математической модели синергизма для оптимизации и прогнозирования синергических эффектов канцерогенеза в культивируемых клетках млекопитающих, а также у лабораторных животных;
- впервые показана возможность применения модели к описанию канцерогенных эффектов комбинированных воздействий экологических агентов на популяционном уровне (человек).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы имеют, прежде всего, фундаментальное значение, поскольку дополняют современный уровень представлений о синергических взаимодействиях. Результаты данной работы использованы в материалах учебных пособий для студентов вузов. Также они могут представлять интерес для экологии, прикладной радиобиологии, медицинской и сельскохозяйственной радиологии при разработке оптимальных режимов промышленной, сельскохозяйственной и медицинской стерилизации. Результаты данной работы могут быть использованы при составлении практических рекомендаций санитарно-гигиенических служб.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Математическая модель синергизма прогнозирует величину максимального синергического усиления и условия, при которых она достигается после одновременного действия гипертермии и сульфата цинка на выживаемость бактерий *Escherichia coli*, а также последовательного действия метотрексата и этилметансульфата на выживаемость культивируемых клеток млекопитающих.
- Возможно применение математической модели синергизма, проверенной ранее для описания инактивации клеток, для прогнозирования выхода мутаций у бактерий *Escherichia coli*.
- Математическая модель синергизма количественно описывает и интерпретирует данные о выходе мутаций и цитогенетических повреждений у растений.

- Математическая модель синергизма может быть использована для прогнозирования канцерогенных эффектов комбинированных воздействий на клеточном уровне, а также на популяционном (человек).

Личный вклад автора в получение научных результатов, изложенных в диссертации. Совместно с научным руководителем автором обоснованы актуальность, цели и задачи исследования, самостоятельно проанализирована научная литература, получены экспериментальные данные, проведен количественный анализ результатов, сделаны выводы, написана диссертация.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертации доложены на Международном рабочем совещании "Современные проблемы радиобиологии" (Дубна, 1996), на 3-м Съезде по радиационным исследованиям (Москва, 1997), на VIII Международном Конгрессе Генетиков (Пекин, 1998), на региональной научно-практической Конференции "Инновационное развитие: достижения учёных Калужской области для народного хозяйства" (Обнинск, 1999), на Четвёртой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности" (Санкт-Петербург, 1999), на научной конференции "Физико-технические проблемы гарантии качества лучевой терапии" (Обнинск, 2006). По теме диссертации опубликовано 16 работ в журналах «Генетика», «Радиационная биология. Радиоэкология», «Радиация и риск», «Российский химический журнал», «Экология», а также в материалах научных конференций.

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции экспериментального радиологического сектора ГУ–МРНЦ РАМН 21 декабря 2006 г.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 161 странице, включает введение, обзор данных литературы, результаты экспериментальных и теоретических исследований, обсуждение, выводы, список использованной литературы и Приложение. Иллюстрирована 36 рисунками и 17 таблицами, список цитируемой литературы включает 78 работ на русском языке и 137 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Влияние комбинированного действия ионизирующего излучения и NiCl₂ на выживаемость и формирование повреждений ДНК в культивируемых клетках человека

Клеточная культура. Для исследования были использованы клетки ТК6 В-лимфоцитов человека, гетерозиготных по тимидинкиназе. Клетки пересеивали дважды в неделю и культивировали в среде RPM1 с добавлением 20 % сыворотки крови эмбриона телят, 1 % NEAA (не незаменимые

кислоты) и 1 % пируват натрия. Поскольку ТК6 клетки не присоединяются к стенкам пластиковых флаконов, в которых они культивируются, то для сбора их в суспензию добавление трипсина не требовалось. В ходе экспериментов клеточную культуру инкубировали в термостате при температуре 37°C с 5 %-ым содержанием CO₂ в воздухе камеры при 100 % влажности.

Облучение. Источником ионизирующего излучения служила установка Cs-137 с мощностью дозы, равной 0,8 Гр/мин. Клеточную суспензию (2·10⁵ клеток/мл) облучали в пластиковых флаконах при комнатной температуре. После облучения культуру возвращали в термостат с CO₂.

Выживаемость клеток. Для определения выживаемости клеток клеточную суспензию разбавляли до концентрации 2·10⁵ клеток/мл в питательной среде при комнатной температуре и 10 мл суспензии помещали в пластиковые флаконы. Необходимые микрообъемы NiCl₂ отбирали из основного 1 М раствора и вводили непосредственно в клеточную суспензию. Клетки ТК6, находящиеся в экспоненциальной стадии роста, инкубировали в средах с добавлением исследуемых концентраций NiCl₂ в течение 24 ч или 48 ч.

Выживаемость клеток рассчитывали по уравнению:

$$S = n_{\text{экс.}}/n_{\text{контр.}} * 100 \%, \quad (1)$$

где n_{экс.} – число выживших клеток в облученной группе, а n_{контр.} – число жизнеспособных клеток в контрольной группе. Концентрацию клеток определяли при помощи камеры Горяева под световым микроскопом. Различие между погибшей и живой клеткой определяли «на глаз», принимая во внимания различную способность клеток отражать свет.

Статистическая обработка результатов. Обработку экспериментальных данных производили в соответствии с общими методами, принятыми при статистическом анализе результатов наблюдений. Достоверность различий статистических показателей оценивали по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Комбинированное действие агентов. Клетки инкубировали в среде, содержащей исследуемую концентрацию хлорида никеля, в течение 24 ч в термостате. Затем клетки облучали в дозе 1 Гр при комнатной температуре. Определение выживаемости клеток после сочетанного воздействия ионизирующего излучения и химического агента проводили через 24 ч после облучения. Результаты последовательного действия агентов на выживаемость клеток ТК6 представлены на рис. 1.А. Из рисунка следует, что если при низких концентрациях хлорида никеля наблюдается эффект, больший, чем аддитивный (синергизм), то при высоких - меньший, чем аддитивный эффект (антагонизм). Коэффициент синергического усиления по экспериментальным значениям рассчитывали как отношение количества повреждений, формируемых в реальных экспериментах по комбинированному действию агентов, к суммарному числу повреждений,

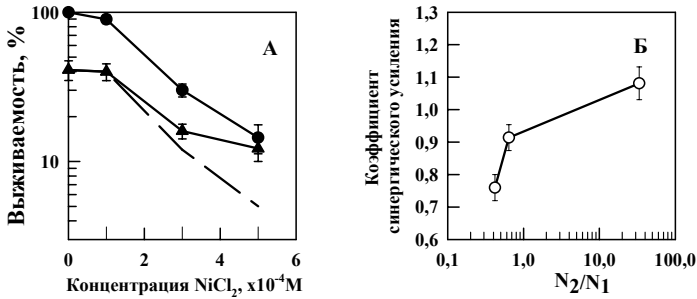


Рис. 1. Комбинированное действие ионизирующего излучения (1Гр) и различных концентраций хлорида никеля на выживаемость В-лимфоцитов человека ТК6. А – Зависимость выживаемости клеток от концентрации NiCl₂. Темные кружки – воздействие NiCl₂, 48 ч. Темные треугольники – комбинированное действие излучения и NiCl₂. Значок ▲ на оси ординат – эффект действия только 1Гр. Данные – результаты 5-ти независимых экспериментов. Пунктирная кривая – ожидаемая кривая выживаемости при независимом (аддитивном) действии этих агентов. Б – Зависимость коэффициента синергического усиления от отношения повреждений N₂/N₁, индуцированными воздействующими агентами. N₁ – число летальных повреждений, вызванных излучением (уравнение 3), N₂ – хлоридом никеля.

сформированных после раздельного действия каждого агента.

$$k_{эксн} = N_{комб} / N_{аддит} \quad (2)$$

где

$$N_i = -\ln(S), \quad (3)$$

где S – доля выживших клеток. Как показано на рис. 1.Б, величина коэффициента синергического усиления, рассчитанная по уравнению (2) во всех случаях близка 1.

Метод «комет». Для регистрации повреждений ДНК, сформированных в клетке после комбинированного действия ионизирующего излучения и хлорида никеля, использовали метод «комет». Этот метод применяют для прямой визуализации повреждений ДНК в отдельно взятой клетке. В работе использовали щелочной метод электрофореза клеток для определения одиночных и двойных разрывов ДНК.

Клетки ТК6 были подвергнуты 24 часовому воздействию NiCl₂, а после облучены при 0°C. Затем 5·10⁴ клеток в 0,01 мл фосфатного буфера смешивали с 0,1 мл мелко молотого агара и помещали на замороженное предметное стекло, которое предварительно было покрыто первым слоем 0,1% агара при низкой температуре. После отвердения агара клетки внутри слоя агара были подвергнуты лизису в течение 60 мин при 4°C. Удаление протеинов ядра происходило в термостате при 37°C в течение 2 ч, затем клетки подвергали действию электрического поля 12 В/см в течение 60 мин. После электрофореза клетки дегидрировали в 96% этаноле и регидрировали в

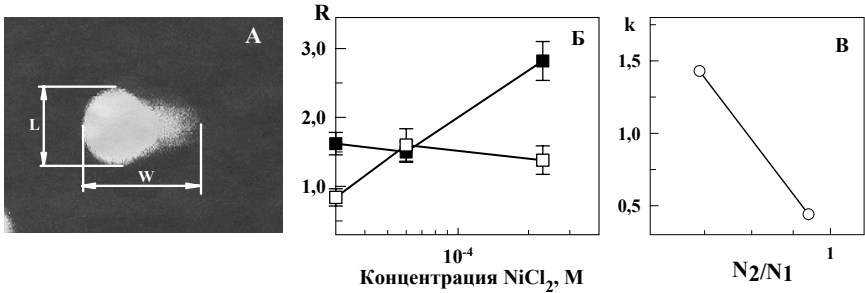


Рис. 2. Последовательное действие различных концентраций хлорида никеля ($0,6 - 2,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$) и ионизирующего излучения (цезий-137, 1 Гр) на формирование одиночных и двойных разрывов ДНК в клетках В-лимфоцитов человека ТК6. А - флуоресцентная микрофотография «кометы», показан способ определения отношения длины кометы к ширине его ядра (R), где „L“ – общая длина кометы, а „W“ – ширина ядра. Б - зависимость отношения R от концентрации NiCl₂. Приведены данные одного эксперимента, в котором было проанализировано от 60 до 130 клеток на распечатанных микрофотографиях. В - зависимость коэффициента синергического усиления от отношения повреждений N_2/N_1 , индуцированными воздействующими агентами. N_1 – число генетических повреждений, вызванных излучением, N_2 – хлоридом никеля.

70% этаноле, а затем окрашивали флуоресцирующим красителем Yo-Yo. Повреждения в популяции клеток оценивали, изучая индивидуальные клетки под микроскопом.

В данных экспериментах повреждения ДНК оценивали путем распечатки микрофотографий, полученных при помощи компьютерной системы, и измерения линейкой геометрических параметров «кометы» (рис. 2А.). Для количественной оценки повреждений ДНК клеток ТК6 после воздействия было использовано отношение длины кометы к ширине его ядра (R). Этот параметр оценивали по уравнению:

$$R = \text{Длина кометы} / \text{Ширина ядра} = L / W \quad (4)$$

На рис. 2Б, В приведены результаты количественной оценки повреждений ДНК клеток ТК6. Видно, что большая концентрация хлорида никеля в комбинации с ионизирующим излучением приводит к значительному увеличению отношения длины кометы к ширине его ядра. Таким образом, на примере комбинированного действия ионизирующего излучения и хлорида никеля на выживаемость и формирование ДНК-повреждений в системе культивируемых клеток человека было подтверждено, что характер взаимодействия агентов может зависеть от отношения повреждений, индуцируемых каждым агентом, используемым при их сочетанном применении. Поэтому представляло интерес рассмотреть математическую модель, учитывающую зависимость эффективности взаимодействия применяемых агентов от соотношения повреждений, вызываемых каждым агентом.

Формулировка математической модели синергизма.

Для прогноза генетических эффектов комбинированных воздействий необходимо было определить параметры математической модели. Пусть N_1 - число генетических повреждений, пропорциональных числу мутаций или онкотрансформаций, регистрируемых в реальном эксперименте от воздействия первого агента, и N_2 - число генетических повреждений, пропорциональных числу мутаций или онкотрансформаций, зафиксированных в эксперименте, от действия второго агента. Пусть p_1 и p_2 количества субповреждений, индуцированные первым и вторым действующим фактором, соответственно, и приходящиеся на одно повреждение, приводящее к регистрируемому генетическому повреждению биологического объекта. Тогда общее число субповреждений, образованных первым агентом, будет равно p_1N_1 , а число субповреждений, индуцированных вторым повреждающим фактором, будет равно p_2N_2 . Следует отметить, что субповреждения каждого из действующих агентов не вносят никакого вклада в их генетическое действие, если они применяются отдельно друг от друга. Другими словами, в модели предполагается, что выход некоторых субповреждений, обуславливающих синергическое взаимодействие, прямо пропорционален числу повреждений, приводящих к регистрируемому генетическому повреждению. Следовательно, общее число генетических повреждений N при комбинированном воздействии агентов будет определяться уравнением:

$$N = N_1 + N_2 + \min\{p_1N_1; p_2N_2\}, \quad (5)$$

где $\min\{p_1N_1; p_2N_2\}$ - минимальное значение из двух величин, характеризующих выход субповреждений p_1N_1 и p_2N_2 . Наличие дополнительного числа повреждений $\min\{p_1N_1; p_2N_2\}$ и обуславливает эффект синергизма.

Для оценки нелинейных генетических эффектов используют коэффициент взаимодействия k , который определяют как отношение инкремента ответной реакции системы на сочетанное действие k сумме инкрементов при раздельном действии каждого из факторов

$$k = N_{комб} / N_{аддит} = \Delta N(X, Y) / \{\Delta N_1(0, Y) + \Delta N_2(X, 0)\}, \quad (6)$$

где X, Y - действующие факторы; $N(X, Y)$ - величина регистрируемого эффекта при действии факторов X и Y ; $N(0, 0)$ - величина спонтанного уровня (естественный фон), а $\Delta N(X, Y) = N(X, Y) - N(0, 0)$ - величина регистрируемого эффекта за вычетом фона. При $k > 1$ имеет место синергизм, при $k = 1$ - независимое действие (аддитивность), а при $k < 1$ - антагонизм действующих агентов. Так как в работе рассматривается синергическое взаимодействие агентов, то коэффициент k в дальнейшем будет называться коэффициентом синергического усиления.

Исходя из вышеизложенных постулатов модели, коэффициент синергического усиления можно описать уравнением:

$$k = I + \min\{p_1 N_1; p_2 N_2\} / (N_1 + N_2). \quad (7)$$

Отсюда видно, что синергический эффект комбинированных воздействий определяется отношением генетических повреждений N_2/N_1 , вызванных воздействующими агентами. Легко показать, что в этом случае максимальный синергический эффект

$$k_{max} = I + (p_1 \cdot p_2) / (p_1 + p_2) \quad (8)$$

будет достигаться при выполнении условия, определяемого уравнением

$$p_1 N_1 = p_2 N_2. \quad (9)$$

Значения p_1 и p_2 можно определить эмпирически по экспериментальным данным совместного действия обоих агентов. Из уравнения (7) получается, что при преимущественном действии второго фактора, когда $\min\{p_1 N_1; p_2 N_2\} = p_1 N_1$

$$p_1 = (k - I) \cdot \left\{ I + \left(N_2 / N_1 \right) \right\}, \quad (10)$$

а при преимущественном действии первого агента, когда $\min\{p_1 N_1; p_2 N_2\} = p_2 N_2$

$$p_2 = (k - I) \cdot \left\{ I + \left(N_1 / N_2 \right) \right\}. \quad (11)$$

Данная математическая модель после определения с помощью уравнений (10) и (11) свободных параметров модели p_1 и p_2 из конкретных экспериментов позволяет прогнозировать значения коэффициента синергического усиления k для любых соотношений повреждений N_2/N_1 , индуцированных воздействующими агентами – уравнение (7), может предсказывать величину максимального синергизма – уравнение (8) и условие, при котором он достигается – уравнение (9).

Одновременное действие сульфата цинка и гипертермии на выживаемость бактериальных клеток *Escherichia coli*

В экспериментах по изучению одновременного действия сульфата цинка, одного из поллютантов, относящихся к классу тяжелых металлов, и гипертермии на бактериальные клетки *Escherichia coli* нами были получены зависимости выживаемости бактерий от времени пребывания в контакте с сульфатом цинка (0,01 М) при повышенных температурах (37 – 60 °С), а также после воздействия каждого фактора в отдельности (кривые доза-эффект). На рис. 3А-Д представлены зависимости выживаемости клеток *E.coli* от продолжительности действия отдельно гипертермии (кривая 1), сульфата цинка 0,01 М (кривая 2), одновременного применения обоих факторов при условии аддитивного (независимого) сложения их эффектов (кривая 3), одновременного действия этих же агентов в реальных условиях их

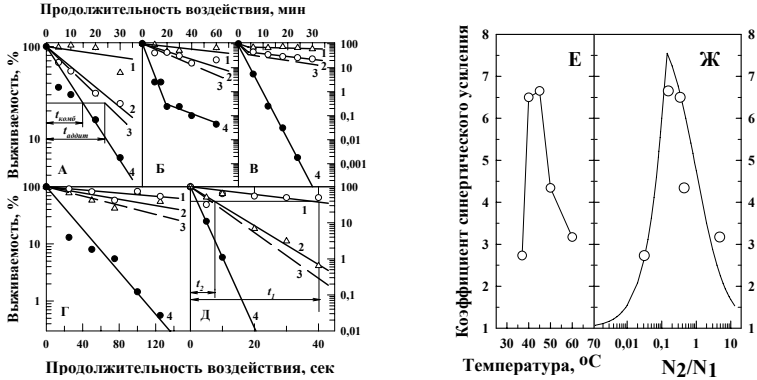


Рис. 3. Зависимости выживаемости бактериальных клеток *Escherichia coli* от продолжительности действия гипертермии (37-60 °С) (кривые 1), сульфата цинка в концентрации 0,01 М (кривые 2) и их одновременного применения (кривые 4), а также ожидаемая кривая выживаемости при независимом (аддитивном) действии этих агентов (кривые 3). А - 37 °С, Б - 40 °С, В - 45 °С, Г - 50 °С, Д - 60 °С. Е – зависимость коэффициента синергического усиления (k) от действующей температуры. Ж – зависимость k от отношения повреждений N_2/N_1 , индуцированными воздействующими агентами. Значки – экспериментальные данные, линия – теоретическая кривая, рассчитанная по уравнению (7) математической модели синергизма.

применения (кривая 4). Из рисунка следует, что выживаемость клеток после одновременного воздействия обоих факторов меньше, чем выживаемость, ожидаемая при независимом сложении эффектов после действия каждого фактора в отдельности (кривая 4 проходит ниже расчетной аддитивной кривой 3). Для количественного описания полученного синергического взаимодействия был рассчитан коэффициент синергического усиления как отношение изоэффективных длительностей воздействия для теоретической кривой выживаемости, ожидаемой при аддитивном действии этих агентов ($t_{адд}$), и для экспериментальной кривой выживаемости, регистрируемой после одновременного комбинированного действия сульфата цинка и гипертермии.

$$k_{эксн} = t_{аддит} / t_{комб} \quad (12)$$

На рис. 3А стрелками показан способ нахождения $t_{адд}$ и $t_{комб}$. Зависимость от температуры коэффициента синергического усиления, рассчитанного по уравнению (12), изображена на рис. 3Е. Как следует из рисунка, данная зависимость представляет собой кривую с выраженным максимумом, существование которого свидетельствует о наличии температуры, максимально усиливающей действие сульфата цинка. Видно также, что понижение или повышение инактивирующей температуры приводит к уменьшению эффекта синергического взаимодействия. Именно такая зависимость коэффициента синергического усиления от температуры качественно предсказывается математической моделью, описанной выше.

Отношение N_2/N_1 находили из соотношения наклонов кривых выживаемостей (рис. 3Д) после раздельного действия химического вещества и физического агента по уравнению:

$$N_2 / N_1 = t_1 / t_2 \quad (13)$$

Параметр p_1 (количество субповреждений, приходящихся на одно эффективное повреждение от действия химического агента) рассчитывали для такой ситуации, когда инактивация клеток была обусловлена преимущественно действием гипертермии, а параметр p_2 определяли для ситуации, когда выживаемость была обусловлена в основном действием $ZnSO_4$. Расчеты показали, что $p_1 = 7,4$, а $p_2 = 56,7$. По уравнению (7) был рассчитан теоретически ожидаемый коэффициент синергического усиления при различных N_2/N_1 . Полученные экспериментальные значения k (значки) и теоретическая кривая зависимости коэффициента синергического усиления от отношения воздействующих агентов (сплошная линия) представлены на рис. 3Ж. Из этого рисунка видно, что модель точно описывает наблюдавшуюся в эксперименте зависимость: при определенных соотношениях N_2/N_1 регистрируется усиление синергического эффекта, а после достижения максимального значения синергизм уменьшается. На примере этих данных была проверена и подтверждена способность модели оптимизировать и прогнозировать синергические летальные эффекты в бактериальных клетках.

Совместное действие ультрафиолетового излучения и формальдегида на выход мутаций у бактерий *E. coli*

На примере данных о совместном действии ультрафиолетового излучения и формальдегида на выход обратных мутаций у бактерий *E. coli* K-12W была продемонстрирована способность модели оптимизировать и прогнозировать синергические эффекты мутагенеза у бактерий (рис. 4А,Б). На рис. 4А приведен пример определения значений N_i , необходимых для расчета k (уравнение 6). Модель точно описывает наблюдавшуюся в эксперименте зависимость: при определенных соотношениях N_2/N_1 регистрируется усиление синергического эффекта, а после достижения максимального значения синергизм уменьшается. При комбинированном действии исследуемых агентов на другой штамм бактерий - *E. coli* 113-3 в эксперименте наблюдался значительно меньший выход мутаций, чем это предсказывает математическая модель синергизма (рис. 4В, пунктирная линия). Сделано предположение, что в области малых доз УФ-света происходит более интенсивная элиминация субповреждений, индуцированных ультрафиолетовым излучением. Это означает прогрессивное уменьшение одного из свободных параметров математической модели (p_1). Можно допустить, что этот параметр модели будет меняться в соответствии с

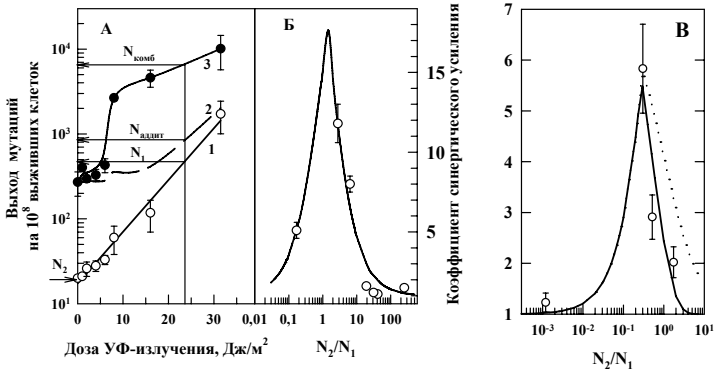


Рис. 4. Совместное действие различных доз ультрафиолетового излучения и формальдегида на индукцию обратных мутаций в локусе *leu* у бактерий *E. coli* K-12W (А, Б) и в локусе *B₁₂* у бактерий *E. coli* 113-3. (В). А – зависимость выхода мутаций от дозы ультрафиолетового излучения при действии только излучения (кривая 1), аддитивное сложение эффектов от обоих факторов (кривая 2) и их комбинированное действие (кривая 3). Б, В – зависимость коэффициента синергического усиления от соотношения поврежденных N_2/N_1 , индуцированных действующими агентами. Значки – экспериментальные значения, рассчитанные по данным, опубликованным в работе (Панфилова З.И. и др., 1966), линии – теоретическая кривая.

уравнением:

$$p_1 = p_1^0 \cdot \exp\{-N_2 / N_1\}, \quad (14)$$

где p_1^0 – константа. Используя уравнение (14), были получены новые теоретически ожидаемые значения коэффициента синергического усиления для комбинации различных доз ультрафиолетового излучения с формальдегидом (сплошная линия, рис. 4В). Этот вариант модели удовлетворительно ($p < 0,1$) описывает экспериментальные результаты. Таким образом, показано применение модифицированной модели синергизма, учитывающей элиминацию субповреждений в области малых доз ультрафиолетового излучения, для прогнозирования и оптимизации мутационных эффектов у бактерий.

Комбинированное действие ионизирующего излучения и химических загрязнителей на индукцию мутаций у растений

Проведена проверка прогностических возможностей модели для описания мутационных эффектов у более сложных биологических организмов – растений. Результаты прогнозирования и оптимизации синергического эффекта комбинированного действия ионизирующего излучения, пестицидов и тяжелых металлов на индукцию мутаций у растений представлены на рис. 5А, Б. Продемонстрировано, что предложенная концепция синергизма статистически достоверно ($p = 0,01$) описывает генетические эффекты

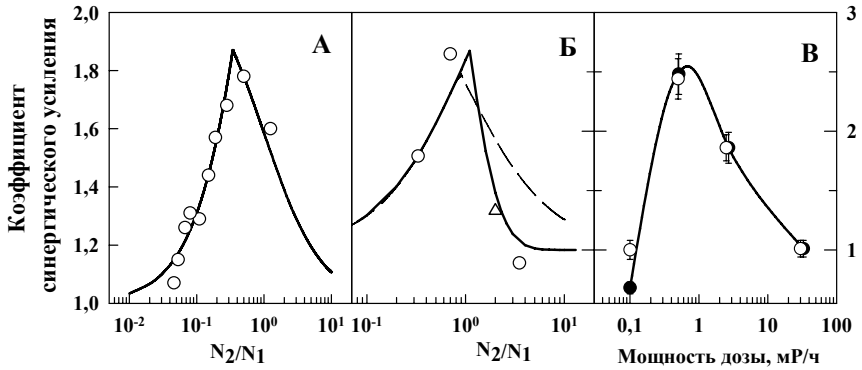


Рис. 5. Зависимость коэффициента синергического усиления от отношения повреждений N_2/N_1 , индуцированных воздействующими агентами, при комбинированном действии: А - ионизирующего излучения и 1,2-дибромэтана на индукцию мутаций у традесканции; значки - экспериментальные значения, рассчитанные по данным, опубликованным в работе (Leenhouts *et al.*, 1986), линия - теоретическая кривая (уравнение 7). Б - нитрата свинца и гербицида 2,4-Д на индукцию мутаций у ячменя; значки - экспериментальные значения, рассчитанные по данным, опубликованным в работе (Гераскин С.А. и др., 2002), линия - теоретическая кривая (уравнения 14, 7). В - зависимость k от мощности дозы ионизирующего излучения при последовательном действии излучения и нитрата свинца на индукцию мутаций в семенах *Arabidopsis thaliana*.

комбинированных воздействий в области малых мощностей доз у растений. Прямые экспериментальные данные, опубликованные в работе (Динева С.Б. и др., 1993) по изучению выхода мутаций у растений при реальных мощностях доз ионизирующего излучения, встречающихся после аварии в 30-км зоне чернобыльского реактора, показали способность излучения синергически усиливать мутагенное действие нитрата свинца. Нами было показано (рис. 5В), что в этом случае коэффициент k , при фиксированной концентрации химического агента, зависит от мощности дозы ионизирующего излучения и достигает своего максимума при определённом оптимальном значении. Эта закономерность указывает на принципиальную возможность взаимного усиления эффектов, индуцированных вредными факторами окружающей среды при реально встречающихся в биосфере интенсивностях.

Комбинированное действие ионизирующих излучений и химических факторов на индукцию канцерогенных эффектов у лабораторных животных

Прогнозирование и оптимизация комбинированных канцерогенных эффектов ионизирующего излучения в комбинации с химическими агентами с помощью рассматриваемой математической модели было проведено как для клеток млекопитающих, так и для лабораторных животных. Результаты прогнозирования приведены на рис. 6. Из рисунка следует, что предложенная концепция синергизма, апробированная ранее для воздействия различных

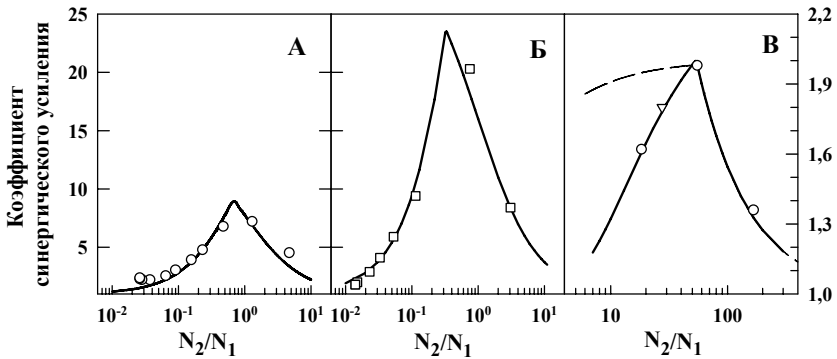


Рис. 6. Зависимость коэффициента синергического усиления от отношения повреждений N_2/N_1 , индуцированных действующими агентами, при одновременном действии различных доз рентгеновского излучения (А) или нейтронов (Б) в комбинации с промотором злокачественных новообразований 12-О-тетрадеканолфорбол-13-ацетатом на индукцию клеточной трансформации в культивируемых клетках мышей $3H3/10T\frac{1}{2}$, а также рентгеновского излучения и гормона эстрогена на индукцию рака молочной железы у крыс (В). Значки – экспериментальные значения, рассчитанные по данным, опубликованным в работах А, Б - (Han, Elkind, 1982), В - (Segaloff, Pettigrew, 1978); линии – теоретические расчеты (уравнения 7 – А, Б, 14 - В).

агентов на выживаемость, мутационный процесс одноклеточных организмов, хорошо описывает действие факторов на канцерогенный процесс более сложных биологических систем (животных).

Индукция онкологических заболеваний у человека при комбинированном действии радона, табакокурения и алкоголя

Предлагаемая модель синергизма была применена для описания комбинированного действия плотноионизирующего излучения (радон) и табачного дыма на индукцию рака легкого у человека с использованием двух групп эпидемиологических данных, отражающих ситуацию, когда формирование новообразований происходило преимущественно под действием одного из агентов. На рис. 7А приведены объединенные данные о взаимодействии радона в диапазоне концентраций от 0,05 до 15,7 кБк/м³ и табачного дыма на индукцию рака легкого у человека. Также модель была протестирована и на эпидемиологических данных о совместном потреблении алкоголя и табака на индукцию двух типов рака у мужчин (рис. 7Б, В). Видно, что величина коэффициента синергического усиления имеет ярко выраженный максимум при определенном соотношении действующих агентов N_2/N_1 . При других величинах N_2/N_1 коэффициент k принимает меньшие значения. Именно такие закономерности изменения коэффициента синергического усиления прогнозирует предложенная модель. Тем самым продемонстрирована возможность применения модели синергизма, разработанной для описания комбинированного действия агентов на

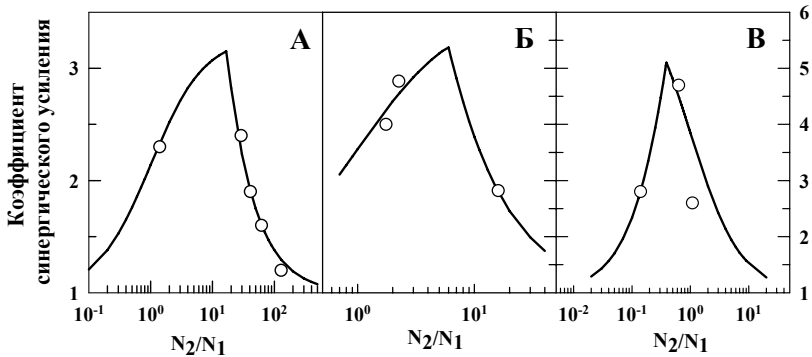


Рис. 7. Зависимость коэффициента синергического усиления от отношения повреждений N_2/N_1 , индуцированных воздействующими агентами, при одновременном действии радона и табачного дыма на индукцию рака легкого у человека (А), а также при совместном потреблении различных концентраций алкоголя и табака, вызывающих формирование рака полости рта и глотки (Б) или пищевода (В) у мужчин. Значки – экспериментальные значения, рассчитанные по данным, опубликованным в работах: А - (Band *et al.*, 1980; Pershagen *et al.*, 1994), Б - (Конопляников А.Г., 1993), В - (Day, Mijoz, 1982); линии – теоретические расчеты (уравнение 7).

клеточные системы, к воздействию на человека.

Результаты диссертации имеют, прежде всего, фундаментальное значение, поскольку дополняют современный уровень представлений о синергических взаимодействиях. Результаты данной работы использованы в материалах учебных пособий для студентов вузов. Также они могут представлять интерес для прикладной радиобиологии, медицинской и сельскохозяйственной радиологии при разработке оптимальных режимов промышленной, сельскохозяйственной и медицинской стерилизации, экологии. Результаты данной работы могут быть использованы при составлении практических рекомендаций санитарно-гигиенических служб.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при комбинированном действии ионизирующего излучения и хлорида никеля на выживаемость и формирование повреждений ДНК в клетках человека характер взаимодействия агентов в существенной степени зависит от соотношения индуцированных ими повреждений.
2. Подтверждена значимость математической модели синергизма для прогнозирования величины максимального синергического усиления и условий, при которых она достигается после одновременного действия гипертермии и сульфата цинка на выживаемость бактерий *Escherichia coli*, а также последовательного действия метотрексата и этилметансульфата на выживаемость культивируемых клеток млекопитающих. Общность подходов к описанию синергического взаимодействия различных агентов указывают на важность использованной модели для проблем радиобиологии и экологии.

3. Продемонстрирована возможность применения математической модели синергизма для прогнозирования выхода мутаций у бактерий *Escherichia coli* при одновременном действии ультрафиолетового излучения в комбинации с формальдегидом или гидраксиламином. Предложен модифицированный вариант модели, учитывающий элиминацию субповреждений. Показано, что модель предсказывает условие для достижения наиболее эффективного синергического взаимодействия. Любое отклонение применяемых в комбинации факторов от оптимального соотношения воздействующих агентов приводило к уменьшению синергизма.
4. Математическая модель синергизма впервые применена для количественного описания и интерпретации данных о выходе мутаций и цитогенетических повреждений у растений – одновременное действие рентгеновского излучения и дибромэтана на выход мутаций у традесканции и совместного действия нитрата свинца и гербицида 2,4-D на выход цитогенетических нарушений у ячменя. Впервые дана интерпретация существованию обнаруженной в 30-км зоне Чернобыльской АЭС оптимальной мощности дозы, при которой синергический эффект хронического действия ионизирующего излучения и нитрата свинца на выход мутаций в семенах *Arabidopsis thaliana* был максимальным.
5. Впервые выявлена возможность использования математической модели синергизма для оптимизации и прогнозирования синергических эффектов при комбинированном действии ионизирующих излучений и химических агентов на канцерогенез в культивируемых клетках млекопитающих, а также у лабораторных животных.
6. Показано, что математическая модель синергизма может быть использована для прогнозирования канцерогенных эффектов комбинированных воздействий на человека. Предложенная модель предсказывает существование максимального синергизма, его величину и условие, при котором он достигается для данных о совместном действии радона и табачного дыма на возникновение рака легкого, а также табачного дыма и алкоголя на возникновение рака гортани и пищевода.
7. Продемонстрированная в работе возможность прогнозирования синергических эффектов, индуцированных при комбинированных воздействиях различных факторов окружающей среды на инактивацию культивируемых клеток различного происхождения, выход мутаций и цитогенетических повреждений растений, а также описание канцерогенных эффектов на уровне клеток, лабораторных животных и человека, указывает на универсальность постулатов, заложенных в математическую модель. В соответствии с постулатами, синергизм обусловлен образованием дополнительных эффективных повреждений за счет взаимодействия некоторых субповреждений, не эффективных при раздельном применении агентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петин В.Г., Дергачёва И.П., Романенко А.Г., Рябова С.В. Новая концепция оптимизации и прогнозирования эффектов синергизма при комбинированном воздействии химических и физических факторов окружающей среды // Российский химический журнал. - 1997. - Т. 41, № 3. - С. 96-104.
2. Рябова С.В. Прогнозирование выхода мутаций после комбинированного действия агентов окружающей среды / Тез. докл. 3-го съезда по рад. исследованиям. (Москва 14-17 октября 1997). Пущино. - 1997. - Т.2. - С.30.
3. Рябова С.В., Петин В.Г. Математическое описание выхода мутаций при комбинированном воздействии различных мутагенов // Генетика. - 1998. - Т.34, № 8. - С.1151-1156.
4. Петин В.Г., Жураковская Г.П., Комарова Л.Н., Рябова С.В. Зависимость синергизма факторов окружающей среды от их интенсивности // Экология. - 1998. - № 5. - С. 383-389.
5. Ryabova S.V., Rassokhina A.V., Zhurakovskaya G.P., Petin V.G. Optimization and prognosis of mutagenic effects under combined action of environmental agents / XVII-th International Congress of Genetics. (Beijing, China August 10-15 1998). – Beijing. – 1998. – P. 26.
6. Рябова С.В., Петин В.Г. Достижение в моделировании синергических эффектов экологических агентов. / Тез. докл. Региональной научно-практической конференции "Инновационное развитие достижений учёных Калужской области для народного хозяйства". (Обнинск 15-16 апреля 1999 г.), Обнинск. – 1999. – С. 75-76.
7. Рябова С.В., Петин В.Г. Новые аспекты в изучении синергизма экологического канцерогенеза/ Труды Четвёртой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности" В 3-х томах, 16-18 июня 1999 года, СПб./ Под ред. Н.И. Иванова; Балт. Гос. Техн. Ун-т, СПб., - 1999. - Т. 3. - С. 212.
8. Рябова С.В. Биофизические аспекты синергического взаимодействия экологических факторов на клеточные системы/ Тез. докл. 2-го Съезда биофизиков России. (Москва 22-29 августа 1999г.) – Москва. – 1999. – Т. II. - С. 911.
9. Петин В.Г., Рябова С.В. Энергетика и глобальные проблемы экологии / Школа-семинар "Энергетика и человек". Сборник докладов (Обнинск, 13-14 октября 1999 г.) Обнинск: ИАТЭ - 1999 - С. 8-16.

10. Рябова С.В., Петин В.Г. Возможность прогнозирования синергических эффектов комбинированных воздействий на организменном уровне // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 2. – С. 192-196.
11. Петин В.Г., Жураковская Г.П., Морозов И.И., Дергачева И.П., Рассохина А.В., Рябова С.В., Комарова Л.Н. Разработка и апробация теоретической модели и синергического взаимодействия вредных факторов окружающей среды, характерных для Калужской области/ (грант РФФИ и Администрации Калужской области №98-04-03599) Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Выпуск 1. – Калуга: Издательский дом «Эйдос». - 2000. – С. 266-279.
12. Kim J.K., Petin V.G., Ryabova S.V. The republic of Korea as an example of power energy influence on quality of life/ Международный конгресс «Энергетика 3000». (Обнинск, 2000 г.) Тез. Докладов. – Обнинск: ИАТЭ. – 2000. – С. 122-123.
13. Ryabova S.V., Petin V.G. Modeling of carcinogenic effects resulting from the combined action radon, smoking, and other agents / “5th International Conference on High Level of Natural Radon and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects” (Munich, September 4-7, 2000) Munich: Institute of Radiation Hygiene. – 2000. – P. 167.
14. Петин В.Г, Рябова С.В., Комарова Л.Н. Оптимизация и прогнозирование на организменном уровне синергического взаимодействия факторов окружающей среды, характерных для Калужской области/ (грант РФФИ и Администрации Калужской области №00-04-96071) Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Выпуск 2. – Калуга: Издательский дом «Эйдос». - 2001. - С. 383-399.
15. Белкина С.В. Оптимизация синергизма при комбинированной терморadiационной терапии / В кн. Физико-технические проблемы гарантии качества лучевой терапии. – Обнинск. – 2006. – С. 23.
16. Белкина С.В., Комарова Л.Н., Крицкий Р.О. Прогнозирование синергических эффектов ионизирующего излучения и других повреждающих факторов на клетки млекопитающих и растения // Радиация и риск. – 2006. – Т. 15, № 3-4. – С. 118-130.

Редактор З.И. Сныкова
Компьютерная верстка С.В. Белкина

ЛР № 020713 от 27.04.1998

Подписано к печати

Формат бумаги 60×84/16

Печать ризограф.

Бумага МВ

Печ. л. 1,25

Заказ №

Тираж 100 экз.

Цена договорная

Отдел множительной техники ИАТЭ
249035, г. Обнинск, Студгородок, 1