

## РАДИАЦИОННАЯ БИОФИЗИКА

УДК 543.429.22:577.3:539.1.047

# МЕТОДОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ ЭПР В АНАЛИЗЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАДИОГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. В. Л. Шарыгин<sup>1,\*,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

\*E-mail: sharygin@chph.ras.ru

\*\*E-mail: sharygin2011@mail.ru

Поступила в редакцию 13.08.2020 г.

После доработки 10.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Исследованы молекулярные механизмы синтеза дезоксирибонуклеотидов, ДНК и белков в тканях кроветворных органов, а также изменения пулов  $Fe^{3+}$ -трансферрина ( $Fe^{3+}$ -ТФ) и  $Cu^{2+}$ -церулоплазмина ( $Cu^{2+}$ -ЦП) и внеклеточной ДНК в крови и плазме животных как под действием  $\gamma$ -радиации, так и при применении радиопротекторов. Контролируемые методом ЭПР изменения пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП в крови, содержания внДНК могут использоваться в качестве маркеров радиочувствительности организма. В механизме противолучевого эффекта индралина и индометовена существенным является повышение активности рибонуклеотидредуктазы и индуцирование синтеза дезоксирибонуклеотидов, необходимых для эффективной репарации повреждений и синтеза ДНК в клетках радиочувствительных органов. Использование ЭПР-технологий позволило обосновать дозы и режимы введения радиопротекторов для получения оптимальной радиозащиты.

**Ключевые слова:**  $\gamma$ -радиация, метод ЭПР, ДНК, белки, дезоксирибонуклеотиды,  $Fe^{3+}$ -трансферрин,  $Cu^{2+}$ -церулоплазмин, внеклеточная ДНК, радиочувствительность организма, радиопротекторы

**DOI:** 10.31857/S0869803121020132

“Для натуралиста все дело — в методе”, — утверждал великий физиолог И.П. Павлов, а по уточнению другого Нобелевского лауреата Л.Д. Ландау: “Метод даже важнее открытия, потому что можно постоянно улучшать его, в зависимости от поставленной задачи”. Сегодня уже абсолютно ясно, что также прав оказался и лауреат Нобелевской премии 2002 г. по физиологии и медицине Сидней Бреннер: “Прогресс в науке зависит от новых методик, новых открытий и новых идей, и, вероятно, именно в таком порядке”. Следование этим принципам и составило стратегию исследования закономерностей динамического ответа молекулярно-клеточных систем жизнеобеспечения на воздействие ионизирующих излучений и установление комплекса ЭПР-биомаркеров лучевого поражения организма. Речь идет о методологическом обосновании анализа возможностей прогнозирования последствий радиационных эффектов на основе биофизико-генетического подхода их истолкования и эмпирического обобщения. Термин В.И. Вернадского означает утверждения, которые не противоречат современному знанию. С точки зрения физика, эти обобщения позволяют описать неизвестное, дают основу для

логических построений с учетом имеющихся фактов, обеспечивают другое видение и интерпретацию предмета исследования. Доминантами междисциплинарных исследований стали определение характерных черт и количественная оценка формирования организменного метаболического адаптивного системного SOS-ответа: спектр биофизических, биохимических и сопряженных цитогенетических показателей, необходимых для анализа регуляторной роли систем репарации ДНК в условиях радиационного окислительного стресса млекопитающих.

Биофизический подход сложился в задачу выяснения первичных пусковых механизмов повреждения ДНК и роли репарационного SOS-ответа в условиях действия ионизирующих излучений различной силы и длительности. Важно было установить “с начала причинных цепей” (по выражению Н.В. Тимофеева-Ресовского) природу реализации мутационного процесса и первичных нарушений репликации и репарации ДНК и их роль в развитии цитогенетических изменений, определяющих стохастическое возникновение экопатологий в условиях радиогенных повреждений организма. Логическое осмысление законо-

мерностей динамики мультипараметрических SOS-реакций молекулярно-клеточных систем, понимание причинной обусловленности и природы фенотипики поможет в дальнейшем получить клинически значимые тесты адекватной адаптации или негативных последствий при действии ДНК-тропных агентов на организм животных и человека. С этих позиций, используя возможности метода ЭПР-спектроскопического анализа биообъектов, проводили поиск метаболических биомаркеров радиационного поражения.

### ОБОСНОВАНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ВЫБОР МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Точность копирования ДНК в процессах репликации и репарации зависит не только от активности ферментов, но и определяется сбалансированным синтезом дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), который обеспечивает ключевой регуляторный компонент в цепи синтеза – тирозильный свободнорадикальный железосодержащий фермент рибонуклеотидредуктаза (RR), идентифицированный нами *ex-vivo* методом ЭПР в тканях и органах животных [1, 2]. В серии наших работ представлены результаты, свидетельствующие о регулирующей роли изменения активности рибонуклеотидредуктазы в уменьшении пулов четырех типов dNTP и их дисбаланса в условиях метаболической генерации повреждений ДНК в органах кроветворения [3–7]. Вектор ЭПР-исследований был направлен на выяснение потенциально важных, главных звеньев механизмов регуляции активности ферментной системы RR и ее участие в биохимической адаптации и функционировании системы SOS-репарации повреждений ДНК. Современный ЭПР-подход в изучении функциональной роли и анализа временной динамики свободнорадикальных метаболических парамагнитных клеточных систем позволил установить факты наличия адаптивного системного SOS-ответа на организменном уровне. Вопрос о многофакторной природе интегрального SOS-ответа системы *de novo* синтеза дезоксирибонуклеотидов и реакций ДНК, РНК и белков в условиях общего облучения организма млекопитающих в значительной степени остается открытым.

Напомним, что в экспериментах *in vitro* на изолированных тканевых и клеточных системах гипотеза SOS-репарации в наиболее полном виде была разработана и доказана ранее зарубежными авторами [8, 9]. Открытие энзиматической системы репарации ДНК во многом определило значение SOS-реакции клеточных систем в поддержании стабильности генома. В работах авторы обращали внимание, что в экстремальных условиях SOS-ответ связан с дисбалансом пулов dNTP, нарушением энзиматической системы синтеза и ре-

парации ДНК, нарушением макромолекулярной структуры ДНК, формированием гипермутаций, снижением качества SOS-репарации, появлением двойных разрывов и возможной гибелью клеток системы кроветворения [10, 11]. Установлено, что обеспечение синхронности реакций гидролиза и ресинтеза нуклеотидов лежит в основе эффективной репарации брешей в цепях ДНК, возникающих из-за влияния эндогенных спонтанных или экстремальных экопатогенных факторов внешней среды. Реализация первичного поражения и полноценная репарация метаболических брешей на фоне дисбаланса синтезов dNTP, ДНК и белков замедляются и нарушаются в результате преобладания скорости гидролиза нуклеотидов, вследствие чего быстро развивается деградация ДНК, и может возникнуть опасность для жизни клеток [12, 13]. Изложенные факты касаются клеточной организации и функционирования составной части организма в условиях опытов *in vitro*, но будущее исследование – за организменным уровнем.

Мы полагаем, что современный биофизический подход к изучению вопросов на уровне целостного организма открывает возможности разработку экспресс-методов тестирования ранних повреждений системы SOS-репарации ДНК, во многом определяющих конечные эффекты радиогенных повреждений организма. В этих условиях необходимо вычленение из общих, взаимосвязанных цитогенетических изменений, реального количественного звена радиационно-индуцированных метаболических показателей, обуславливающих конкретные этапы постлучевого периода у экспериментальных животных.

Комплексную оценку совокупности данных ЭПР-исследований радикального фермента RR, изменения биосинтезов белка и ДНК радиоизотопными методами, биохимических показателей активности ряда ферментов в условиях действия ионизирующих излучений сопоставляли с результатами параллельного цитогенетического анализа крови в тех же экспериментальных моделях. Это и позволило адекватно судить о радиационно-индуцированных первичных поражениях ДНК, формировании и развитии мутационных процессов в пролиферирующих клетках, тканях и органах системы кроветворения млекопитающих [14, 15].

Попытки контролировать в полноценных опытах на организме методом ЭПР режимы биосинтеза внутриклеточных предшественников синтеза ДНК обозначили новые задачи по выяснению роли первичных физико-химических механизмов в повреждающих и восстановительных реакциях синтеза ДНК, РНК и белков в условиях  $\gamma$ -облучения. Как упоминалось выше, изучая динамику метаболических реакций с участием сво-

бодных радикалов и парамагнитных металлокомплексов в крови и тканях животных, установили важный феномен: дозозависимый SOS-репарационный измененный ответ гомеостатических систем жизнеобеспечения облученного организма [3–5].

Количественная оценка динамики свободно-радикальной активности фермента RR в тканях кроветворной системы *ex-vivo* позволила выстроить определенную цепочку логических заключений о значении возникающего дисбаланса нуклеотидов dNTP, служащих субстратами ДНК-полимераз в механизмах индукции радиационного мутагенеза и возникающих перестроек и нарушений в системах SOS-репарации ДНК в экстремальных условиях организменного радиационно-окислительного стресса. Очевидно, в защитной SOS-реакции значительная роль принадлежит интегральной оценке последствий дисбаланса пулов нуклеотидов и комплекса молекулярных гомеостатических реакций в системе обеспечивающих синтез ДНК, РНК и белков [16, 17]. Результаты экспериментов позволили заключить, что в неблагоприятной для организма SOS-ситуации следствием дисбалансного мутагенеза является возможная индуцированная мутабельность генома, характеризующаяся увеличением частоты спонтанных мутаций, проявляющихся отдаленными эффектами в последующих поколениях клеток и снижении их жизнеспособности. Следует отметить, что последствия резкого и длительного по времени дисбаланса могут быть одним из начальных пусковых звеньев злокачественного перерождения клеток. Известно, что запрограммированное самоубийство клеток (апоптоз) в пролиферирующих тканях млекопитающих также связано с длительным и глубоким нарушением процессов репликации и репарации ДНК.

#### ЭПР-АНАЛИЗ РАННИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ РАДИОГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Методология исследований при изучении интегрального SOS-ответа ферментных систем целостного организма нацелена на рассмотрение системного организменного ответа, связанного с нарушением баланса внутриклеточных синтезов ДНК, РНК, белков, dNTP, повышающих вероятность возникновения генных и структурных мутаций в условиях общего  $\gamma$ -облучения. И на этой основе поставлена задача анализа информации о количественной фазно развивающейся взаимной обусловленности динамики энергетических и биосинтетических реакций в организме при развитии радиационного окислительного стресса [17, 18]. Важным результатом работы является выяснение “пороговых эффектов” и резервных возможностей гомеостатических реакций, отражающих

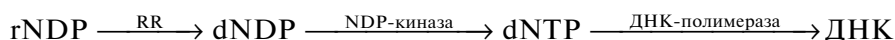
изменения состояний организма, в условиях линейно нарастающего по силе и длительности воздействия ионизирующих излучений (ИИ). Кроме того, принципиальное значение имеет предоставление доказательств о роли мутационного процесса и взаимосвязанных механизмов репарации ДНК в радиационно-индуцированных повреждениях генома, а также в возникновении метаболических последствий, приводящих к пролиферативным заболеваниям и опухолевому росту. Использовали комплекс взаимодополняющих методов и оценивали адаптивный системный SOS-ответ ферментных систем защиты на уровне целого организма по динамике радиационно-индуцированных молекулярно-генетических повреждений в тканях и органах при воздействии различных доз  $\gamma$ -радиации.

Интенсивность свободнорадикального сигнала радикального фермента RR, регистрируемого ЭПР-методом в системах с высокой пролиферативной активностью, и, в том числе, органах кроветворения, пропорциональна его каталитической активности и изучена нами в динамике при действии на организм ИИ разной мощности дозы и различных экзогенных генотоксикантов [1–5, 14–16]. Спектр ЭПР активной RR представляет собой дублет со значением сверхтонкого расщепления  $a = 20$  Гс и g-фактором 2.005 и регистрируется при значении микроволновой мощности, равной 200 мВт. Образцы измеряли при 77 К на радиоспектрометре “ER-220D” (Bruker, Германия) с использованием стандартной методики накопления и анализа спектров на мини-ЭВМ “Aspect-2000”. В монографии М.К. Пулатовой и соавт. подробно описана методология наших исследований [19]. Для контроля RR-активности использовали быстрозамороженные в жидком азоте образцы крови и ткани кроветворных органов. Биосинтетические реакции систем макромолекулярного синтеза оценивали с помощью радиоизотопных методов по временным и дозозависимым пострadiационным изменениям интенсивности биосинтезов ДНК, РНК и белков. Количественные ЭПР-измерения уровня каталитической активности рибонуклеотидредуктазы *ex-vivo* позволили анализировать и судить о пострadiационных изменениях синтеза dNTP в активно пролиферирующих тканях системы кроветворения (костный мозг, селезенка, тимус, печень). Кроме того, методом ЭПР контролировали показатели, характеризующие энергетические, детоксицирующие, антиокислительные, свойства крови, антирадикальную активность плазмы, изменения пулов  $Fe^{3+}$ -трансферрина ( $Fe^{3+}$ -ТФ) и  $Cu^{2+}$ -церулоплазмина ( $Cu^{2+}$ -ЦП) в крови и уровне адреналина и метгемоглобина. Наиболее высокочувствительными и информативными, позволяющими охарактеризовать влияние малых доз облучения и индивидуальную радиочувствитель-

ность организма, служили показатели изменения пулов плазменных белков  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП. Биохимическими методами определяли изменения содержания эстрадиола и тестостерона в плазме, клеточную активность супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы, антиокислительную активность крови, уровень внеклеточной низкомолекулярной фракции ДНК в плазме ( $_{вн}ДНК$ ), ингибиторную активность  $\alpha_2$ -макроглобулина в крови мышей и собак.

Особый интерес представляют вопросы ЭПР-анализа механизмов участия фермента RR в SOS-ответе и в репарационных реакциях повреждений

ДНК; динамика его каталитической активности при действии на организм ионизирующих излучений разной мощности дозы и различных экзогенных генотоксикантов. Фермент RR контролирует скорость-лимитирующую стадию в синтезе ДНК: синтез 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфатов (dNDP), катализируя замещение ОН-группы в положении 2'-рибозного остатка на атом водорода и образуя 2'-дезоксипроизводные. Метаболический путь включения рибонуклеозид-5'-дифосфатов (rNDP) в молекулу ДНК представлен:



Синтез dNTP строго контролируется именно ферментом RR, поскольку NDP-киназа не лимитирует скорость этой реакции. На этапе, катализируемом RR, обеспечивается сбалансированное поступление четырех типов dNTP (аденин, гуанин, тимин, цитозин) для репликации и репарации ДНК, от величины пулов которых и их соотношения зависят как точность копирования, так и скорость синтеза ДНК. Установлено, что в условиях дисбаланса синтеза предшественников (dNTP) нарушается структурная стабильность макромолекул ДНК, образуются метаболические бреши в цепях ДНК и возрастает “нагрузка” на ферментные системы репарации [12, 13, 20].

Мы отмечали, что на активно пролиферирующих клеточных культурах детальная оценка роли фермента RR, как регулятора “качества синтеза” ДНК, продемонстрирована во многих экспериментах *in vitro* и свидетельствует об универсальном характере SOS-реакций организма на лучевое поражение. Именно в систематических ЭПР-исследованиях получена возможность судить о результативности подхода, позволяющего на организменном уровне контролировать вполне определенные и жизненно важные молекулярно-клеточные процессы. В ходе проведенных нами работ установлено, что SOS-ответ включает раннюю активацию систем синтеза dNTP, длительность которой не более 1 ч после воздействия агента на организм. В течение первого часа после  $\gamma$ -облучения животного максимальная активация синтеза dNTP в тканях сопровождалась мощным повышением интенсивности синтезов РНК, ДНК и белков в радиочувствительных активно пролиферирующих клетках кроветворных органов. Увеличение числа транскрипционных факторов во время SOS-ответа приводит к активации трансляции и накоплению пула фермента RR, что обеспечивает повышенный синтез dNTP. Резкая активация биосинтеза РНК и одновременный рост активности RR однозначно свидетельствуют

о стимулирующем эффекте и об интегральном повышении мощности систем синтезов ДНК, РНК и всего белоксинтезирующего аппарата [3, 4]. Экспериментально обнаружено существование зависимости системной ответной реакции на дозы облучения. Из установленных в опыте взаимосвязей функций “селективного эффекта” с генетическими элементами мы пришли к выводу, что основным стимулом для SOS-активации синтеза dNTP в условиях радиационного воздействия является необходимость экстренной репарации увеличенного объема радиационно-индуцированных повреждений ДНК [5].

В ответе клеточных систем на облучение за SOS-активацией синтезов РНК и возрастанием пулов dNTP следовала закономерная стадия ингибирования RR-активности и синтезов РНК, ДНК и белков. Показательно, что в период от 3–24 ч синтеза dNTP и ДНК в селезенке облученных мышей были подавлены на 40 и 80–85% от контроля соответственно. Использование ЭПР в одном эксперименте с радиоизотопными и биохимическими методами позволило заключить, что последствия ингибирования и возникновения ошибок транскрипции и трансляции, дефектный репликативный синтез и неполноценная репарация ДНК при воздействии  $\gamma$ -радиации на организм проходят с участием нарушенного соотношения (дисбаланс) пулов четырех типов dNTP. Эффективная регуляция синтеза ДНК со стороны RR может быть нарушена под влиянием различных факторов, и особенно активных форм кислорода, что нашло подтверждение в ряде работ [11–13].

Комплекс факторов радиационного окислительного стресса может определять функциональную роль возникающих метаболических изменений, приводящих к увеличению суммарного выхода спонтанных мутаций и к появлению дефектов в молекуле ДНК. Под действием даже слабо выраженной степени ингибирования фермен-

та RR имеет место значительное подавление синтеза ДНК, что обусловлено установленной в опытах сигмоидальной зависимостью между этими показателями. Поэтому даже незначительное изменение концентрации dNTP или их дисбаланс вызывают возникновение существенного подавления синтеза и репарации ДНК [14, 15]. Опыты свидетельствуют, что разрывы, обнаруживаемые вслед за облучением в ДНК клеток млекопитающих, уже через 1 ч полностью исчезают (репарируются). И, тем не менее, через 3 ч регистрируется новая волна разрывов в делящихся клетках при резком угнетении репликативного синтеза. В рамках адаптивного SOS-каскада взаимозависимых реакций уменьшение RR-активности реально может быть связано с зарегистрированным подавлением синтеза белков на 85% в органах облученных животных [16]. Показано, что регуляция активности RR осуществляется посредством синтеза *de novo* или деградации его субъединицы B2 – коротко живущего белка M2B, время жизни которого всего 3 ч. Дисфункция и деградация системы RR в условиях подавленного синтеза белков означают, что и пул B2, а также пул фермента RR не восстанавливаются. И это приводит к ингибированию синтеза ДНК [17, 18, 20].

Вторая волна активации синтеза dNTP, ДНК и белков связана с развитием компенсаторно-восстановительных организменных реакций, направленных на репарацию клеточных структур. Интенсивность этих реакций растет линейно с дозой облучения, (вплоть до летальной), при которой ее значение настолько велико, что возникает риск срыва метаболической защитной SOS-реакции организма и, в том числе, – ингибирование скоростей синтеза ДНК, РНК и белков из-за истощения биосинтетического и биоэнергетического потенциалов клеток [3, 4].

Биофизический подход позволил анализировать режимы возникновения индукции мутагеназа по характеру динамических изменений активности RR и изменению пулов плазменных белков Fe<sup>3+</sup>-трансферрина (Fe<sup>3+</sup>-ТФ) и Cu<sup>2+</sup>-церулоплазмина (Cu<sup>2+</sup>-ЦП), используемых в качестве метаболических маркеров SOS-ответа [5].

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТАЦИОННЫХ SOS-РЕАКЦИЙ И СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА

В свете приведенной выше оценки системного нарушения цитогеномного гомеостаза и, в частности, этапов индукции репарации ДНК, попытались обосновать свой методический подход к анализу способов оценки радиозащитного действия ряда соединений. В опытах радиозащиты

организма использовали концептуальную основу цитогенетических реакций системы SOS-ответа для прогностической оценки способности перспективных радиопротекторов предотвращать переход компенсаторно-восстановительных реакций в период развития постлучевого синдрома в гиперформу [17, 18].

Наличие индикаторов лучевого поражения обеспечивает возможность раннего выявления радиогенных молекулярно-клеточных повреждений, расширения представлений о природе молекулярно-клеточных мишеней и механизмов радиогенных эффектов. Анализ результатов наших опытов о временных изменениях клеточных SOS-реакций, индуцированных облучением (в дозах от 0.25 до 16 Гр), свидетельствует, что возрастание частоты генных мутаций и мутаций хромосом, несомненно, в определенной степени, связано с механизмами возникающего дисбаланса нуклеотидов. Подтверждением важной функциональной роли RR в фенотипических мутациях является существование корреляционной связи между активностью этого фермента репарации и фазными изменениями в крови ряда показателей SOS-реакции организма и, в частности, пулов активных плазменных белков Fe<sup>3+</sup>-трансферрина (Fe<sup>3+</sup>-ТФ) и Cu<sup>2+</sup>-церулоплазмина (Cu<sup>2+</sup>-ЦП).

В костном мозге, селезенке, тимусе синтез dNTP и ДНК зависит от колебания содержания железа в клетках, так как субъединица M2 рибонуклеотидредуктазы (Fe<sup>3+</sup>-RR) содержит два иона железа. Обеспечение клеток ионами Fe<sup>3+</sup> осуществляет железотранспортный белок плазмы крови Fe<sup>3+</sup>-трансферрин. Механизм переноса ионов включает стадию образования комплекса Fe<sup>3+</sup>-ТФ с его рецептором. Блокада рецепторов, в ответ на облучение, приводит к уменьшению пулов Fe<sup>3+</sup>-ТФ в крови, в зависимости от дозы облучения, и к подавлению синтеза dNTP и ДНК, а также и железозависимых и железосодержащих белков, в том числе митохондриальных [20, 21]. Отметим, что другой важнейший многофункциональный белок плазмы Cu<sup>2+</sup>-церулоплазмин (Cu<sup>2+</sup>-ЦП) окисляет ионы Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup> и, благодаря этой ферроксидазной активности, способствует включению ионов железа в апотрансферрин. Кроме того, этот транспортный белок обеспечивает клетки ионами Cu<sup>+</sup>. К тому же, Cu<sup>2+</sup>-ЦП, обладая аминоксидазной активностью, регулирует концентрацию биогенных аминов, а также является основным антиоксидантом крови, благодаря его супероксиддисмутазной и пероксидазной активностям [22].

Изменения пулов плазменных белков в крови были использованы для контроля динамики синтезов ДНК, dNTP и белков в качестве маркеров, отражающих развитие фенотипических молекулярно-клеточных компенсаторно-восстанови-

тельных реакций. Совокупность биомаркеров позволила судить о временных и дозовых изменениях индивидуальных реакций при действии радиационных факторов на организм. Было обнаружено, что фазные изменения пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ в крови облученных собак однотипны и по времени их регистрации совпадают при всех использованных дозах облучения (0.25–16.0 Гр). Существует мнение, что эти закономерные динамические аспекты клеточных систем находятся под жестким контролем эволюционного отбора, направленного против дестабилизации генома: способствуют “сохранению целостности клеточной организации, предотвращению сбоя и обеспечению контроля за возможными повреждениями” [23].

В ходе наших опытов были зарегистрированы максимальные значения пула  $Fe^{3+}$ -ТФ на 2-е и 6-е сутки от момента начала  $\gamma$ -облучения. Последующие повышения пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ закономерно регистрировали с 10-х по 15-е, с 20-х по 27-е и с 45-х по 60-е сутки. И они были менее интенсивными и растянутыми во времени. Важно, что в тех же самых опытах регистрировали идентичную динамику и фазовую зависимость изменений пулов  $Cu^{2+}$ -ЦП и содержания метНб, супероксиддисмутазную активность, антипротеолитическую активность  $\alpha_2$ -макроглобулина.

В опытах на собаках, для отражения показателей индивидуальной сложной биологической системы, методом ЭПР оценивали интенсивность организменных интегральных реакций на разные дозы облучения по величине прироста пула  $Fe^{3+}$ -ТФ на 2-е (или на 6-е) сутки от его минимального значения, которое регистрировали через 9 ч после облучения, т.е.  $\Delta I = I_{\max} - I_{\min}$ . Было обнаружено, что величина  $\Delta I$  линейно росла с увеличением дозы, вплоть до летальной. Характерно, что при дозах, превышающих летальную, увеличения  $\Delta I$  не наблюдали. В экстремальных условиях действия больших доз облучения, когда “гиперответ” переводит организм в состояние предельного “биохимического напряжения”, возникает “летальный удар” — срыв реакций адаптации и цитогенетических внутриклеточных процессов. Это неизбежно сопровождается истощением энергетических, синтетических, нейрогуморальных и иммунных резервов, вызывающих репродуктивную гибель клеток, приводящую к необратимым пострадиационным изменениям в организме.

Отметим, что для оценки методом ЭПР неспецифической компоненты резистентности, определяющей исходное состояние, использовали отношение  $(Fe^{3+}\text{-ТФ/МетНб})_{\text{исх}}$ , которое учитывает синтез dNTP и других железосодержащих белков и убыль функционального гемоглобина в периферической крови. Для практически здоровых собак контрольной группы величины этого показателя были в пределах 0.9–1.6. Для собак в

“активированном” состоянии (например, из-за стресса или приема лекарств) значение  $(Fe^{3+}\text{-ТФ/МетНб})_{\text{исх}}$  было больше, а в “угнетенном” состоянии — меньше указанных значений. Комплексная оценка этой группы собак в экстремальных опытах характеризовалась наибольшими отклонениями от контроля. Именно у этих животных были зарегистрированы повышенная радиочувствительность и интенсивность организменной адаптивной реакции, неадекватная дозе облучения. Кроме того, во всех случаях индивидуальных отклонений от контроля повышение пула  $Fe^{3+}$ -ТФ не отвечало линейной зависимости доза/эффект и не предотвращало возникновение сбоев устойчивости к повреждающему действию  $\gamma$ -облучения [24].

Реакции организма остаются неизменными по своей характерной фазовой картине и при облучении в малых дозах (0.25 и 0.5 Гр). Регистрировалось повышение пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП, адреналина и гемоглобина, активности СОД и глутатионпероксидазы, активности  $\alpha_2$ -макроглобулина в крови собак, но только в течение первых 10 суток. Затем пул  $Fe^{3+}$ -ТФ уменьшался и к 90-м суткам составлял 50% от исходного значения. Эти наблюдения подтверждают развитие адаптивных реакций в условиях  $\gamma$ -облучения малыми дозами и позволяют сделать вывод о динамическом регуляторном организменном SOS-ответе, отражающем единый характер процессов клеточного обновления кроветворной ткани [25].

Анализ динамики величин ЭПР-показателей свидетельствует о колебательном характере биохимической адаптации к пролонгированному радиационному фону и позволяет судить о закономерных реакциях, отражающих феномены цитогенетической индивидуальной радиорезистентности организма. Несомненно, что ЭПР-биомаркеры определяют фенотипические реакции, реально связанные с дозой облучения, вплоть до низких доз. Установлено, что накопление даже малой дозы облучения млекопитающими приводит к уменьшению пула  $Fe^{3+}$ -ТФ, и это негативно отражается на процессах гемопоэза и эритропоэза, а также не может не сказаться на пролиферативной активности клеток.

Таким образом, на основе пострадиационных индивидуальных изменений пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ в крови подопытных собак в стандартном неспецифическом ответе на  $\gamma$ -облучение можно выделить следующие стадии: 1) SOS-повышение пулов и активности фермента RR, результатом которого является активация синтеза dNTP и ДНК;

2) последующее, в течение первых суток, уменьшение пулов и ингибирование RR-активности, приводящее к подавлению железозависимых, в том числе митохондриальных энергетиче-

ских процессов, и синтеза dNTP, ДНК, РНК и белков;

3) восстановление RR-активности и ключевых процессов развития компенсаторно-восстановительных реакций организма связано с интегральным повышением мощности систем железозависимых синтезов dNTP, ДНК и всего белоксинтезирующего аппарата.

В течение первых суток после облучения, за счет выраженного ингибирующего эффекта RR и снижения синтеза предшественников ДНК (dNTP), усиливается первичное радиационно-индуцированное поражение – критическое для развития и дальнейших возможных повреждений ДНК. Вторая волна – активация синтезов – обеспечивает развитие компенсаторно-восстановительных реакций клеточных систем органов и тканей, направленных на репарацию клеточных структур и соответствующих адекватных, обеспечивающих защиту организма метаболических реакций. Важно отметить, что установлена зависимость этих репарационных SOS-ответов от исходного состояния организма и его индивидуальной радиочувствительности.

Анализ количественных показателей и их причинная обусловленность в условиях РОС позволяют заключить об инициации резервных возможностей организменного SOS-ответа важнейших систем жизнеобеспечения. Установлены функциональная роль и возможность использовать в качестве биомаркеров плазменные белки крови  $Fe^{3+}$ -трансферрина ( $Fe^{3+}$ -ТФ) и  $Cu^{2+}$ -церулоплазмина ( $Cu^{2+}$ -ЦП), участвующие в метаболическом контроле синтезов dNTP и изменении режима функционирования систем синтеза ДНК, РНК и белков в условиях действия экопатогенных факторов. Эффективное использование ЭПР-методологии позволяет характеризовать ранние молекулярно-клеточные SOS-реакции и комплексную оценку совокупности параметров, обеспечивающих каскад системных защитных реакций организма в условиях облучения. Обнаруженные в радиобиологических экспериментах закономерности подтверждают, что в тканях и органах главной мишенью радиационного поражения служит система биосинтеза макромолекул ДНК, РНК и белков. Дисбалансная концепция мутагенеза расширила наше понимание круга явлений SOS-адаптации, позволила по-новому объяснить стохастический характер возникновения фенотипических мутаций и прийти к заключению, что “мутагенная репарация управляется сложными эволюционно наработанными механизмами регуляции и не оставляет сомнений относительно физико-химической природы этого процесса [23].

### СТРЕСС-АДАПТИВНОСТЬ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ SOS-РЕПАРАЦИИ ФЕНОТИПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ОРГАНИЗМ

Сложные функциональные взаимоотношения между центральными регулирующими системами (нервная, иммунная, эндокринная, репродуктивная) и субклеточными энзиматическими системами (антиоксидантная и ДНК-репарирующая) в экстремальных условиях могут нарушаться, увеличивать радиационно-индуцированную нестабильность генома, повышать эндогенный мутагенный фон и перестраивать функциональное метаболическое состояние клеток, заметно изменяя их восприимчивость к стресс-фактору. Становится очевидным, что репарация ДНК имеет исключительное значение для поддержания надежности и устойчивости биологических систем при экстремальных воздействиях на организм.

Результаты исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют, что стресс адаптивный SOS-ответ при воздействии различной мощности и дозы ИИ в значительной степени зависит от генетических систем и подсистем клетки и организма. При выяснении физико-химических механизмов радиогенных повреждений существенным моментом для этой оценки служили вышеприведенные факты и феноменология дисбалансного мутагенеза и их роль в возникновении мутабельности и нарушения условий синтеза и репарации ДНК [17, 25].

Регистрация ЭПР-показателей и комплекса физико-биохимических характеристик указала на возможность оценить количественно жизненно важные цитогенетические эффекты радиационного поражения организма животных и человека. Эмпирическое обобщение фактического материала позволило выявить важную роль активности SOS-каскада механизмов репарации ДНК у млекопитающих в условиях общего облучения. И на этом основании предполагается комплексно отслеживать регулярное поведение и оценку отдаленных последствий мутагенных эффектов, обуславливающих нарушение эффективности SOS-репарации при перестройке режимов центральных функциональных систем организма [18, 25].

Описываемый подход становится расширенной методологической задачей: установить важную конкретику изменения широкого спектра молекулярно-клеточных диагностических параметров с участием центральных организменных систем регуляции метаболизма. Очевидно, предстоит изучать причинно-следственную взаимосвязь и взаимозависимость спектра реакций систем субклеточного метаболизма (энергетической, белоксинтезирующей, генетической, детоксици-

рующей) в условиях моделирования различных режимов угнетающего или стимулирующего действия процессов облучения.

Физико-химические закономерности, в экстремальных условиях существования, насколько мы проверили в экспериментах с помощью ЭПР-показателей, имеют универсальное значение при изучении сложных биологических систем и во многом определяют перспективы теоретических обобщений и практических предложений. При более глубоком анализе SOS-реакций крупных организмов (и особенно человека) необходимо рассматривать их в сопоставлении со специальными цитогенетическими фактами, отражающими дополнительный аспект описания и интерпретации системных радиогенных изменений в организме.

Стохастический характер изучаемых процессов и индивидуальные различия в чувствительности организма к действию ИИ имеют решающее значение как в биологической статистичности, так и в проявлении неопределенностей изучаемых эффектов. Простое измерение генетического “брутто”-эффекта, пусть даже и дополненное биофизическим анализом молекулярно-клеточных реакций, не обеспечит установление надежного “порога” действия ИИ и вывода о роли критических фенотипических мутаций в возникновении конкретной экопатологии. Решающее значение имеет возможность судить по динамическому характеру комплексного организменного SOS-ответа о вероятности перехода изучаемых биологических систем в экстремальных условиях из одного состояния в другое [25].

Формирование идеологии и выработку концепции мы начинали с изучения последствий высоких доз  $\gamma$ -облучения, снижая их в опытах на животных до реально малых доз. При изучении закономерностей реакций генетических систем и подсистем клетки важно было зарегистрировать комплекс показателей раннего интегрального SOS-ответа. Было показано, что темп и характер возникающего SOS-каскада неспецифической адаптивной активности определяют стартовые точки и количественные реакции систем, чувствительных к отдаленным негативным последствиям, реально связанным с нарушениями эффективности репарационных процессов в системе ДНК кроветворных органов [26]. С этим связано выявление фактов о накоплении мутаций в митохондриальном геноме, где скорость мутаций существенно выше, чем в ядерном. Речь идет о возникновении специальных режимов индукции дополнительных репарирующих систем к широкому спектру возмущений от экопатогенных агентов различной природы и вероятному возникновению злокачественных радиогенных опухолей и лейкозов в облученном организме

[27]. Количественная интерпретация и возможность функциональной оценки стохастических звеньев и их системного характера с помощью комплекса цитогенетических критериев SOS-реакций чрезвычайно важны именно в связи с прогностическим анализом возникновения отдаленных последствий в условиях индивидуального организма. Безусловным моментом в реальной оценке индивидуальной радиоустойчивости служит выявление конкретных информационных различий в SOS-ответах с учетом дополнительных факторов внешней среды. Использование эпигенетических механизмов реально определяет итоговые фенотипические реакции млекопитающих на облучение. В этих условиях необходимы оценка (по совокупности параметров) устойчивости организма к общему  $\gamma$ -облучению и вычленение из общих взаимосвязанных изменений главных звеньев ведущих механизмов, обуславливающих определенные негативные радиобиологические эффекты.

Мониторинг состояния здоровья детей, подвергшихся радиационному воздействию в малых дозах, имеет новое и самостоятельное значение также как и установление индивидуальной повышенной радиационной чувствительности в детской популяции с помощью тестов молекулярного и клеточного уровня [28–30]. Первичная реакция детского организма к изменившемуся фону на начальном этапе заключается в повышении уровня  $Fe^{3+}$ -трансферрина и  $Cu^{2+}$ -церулоплазмينا в крови и плазме, что функционально связано с активацией окислительных и энергетических реакций, обеспечивающих адекватный контроль за скоростью-лимитирующей стадией в синтезе ДНК. При проведении длительного динамического обследования было зарегистрировано сохранение закономерного повышенного уровня содержания  $Fe^{3+}$ -трансферрина и  $Cu^{2+}$ -церулоплазмينا в крови и плазме у детей, что обеспечивает активацию синтеза dNTP и ДНК, т.е. защиту и восстановление кроветворной и репродуктивной систем организма в ответ на длительное радиационное воздействие. У детей, проживающих в регионах с более высоким уровнем загрязнения радионуклидами, установлено устойчивое снижение интенсивности сигналов  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП в крови и плазме при сохранении динамики фазовозависимых изменений клеточного метаболизма у облученных. Это свидетельствует о снижении включения ионов железа в апотрансферрин, ухудшении антиоксидантных свойств крови, подавлении синтеза dNTP из-за ингибирования свободнорадикальной активности RR. Последнее привело к подавлению синтеза dNTP, следовательно, — ингибированию скорость-лимитирующей стадии в синтезе ДНК, а также к ингибированию синтеза железосодержащих белков и ферментов. Нарушение работы ЦЭТ приводит к



усилению продукции активных форм кислорода и развитию хронического и острого энергетического кризиса, возникающего на уровне целого организма [27, 31].

На фоне изменчивости уровня мутагенеза установлены сведения об увеличении выхода мутаций митохондриальной ДНК по сравнению со спонтанным уровнем этих нарушений. Существуют многочисленные свидетельства того, что окислительный стресс и мутации мтДНК снижают митохондриальный синтез АТР [27, 33]. Таким образом, возникает хорошо известная ситуация “порочного круга”, когда снижение синтеза АТР под влиянием указанных факторов приводит к снижению активности RR, нарушению баланса dNTP, что чревато снижением эффективности репарации и повышением мутаций в мтДНК, которые, в свою очередь, вызывают дальнейшее снижение синтеза АТР и т.д. Это позволяет считать уровень активности RR, зависящей от концентрации АТР, важным непосредственным фактором высокой частоты мутаций мтДНК [34, 35]. Интерпретация результатов позволила заключить, что комплекс ЭПР-биомаркеров радиочувствительности отражает совокупные возможности оценить пороговые и дозовые эффекты, выявить детерминанты адаптивных молекулярных реакций облученного организма детей в критические периоды их роста. Повышенная индуцированная нестабильность генома, мутации в соматических клетках, снижение эффективности репарации увеличивают риск развития молекулярно-геномных повреждений и увеличивают состояние дезадаптации детского организма [35, 36].

Цитогенетические исследования показали увеличение частоты аберраций хромосом, активацию соматического мутагенеза, накопление клеток с дисгеномными эффектами в детском организме [30]. По структуре хромосомных аберраций выявлено увеличение количества делеций, инверсий, колец, изохроматидных и одиночных фрагментов и пробелов, полиплоидии. У детей, проживающих в регионах радионуклидного загрязнения, уровень внеклеточной ДНК (вкДНК) статистически значимо превышает таковой показатель в группе сравнения. Установлено, что в группе детей, облученных внутриутробно и рожденных в 1986–1987 гг. (1-е поколение), имеет место значительное повышение вкДНК ( $7.87 \pm 0.58$  мкг/мл) а в группе сравнения –  $4.53 \pm 0.23$ . Повышенный уровень вкДНК и увеличение выхода в циркуляцию клеток – предикторов апоптоза (клетки с иммунофенотипом CD95+) характеризуют активность клеточного апоптоза и могут свидетельствовать о наличии склонности к новообразованиям [29, 30]. Отметим, что у детей из регионов радионуклидного загрязнения дисгеномные эффекты сопровождаются закономерным параллелизмом яв-

ний нарушения нуклеотидного обмена: изменения соотношений уровня нуклеотидов и их метаболитов в крови регистрируются чаще, чем в группе сравнения [32].

Все это указывает на регуляторное непостоянство генома, активную элиминацию “поломок” ДНК, высокую скорость процессов катаболизма, т.е. развитие фенотоза. Это связано с комплексной модификацией генной экспрессии, обуславливающей как потенциально обратимые изменения, так и возможное развитие экопатологии. Однако “вклад генома” можно по-настоящему оценить только в контексте взаимодействия организма со средой обитания (эпигеномика в действии).

Существует необходимость в продолжении исследований. И на этом пути могут быть получены результаты для выявления групп повышенного риска на основе изучения молекулярно-клеточных механизмов и использования новых дополнительных научных критериев оценки последствий, приводящих “по факту” к пролиферативным заболеваниям и опухолевому росту. Дальнейшее посемейное изучение индивидуальных генотипических особенностей детских организмов, использование методов аналитического и математического анализа, выявление адекватных индивидуальных оценок наследуемости мультифакториальных заболеваний потребует серьезного компьютерного мониторинга. Это позволит определить неизвестные факты индуцибельной SOS-репарации и “несовершенств” репарации, приводящих к реализации адекватных мутагенных эффектов радиационного воздействия в растущем организме ребенка.

Принципиально важно установление предельно допустимых доз и мощностей облучения для выяснения концепции “пороговости” действия и сведений о влиянии хронического воздействия малых доз ионизирующих излучений. Это может способствовать выявлению групп людей с повышенным риском возникновения различных экопатологий. Научный интерес представляет анализ динамики комплекса показателей: совокупности общепринятых параметров радиочувствительности и количественные сведения об увеличении выхода конкретных видов спонтанных мутаций мтДНК и яДНК, о фактах экспрессии определенных генов в ядрах и митохондриях, об экзо/эндогенных факторах, обуславливающих нарушение регуляции эффективности SOS-репарации. Это может отражать интегральную устойчивость, зависящую от режимов “поведения” функциональных систем регуляции целостного организма.

Развитие методов анализа и прикладная направленность исследований стали убедительным “руководством к действию”: необходимость изучения механизмов эффективной радиозащи-

ты и модификации лучевого повреждения уникальных структур клетки на основе комплекса цитогенетических количественных показателей репарации повреждения ДНК. Целью является выяснение роли индуцированного мутагенеза и закономерностей возникающих фенотипических изменений при действии экофакторов различной природы на потенциал живых систем. Определяющее значение в экстремальных условиях существования приобретает анализ фактов и физико-химических механизмов радиационной опасности с учетом дополнительных экопатогенных воздействий. Все это связано с перспективами развития современной оценки непосредственных и отдаленных последствий радиоактивных загрязнений для людей и биоценозов.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА dNTP И ДНК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ ОБЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

Анализ собственных результатов и научных идей, касающихся принципиально важной взаимосвязи фенотипических мутационных повреждений с формированием резистентности организма к ДНК-повреждающим агентам во многом определил методологические подходы к задачам противорадиационной защиты. Напомним, что существует биохимический путь регуляции свободнорадикальной активности RR, который в большей степени нарушается при воздействии радиации и в пострadiационном периоде. Для фермента RR биохимическими регуляторами активности являются редокс-состояние SH-групп в активном центре, пулы АТФ и dNTP, концентрация внутриклеточного кислорода и ионов железа, содержание восстановителей. Инициированные радиацией процессы пироксидного окисления негативно влияют именно на эти факторы, а участие повышенной активности RR помогает снижать летальный удар  $\gamma$ -облучения на синтез и репарацию ДНК. Отметим, что dNTP являются субстратами для ДНК-полимеразы, и ее активность регулируется по субстрат-зависимому механизму, что, безусловно, влияет на скорость синтеза ДНК.

В ряде наших работ были получены сведения, что существует дозозависимая корреляция между степенью ингибирования активности RR и накоплением разрывов в ДНК в УФ-облученной культуре фибробластов человека и других культурах клеток. Повышение активности RR или сохранение ее на уровне нормы обеспечивает пулы dNTP, достаточные для эффективной эксцизионной репарации ДНК. Так называемые “нерепарируемые” повреждения ДНК, составляющие 1–3% от общего количества, одно- и двунитевых разрывов ДНК, регистрировались спустя 6 ч после об-

лучения, когда активность RR была максимально снижена, но стоило добавить dNTP на фоне подавленной активности RR – происходила полная репарация разрывов ДНК уже в течение 1.5 ч [7, 15]. Как показано в этих работах, пострadiационное появление структурных дефектов ДНК, в определенной степени, обусловлено дефицитом и дисбалансом пулов dNTP, которые мобильно осуществляют и определяют неполноценную репликацию и дефектную репарацию.

Новый подход к созданию противолучевых средств различного назначения мы связываем с использованием концепции системного SOS-ответа молекулярно-генетических систем в условиях радиационного окислительного стресса. Роль дисбаланса дезоксирибонуклеотидов в генерации фенотипических мутационных повреждений ДНК и возникновении неспецифической адаптивной реакции клеточных систем на внешние воздействия достаточно очевидно. С этой точки зрения рассматриваем активацию определенных ферментных систем и экспрессию определенных генов, связанных с разного типа репарацией разрывов ДНК и/или накоплением летальных повреждений типа хромосомных aberrаций. Важно оценить регуляторный характер молекулярно-клеточной SOS-реакции в поддержании целостности генетических систем и подсистем клетки и попытаться установить критерии повышения резистентности организма в экстремальных условиях.

Примером использования результатов исследования стохастического характера возникновения фенотипических мутаций и взаимосвязанных хромосомных повреждений в условиях радиационно-окислительного стресса является попытка обосновать методологические аспекты ЭПР-анализа радиационных эффектов на основе механизмов, их определяющих. Исходя из расшифровки критических этапов и поиска критериев лучевого поражения на основе динамического SOS-ответа и с учетом закономерностей механизмов интерфазной гибели клеток, правильность нашей концепции была проверена на моделях радиозащиты с использованием радиопротекторов различного класса. В качестве маркеров радиочувствительности для оценки степени эффективности радиопротекторов использовали свободнорадикальную активность RR (в опытах на мышах) и изменения пулов  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП в крови и содержания  $vH$ ДНК в плазме крови (в опытах на собаках). Изменения пулов позволяют надежно и количественно контролировать линейную зависимость дозовых реакций организменного ответа, степень радиационного поражения и результативность защитного действия перспективных радиопротекторов [15, 16].

Эффективные, по тесту выживаемости животных, радиопротекторы вызвали максимальное повышение RR-активности в сроки, когда у незащищенных облученных животных она была подавлена на 40–50% от контроля. Отметим, что у защищенных животных радиопротектор-обусловленное повышение RR-активности создавало условия для поддержания высоких сбалансированных пулов dNTP во время облучения. Это обеспечивает репликативный синтез ДНК и его эффективную репарацию в костном мозге и в селезенке от повреждений. При этом предотвращается образование новых радиационно-индуцированных повреждений ДНК и обеспечивается более раннее интенсивное развитие компенсаторно-восстановительных реакций. Исследования подтвердили, что радиопротекторы индралин и индометофен защищают синтез АТФ и гликогена в органах животных, повышают активность RR и обеспечивают индукцию синтеза dNTP в радиочувствительных органах [24].

Существование взаимосвязанных фактов и механизмов адекватного взаимодействия между активностью этого ключевого фермента ДНК-репарации и соответствующими изменениями пулов активных плазменных белков  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП в крови собак свидетельствуют о важной роли ферментной системы RR в эксцизионной репарации ДНК. Очевидно, что механизмы, обеспечивающие клеточную стабильность, закономерно осуществляют адекватную активацию синтеза дезоксирибонуклеотидов — субстратов ферментов синтеза ДНК [8–11]. Радиопротекторы, активируя синтез ДНК, РНК и белков, обеспечивают их защиту и полноценное восстановление в раннем пострadiационном периоде. Именно эти эффекты имеют решающее значение для поддержания жизнедеятельности клетки и определяют высокую выживаемость животных, облученных в смертельных дозах [14, 15]. По сути, дисбалансная концепция мутагенеза позволила подтвердить метаболическую природу мутагенного действия ионизирующих излучений и стохастический характер возникновения фенотипических мутаций и большого количества разнообразных хромосомных повреждений в условиях окислительного радиационного стресса. Экспериментально доказано, что активация синтеза dNTP к моменту облучения и в критические сроки лучевого поражения может быть реально использована в опытах радиозащиты организма с помощью радиопротекторов.

Именно на основе использования ЭПР-технологий удалось разработать рациональные унифицированные принципы отбора перспективных радиозащитных средств широкого назначения, обосновать дозы препаратов, установить режимы их введения для получения оптимальной защиты

по тесту выживаемости животных и развитию восстановительных процессов в крови и органах [14–18]. Предложена схема радиозащиты при остром облучении, в которой на этапе I используется модификатор радиорезистентности индометофен, повышающий на протяжении нескольких часов общую неспецифическую резистентность в группе животных. На этапе II используется радиопротектор экстренного действия — адренометик индралин. Установленный противолучевой эффект достигался введением половинной радиозащитной дозы препарата индралин, что, несомненно, уменьшало токсические эффекты и накопление продуктов деградации ДНК в условиях острого облучения [24, 25].

В опытах на собаках доказано, что индукторами синтеза dNTP могут быть вещества, являющиеся  $\beta$ -блокаторами адреналиновых рецепторов, а также вещества, обладающие эстрогеноподобным действием. Вещества, известные как антиоксиданты, также вызывают индукцию синтезов дезоксирибонуклеотидов, способствуют эффективной репарации ДНК и содействуют развитию метаболического радиоадаптивного ответа организма при нарушениях дыхательной цепи митохондрий. Использование ЭПР-биомаркеров позволило впервые обнаружить активацию синтезов дезоксирибонуклеотидов, ДНК, РНК и белков в органах при введении животным лекарственных веществ с антирадикальными свойствами (ионол и  $\alpha$ -токоферол). Установлено, что эта активация является обязательной стадией в механизме протекторного действия этих веществ [26]. Приоритетными являются и данные, позволяющие выявлять и анализировать по динамике пулов плазменных белков  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП периферической крови изменение резистентности организма крупных животных и человека, что необходимо при проведении клинических испытаний препаратов. Эти тесты использовались нами для выявления метаболических изменений у лиц, работающих на радиационно опасных объектах, и у населения, в том числе у детей от облученных родителей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях [28–30, 32]. Впервые нами были разработаны и апробированы критерии отбора и формирования групп лиц с повышенной исходной индивидуальной резистентностью для проведения работ в условиях радиационного и химического риска. Несомненно, методы анализа индивидуальной чувствительности к воздействию  $\gamma$ -радиации еще требуют продолжения поиска, многое из феноменологического описания следует рассматривать как начало нового объекта дальнейших актуальных исследований [31].

В ходе биофизических исследований постепенно решается задача поисков ЭПР-маркеров периферической крови, позволяющих судить об изменении индивидуальной радиорезистентно-

сти организма. Это открывает практические перспективы целенаправленного выбора физиологически активных соединений, повышающих устойчивость организма к действию ДНК-тропных агентов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате аналитического обобщения фактического материала и выводов об индуцированном облучением мутагенезе как причине начала метаболично-физиологических реакций сложились представления о вероятностном характере возникновения спектра повреждений важнейших систем жизнеобеспечения. В условиях повышенного уровня непостоянства генома, возрастания частоты мутаций в соматических клетках можно прогнозировать возникновение отдаленных эффектов ионизирующих излучений и в последующих поколениях облученных клеток. В междисциплинарном исследовании ЭПР-технологии позволили обосновать, в рамках нашей задачи, биодозиметрические подходы на основе анализа закономерностей развития SOS-реакции клеток тканей и органов в ответ на  $\gamma$ -облучение.

Фундаментальные исследования *in vitro* и на организменном уровне выявили сложный и нетривиальный характер молекулярно-клеточного SOS-ответа системы репарационного синтеза ДНК, обеспечивающего раннее и интенсивное развитие типичного радиоадаптивного ответа организма. Анализ физико-химических механизмов и количественное обоснование специализированных ЭПР-баз данных из радиобиологических опытов позволили выработать систему взглядов на природу организменного SOS-ответа на повреждающие воздействия. Эксперименты показали, что существует взаимосвязь и взаимозависимость фенотипических молекулярно-клеточных характеристик, обеспечивающих и сохраняющих стохастический результат жизнеобеспечения.

На новом этапе накопления фактов открываются перспективы изучения природы и количественных интерпретаций физико-химических механизмов репарации лучевых повреждений, возможности их модификации и повышения жизнеспособности облученного организма. Несомненно, свободнорадикальный фермент RR активно участвует в клеточном SOS-ответе системы *de novo* синтеза dNTP и играет ключевую роль в реакциях систем репликации и репарации ДНК, РНК и белков на действие  $\gamma$ -радиации. Экспериментально подтверждено, что дисбаланс скоростей синтеза ДНК и белка, как и дисбаланс нуклеотидов, усугубляют ошибки репликации и репарации ДНК. Именно объективным результатом SOS-ответов и, в том числе, последствиями дисбаланса пулов нуклеотидов являются факты возрастания частоты генных мутаций и мутаций хро-

мосом при действии экопатогенных факторов. Существенно, что по величине SOS-ответа и последующей динамике адаптивных молекулярно-клеточных реакций можно судить о силе действующих стресс-агентов различной природы и, применяя модификаторы и протекторы, влиять на SOS-реакцию. Удовлетворительным результатом экспериментов является вывод: пулы  $Fe^{3+}$ -ТФ и  $Cu^{2+}$ -ЦП в периферической крови могут быть использованы в качестве высокочувствительных маркеров действия генотоксических агентов.

Биофизический подход к анализу фактов о природе фенотипических радиогенных повреждений дает возможность судить о характере и степени возникающих физиологических изменений в индивидуальном облученном организме. Удастся тестировать развитие процессов во времени в зависимости от исходного состояния организма и осуществлять количественный контроль молекулярно-клеточных результатов радиационных воздействий. Фазные изменения определяемых ЭПР-показателей их сопоставление и качественное соответствие с цитогенетическими характеристиками способствуют прогностическому пониманию и оценке стохастически возникающих радиогенных повреждений метаболизма, достигающих уровня необратимых, в условиях использования высоких доз  $\gamma$ -облучения. Можно предполагать, что в условиях влияния разнообразных экопатогенных факторов среды обитания живых систем существует базисный универсальный механизм SOS-ответа, сформировавшийся как "высшая реальность" у млекопитающих в результате эволюционного развития.

Согласно развиваемой концепции, именно мобилизацией природного компенсаторного цитогенетического механизма может быть обусловлена репарация лучевых повреждений и, в том числе, закономерное увеличение вероятности мутаций в условиях  $\gamma$ -облучения. Предлагаемая концепция требует дальнейшего анализа и конкретного наполнения динамического SOS-ответа количественными оценками внутриклеточных сдвигов энергетического метаболизма, классификации "качества" процессов репаративного синтеза ДНК, новыми молекулярными критериями радиационных повреждений (системными по значению) и совокупных характеристик индивидуальных реакций фенотипа в экстремальных условиях. Это означает, что на первое место выходит признание важности и необходимости фундаментальных идей и, в том числе, изучения фактов и понимания критериев эпигенетических изменений в системе наследственности в условиях внешней среды.

Результаты аналитического обзора убеждают в необходимости современного изучения и понимания фундаментальных механизмов клеточного гомеостаза, обеспечивающего стабильность жи-

вых систем в условиях загрязнения биосферы. Упреждающий эффект мутаций с выраженными фенотипическими проявлениями, обеспечивающий защитный потенциал, может заключаться в активации процессов репарации в митохондриальной RR и способствовать выживанию организма без существенных повреждений генома. Аппарат SOS-репарации и мутагенеза в организме под воздействием радиации в малых дозах может содействовать привлечению стресс-индуцированных репарационных ферментов к поврежденным участкам ДНК и временно поднять частоту мутаций именно в генах репарации [27, 31, 37].

Использование современного эмпирического знания недостаточно для понимания сути сложного защитного явления в его реальной природной самонастраивающейся биологической завершенности. Однако, на основе исследовательских фактов об эффектах целого ряда радиомодифицирующих соединений, была установлена возможность расширить перспективы поиска новых антиканцерогенных, антирадикальных, антиоксидантных и противолучевых средств в биомедицинских экспериментах и в клинике. Результаты работы могут оказаться необходимыми для будущего достижения цели познать роль SOS-репарационных реакций повреждений ДНК, обеспечивающих вероятностный характер выживания индивидуальных млекопитающих в экстремальных для организма условиях [38, 39].

Метод ЭПР оказался абсолютно необходим в междисциплинарном комплексе для научного рассмотрения и адекватной оценки возможностей и причин возникновения генных мутаций из-за дисбаланса пулов dNTP в тканях кровеносных органов в условиях острого облучения в опытах на крупных млекопитающих (собаки) и мониторинга разновозрастных когорт детского населения из регионов радионуклидного загрязнения. Неоднозначность анализа интегральных процессов и интерпретаций их механизмов, тем не менее, имеют смысл как попытка судить о феномене радиорезистентности организма и стратегии его выживания в условиях не только радиационного фона Земли, но и околоземного пространства.

Для ретроспективной биодозиметрии все большее значение приобретает возможность количественного мультикомпонентного анализа повреждений ДНК и продуктов ее деградации; нарушение нуклеотидного обмена и систем репарации мтДНК; комплексная оценка экспрессии отдельных конкретных генов; регистрация метилирования ДНК и индукции микроРНК; оценка совокупности параметров, характеризующих антиоксидантный статус организма, и степени дестабилизации иммунной системы; наличие закономерного функционального сдвига к апоптозу у

поврежденных клеток. Очевидно, что это и есть будущие системные эмпирические факты, позволяющие выстраивать определенную цепочку логических заключений, отражающих влияние условий окружающей среды, запускающих мутагенез и обеспечивающих адаптацию к факторам стресса.

Эмпирическое обобщение дает основание предположить существование “высшей реальности” – базисного универсального адаптивного защитного SOS-ответа на экстремальные экопатогенные факторы, сформировавшегося в результате эволюционной парадигмы сложной системы живой жизни. Необходимость использовать механизм целенаправленного выживания на основе собственного гомеостаза определяет для организма жесткий выбор: среди множества критериев его жизнеобеспечения следует ограничиться рамками экологического императива. Для организма стратегическим приоритетом является выбор эффективных режимов системной регуляции и адекватного уровня управления репликацией и репарацией ДНК. В рамках этого понимания предстоит выяснить функциональную взаимосвязь возникающей мутационной нагрузки и адекватного репарационного SOS-ответа, обеспечивающего повышение резистентности и жизнеспособности организма в условиях экстремальной экопатогенной нагрузки. Результаты работы свидетельствуют о необходимости научного и практического контроля биофизико-генетических механизмов для анализа и понимания сути фенотипических молекулярно-клеточных характеристик и, в том числе, интерпретации и возможного повышения эффективности индуцированных SOS-реакций систем репарации ДНК в условиях действия экофакторов различной природы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания № 48.19, тема 0082-2019-0015 “Изучение принципов структурно-функциональной организации биомолекулярных систем, разработка методов дизайна их физико-химических аналогов и создание на этой основе биологически активных препаратов нового поколения”, № АААА-А20-120031490003-7.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thelander L., Reichard P.* Reduction of ribonucleotides // *Annu. Rev. Biochem.* 1979. V. 48. P. 133.
2. *Pulatova M.K., Sharygin V.L., Filatov D.E., Todorov I.N.* ESR studies of the role of ribonucleotide reductase in DNA synthesis regulation during normal and pathological processes in animal tissues // *Highlights of Modern Biochemistry* / Eds A. Kotyk, I. Skoda, V. Paces, V. Kostka. Zeist: VSP Int. Sci. Publishers, 1989. P. 215–229.

3. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Филатов Д.Э., Тодоров И.Н. Активация рибонуклеотидредуктазы как показатель SOS-реакции на воздействие экстремальных факторов, повреждающий ДНК в клетках высших животных // Докл. РАН. 1995. Т. 340. № 1. С. 123–127. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Filatov D.E., Todorov I.N. Aktivacija ribonukleotidreduktazy kak pokazatel' SOS-reakcii na vozdejstvie jekstremal'nyh faktorov, povrezhdajushhij DNK v kletkah vysshih zhivotnyh // Dokl. RAN. 1995. V. 340. № 1. P. 123–127. (In Russian)]
4. Pulatova M.K., Sharygin V.L. Free radical reactions in mechanisms of damage, repair and protection of blood systems // Free Radicals in Biology and Environment. Ser. A. Life Science / Ed. F. Minisci. V. 27. Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 305–315.
5. Pulatova M.K., Sharygin V.L., Todorov I.N. The activation of ribonucleotide reductase in animal organs as the cellular response against the treatment with DNA damaging factors and the influence of radioprotectors on this effect // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1453. № 3. P. 321–329.
6. Балева Л.С., Сипягина А.Е., Смотряева М.А. и др. Маркеры метаболических изменений, возникающих вследствие воздействия ионизирующей радиации // Изв. РАН. Сер. Биол. 1995. № 6. С. 657–668. [Baleva L.S., Sipjagina A.E., Smotrjaeva M.A. et al. Markjory metabolicheskikh izmenenij, vznikajushhijh vsledstvie vozdejstvija ionizirujushhej radiacii // Izv. RAN. Ser. Biol. 1995. № 6. P. 657–668. (In Russian)]
7. Baleva L.S., Pulatova M.K., Vartanyan L.S. et al. The Assessment of Biochemical Changes in the Blood of Children Exposed to Radiation at Low Dose Rate after the Chernobyl Atomic Power Station Accident // Phys. Chem. Biol. Med. 1995. V. 2. P. 115–126.
8. Snyder R.D. The role of deoxynucleoside triphosphate pools in the inhibition of DNA excision repair and replication in human cells by hydroxyurea // Mutat. Res. 1984. V. 131. № 3–4. P. 163.
9. Cory J.G., Carter G.L. Drug action on ribonucleotide reductase // Advances in Enzyme Regulation / Ed. G.N.Y. Werber. L.: Pergamon Press, 1986. V. 24. P. 385–401.
10. Elledge S.J. and Davis R.W. DNA damage induction of ribonucleotide reductase // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. № 11. P. 4932.
11. Genetic Consequences of Nucleotide Poolimbalance / Ed. F.S. De Serres. N.Y.: Plenum Press, 1985. 512 p.
12. Meuth M. The molecular basis of mutations induced by deoxynucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells // Experim. Cell. Res. 1989. V. 181. № 2. P. 305–316.
13. Nordlund P. and Reichard P. Ribonucleotides Reductases // Annu. Rev. Biochem. 2006. V. 75. P. 681–706.
14. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г., Тодоров И.Н. Временные и дозозависимые пострадиационные изменения в содержании Fe<sup>3+</sup>-трансферина и Cu<sup>2+</sup>-церулоплазмина в крови животных и их влияние на RR-активность тканей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 6. С. 662–667. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G., Todorov I.N. Vremennye i dozozavisimye postradiacionnye izmenenija v sodержanii Fe<sup>3+</sup>-transferrina i Cu<sup>2+</sup>-ceruloplazmina v krvi zhivotnyh i ih vlijanie na RR-aktivnost' tkanej // Radiac. biologija. Radioekologija. 2003. V. 43. № 6. P. 662–667. (In Russian)]
15. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Шлякова Т.Г. Реакции системы синтеза дезоксирибонуклеотидов на облучение и их модификация радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 1. С. 29–43. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Shljakova T.G. Reakcii sistemy sinteza dezoksiribonukleotidov na obluchenie i ih modifikacija radioprotektorami // Radiac. biologija. Radioekologija. 2003. V. 43. № 1. P. 29–43. (In Russian)]
16. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г. и др. Активация радиопротекторами и антиоксидантами синтеза дезоксирибонуклеотидов как важнейшая стадия в механизме формирования резистентности организма к действию ДНК-повреждающих факторов // Изв. РАН. Сер. Биол. 2005. № 4. С. 401–422. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G. et al. Aktivacija radioprotektorami i antioksidantami sinteza dezoksiribonukleotidov kak vazhnejshaja stadija v mehanizme formirovanija rezistentnosti organizma k dejstvuju DNK-povrezhdajushhijh faktorov // Izv. RAN. Ser. Biol. 2005. № 4. P. 401–422. (In Russian)]
17. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Шлякова Т.Г. и др. Радиоспектроскопия ЭПР как метод регистрации изменения радиорезистентности организма. Экспериментальное обоснование // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 2. С. 311–322. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Shljakova T.G. et al. Radiospektroskopija JePR kak metod registracii izmenenija radiorezistentnosti organizma. Jeksperimental'noe obosnovanie // Biofizika. 2009. V. 54. Vyp. 2. P. 311–322. (In Russian)]
18. Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Шлякова Т.Г. и др. Радиоспектроскопия ЭПР как метод регистрации изменения радиорезистентности организма. Клиническое обоснование // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 2. С. 323–333. [Pulatova M.K., Sharygin V.L., Shljakova T.G. et al. Radiospektroskopija JePR kak metod registracii izmenenija radiorezistentnosti organizma. Klinicheskoe obosnovanie // Biofizika. 2009. V. 54. Vyp. 2. P. 323–333. (In Russian)]
19. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куронтева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии / Ред. Л.Х. Эйбус. М.: Энергоатомиздат, 1989. 232 с. [Pulatova M.K., Rihireva G.T., Kuropteva Z.V. Elektronnyj paramagnitnyj resonans v moleculyarnoj radiobiologii / Red. L.H. Ejbus. M.: Energoatomizdat, 1989. 232 p. (In Russian)]
20. Thelender L. Ribonucleotide reductase and mitochondrial DNA synthesis // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 703–704.
21. Crichton R.R. Proteins of iron storage and transport // Adv. Protein. Chem. 1990. V. 40. P. 281.
22. de Jong G., van Dijk J.P., van Eijk H.G. The biology of transferrin // Clin. Chim. Acta. 1990. V. 190. № 1–2. P. 1.
23. Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции / Пер. с англ. М.: ЗАО Изд-во Центрполиграф, 2014. 527 с. [Kunin E.V. Logika sluchaja. O prirode i proishozhdenii biologicheskoj jevoljucii / Per. s angl. M.: ZAO Izdatel'stvo Centrpoligraf, 2014. 527 p. (In Russian)]

24. Шлякова Т.Г., Шарыгин В.Л., Зорин В.В., Чернов Г.А., Пулатова М.К. Влияние индометопена на противолучевые свойства индралина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 1. С. 50–56. [Shlyakova T.G., Sharygin V.L., Zorin V.V., Chernov G.A., Pulatova M.K. Vliyanie indometofena na protivoluchevye svojstva indralina // Radiacionnaja biologija. Radiojekoologija. 2014. V. 54. № 1. P. 50–56. (In Russian)]
25. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К., Сипягина А.Е., Балева Л.С. Использование магниторезонансной спектроскопии при системном анализе радиочувствительности / радиорезистентности животных и человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 2. С. 151–169. [Sharygin V.L., Pulatova M.K., Sipjagina A.E., Baleva L.S. Ispol'zovanie magnitorezonansnoj spektroskopii pri sistemnom analize radiochuvstvitel'nosti / radiorezistentnosti zhivotnyh i cheloveka // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2013. V. 53. № 2. P. 151–169. (In Russian)]
26. Шарыгин В.Л., Пулатова М.К. ЭПР-спектроскопия при системном анализе радиорезистентности организма животных и человека. Чернобыльский аспект // Сб. трудов XXII ежегодной конф. ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, секция “Динамика химических и биологических процессов”. М.: РУДН, 2017. С. 71–81. [Sharygin V.L., Pulatova M.K. JePR-spektroskopija pri sistemnom analize radiorezistentnosti organizma zhivotnyh i cheloveka. Chernobyl'skij aspekt // Sb. trudov XXII ezhegodnoj konferencii IHF im. N.N. Semjonova RAN, sekcija “Dinamika himicheskikh i biologicheskikh processov”. M.: RUDN, 2017. S. 71–81. (In Russian)]
27. Тодоров И.Н. Роль оксидативного стресса и мутаций митохондриальной ДНК в процессе старения, прогрессии патологий и апоптоза // Рос. хим. журн. Менделеевского об-ва. 2007. Т. LI. № 1. С. 93–106. [Todorov I.N. Rol' oksidativnogo stressa i mutacij mitohondrial'noj DNK v processe starenija, progressii patologij i apoptoza // Ros. him. zhurn. Mendeleevskogo ob-va. 2007. V. LI. № 1. P. 93–106. (In Russian)]
28. Сипягина А.Е., Балева Л.С., Пулатова М.К., Шарыгин В.Л. и др. Организация медицинской помощи детям различных когорт наблюдения, подвергшимся воздействию малых доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 3. С. 374–380. [Sipjagina A.E., Baleva L.S., Pulatova M.K., Sharygin V.L. i dr. Organizacija medicinskoj pomoshhi detjam razlichnyh kogort nabljudenija, podvergshimsja vozdejstviju malyh doz radiacii // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2006. V. 46. № 3. P. 374–380. (In Russian)]
29. Сипягина А.Е., Пулатова М.К., Шарыгин В.Л., Сусков И.И. Критерии повышенной чувствительности к малым дозам ионизирующего излучения и ее значение в формировании адаптивных процессов у детей // Здоровье детей и радиация: Актуальные проблемы и решения / Под ред. Л.С. Балевой и А.Д. Царегородцева. Вып. 2. М., 2006. С. 149–160. [Sipjagina A.E., Pulatova M.K., Sharygin V.L., Suskov I.I. Kriterii povyshennoj chuvstvitel'nosti k malym dozam ionizirujushhego izlucheniya i ejo znachenie v formirovanii adaptivnyh processov u detej // Zdorov'e detej i radiacija: aktual'nye problemy i reshenija / Pod red. L.S. Balevoj i A.D. Caregorodceva. Вып. 2. М., 2006. С. 149–160. (In Russian)]
30. Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. и др. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 2. С. 167–177. [Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Suskova V.S. et al. Problema inducirovannoj genomnoj nestabil'nosti kak osnovy povyshennoj zabolevaemosti u detej, podvergajushhhsja nizkointensivnomu vozdejstviju radiacii v malyh dozah // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2006. V. 46. № 2. P. 167–177. (In Russian)]
31. Шарыгин В.Л., Сипягина А.Е., Балева Л.С. и др. Опыт использования магниторезонансной спектроскопии при системном анализе радиочувствительности/радиорезистентности животных и человека // Динамика химических и биологических процессов, XXI век. М.: Книга по Требованию, 2012. С. 413–441. [Sharygin V.L., Sipjagina A.E., Baleva L.S. et al. Opyt ispol'zovaniya magnitorezonansnoj spektroskopii pri sistemnom analize radiochuvstvitel'nosti/radiorezistentnosti zhivotnyh i cheloveka // Dinamika himicheskikh i biologicheskikh processov, XXI vek. M.: Kniga po Trebovaniju, 2012. P. 413–441. (In Russian)]
32. Сипягина А.Е., Балева Л.С., Карахан Н.М., Яблонская М.И., Шарыгин В.Л. Характеристика и роль изменения нуклеотидов в I–II поколениях детей, проживающих в загрязненных радионуклидами регионах // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017, 11–15 сентября 2017 г. / Под ред. Ю.А. Омельчук, Н.В. Ляминой, Г.В. Кучерик. Севастополь: СевГУ, 2017. 1617 с. С. 1229–1233. [Sipjagina A.E., Baleva L.S., Karahan N.M., Jablonskaja M.I., Sharygin V.L. Harakteristika i rol' izmenenija nukleotidov v I–II pokolenijah detej, prozhivajushhih v zagrjaznennyh radionuklidami regionah // Jekologicheskaja, promyshlennaja i jenergeticheskaja bezopasnost' – 2017, 11–15 sentjabrja 2017 g. / Pod red. Ju.A. Omel'chuk, N.V. Ljaminoj, G.V. Kucherik. Sevastopol': SevGU, 2017. P. 1229–1233. (In Russian)]
33. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ионизирующая радиация может активировать встраивание фрагментов митохондриальной ДНК в ядерный геном // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47. № 4. С. 673–683. [Gaziev A.I., Shajhaev G.O. Ionizirujushhaja radiacija mozhet aktivirovat' vstraivanie fragmentov mitohondrial'noj DNK v jadernyj genom // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2007. T. 47. № 4. P. 673–683. (In Russian)]
34. Газиев А.И. Пути сохранения целостности митохондриальной ДНК и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 2. С. 117–136. [Gaziev A.I. Puti sohraneniya celostnosti mitohondrial'noj DNK i funkcij mitohondrij v kletkah, podvergshihhsja vozdejstviju ionizirujushhej radiacii // Radiac. biologija. Radiojekoologija. 2013. V. 53. № 2. P. 117–136. (In Russian)]

35. *Тодоров И.Н., Тодоров Г.И.* Мультифакторная природа высокой частоты мутаций мтДНК соматических клеток млекопитающих // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 9. С. 1184–1194. [*Todorov I.N., Todorov G.I.* Mul'tifaktornaja priroda vysokoj chastoty mutacij mTDNK somaticheskikh kletok mlekopitajushhih // Biohimija. 2009. V. 74. Vyp. 9. P. 1184–1194. (In Russian)]
36. *Газиев А.И., Шайхаев Г.О.* Повреждение митохондриального генома и пути его сохранения // Генетика. 2008. Т. 44. № 4. С. 437–455. [*Gaziev A.I., Shajhaev G.O.* Povrezhdenie mitochondrial'nogo genoma i puti ego sohraneniya // Genetika. 2008. V. 44. № 4. P. 437–455. (In Russian)]
37. *Rampazzo C., Ferraro P., Reichard P.* Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 17–19.
38. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с. [*Hesin R.B.* Nepostojanstvo genoma. M.: Nauka, 1984. 472 s. (In Russian)]
39. *Свердлов Е.Д.* Взгляд на жизнь через окно генома. В 3 т. Т. 1: Очерки структурной молекулярной генетики. М.: Наука, 2009. [*Sverdlov E.D.* Vzglyad na zhizn' cherez okno genoma. V 3 t. T. 1: Ocherki strukturnoj molekularnoj genetiki. M.: Nauka, 2009. (In Russian)]

## The Methodology of EPR Spectroscopy using in Analysis of Physical and Chemical Mechanisms of Radio-genetics Damages in Animal and Human Organisms

V. L. Sharygin<sup>a,\*,##</sup>

<sup>a</sup> *N.N. Semyonov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>#</sup> *E-mail: sharygin@chph.ras.ru*

<sup>##</sup> *E-mail: sharygin2011@mail.ru*

The responses of deoxyribonucleotide (dNTP), DNA and protein synthesis systems in blood-forming organs of animals (dogs, mice), as well as the changes in Fe<sup>3+</sup>-transferrin (Fe<sup>3+</sup>-TF) and Cu<sup>2+</sup>-ceruloplasmin (Cu<sup>2+</sup>-CP) pools in blood due to  $\gamma$ -irradiation and administration of radioprotectors have been studied. It has been shown that changes in Fe<sup>3+</sup>-TF and Cu<sup>2+</sup>-CP pools in blood serve the indices of the changes of body radioresistance and are reliably controlled by the EPR technique. The important role in the mechanism of the antiradiation activity of indometophene and indralin belongs to the increased ribonucleotide reductase activity and induction of the ribonucleotide synthesis, which provides effective reparation of the damage to the DNA of the cells in radiosensitive tissues and organs as a result of administration of radioprotectors at the optimal protective doses before radiation exposure.

**Keywords:**  $\gamma$ -radiation, EPR method, DNA, proteins, deoxyribonucleotides, Fe<sup>3+</sup>-transferrin, Cu<sup>2+</sup>-ceruloplasmin, extracellular DNA, radioresistance of organism, radioprotectors