АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

На правах рукописи

Н. В. ЛУЧНИК

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва — 1966

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

На правах рукописи

Н. В. ЛУЧНИК

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва — 1966

Работа выполнена в Отделе биофизики Уральского филиала АН СССР, г. Свердловск (зав. отделом — доктор биологических наук Н. В. Тимофеев-Ресовский) и в Институте медицинской радиологии АМН СССР, г. Обнинск, (директор— действительный член АМН СССР профессор Г. А. ЗЕДГЕНИДЗЕ).

Научные консультанты:

действительный член АМН СССР профессор Г. А. ЗЕДГЕНИДЗЕ;

Доктор биологических наук Н. В. ТИМОФЕЕВ-РЕСОВСКИЙ.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Член-корреспондент АН СССР профессор А. А. ЛЯПУНОВ.
Доктор биологических наук В. В. САХАРОВ.
Доктор биологических наук П. И. ЦЕЙТЛИН.

Защита состоится « 24 » . 5 . 1966 года на заседании Совета Отделения медико-биологических наук по физиологии, биохимии и фармакологии АМН СССР (Москва, Солянка 14).

Автореферат разослан « 23 » . 4 . 1966 года.

Диссертация представляет собой попытку подвести некоторые итоги 18-летней работы автора, которая велась до 1963 года в Уральском филиале Академии наук СССР, а после этого продолжалась в Институте медицинской радиологии Академии медицинских наук СССР.

Все наши работы были так или иначе связаны с биофизическим анализом механизмов биологического действия ионизирующих излучений. Подавляющее большинство этих работ касалось цитогенетических эффектов, как наиболее существенного компонента биологического действия радиации. Исследования велись на различных уровнях — начиная с молекулярного и кончая опытами по тотальному облучению млекопитающих. Естественно, что каждая отдельная работа ставила перед собой вполне конкретные задачи; однако при этом нас всегда интересовал вопрос о том, каким образом первичные субмолекулярные изменения приводят, в конечном счете, к поражению всего организма. И из всех опытов мы стремились извлечь возможную информацию по этому вопросу. Эта задача непосредственно связана с другой, еще более широкой, проблемой выяснения связи между разными уровнями организации биологических структур и функций в норме. Если бы последняя проблема уже была решена, то это очень сильно облегчило бы решение предыдущей задачи. Однако современные знания по этому вопросу пока очень ограничены. При такой ситуации первая задача становится еще более интересной, так как выясняя связь между генетическими изменениями на разных уровнях, можно надеяться получить информацию и о связи между этими уровнями в норме.

Любая из этих двух задач настолько обширна, что ни один человек, ни одна лаборатория не могут рассчитывать на то, чтобы решить ее в ограниченное время. Мы формулируем их здесь лишь для того, чтобы указать на ту общую идею, которая связывает воедино все наши работы.

За прошедшие годы больше всего материала у нас накопилось о связи между молекулярным и хромосомным уровнями при возникновении радиационно-генетических эффектов.

Поэтому именно этот участок работ и был избран в качестве темы для диссертации.

Работа велась в двух направлениях. Начиная с конца 40-х годов автор занимался изучением количественных закономерностей действия ионизирующих лучей на хромосомы. В середине 50-х годов эти работы привели к обоснованию представления о потенциальном характере первичных генетических лучевых поражений, а исследование природы первичных повреждений дало возможность в 1959 году сформулировать матричную гипотезу, связывающую наблюдаемые эффекты с молекулярными изменениями. Эти представления, подтвержденные затем экспериментально, легли в качестве рабочей гипотезы в основу дальнейших работ. Со второй половины 50-х годов автор начал заниматься, кроме того, теоретическим биофизическим анализом некоторых элементарных биологических структур и процессов. Наиболее интересные результаты это направление дало при исследовании проблемы генетического кода. Основные материалы этой работы составили содержание монографии «Статистический анализ проблемы аминокислотного кода», опубликованной в 1963 году.

Эти два направления работы дают возможность применить «встречный метод» при анализе молекулярных основ генетических изменений. Выяснение молекулярных механизмов хранения и передачи наследственной информации и почти полная расшифровка генетического кода открывают путь «снизу вверх» — на основе результатов этой расшифровки и используя данные об изменении первичной структуры белков при мутациях, делать выводы о молекулярных механизмах возникновения мутаций. Применение же матричной гипотезы к анализу результатов опытов по вызыванию цитогенетических изменений, позволяет связать их с элементарными молекулярными процессами, идя при этом «сверху вниз». Оба эти метода взаимно дополняют друг друга.

В связи со сказанным, первые 7 из 14 глав диссертации посвящены проблеме генетического кода, а последующие — радиационной цитогенетике. Первая часть диссертации является теоретической, где экспериментальные данные других авторов проанализированы с помощью методов, разработанных нами. Хотя в основе этой части и лежит упомянутая выше монография, она, в связи с исключительно быстрым развитием данной области науки, в значительной степени переработана. В этой части учтены все работы, вышедшие к середине 1965 года. Вторая часть основана на собственном экспериментальном материале, опубликованном в ряде статей. В последней, заключительной главе, подводятся общие итоги и материал предыдущих глав рассматривается с точки зрения

молекулярных основ генетических эффектов. В этой главе делаются некоторые выводы о связи между разными уровнями биологических структур и функций и обсуждаются практические следствия, вытекающие из нашей работы. Некоторые материалы, необходимые для строгого обоснования отдельных положений, но содержащие расчеты или большое количество цифр, которые можно опустить при чтении основного текста, помещены в конце работы, в виде семи приложений.

Общий объем диссертации — 673 страницы машинописи. Иллюстрационный материал состоит из 68 рисунков и 141 таблицы. Список цитированной литературы включает 528 номеров (193 работы на русском языке и 335 на иностранных).

Ниже излагается краткое содержание диссертации.

Первая глава **«Механизм биосинтеза белка, термины, относящиеся к проблеме кода»** и вторая — **«Расшифровка генетического кода, исторический обзор»** являются вводными к первой части диссертации. В первой главе приводятся краткий очерк современных представлений о механизме биосинтеза белка, а также термины и определения, относящиеся к проблеме генетического кода. Во второй главе дается, в историческом аспекте, обзор основных работ по проблеме генетического кода. Начало работ по этой проблеме можно отнести к 1953 году, когда Уотсон и Крик, расшифровав макромолекулярную структуру ДНК, показали, что в самой этой структуре заложена способность молекул к самовоспроизведению. Этот результат, наряду с накопившимися данными о генетической роли нуклеиновых кислот, стимулировал появление ряда работ, где пытались установить связь между строением ДНК или РНК и первичной структурой белков. В связи с отсутствием экспериментальных подходов, начиная с работы Г. А. Гамова (1954) применяли криптографические методы, т. е. строили те или иные (в общем, мало обоснованные) предположения об общих свойствах кода и на их основании анализировали данные о строении белков. Эти работы проблемы не решили. Второй период начался с 1961 года, когда открылись три пути экспериментального изучения генетического кода — опыты с бесклеточной системой синтеза белка в присутствии искусственных полирибонуклеотидов (Ниренберг с сотр., Очоа с сотр.), вызывание мутаций у вируса табачной мозаики с помощью азотистой кислоты (Виттман, Френкель-Конрат, Цуджита и др.) и анализ профлави-

новых мутантов бактериофага (Крик и сотр.). Наибольшее значение при этом имели опыты с бесклеточной системой, позволившие дать частичную расшифровку кода. Однако, последующие работы, характеризующие современный период, показали, что целый ряд факторов (антибиотики, различные катионы, органические растворители, температура) существенно влияют на получаемые результаты, в связи с чем появились серьезные сомнения в адекватности бесклеточной системы. Между тем, все попытки расшифровки кода, полностью или частично, базировались на результатах опытов с бесклеточной системой. Кроме того, выяснилось, что код является сильно вырожденным, т. е. одна и та же аминокислота кодируется, как правило, несколькими комбинациями нуклеотидов. Однако, экспериментальные данные анализировались таким образом, как будто код не является вырожденным, что могло вести к крупным ошибкам. В связи с этим, основными задачами в проблеме кода стали: нахождение совершенно независимых от бесклеточной системы методов расшифровки кода, на оснований только данных «ин виво», и разработка методов анализа экспериментальных данных с учетом сильной вырожденности кода. Решение этих двух наиболее важных вопросов и явилось главным предметом наших работ, описанных в первой части диссертации.

Основным материалом для расшифровки кода, исходя из данных «ин виво», являются замещения аминокислот. В связи с этим в третьей главе «**Замещения аминокислот**» этот материал подвергнут специальному рассмотрению. Замещения могут быть только тогда использованы для анализа кода, когда имеется полная уверенность в том, что они представляют собой результат замены одного основания (т. е. являются «разрешенными»). Между тем ни в одном, отдельно взятом, случае такой уверенности быть не может. Обычно применяемый строгий отбор материала тоже не дает никакой гарантии от ошибок. Мы впервые применили для классификации замещений статистический анализ, который позволил из всего материала выделить две группы — заведомо разрешенных замещений и запрещенных замещений. Этот материал и используется в дальнейшем для исследования генетического кода.

Четвертая глава «**Общие свойства генетического кода**» посвящена выяснению основных общих закономерностей кодирования генетической информации. В литературе последних лет этому вопросу уделялось недостаточно внимания. Единственная работа, специально посвященная общим свойствам кода — известная статья Крика и сотр., опубликованная в 1961 году. В ней сделаны выводы о ряде свойств, однако для этого применены косвенные методы, которые не могут быть

вполне надежными. Мы использовали для исследования тех же вопросов другие методы — главным образом статистический анализ замещений. Это позволило сделать следующие выводы:

а) генетический код универсален, т. е. общие свойства кода и смысл кодонов одинаковы для всех живых существ, хотя незначительные различия в составе «словаря» для отдельных видов не исключены;

б) информация о первичной структуре белка, закодированная в виде последовательности нуклеотидов информационной РНК, считывается последовательно, начиная с некоторой фиксированной точки;

в) генетический код является не перекрывающимся;

г) кодовое отношение равно трем, т. е. на каждую аминокислоту приходится по три основания в информационной РНК;

д) кодовое число равно трем, т. е. каждая аминокислота кодируется комбинацией из трех нуклеотидов (триплетом);

е) код является сильно вырожденным, все или почти все триплеты кодируют аминокислоты, так что большинству аминокислот соответствует более одного триплета;

ж) последовательности аминокислот в белке и кодонов в нуклеиновой кислоте колинеарны.

Ни один из этих выводов не является принципиально новым. Однако до последнего времени они базировались лишь на немногочисленных косвенных данных. Подтверждение с помощью новых методов делает их значительно более достоверными.

Наш анализ дал возможность найти закон вырождения кода. Вырожденность носит не случайный характер. Из трех букв триплета две являются **облигатными**, т. е. не могут быть заменены на другие без изменения смысла триплета, а третья — **факультативной**, т. е. может быть заменена (на любую или вполне определенную букву) без изменения смысла триплета. Факультативная буква во всех триплетах занимает одно и то же место.

Если бы генетический код был вырожден случайным образом, то с помощью имеющихся фактических данных однозначно расшифровать его было бы невозможно. (Такая возможность появилась только после окончания нашей работы, в последних опытах Ниренберга). Однако, установление неравноценности букв триплета дает возможность предложить метод однозначной расшифровки вырожденного кода. Для этого ее следует подразделить на две части: сначала выяснить состав облигатных пар, кодирующих все аминокислоты, и только после этого переходить к полной расшифровке кода.

Пятая глава **«Определение облигатных букв»** распадается, в связи с общим планом работы, на две части. В первой части облигатные буквы определяются с помощью качественного анализа результатов опытов с бесклеточной системой. Во второй — то же делается на основании данных «ин виво». В последнем случае удалось применить для этой цели четыре разных метода. Все они дали согласные результаты, совпадающие с полученными при анализе опытов с бесклеточной системой. Такое совпадение показывает, что нормальная бесклеточная система, в той форме, в которой она применялась в опытах Ниренберга и Очоа, приводит к тем же выводам, что и данные «ин виво».

В шестой главе **«Абсолютный порядок букв в кодонах»** рассмотрены пути определения последовательности оснований в триплетах. Информации по данному вопросу имеется довольно мало, поэтому для его выяснения было применено семь различных методов (часть из них была впервые предложена автором). Два метода основаны на анализе результатов опытов с бесклеточной системой, три являются генетическими и два используют немногочисленные данные о последовательности оснований в природных нуклеиновых кислотах. Поскольку во всех случаях анализ базируется на небольшом материале, эти методы дали отчасти противоречивые результаты. Однако, сравнение данных, полученных разными методами, позволило одну из возможных последовательностей считать наиболее правдоподобной.

В седьмой главе **«Расшифровка генетического кода»**, завершающей первую часть диссертации, разработан метод, позволяющий однозначно анализировать экспериментальные данные в случае вырожденного кода. Этот метод был применен к анализу результатов опытов с бесклеточной системой, что позволило расшифровать большую часть триплетов. В соответствии с первоначальным планом работы, в этой главе предполагалось, так же как в пятой, попытаться дать независимую расшифровку триплетов на основании опытов с бесклеточной системой и на основании опытов «ин виво»». Однако, уже во время написания диссертации появился ряд работ Ниренберга и сотр. (1965) по применению новой бесклеточной системы, где сродство аминокислот к триплетам определяется не по включению аминокислот в полипептиды, а на значительно более ранней стадии — при присоединении их к рибосомам. Следует заметить, что эти работы дали прямое экспериментальное подтверждение ряду выводов, сделанных автором ранее (Лучник, 1963), с помощью разработанных им методов и вопреки противоречивым выводам авторов других работ.

Благодаря появлению упомянутых работ, окончательную расшифровку кода стало возможным упростить и сделать более убедительной. На основе найденных выше облигатных пар была произведена расшифровка триплетов с помощью методов, предложенных автором. Сравнение полученных результатов с новыми результатами Ниренберга дало почти полное совпадение. После незначительных взаимных уточнений современное состояние расшифровки генетического кода было доведено до уровня, представленного в таблице 1. Следует заметить, что эти результаты нужно считать значительно более достоверными, чем публиковавшиеся когда либо ранее. В их достоверности убеждает, в частности, их сопоставление с рядом данных «ин виво», не использовавшихся для расшифровки триплетов, таких как корреляции между составом ДНК и белков, составом РНК и белков, данные о нитритных и спонтанных замещениях аминокислот в белках при мутациях.

Таблица 1

Современное состояние расшифровки генетического кода

Аминокислоты	Кодоны
Аланин	ГЦА, ГЦГ, ГЦЦ, ГЦУ, (?)
Аргинин	ЦГГ, ЦГА, ЦГЦ, (АГА), (?)
Аспарагиновая кислота	ГАЦ, ГАУ
Аспарагин	ААЦ, ААУ, (?)
Цистеин	УГУ
Глютаминовая кислота	ГАА, ГАГ
Глютамин	ЦАА, ЦАГ
Глицин	ГГА, ГГЦ, ГГУ, (ГГГ)
Гистидин	ЦАЦ, (ЦАУ)
Изолейцин	АУА, АУЦ, АУУ
Лейцин	ЦУГ, ЦУЦ, ЦУУ, УУА, УУГ
Лизин	ААА, ААГ
Метионин	АУГ
Фенилаланин	УУУ, УУЦ
Пролин	ЦЦА, ЦЦЦ, ЦЦУ
Серин	АГЦ, АГУ, УЦА, УЦГ, УЦЦ, УЦУ,
Треонин	АЦА, АЦГ, АЦЦ, АЦУ, (ЦЦГ), (?)
Триптофан	УГГ
Тирозин	УАЦ, УАУ
Валин	ГУА, ГУГ, ГУЦ, ГУУ
Нонсенсы	УАА, (УАГ)
Не расшифрованы	ЦГУ, ЦУА, УГА, УГЦ

Примечания: 1. Последовательность указана в направлении от 3′ к 5′-гидроксилу, считывание при синтезе белка справа налево.

2. В скобках — вероятные, но недостаточно доказанные. Вопросительный знак — возможное (маловероятное) существование дополнительного кодона.

Добавление при окончательной редакции. Уже после окончания диссертации и написания автореферата нам стала известна последняя работа Хорана и сотр., в которой дается почти полная расшифровка генетического кода с помощью новых методов. Эта работа полностью подтверждает сделанные нами выводы. Единственное расхождение — триплет ЦЦГ, который был нами предположительно расшифрован как кодирующий треонин (авторы цитируемой работы считают, что он кодирует пролин). Кроме того, результаты этой работы позволяют дополнить нашу таблицу триплетами, для расшифровки которых у нас не было достаточных данных; ЦГУ кодирует аргинин, а УГЦ — цистеин. Эти результаты рассеивают последние сомнения в адекватности расшифровки кода.

Последующие главы диссертации посвящены экспериментально-теоретическому анализу радиационно-цитогенетических изменений. В восьмой главе **«Изучение цитогенетических повреждений»,** являющейся вводной ко второй части, дается краткий очерк истории изучения механизма образования хромосомных мутаций под действием излучений и его значения для развития других областей биологии. Рассмотрение современного состояния проблемы показывает, что в настоящее время наиболее актуальными являются следующие вопросы:

а) доказательство восстановимости (потенциального характера) первичных изменений хромосом;

б) выяснение природы первичных повреждений, лежащих в основе генетических изменений;

в) изучение механизма реализации первичных повреждений в необратимые изменения и механизма восстановления поврежденных внутриклеточных структур;

г) исследование связи упомянутых выше изменений и процессов с клеточным циклом и со структурами и процессами молекулярного уровня. Именно эти вопросы и стоят в центре внимания в последующих главах диссертации.

В восьмой главе описаны также основные методы цитогенетических исследований, в частности, методика собственных опытов. Экспериментальная часть нашей работы была проведена главным образом на семенах и проростках гороха сорта Капитал, облученных гамма-лучами радиокобальта. Дозы облучения, так же как их распределение во времени, время фиксации, дополнительные воздействия в разных опытах варьировались в широких пределах. Фиксация производилась в смеси спирта, уксусной кислоты и хлороформа 6 : 3 : 1, исследовались давленные препараты, окрашенные ацетолакмоидом. Во всех опытах определялась митотическая активность, под-

считывалось число клеток, находящихся на разных фазах деления, а также проводился подробный анализ ненормальных анафаз. В анафазах дифференцированно подсчитывались (одиночные и парные): мосты, полумосты, пробелы, кольца, прямые, дугообразные и точечные фрагменты. В специальных опытах учитывались и некоторые дополнительные показатели.

Вопрос, составляющий содержание девятой главы **«Восстановимость первичных цитогенетических повреждений»** в последние годы являлся предметом оживленных дискуссий и интенсивно исследовался экспериментально. В классической радиобиологии господствовало представление о необратимости первичных изменений, лежащих в основе генетических и клеточно-летальных эффектов облучения. После открытия явления фотореактивации стала очевидной восстановимость первичных повреждений, вызываемых ультрафиолетом. В настоящее время это явление, также как и «темновая» реактивация, исследованы достаточно глубоко, вплоть до выяснения биохимических и молекулярных механизмов. Первые указания на восстановимость первичных повреждений при действии ионизирующей радиации были получены только в пятидесятых годах как в отношении клеточно-летальных эффектов (В. И. Корогодин, О. В. Малиновский, Т. Альпер, Э. Виткин, М. Элкинд и др), так и в отношении генетических и цитогенетических эффектов (Н. В. Лучник, Р. Кимбалл, К. Люнинг, Ш. Ауэрбах и др.). Однако, хотя число фактов, которые легче всего объяснялись с позиции гипотезы восстановления, непрерывно возрастало, их при желании можно было объяснять и иначе (например, разной первичной поражаемостью клеток или различными вторичными эффектами). В отношении восстановления от клеточно-летальных повреждений вполне убедительные доказательства его существования были получены В. И. Корогодиным. Для цитогенетических эффектов они отсутствовали дольше. Поэтому в настоящей главе главное место занимает рассмотрение статистических закономерностей распределения повреждений по клеткам, так как оно дает наиболее бесспорное доказательство восстановления клеток от первичных повреждений, лежащих в основе образования хромосомных мутаций.

В наших опытах удавалось снизить число хромосомных мутаций не только путем химических воздействий непосредственно перед облучением, но также при воздействиях после облучения и при изменении физиологического состояния облучаемых клеток. В качестве примера в таблице 2 приведены результаты опытов по влиянию цистеина после облучения и по влиянию содержания воды в облучаемых семенах на их

Таблица 2

Изменение радиочувствительности семян гороха в разных условиях

Варианты опытов	Число исследованных анафаз	Процент клеток с фрагментами	Число фрагментов	
			на облученную клетку	на клетку с фрагментами
Намачивание после облучения				
в воде	1450	24,5 ± 1,13	0,62±0,021	2,24±0,075
в цистеине	1400	8,4 ± 0,74	0,19±0,012	2,21±0,138
Содержание воды в облучаемых клетках				
низкое (5—8%)	1150	50,0 ± 1,47	1,40±0,034	2,80±0,066
высокое (12—16%)	1100	26,5 ± 1,33	0,71±0,026	2,60±0,096

Примечание. Покоящиеся семена облучались дозой 15000 рад. Фиксация — в конце первого митоза.

радиочувствительность. В большинстве подобных опытов, так же как и в только что приведенных, отмечался своеобразный характер изменения радиочувствительности: число поврежденных клеток уменьшалось, но среднее число изменений на поврежденную клетку оставалось постоянным. Такой «поклеточный» характер изменения эффекта отмечался и другими авторами (Джексон, Барбер, Мантель, Гринблат и др.), но никогда не являлся предметом специального исследования. Автором был подробно изучен вопрос о возможных причинах поклеточного изменения эффекта, причем было показано, что для объяснения наблюдаемого явления можно предложить несколько гипотез, требующих, однако, разной зависимости эффекта от дозы и различной связи между числом хромосомных мутаций и митотической активностью. Специально поставленные опыты показали, что изменение эффекта не сопровождается изменением митотической активности и что с повышением дозы облучения возрастает не только общее число мутаций, но также число клеток с мутациями и среднее число мутаций на измененную клетку. Эти результаты отвечают единственной гипотезе, согласно которой поклеточное распределение мутаций связано с восстановлением клеток от первичных повреждений, происходящих по принципу «все или ничего». Таким образом, существование пострадиационного восстановления от первичных повреждений, лежащих в основе хромосомных мутаций, можно считать доказанным. В диссертации приведены также результаты других опытов, приводящих к тому же выводу.

Полученный вывод дает возможность использовать факт поклеточного восстановления для количественной оценки числа восстанавливающихся клеток, которое прямыми методами определять нельзя. Метод основан на анализе наблюдаемого в опытах распределения повреждений по клеткам. Составлены специальные таблицы, значительно упрощающие анализ.

После доказательства потенциального характера первичных изменений, естественно, встает вопрос об их природе. Этому вопросу посвящена десятая глава диссертации **«Природа первичных цитогенетических повреждений».** В этой главе подвергнуты критическому рассмотрению предлагавшиеся в разное время гипотезы о природе первичных повреждений. Все существующие взгляды можно свести к четырем гипотезам. Согласно первой из них, первичное изменение представляет собой физический (истинный) разлом хромосомы (Навашин, Стадлер, Ли, Рид и др.). Согласно второй, первичное повреждение представляет собой «потенциальный разлом», т. е. место, способное к разлому (Тодей, Свенсон, Люнинг и др.). Третья гипотеза предполагает, что облучение вызывает возникновение мест, способных к рекомбинации (Серебровский, Ривелл, Ивенс и др.). Согласно этой «обменной» гипотезе фрагменты рассматриваются как результат неполных обменов. Наконец, четвертая гипотеза предполагает, что первичное повреждение состоит в локальном изменении матричных свойств хромосомы (Лучник). Все гипотезы ставят наблюдаемые изменения в связь с событиями клеточного цикла, в частности, с процессом редупликации хромосом. Согласно трем первым гипотезам, возникновение одиночных (т. наз. хроматидных) и парных (т. наз. хромосомных) аберраций связано с тем, облучаются ли хромосомы в «расщепленном» или «не расщепленном» состоянии. Четвертая («матричная») гипотеза связывает время редупликации хромосом с переходом первичных изменений в необратимую форму.

Проведенные опыты показали, что ожидаемая с точки зрения старых гипотез смена во времени одиночных аберраций парными наблюдается только для «обменов» (которые в основном и рассматривались сторонниками упомянутых гипотез). Для других групп аберраций такой переход не наблюдается, что, наряду с современными представлениями о строении и механизме редупликации хромосом, говорит против этих гипотез.

В наших опытах, в полном соответствии с результатами других авторов, были получены асимметричные кривые время—эффект с максимумом, приходящимся на время перехода от синтетической к постсинтетической стадии интерфазы. При-

менение метода, описанного в девятой главе диссертации, позволило выяснить, что уменьшение эффекта в синтетической и пресинтетической стадии связано с пострадиационным восстановлением. Низкий же процент хромосомных мутаций в клетках, облученных в постсинтетической стадии, как показывает тот же анализ, связан с нереализацией скрытых повреждений. Эти результаты дали основание сформулировать упомянутую выше матричную гипотезу, согласно которой переход скрытых повреждений в необратимую форму осуществляется во время и в процессе синтеза дочерних хроматид.

Одиннадцатая глава **«Матричная гипотеза»** посвящена дальнейшему обоснованию и более детальной разработке взглядов, сформулированных в предыдущей главе. В связи с тем, что хромосомы строятся полуконсервативно, т. е. каждая новая хроматида состоит наполовину из нового, а наполовину из старого материала, следовало бы ожидать, что полные разрывы должны наблюдаться только во втором после облучения митозе, так как согласно матричной гипотезе измененными должны быть преимущественно дочерние структуры. Между тем опыты показывают, что уже в первом митозе наблюдается значительное число полных разрывов. Такого результата следовало бы ожидать при консервативном построении хромосом, когда одна из хроматид состоит полностью из нового, а другая — из старого материала.

Автором было высказано предположение о том, что облучение может повреждать нормальный механизм формирования хромосом, в связи с чем в первом митозе наблюдается все многообразие хромосомных мутаций. Специально поставленные опыты показали, что относительное число мутаций, соответствующих неправильному формированию хромосом возрастает с дозой облучения и уменьшается со временем за счет уменьшения числа мутаций, соответствующих правильному формированию. Такой взаимный переход наблюдается для всех трех пар аберраций, для которых он предсказывается теорией: а) для пары простые фрагменты — парные пробелы; б) дуговые фрагменты — парные фрагменты; в) простые мосты — парные полумосты. Дополнительные химические воздействия также изменяют соотношение числа аберраций, соответствующих двум типам формирования хромосом. В большинстве случаев это изменение происходит на фоне общего восстановления. Колхицин, совершенно не влияющий на степень пострадиационного восстановления, повышает относительное число хромосом, формирующихся неправильно и потому дает наиболее демонстративные результаты, которые приведены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние колхицина на число некоторых типов хромосомных аберраций, вызванных облучением

Типы хромосомных аберраций	Контроль		Колхицин		Разница	t	P
	абсол. цифры	на 100 клеток	абсол. цифры	на 100 клеток			
Парные пробелы	60/200	30,0±3,2	48/200	24,0 ±3,0	6,0±4,4	1,36	0,17
Простые фрагменты	14/200	7,0±1,8	22/200	11,0±2,2	4,0±2,9	1,40	0,16
Сумма	74/200	37,0±3,4	70/200	35,0±3,4	2,0±4,8	0,42	0,67
Парные фрагменты	20/300	6,7±1,4	12/350	3,4±1,0	3,3±1,8	1,86	0,06
Дуговые фрагменты	21/300	7,0±1,5	42/350	12,0±1,9	5,0±2,4	2,10	0,03
Сумма	41/300	13,7±2,0	54/350	15,5±2,2	1,8±3,0	0,66	0, 1

Примечание: Семена облучали через 20 часов после конца намачивания дозой 300 рад гамма-лучей, через 5 часов помещали на два часа в 0,001% растворколхицина. Фиксация через 35 часов после конца намачивания в воде.

Совокупность этих данных, также как и результатов других опытов, описанных в диссертации, убеждает в том, что матричная гипотеза соответствует фактам лучше, чем прежние гипотезы. С точки зрения матричной гипотезы хорошо объясняется все многообразие наблюдаемых структурных изменений хромосом. В диссертации дана общая схема образования хромосомных аберраций. Согласно этой схеме, тип наблюдаемых изменений определяется в первую очередь локализацией первичного изменения и типом формирования хромосом.

В двенадцатой главе **«Закономерности восстановления клеток»** рассматриваются более подробно вопросы, связанные с пострадиационным восстановлением и с реализацией первичных изменений в необратимые поражения. Вначале проанализированы основные относящиеся сюда понятия и определения. Особенно подробно рассмотрено понятие скорость восстановления. Показано, что хотя описание результатов опытов в терминах скорости восстановления представляется весьма заманчивым, существующие методы постановки опытов не дают возможности для количественной оценки этой величины.

В ряде специальных опытов, описанных в этой главе, была более детально изучена связь процессов, ведущих к наблюдаемым изменениям, с клеточным циклом. В этих опытах определяли число восстановленных клеток и число наблюдаемых повреждений при облучении на разных стадиях клеточного цикла — в нормальных условиях и при полностью выключенном восстановлении. В качестве примера в таблице 4 приведены результаты опыта по облучению покоящихся семян с нормальной и пониженной влажностью (в последнем случае процессы восстановления полностью выключены). В подобных опытах было показано следующее. Реализация первичных повреждений происходит после окончания синтеза ДНК, во время окончательного формирования хромосом. Описанное в девятой главе поклеточное восстановление осуществляется в предсинтетической стадии клеточного цикла. Продолжительность времени между облучением и началом синтеза ДНК и различные сопутствующие факторы влияют только на число поврежденных клеток, в то время как среднее число повреждений на поврежденную клетку остается постоянным и зависит только от дозы облучения. Другими словами, восстановление на этой стадии протекает по принципу «все или ничего». Во время синтеза ДНК процессы восстановления также идут, но кинетика их иная: в этот период происходит независимое восстановление отдельных поврежденных локусов и тем самым определяется окончательное среднее число

Таблица 4

Судьба первичных изменений в зависимости от стадии клеточного цикла

Влажность облучаемых семян	Время фиксации, часы	Число исследованных анафаз	Клетки с фрагментами		Число фрагментов		Среднее число фрагментов на клетку с фрагментами	Процент клеток			
			число	процент	всего	на клетку		с первичными повреждениями	восстановленных „локально“	восстановленных „поклеточно“	с реализованными повреждениями
8 %	30—40	1250	1154	92,4	3234	2,59	2,80	92	0	0	92
12—20%	25	750	628	83,7	1511	2,02	2,41	92	5	4	83
	27,5	750	541	72,1	1067	1,42	1,97	92	13	7	72
	30	750	415	55,3	655	0,87	1,58	92	29	8	55
	32,5	750	340	45,4	540	0,72	1,59	92	28	19	45
	35	750	221	29,5	346	0,46	1,56	92	31	31	30

Примечания: 1. Покоящиеся семена гороха облучали дозой 15000 рад гамма-лучей. При влажности 8% во все сроки фиксации процессы восстановления полностью подавлены.

2. Сроки фиксации 25—30 часов соответствуют облучению в синтетической стадии клеточного цикла, сроки 30—35 часов — облучению на предсинтетической стадии.

повреждений на поврежденную клетку. Во время стадий, непосредственно предшествующих митозу, процессы восстановления и реализации не происходят. Однако, как показывают наши эксперименты, скрытые повреждения, не проявившиеся в первом митозе, могут реализоваться позже, при подготовке к последующим митозам. Наличия «необратимого компонента» на нашем материале обнаружить не удалось.

Последняя группа вопросов, возникающая в связи с решаемой проблемой, касается физико-химической природы первичных повреждений и биохимических процессов, ведущих к восстановлению или реализации скрытых изменений. Подобные исследования выходят за рамки настоящей работы, но в связи с их общим интересом, в тринадцатой главе **«О физико-химических и биохимических механизмах»** описаны и обсуждены некоторые результаты, полученные автором и его сотрудниками, дающие информацию по упомянутым вопросам.

Поскольку наиболее вероятными молекулярными изменениями, лежащими в основе хромосомных мутаций, являются разрывы молекул ДНК, были исследованы количественные закономерности этого процесса. Оказалось, что полные раз-

рывы молекул возникают при небольших дозах очень редко и следуют двухударной кривой, в то время как простейшие хромосомные мутации являются одноударными. Что же касается одиночных разрывов ДНК (затрагивающих лишь одну из сахарофосфатных нитей), то, хотя они возникают в достаточном количестве и при малых дозах и следуют одноударной зависимости, но само по себе их наличие не может сказываться на свойствах макромолекул, а тем более хромосом. Однако, после ауторепродукции молекул ДНК по полуконсервативному механизму, одиночные разрывы должны трансформироваться в полные, что может вести к возникновению генетических аномалий. Между тем, выше было показано, что скрытые изменения реализуются в хромосомные мутации именно после завершения ауторепродукции молекул ДНК. В связи с этим, представляется весьма вероятным, что в основе возникновения хромосомных мутаций лежат именно одиночные разрывы молекул ДНК.

Для объяснения механизма усиления внутримолекулярных изменений до клеточного уровня, автором была предложена гипотеза «эстафетного синтеза», согласно которой способность к самовоспроизведению сохраняется лишь у одной из дочерних структур. Помимо объяснения результатов опытов по вызыванию мутаций, эта гипотеза снимает противоречие между многочисленными данными о многонитчатом строении хромосомы и не менее многочисленными фактами, показывающими, что функционально она ведет себя часто как мономолекулярная структура.

Полученные нами данные о характере химических веществ, влияющих на судьбу первичных повреждений, заставляют считать, что наиболее вероятными кандидатами на роль биохимических систем, состояние которых определяет вероятность восстановления и реализации, являются система окислительного фосфорилирования и механизм биосинтеза нуклеиновых кислот.

В четырнадцатой главе **«Молекулярные механизмы генетических эффектов»**, являющейся заключительной главой всей диссертации, подводятся общие итоги. В ней обсуждаются, в свете полученных данных, некоторые общие вопросы теоретической биологии, молекулярные механизмы генных и хромосомных мутаций и значение полученных результатов.

Успехи в изучении закономерностей хранения и передачи наследственной информации на разных уровнях, достигнутые в последние годы, делают своевременной попытку сформулировать общие принципы, лежащие в их основе. Дополнительные данные для этого дают некоторые из результатов, полученных в настоящей работе. С другой стороны, такие

общие принципы сильно облегчают понимание молекулярных механизмов образования мутаций. Поэтому автором была предпринята попытка сформулировать некоторые из этих принципов; в дальнейшем они кладутся в основу общего обсуждения полученных результатов. Эти принципы сводятся к следующему.

«Бинарный принцип», уже давно применяемый для объяснения процессов эволюции живых организмов, оказывается справедливым и в ряде других процессов (мутагенез, канцерогенез и др.). Он сводится к тому, что *возникновение необратимых изменений осуществляется в результате взаимодействия случайно возникающей внутренней предпосылки и векторизованных внешних условий ее реализации и закрепления.*

«Матричный принцип», впервые выдвинутый Н. К. Кольцовым, который в настоящее время может быть распространен на такие явления, как ауторепродукция хромосом, биосинтез ДНК и РНК, а также белков, сводится к тому, что *построение структур, несущих большой объем информации, осуществляется с помощью расположения элементарных единиц на линейной матрице на основе закона, определяющего соответствие между элементарными единицами и элементами матрицы.* Возможно, что этот принцип впоследствии может быть распространен и на нелинейные матрицы.

«Эстафетный принцип», впервые обнаруженный в связи с открытием зародышевого пути, но не получавший более широкой формулировки, сводится к тому, что *воспроизведение сложных образований, построенных из большого числа идентичных (или сходных) структур, осуществляется путем передачи репродуктивной функции лишь одной из новообразованных структур.*

Наконец, **«Принцип парности»** касается структурно-функциональной связи между разными уровнями организации и формулируется следующим образом. *Сложные организмы строятся иерархически, причем последовательные уровни строятся поочередно то из двух, то из многих элементов предыдущего уровня.* Отмеченное чередование касается не только строения, но и ряда других структурных и функциональных характеристик.

Применение этих принципов, подробно обоснованных и обсужденных в диссертации, в качестве основы для рассмотрения полученных результатов, оказывается плодотворным.

Почти полная расшифровка генетического кода позволяет подойти к выяснению молекулярных механизмов генных мутаций. Проведенный автором анализ показал, что все замены нуклеотидов являются равновероятными. Это говорит про-

тив предположения о том, что химические изменения молекул ДНК являются ведущим механизмом спонтанного мутагенеза. Следует считать, что основная причина мутаций — ошибки, происходящие во время ауторепродукции. Общий ход образования генных мутаций состоит в возникновении первичных изменений в результате нарушений работы матричного механизма; судьба первичных изменений определяется бинарным принципом, а усиление до надмолекулярных и организменных масштабов происходит за счет эстафетного принципа и принципа парности.

При образовании хромосомных мутаций действует тот же общий механизм мутагенеза, вырисовывающийся здесь еще более наглядно. Основные звенья их образования: случайно возникающие скрытые изменения (нарушение матричных свойств хромосом), сопутствующие векторизованные условия их реализации (бинарный принцип), усиление до клеточных и организменных масштабов (эстафетный принцип и принцип парности). Думается, что данные о месте приложения этих принципов в условиях лучевой патологии могут быть интересными и с точки зрения познания молекулярных механизмов нормальных процессов.

В заключение обсуждаются некоторые более частные следствия из полученных результатов. Эти результаты в первую очередь могут найти применение при решении некоторых общебиологических вопросов, при поисках средств защиты от вредного биологического действия ионизирующих излучений, при разработке методов радиотерапии и в вопросах канцерогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые методы изучения общих свойств генетического кода, применение которых к имеющимся экспериментальным данным позволило получить независимое подтверждение выводов, сделанных Криком и сотр. в 1961 году (триплетность кода, его вырожденность, универсальность, отсутствие перекрывания, считывание с одного конца). Кроме того, найден закон вырождения кода: триплеты, кодирующие одну и ту же аминокислоту («синонимы») как правило имеют два совпадающих нуклеотида (т. наз. облигатные буквы). Третья («факультативная») буква может быть заменена на другую (любую, или вполне определенную) без изменения смысла триплета.

2. Показано, что непосредственная расшифровка сильно вырожденного кода с помощью имеющихся экспериментальных данных невозможна. Разработан двухэтапный метод од-

нозначной расшифровки вырожденного кода, основанный на предварительной расшифровке облигатных пар.

3. Впервые предложены методы для расшифровки кода без использования результатов опытов с бесклеточной системой, на основании данных «ин виво». Применение этих методов к имеющемуся материалу для расшифровки состава облигатных пар и порядка букв в них дало согласные результаты, совпадающие с даваемыми опытами «ин витро».

4. На основе расшифрованных облигатных пар произведена дальнейшая расшифровка кода с использованием данных опытов с бесклеточной системой. Расшифровку кода удалось довести почти до конца. Сопоставление результатов этой расшифровки с различными экспериментальными данными показывает хорошее соответствие.

5. На основе почти полностью расшифрованного кода, анализируется имеющийся материал о замещениях аминокислот при мутациях. Делается вывод о том, что при спонтанном мутагенезе наиболее частой причиной мутаций являются ошибки при синтезе, а не химические изменения исходных структур.

6. Первичные изменения хромосом, приводящие в конечном счете к хромосомным мутациям, носят потенциальный характер и в довольно сильной степени обратимы. Приведены результаты опытов, которые, по-видимому, не допускают другого объяснения. Пострадиационное восстановление может идти по двум механизмам: происходит либо независимое восстановление отдельных поврежденных локусов, либо восстановление клеток по принципу «все или ничего». Предложен статистический метод для количественной оценки степени поклеточного восстановления.

7 В ряде опытов исследован вопрос о природе первичных повреждений, в результате чего разработана «матричная гипотеза», находящаяся в лучшем соответствии с фактами, чем другие взгляды. Согласно предложенной гипотезе, первичное изменение состоит в повреждении матричных свойств хромосомы: мутация представляет собой, таким образом, результат аномальной репродукции хромосом.

8. Экспериментально показано существенное влияние радиации на процесс редупликации хромосом. После облучения часть хромосом формируется неправильно. Это повреждение вызывается небольшими дозами облучения, но клетки относительно легко восстанавливаются от него. Дана общая схема образования хромосомных мутаций. Наблюдаемое их многообразие связано с разной локализацией первичных повреждений и с типом формирования хромосом.

9. Экспериментально показано, что окончательный переход первичных изменений в необратимую форму имеет место после окончания синтеза ДНК. При облучении хромосом на пресинтетических стадиях преобладает поклеточное восстановление, при облучении в синтетической стадии — локальное.

10. Проведенные опыты делают вероятным предположение о том, что первичное повреждение связано с одиночными разрывами сахаро-фосфатных цепей молекул ДНК. Судьба первичных повреждений определяется состоянием систем окислительного фосфорилирования и синтеза нуклеиновых кислот.

11. Рассмотрение всего материала позволяет сделать вывод о том, что в основе возникновения генных и хромосомных мутаций лежат одни и те же общие принципы, в первую очередь, матричный принцип возникновения первичного изменения и существенная зависимость конечного результата от сопутствующих условий. Эти принципы являются частным выражением общебиологических закономерностей.

Материалы диссертации обсуждались на ряде научных совещаний, в частности, на Пятом международном биохимическом конгрессе (Москва, 1961), на Международном симпозиуме по мутационному процессу (Прага, 1965), на Первом всесоюзном биохимическом съезде (Ленинград, 1964), на Восьмом всесоюзном съезде рентгенологов и радиологов (Ташкент, 1964), на Первой всесоюзной конференции по медицинской радиологии (Москва, 1956), на Всесоюзной конференции по применению изотопов и излучений в народном хозяйстве и науке (Москва, 1957), на Первой конференции по нуклеиновым кислотам и нуклеопротеидам (Москва, 1959), на симпозиуме Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений (Москва, 1960), на симпозиуме Восстановление от лучевых поражений на клеточном уровне (Москва, 1964), на симпозиуме по экспериментальному мутагенезу (Москва, 1965) и др.

Основные работы автора по теме диссертации

1. О влиянии фракционирования и мощности дозы на цитологический эффект облучения. Биофизика, **1**, 633 (1956).

2. Влияние облучения радиоактивным кобальтом на содержание нуклеиновых кислот в ткани селезенки. Биохимия, 21, 668 (1956).

3. Влияние гибридизации на радиочувствительность. Доклады АН СССР, **114**, 754 (1957).

4. Лучевые повреждения и воздействия на них. 1. О классификации возможных путей воздействия на общий эффект облучения (совм. с Н. В. Тимофеевым-Ресовским). Тр. Ин-та биологии УФАН, в 9, 57 (1957).

5. Об аномальной реакции при малых дозах облучения. Биофизика, 2, 86 (1957).

6. Цитологический анализ действия слабых и сильных доз ионизирующих излучений на растения. Тр. Всес. конф. по медиц. радиол., Медгиз, М., 93 (1957).

7. Влияние слабых доз излучателей на митоз у гороха. Бюлл. Уральск. отд. МОИП, в. 1, 37 (1958).

8. Влияние дрожжевых экстрактов на облученные организмы. Биохимия, **23**, 149 (1958).

9. Противолучевые средства и пики смертности. Биофизика, 3, 332, (1958).

10. Об обратимости цитогенетических лучевых повреждений (совм. с Л. С. Царапкиным). Доклады АН СССР, **124**, 213 (1959).

11. Влияние цистеина на цитогенетические поражения, вызванные гамма-лучами у гороха (совм. с Л. С. Царапкиным). Цитология, **1**, 73 (1959).

12. К вопросу о спиральном строении молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты и механизме их самовоспроизведения (совм. с Ю. М. Плишкиным и Г. Г. Талуцем). Биофизика, **4**, 275 (1959).

13. О роли нуклеозидполифосфатов при делении клеток и ауторепродукции нуклеиновых кислот. Доклады АН СССР, **126**, 417 (1959).

14. Природа первичных цитогенетических лучевых поражений и каталитическая активность хромосом. Доклады АН СССР, **129**, 1168 (1959).

15. Лучевые поражения и воздействия на них. 5. Влияние цистеина и некоторых других веществ, содержащих серу, на эффект облучения животных и растений (совм. с Е. А. Тимофеевой-Ресовской). Тр. Ин-та биологии УФАН, в. 12, 76 (1960).

16. Лучевые поражения и воздействие на них. 6. Действие дрожжевых экстрактов на смертность мышей и на проростки гороха. Тр. Ин-та биологии УФАН, в. 12, 93 (1960).

17. Обратимость цитогенетических повреждений, вызванных радиацией (совм. с Н. А. Изможеровым, Н. А. Порядковой, Л. С. Царапкиным и Н. В. Тимофеевым-Ресовским). Доклады на VIII сессии комитета ООН по действию излучений, Изд. АН СССР, (1960).

18. О механизмах ауторепродукции элементарных клеточных структур. 2. Физические основы спиралевидной формы некоторых макромолекул и возможный механизм авторепродукции дезоксирибонуклеиновой кислоты (совм. с Ю. М. Плишкиным и Г. Г. Талуцем). Цитология, **2**, 57 (1960).

19. К вопросу о природе первичных изменений при лучевом поражении клеток (совм. с В. И. Корогодиным). Биофизика, **5**, 88 (1960).

20. Бинарный механизм радиационно-цитогенетических повреждений. Доклады на конф. по экспер. генетике, Изд. ЛГУ. **1**, 100 (1961).

21. Пути классификации противолучевых средств. Тр. Ин-та биологии УФАН, в. 13, 57 (1960).

22. О природе двух фаз биосинтеза нуклеиновых кислот. В кн. «Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды», М., (1961).

23. О последовательности нуклеотидов в триплетах РНК, определяющих включение аминокислот в белки. Биохимия, **27**, 1032 (1962).

24. Об одном из возможных применений теории вероятностей в радиационной цитогенетике. Применение математич. методов в биологии, в. 2, 177 (1963).

25. Об интерпретации кривых «время-эффект» (совм. с Я. Б. Ливчаком). Применение математич. методов в биологии, в. 2, 212 (1963).

26. Взаимодействие излучений с живым веществом и природа реакций латентного периода. Труды МОИП, **7**, 174 (1963).

27. О механизме восстановления радиационных поражений на клеточном уровне (совм. с Н. А. Порядковой, Л. С. Царапкиным и Н. В. Тимофеевым-Ресовским). В кн. «Восстановление радиационных поражений», Атомиздат, М., 5 (1964).

28. Статистический анализ проблемы аминокислотного кода. Изд. УФАН, Свердловск, 172 (1963).

29. Об общих свойствах аминокислотного кода и составе кодовых слов. Тезисы докл. 1 Всес. биохим. съезда, в. 2, 75 (1964).

30. О причине поклеточного характера изменения радиочувствительности и методика определения числа первичных генетических повреждений. В кн. «Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов», **2**, 22 (1965).

31. Анализ пространственно-временных закономерностей возникновения разных типов хромосомных повреждений. В кн. «Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов», **2**, 23 (1965).

32. Некоторые количественные закономерности мутационного процесса в свете матричной гипотезы (совм. с Н. А. Порядковой и Л. С. Царапкиным). В кн. «Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов», **2**, 24 (1965).

Л26356 Зак. 2777 Тираж 300 экз.

Малоярославецкая городская типография
Калужского областного управления по печати