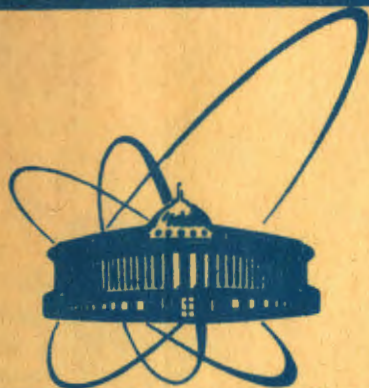


83-685

26/XII-83



СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

6790/83

19-83-685

С.Козубек, Е.А.Красавин

РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ДНК  
В РЕАЛИЗАЦИИ КИСЛОРОДНОГО ЭФФЕКТА  
У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ  
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ  
ЭНЕРГИИ (теоретический анализ)

Основные закономерности  
проявления кислородного эффекта

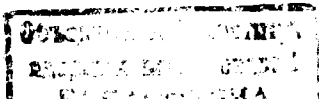
1983

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Более трех десятилетий известно, что кислород является наиболее эффективным агентом, модифицирующим различные реакции клеток на облучение. Хотя отдельные указания на радиосенсибилизирующее действие кислорода появились уже в 10-20 годы <sup>/1,2/</sup>, однако широкое и систематическое изучение "кислородного эффекта" /КЭ/ началось после того, как Тодей и Рид в 1947 году показали, что выход хромосомных поломок в клетках *Vicia faba* при рентгенооблучении в 3 раза выше в атмосфере кислорода, чем в атмосфере азота <sup>/8/</sup>.

Одной из главных черт КЭ является его универсальность, проявляющаяся в том, что влияние кислорода обнаруживается у всех организмов и на всех типах реакций клеток: выживаемости, индукции хромосомных и генных мутаций, возникновении одноклеточных и двухклеточных разрывов /ОР/ и ДР/ ДНК и т.д. Позднее выяснилось, что усиливающее действие кислорода на выход регистрируемых реакций зависит от его концентрации в среде, и эта зависимость описывается кривой насыщения с выходом на плато при концентрации кислорода ~20%. Вскоре были уточнены еще два важных обстоятельства в феноменологии КЭ: его зависимость от линейной передачи энергии (L) излучений и необходимость присутствия кислорода в среде для реализации КЭ непосредственно в момент облучения. При этом было отмечено, что в случае облучения биологических макромолекул *in vitro*, для проявления КЭ необходимо присутствие в среде SH-соединений.

Сразу после открытия КЭ были предприняты попытки объяснения его природы, которые вначале сводились к обсуждению роли различных продуктов радиолиза воды, образующихся в кислородных и анаэробических условиях, в инактивирующем действии излучений на клетку <sup>/4-6/</sup>. Однако было выяснено, что время жизни водных радикалов намного меньше времени, когда после импульсного облучения клеток введение кислорода вызывает КЭ <sup>/7/</sup>. У "радикальной гипотезы" появились новые трудности в связи с обнаружением КЭ в экспериментах с высушенными кристаллическими белками, семенами растений и бактериальными спорами <sup>/8/</sup>. Не находил также объяснения выявляемый в ряде случаев эффект "кислородного последствия". Еще более затруднили интерпретацию КЭ эксперименты с мутантами, имеющими дефект в механизме репарации ДНК. Как оказалось, у многих репарационных мутантов КЭ значительно меньший, чем у клеток дикого типа, у *rol*-мутантов, наоборот, - больший, а в ряде случаев



у некоторых мутантов выявляется даже "отрицательный" КЭ, то есть имеет место радиозащитное действие кислорода /9,10/.

Попытки выяснить природу КЭ с учетом всех перечисленных обстоятельств были предприняты многими авторами /8,11-14/, однако до последнего времени отсутствует концепция, которая позволяла бы с единых позиций непротиворечиво объяснить многообразие фактов, касающихся КЭ. В последнее время становится все более очевидным, что без учета особенностей организации генетического аппарата живых клеток, закономерностей реализации процесса репарации повреждений ДНК невозможна непротиворечивая интерпретация КЭ. Как известно, наиболее полно изучена структурно-функциональная организация генома у клеток прокариот - бактерий *E.coli*, у которых выделен ряд изогенных чувствительных и суперрезистентных мутантов. К тому же на *E.coli* получен большой фактический материал, касающийся феноменологии КЭ при действии излучений с разной *L*. Эти обстоятельства позволяют провести теоретический анализ особенностей проявления КЭ у разных штаммов *E.coli* при действии излучений, различающихся по *L*, на основе подходов, разработанных нами ранее /15-19/. Проведение такого анализа и явилось целью настоящей работы. Прежде чем приступить к изложению полученных нами результатов, рассмотрим основные закономерности проявления КЭ при действии на *E.coli* разных видов излучений и гипотезы, объясняющие механизм КЭ.

## 2. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ КЭ У БАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ *L*

По КЭ, выявляемому на всех уровнях биологической организации, имеется обширная литература, и в нашу задачу не входит ее анализ. Исходя из целей настоящей работы, рассмотрим некоторые, наиболее важные в свете развиваемых представлений моменты, касающиеся проявлений КЭ у бактерий при действии излучений, различающихся по *L*.

Как уже отмечалось, сенсibiliзирующее действие кислорода наблюдается тогда, когда он присутствует в клетках непосредственно в момент их облучения. В опытах с использованием техники импульсного облучения было установлено, что усиливающее влияние кислорода реализуется в течение ~1-4 мс /7,20/. Введение кислорода в более поздние сроки не приводит к появлению КЭ. Следует, однако, отметить, что в ряде случаев при облучении макромолекул *in vitro* выявляется эффект "кислородного последействия" /21/.

Зависимость величины КЭ от средней концентрации кислорода в среде была аналитически описана в /22/ в виде следующего уравнения:

$$r = (m \cdot P + K) / (P + K),$$

/1/

где *r* - величина КЭ, *P* - парциальное давление кислорода, *m* и *K* - константы. При больших значениях *P*  $r = m$ , и *m* является максимальным значением КЭ. В случае же  $P = K$   $r = \frac{m+1}{2}$  и представляет собой

величину парциального давления кислорода, при котором наблюдается "половинный" КЭ. Значения параметра *K* могут существенно варьировать, и есть основания полагать, что величина этих вариаций коррелирует с содержанием эндогенных SH-соединений в клетке - большим значениям *K* соответствуют большие концентрации SH-соединений /23,24/. Как уже указывалось, величина *m* зависит от многих факторов физической и биологической природы. Хорошо известна зависимость КЭ от *L* излучений. На различных штаммах бактерий было показано, что величина КЭ с возрастанием *L* уменьшается /25-27/. В ряде случаев для некоторых чувствительных мутантов выраженность КЭ меняется и при изменении мощности дозы  $\gamma$ -облучения. Причем возрастание мощности дозы не приводит к изменению чувствительности клеток в кислородных условиях, но при облучении в условиях аноксии их чувствительность возрастает и КЭ снижается /28/. Температура, при которой производится облучение клеток, также влияет на величину КЭ, например, КЭ, равный 3,6 в случае  $\gamma$ -облучения *E.coli* В при 45°C, снижается до 1,6 при температуре 19°C /29/.

Выделение чувствительных мутантов бактерий, имеющих дефекты в системе репарации ДНК, сделало возможным изучение влияния биологических факторов на КЭ. Уже указывалось, что величина КЭ в значительной степени зависит от репарационного генотипа клетки. Как правило, различные дефекты в механизме репарации ДНК уменьшают величину КЭ, но при наличии в геноме *rol*-мутации наблюдается его возрастание /9/.

Следует заметить, что проявления КЭ у клеток дикого типа и репарационных мутантов могут в значительной степени варьировать в зависимости от среды, в которой происходит облучение клеток /29/. Например, облучение *E.coli* в физиологическом растворе, в отличие от буферного, приводит к снижению величин КЭ у клеток дикого типа и *uvr*-мутантов, в то же время для *gcs*<sup>-</sup> и *lex*<sup>-</sup>-мутантов влияния среды на КЭ не отмечается. У *uvr*-мутанта при облучении в физиологическом растворе наблюдается "обратный" КЭ - защитное действие кислорода.

Известно, что  $\gamma$ -облучение вызывает в ДНК клеток широкий спектр первичных повреждений. Значительное число их репарируется на физико-химическом уровне, однако определенное количество таких повреждений модифицируется кислородом, что делает невозможным их восстановление на физико-химической стадии развития лучевого повреждения /21/. Следует заметить, что спектр первичных событий абсорбции энергии излучений и начальное количество повреждений в мишени не зависят от присутствия кислорода. Поскольку первичные повреждения ДНК трансформируются в дальнейшем в ОР и ДР, которые играют ключевую роль в летальном действии излучений на клетку, исключительно важным в расшифровке механизма КЭ является изучение

закономерностей индукции ОР и ДР ДНК при облучении клеток в аноксических и кислородных условиях. В связи с этим рассмотрим кратко основные закономерности проявления КЭ на молекулярном уровне.

В <sup>/30/</sup> с применением техники импульсного облучения и сверхбыстрого лизиса клеток было установлено, что выход ОР в присутствии кислорода и в аноксических условиях отличается в 4 раза и не зависит от температурных условий облучения /в диапазоне 0°C-37°C/ и активности гена *pol*. Было отмечено, что репарация индуцируемых в кислородных условиях ОР происходит весьма быстро, значительная их часть восстанавливается уже в течение первой минуты после облучения. В аноксических же условиях репарация идет несколько медленнее. В этих опытах было показано, что величина К по критерию образования ОР составляет  $0,5 \cdot 10^{-8}$  моль л<sup>-1</sup>, а по критерию выживания клеток -  $8 \cdot 10^{-6}$  моль л<sup>-1</sup>. На основании полученных данных сделан вывод об отсутствии корреляции между величиной КЭ, выходом ОР и выживаемостью. В <sup>/31/</sup> при исследовании влияния кислорода на выход ОР ДНК у бактерий было выяснено, что в кислородных условиях непосредственно после облучения выход ОР составляет  $1,5 \cdot 10^{-12}$  сГр<sup>-1</sup>. дальтон<sup>-1</sup> как для клеток дикого типа, так и для *pol*<sup>-</sup>-мутанта. При облучении же в аноксических условиях эти выходы имели значения, соответственно равные  $2,6 \cdot 10^{-13}$  сГр<sup>-1</sup>. дальтон<sup>-1</sup> и  $4,7 \cdot 10^{-13}$  сГр<sup>-1</sup>. дальтон<sup>-1</sup>. Величина КЭ для клеток дикого типа по критерию их выживания составила 3. Спустя 15 мин. пострадиационной инкубации выход ОР у клеток, облученных в кислородных и аноксических условиях, соответственно уменьшился до  $1,4 \cdot 10^{-18}$  сГр<sup>-1</sup>. дальтон<sup>-1</sup> и  $4,8 \cdot 10^{-14}$  сГр<sup>-1</sup> дальтон<sup>-1</sup>. С учетом полученных результатов сделан вывод о том, что у клеток дикого типа и у *pol*<sup>-</sup>-мутанта механизмом сверхбыстрой репарации /I/ восстанавливается ~25% повреждений в кислородных условиях и ~75% при облучении в условиях аноксии. Благодаря функционированию механизма быстрой репарации /II/ у клеток дикого типа количество ОР уменьшается еще примерно в 10 раз, однако у *pol*<sup>-</sup>-мутанта, дефектного по репарации /II/, этого не происходит. Полученные результаты не позволили авторам <sup>/31/</sup> связать закономерности реализации КЭ на молекулярном уровне и на уровне выживания клеток.

Таким образом, рассмотренные материалы по КЭ, выявляемому при облучении бактерий *E. coli* излучениями разного качества, свидетельствуют о "многоликости" его проявлений. Данное обстоятельство затрудняет однозначную интерпретацию механизмов реализации этого универсального радиобиологического феномена. Рассмотрим далее основные гипотезы, касающиеся механизмов КЭ.

### 3. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ КЭ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ РАЗНОГО КАЧЕСТВА

Как уже указывалось, механизм КЭ в начале 50-х годов пытались объяснить участием кислорода в реакциях радиоллиза воды, предполагая, что в результате этих реакций образуется высокореактивный

радикал  $\text{HO}_2^{/4-8/}$ . Однако такое объяснение КЭ не выдержало экспериментальной проверки и вскоре было отвергнуто <sup>/7,32/</sup>. Взамен "радиолизной" концепции было высказано предположение о возможном физико-химическом взаимодействии кислорода с радиационно-измененными биологически важными макромолекулами, являющимися чувствительными мишенями клеток <sup>/12/</sup>. В таком "активированном" состоянии облученные макромолекулы могут существовать, по мнению авторов, в течение нескольких миллисекунд, и для реализации КЭ присутствие кислорода необходимо непосредственно в момент облучения. Зависимость радиочувствительности клеток от концентрации кислорода в среде была аналитически описана авторами данной концепции в виде уравнения /1/. В то же время были предприняты попытки теоретического обоснования этой зависимости <sup>/12,24/</sup>. Рассмотрим более подробно развиваемые представления.

В <sup>/24/</sup> предполагается, что в чувствительной мишени линейно с дозой облучения (D) возникают первичные повреждения  $R'$  в количестве  $\lambda \cdot D$ , которые спонтанно с вероятностью  $k_f$  или в результате действия кислорода при концентрации  $[\text{O}_2]$  с вероятностью  $k_0[\text{O}_2]$  фиксируются в летальные повреждения  $R_f$ . При этом допускается, что первичные повреждения  $R'$  за счет присутствия SH-соединений, являющихся хорошими электронными донорами, могут восстановиться с вероятностью  $k_s = k_0 \cdot [\text{SH}]$  при концентрации таких соединений, равной  $[\text{SH}]$ . И если  $[\text{SH}]$  и  $[\text{O}_2]$  намного выше количества  $R'$  ( $[R']$ ), то уменьшение во времени  $t$  числа  $R'$  в клетке будет описываться процессом первого порядка:

$$[R']_t = [R']_0 \cdot \exp\{-(k_0 \cdot [\text{O}_2] + k_s + k_f) \cdot t\}. \quad /2/$$

После окончания физико-химической стадии лучевого поражения количество повреждений  $[R_f]$  будет:

$$[R_f] = [R']_0 - [R_s], \quad /3/$$

где  $[R_f]$  и  $[R_s]$  - соответственно число летальных и восстановленных повреждений. Доля фиксированных повреждений  $R_f$  при облучении клеток в присутствии кислорода будет равна:

$$R_f = \frac{k_0 \cdot [\text{O}_2] + k_f}{k_0 \cdot [\text{O}_2] + k_f + k_s}, \quad /4/$$

а в условиях аноксии:

$$R_f' = \frac{k_f}{k_f + k_s}. \quad /5/$$

Величина КЭ в этом случае будет выражаться через отношения /4/ и /5/:

$$r = \frac{\{k_f + k_g\} \cdot [O_2] / k_f + (k_f + k_g) / k_0}{[O_2] + (k_f + k_g) / k_0} \quad /6/$$

Как можно видеть, /6/ имеет вид уравнения /1/.

Рассмотрим далее неравновесный случай, когда концентрация кислорода в клетке меняется, и  $[O_2]_t$  есть функция времени. В таком случае при условии мгновенного облучения клеток необходимо решить следующее дифференциальное уравнение ( $[R^*]_0 = \lambda \cdot D$ ):

$$d[R^*]_t = -k_f \cdot [R^*]_t \cdot dt - k_g [R^*]_t \cdot dt - k_0 \cdot [O_2]_t \cdot [R^*]_t \cdot dt. \quad /7/$$

Далее имеем:

$$\ln([R^*]_t / [R^*]_0) = -\int_0^t \{k_f + k_g + k_0 \cdot [O_2]_t\} dt. \quad /8/$$

На основании /6/ удается получить хорошее соответствие между величиной КЭ и содержанием SH-соединений в клетках. Аналогичная корреляция между величиной КЭ и содержанием SH-соединений в среде отмечается и при облучении биологических макромолекул *in vitro*. Вместе с тем, в рамках изложенных представлений не учитывается важная роль ферментативной репарации повреждений в клетке, также участвующей в реализации КЭ. Попытки возложить эту роль на эндогенные SH-соединения клетки<sup>/12/</sup> противоречат данным о тесной корреляции между величиной [SH], постоянной K и величинами выходов первичных ОР.

Более совершенная схема реализации КЭ при  $\gamma$ -облучении клеток, где учитывается роль ферментативной репарации, была предложена Л.Х.Эйдусом<sup>/14/</sup>, согласно которой после реакции  $R^* + SH \rightarrow RH^*$  должна еще произойти ферментативная репарация  $RH^*$ . При таком подходе находят объяснение факты уменьшения или исчезновения КЭ у репарационных мутантов и в то же время отражена роль SH-соединений в реализации КЭ. Вместе с тем, предположение о том, что реакция  $R^* + O_2 \rightarrow RO_2$  приводит клетку к гибели, противоречит тому обстоятельству, что выход летальных повреждений у *E.coli* на несколько порядков меньше, чем выход повреждений типа  $RO_2$ . Для устранения этого несоответствия в данном случае необходимо предположить одновременно репарацию  $RO_2$  и  $RH^*$ . Тогда репарация  $RH^*$  должна бы происходить экстремально быстро или не сопровождаться индукцией ОР<sup>/81,88/</sup>. К тому же, учитывая уменьшение КЭ у чувствительных мутантов /*tes*<sup>-</sup>, /*lex*<sup>-</sup>/, у них следовало бы ожидать нарушения репарации I, однако у данных мутантов нарушен медленный тип репарации<sup>/21, 34/</sup>. Кроме того, при таком подходе неясно, каким образом интерпретировать большие значения КЭ по сравнению с клетками дикого типа у *rol*<sup>-</sup>-мутантов.

С целью преодоления указанных противоречий, а также с учетом отличий в действии ультрафиолетового /УФ/ и  $\gamma$ -излучения на клет-

ку, в<sup>/24/</sup> была предложена гипотеза "двойной мишени", в предположении, что чувствительной мишенью в клетке является не только молекула ДНК, но и мембрана клетки, а именно - места связывания ДНК с мембраной. Авторы гипотезы полагают, что кислород оказывает усиливающее влияние при лучевом повреждении мембран клеток и защищающее при повреждении ДНК. Основанием для таких предположений послужили данные о подавлении синтеза ДНК в мембранных комплексах, выделенных из клеток при облучении *in vitro*<sup>/35/</sup>. Согласно полученным данным, максимальное подавление синтеза ДНК наблюдается через 40 мин. после  $\gamma$ -облучения, в то же время при действии УФ-радиации блок синтеза ДНК возникает непосредственно после облучения. При этом отмечено, что в исследованном диапазоне доз облучений  $\gamma$ -лучи ингибируют синтез ДНК на 95%, а УФ-облучение - на 50%. На основании этого был сделан вывод о существовании в клетке двух чувствительных мишеней, одна из которых не является ДНК и чувствительна к ионизирующим излучениям. Следует заметить, что корреляции между подавлением синтеза и снижением выживания облученных клеток не наблюдается. Например, при дозах  $\gamma$ -облучения, снижающих выживаемость клеток *E.coli*  $B_{g-1}$  на 37%, подавления синтеза ДНК практически не отмечается. Таким образом, данные о различиях в ингибирующем влиянии синтеза ДНК УФ и  $\gamma$ -облучения не являются убедительным аргументом в пользу существования в клетке двух чувствительных мишеней. В равной степени их можно объяснить различным характером индуцируемых повреждений ДНК при УФ- и  $\gamma$ -облучении и разной кинетикой их репарации. К тому же имеются доказательства, что угнетение синтеза ДНК в ДНК-мембранных комплексах при облучении *in vitro* не указывает на решающую роль в этом процессе повреждений мембран<sup>/38/</sup>. Предположение же о защитном действии кислорода на ДНК клеток при  $\gamma$ -облучении противоречит данным о выходе ОР и ДР ДНК в условиях аноксии, когда отмечается значительно меньший /примерно в 3 раза/ их выход<sup>/37/</sup>.

Изложенные выше представления о механизме КЭ были развиты для электромагнитных видов излучений, имеющих малые величины L. Для объяснения феномена уменьшения КЭ с ростом L в разное время было предложено несколько гипотез. Рассмотрим наиболее известные из них.

Первоначально, в соответствии с представлениями теории косвенного действия излучений, уменьшение КЭ с ростом L объясняли высокой плотностью продуктов радиолиза воды, образующихся в треках тяжелых частиц, которые в результате разложения приводят к образованию кислорода в среде. Поэтому предварительное удаление кислорода оказывается неэффективным, поскольку повреждение как в кислородных, так и в аноксических условиях являются максимальными<sup>/22/</sup>. Альтернативное объяснение снижению КЭ с увеличением L заключалось в том, что в треках плотноионизирующих частиц имеет место нехватка кислорода. Так как при нормальных условиях в воде в объеме с линейным размером ~20 нм имеется в среднем одна моле-

кула кислорода, а расстояние между ионизациями в треках тяжелых частиц намного меньше этой величины, то кислородозависимые повреждения не могут модифицироваться кислородом как в оксигенированных, так и в аноксических условиях. Наряду с указанными представлениями было выдвинуто другое объяснение уменьшению КЭ с возрастанием  $L$ . В<sup>4/</sup> было отмечено, что поскольку при прохождении тяжелых частиц через мишени клеток возникает одновременно большое количество ионизаций, то и в аноксических и кислородных условиях эти события вызывают максимально возможные повреждения, приводя клетки к гибели. Позднее эти представления были развиты в гипотезу "взаимодействующих радикалов"<sup>22/</sup>. Согласно данной гипотезе, при облучении вблизи клеточных мишеней образуются или "одиночные", или "множественные" радикалы. Количество последних увеличивается с возрастанием  $L$ . Предполагается, что "множественные радикалы" при кооперативном взаимодействии с клеточными мишенями приводят к образованию летальных повреждений, тогда как "одиночные радикалы" образуют летальные повреждения только при взаимодействии с кислородом. В свете указанных предположений находит объяснение, во-первых, возрастание чувствительности клеток с ростом  $L$  / поскольку увеличивается число "множественных событий", вызывающих летальный эффект / и, во-вторых, уменьшение КЭ / так как выход "одиночных событий", модифицируемых кислородом, уменьшается /. Однако данная гипотеза не выдержала экспериментальной проверки, поскольку возник ряд противоречий, касающихся изменения чувствительности клеток к излучениям с разной  $L$  и регистрируемыми при этом величинами КЭ.

Действительно, если предположить, что чувствительность клеток  $\lambda$  определяется вкладом в летальный эффект "одиночных"  $\lambda_s$  и "множественных событий"  $\lambda_d$  и наклон кривой выживания описывается как  $\lambda = f \cdot \lambda_s + (1 - f) \cdot \lambda_d$ , где  $f$  есть фракция "одиночных событий", то в таком случае  $\lambda_d > \lambda_s$  и  $f(L_2) < f(L_1)$ , если  $L_2 > L_1$ . Обозначим соотношения наклонов кривых выживания для излучений с  $L = L_1$  и  $L = L_2$  как  $R = \lambda_2 / \lambda_1$  и предположим, что количество летальных повреждений от одиночных актов передачи энергии, уменьшается в аноксических условиях в  $m$  раз. В таком случае для излучений с  $L_1$  и  $L_2 / i = 1, 2 /$  для кислородных условий имеем:

$$\lambda_1 = f_1 \lambda_s + (1 - f_1) \lambda_d, \quad /9/$$

а для условий аноксии:

$$\lambda_1 / m_1 = f_1 \lambda_s / m + (1 - f_1) \cdot \lambda_d, \quad /10/$$

где  $m_1$  - максимальное значение КЭ для излучений с  $L_1$  и  $L_2$ . Вычисляя  $\Delta\lambda$  для кислородных ( $\Delta\lambda_0$ ) и аноксических ( $\Delta\lambda_N$ ) условий, получаем:

$$\Delta\lambda_0 = \lambda_2 - \lambda_1 = (f_1 - f_2) \cdot (\lambda_d - \lambda_s), \quad /11/$$

$$\Delta\lambda_N = \lambda_2 / m_2 - \lambda_1 / m_1 = (f_1 - f_2) \cdot (\lambda_d - \lambda_s / m). \quad /12/$$

Поскольку  $m > 1$  и  $f_1 > f_2$ , а  $\lambda_d > \lambda_s$ , получаем, что

$$\Delta\lambda_N > \Delta\lambda_0 \quad /13/$$

или:

$$\lambda_1 \cdot (R / m_2 - 1 / m_1) > \lambda_1 \cdot (R - 1). \quad /14/$$

Перепишем далее /14/ в известное неравенство:

$$\lambda_2 / \lambda_1 = R < (1 - \frac{1}{m_1}) / (1 - \frac{1}{m_2}). \quad /15/$$

/15/ было подвергнуто обстоятельной экспериментальной проверке и выяснилось, что в подавляющем большинстве случаев оно не выполняется, а имеется обратное неравенство. Иными словами, гипотеза "взаимодействующих радикалов" оказалась несостоятельной.

С учетом этих обстоятельств, для объяснения зависимости КЭ от  $L$  была предложена гипотеза "образования кислорода в треке частицы"<sup>18/</sup>. В ее основе лежит предположение о том, что в треках частиц с высокой  $L$  образуется значительное количество кислорода, который, взаимодействуя с  $R^*$ , переводит их в летальные повреждения. Проверка гипотезы была выполнена с использованием двух подходов. Во-первых, оценить концентрацию кислорода в треке  $[O_2]$  можно на основе уравнения /1/. В таком случае постоянная  $K$  в /1/ изменится на

$$K' = K + [O_2] \quad /16/$$

и постоянная  $m$  изменится на

$$m' = m(K + [O_2]) / (m \cdot [O_2] + K). \quad /17/$$

Во-вторых, такую проверку можно провести путем элиминации переменной  $[O_2]$  в /16/, /17/. Это можно выполнить при наличии линейной зависимости  $1/m$  и  $1/m'$  в предположении, что  $K$  и  $K'$  постоянны при изменении  $m$  и  $m'$ :

$$1/m' = (K' - K) / K' + K / (K' \cdot m). \quad /18/$$

Оценки величины  $[O_2]$  с использованием указанных подходов были выполнены в<sup>32/</sup> и сопоставлены с прямыми измерениями концентрации кислорода в треках частиц. По данным<sup>37/</sup>, выход кислорода в треке  $G$  составляет  $G = 0,03$  молекулы/100 эВ для частиц с высокой  $L$ . Для излучений с  $L = 100$  кэВ/мкм  $G = 0,008$  молекулы/100 эВ. Расчеты величин  $[O_2]$  непосредственно после прохождения ионизирующих частиц в среде выполнены с помощью следующего уравнения:

$$[O_2] = G \cdot L / [60 \cdot \pi \cdot (r_0^2 + 4 \cdot D \cdot t)], \quad [M/l], \quad /19/$$

где  $r_0$  - диаметр трека частицы, нм,  $D = 2 \cdot 10^9$  нм<sup>2</sup>/с - коэффици-

ент диффузии кислорода в воде,  $t$  - время, с,  $L$ , кэВ/мкм и  $G$  - выход молекул кислорода на 100 эВ.

В результате проведенных исследований было выяснено, что концентрация кислорода в треках  $\alpha$ -частиц с энергией  $\sim 6$  МэВ и диаметром трека  $r_0 = 40$  нм составляет 2 мкм/л ( $G = 0,008$  молекулы/100 эВ), т. е. примерно такую же величину, которая была получена из радиобиологических экспериментов на основе уравнения /16/. Время, за которое кислород диффундирует на расстояние  $\sim 40$  нм, составляет  $\sim 10^{-7}$  с. Это время значительно меньше, чем время фиксации первичных повреждений в условиях аноксии, равное  $10^{-8}$  с /7/.

Рассмотрим более подробно кинетику образования кислорода в треке. Для аноксических условий, когда  $[O_2] = 0$ , на основании /2/ получаем:

$$[R']_t = [R']_0 \exp\{-(k_g + k_f) \cdot t\}. \quad /20/$$

Поскольку первичные повреждения в аноксических условиях фиксируются за  $10^{-8}$  с /20, 39, 40/, величину  $k_g + k_f$  можно оценить равной  $10^8$  с $^{-1}$ . Очевидно, что процесс фиксации первичных повреждений является более медленным по сравнению с кинетикой образования и диффузии кислорода в треке. Проведем далее оценку параметра  $k_0$  из уравнения /2/. Поскольку вероятность взаимодействия кислорода с первичными повреждениями примерно равна вероятности такого взаимодействия с SH-соединениями при  $[O_2] = K$  /половинном кислородном эффекте/, то  $k_0 \cdot [O_2] = 10^8$  с $^{-1}$  при  $[O_2] = K = 2$  мкм/л /32, 41, 42/, и в этом случае  $k_0 = 500$  мкм $^{-1}$  с $^{-1}$ . На основании величин этих параметров проведем расчет доли первичных повреждений, которые фиксируются кислородом, возникающим в треке. Расчет проведем для  $L = 50$  кэВ/мкм, когда уже наблюдается значительное уменьшение КЭ /в 2 раза и более /24, 26/, принимая  $G = 0,005$  /24, 28/,  $k_0 = 500$  мкм $^{-1}$  с $^{-1}$  дм $^3$  и  $D = 2 \cdot 10^9$  нм $^2$  с $^{-1}$  в соответствии с /38/. Ввиду того, что в аноксических условиях через 1 мс после облучения первичные повреждения фиксируются независимо от кислорода путем, ограничим расчет на время до  $t_0 = 0,01$  с и предположим, что в течение всего этого времени в мишени существует некоторое количество  $[R']_0$  повреждений, подлежащих фиксации. В таком случае доля фиксированных повреждений при  $L = 50$  кэВ/мкм будет:

$$\frac{[R_f]}{[R']_0} \leq \int_0^{t_0} k_0 \frac{G \cdot L}{60 \cdot \pi \cdot (r_0^2 + 4 \cdot D \cdot t)} dt = \frac{k_0 G \cdot L}{240 \cdot \pi \cdot D} \cdot \ln\left(1 + \frac{4 \cdot D \cdot t_0}{r_0^2}\right) \approx 10^{-8} \ll 1.$$

Из этого соотношения ясно, что диффузия кислорода из трека произойдет намного раньше, чем он сможет прореагировать с первичными радиационными повреждениями. Для того, чтобы кислород, образуемый в треке, оказал существенное влияние на реализацию летальных повреждений, определяющих возрастание зависимости  $D_0^{-1}(L)$  в аноксических условиях, величина интеграла /21/ должна

быть больше единицы. Для получения необходимого соответствия авторы, отстаивающие концепцию "кислорода в треке", вынуждены произвольно изменять значения параметров  $G$ ,  $k_0$  и  $D$  каждого на порядок /43/. Таким путем осуществляется подгонка теоретических данных для получения соответствия с экспериментальной зависимостью  $D_0^{-1}(L)$  в аноксических условиях. Однако очевидно, что такой подход не имеет под собой биофизических оснований. К тому же аргументы о совпадении теоретических кривых с экспериментальными неубедительны, поскольку при  $L \approx 100$  кэВ/мкм авторами не учитываются флуктуации энергии по чувствительным микрообъемам клеток.

На основании /18/ можно проверить справедливость гипотезы "кислорода в треке" и для быстрых нейтронов. Согласно /24/, постоянная  $K/K' = 0,77$  соответствует  $1/m' = 0,77 \cdot 1/m + 0,23$ . Однако оказывается, что эти данные с той же точностью можно аппроксимировать и другим уравнением, например,  $1/m' = 1,1 \cdot 1/m + 0,1$ , которое противоречит гипотезе. То есть данные, полученные в /24/, свидетельствуют лишь об общей тенденции уменьшения величины КЭ при облучении клеток нейтронами и приблизительно линейной зависимостью между величиной КЭ при нейтронном и  $\gamma$ -облучении. Аргументы гипотезы "кислорода в треке" становятся еще более сомнительными, если учесть, что для клеток дикого типа и репарационного мутанта, использованных в данных экспериментах, летальными событиями являются разные типы повреждений ДНК /16-19, 34/.

Таким образом, мы рассмотрели основные закономерности реализации КЭ, провели краткий анализ гипотез, объясняющих механизм его возникновения при действии на клетки излучений с разной  $L$ . На основании всего изложенного можно прийти к заключению о том, что к настоящему времени отсутствует концепция, непротиворечиво объясняющая многообразие проявлений этого универсального радиобиологического феномена.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Schwarz G. Münchener Med. Wochenschr. 1909, 56, p.1217-8.
- Holthusen H. Pflüger's Arch.Ges.Physiol. 1921, 187, p.1-24.
- Thoday J.M., Read J. Nature 1947, 160, p.608.
- Gray L.H. Radiat.Res. 1954, 1, p.189-213.
- Bacq Z., Alexander P. Fundamentals of Radiobiology, Butterworth, London, 1955.
- Alper T. Radiat. Res. 1956, 5, p.573-86.
- Michael B.D. et al. Radiat.Res. 1973, 54, p.239-51.
- Stratford I.J. et al. Int.J.Radiat.Biol. 1977, 32, p.447-55.
- Sapora O., Fielden E.M., Loverock P.S. Radiat.Res. 1977, 69, p. 293-305.
- Мясник М.Н., Скворцов В.Г. Соколов В.А. Радиобиология, 1982, 22, с.312-316.

11. Howard-Flanders P. In: Advances in Biological and Medical Physics. /Eds. C.A.Tobias, J.H.Lawrence/, Academic Press, New York, 1952, vol.VI.
12. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология, Атомиздат, М., 1973.
13. Neary G.J. Int.J.Radiat.Biol. 1965, 9, p.477-502.
14. Эйдуc Л.Х. Инф.Бюл. научного совета АН СССР по проблемам радиобиологии. Изд. АН СССР, М., 1983, 27, с.39-40.
15. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-82-928, Дубна.
16. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-82-882, Дубна.
17. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-82-883, Дубна.
18. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-82-929, Дубна.
19. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-82-884, Дубна.
20. Michael B.D. et al. K.B. Br.J.Cancer, 1978, 37, p.29-33.
21. Эйдуc Л.Х. Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучений, Атомиздат, М., 1972.
22. Alper T., Howard-Flanders P. Nature, 1956, 178, p.978-9.
23. Cullen B.M., Lansley I. Int.J.Radiat.Biol. 1974, 26, p.579-88.
24. Alper T. Cellular Radiobiology. Cambridge university press, Cambridge - London - New York - Melbourne, 1981.
25. Alper T., Moore J.L., Bewley D.K. Radiat.Res. 1967, 32, p.277-93.
26. Brustad T. Radiat.Res. 1961, 15, p.139.
27. Grigoryev J.G. et al. The Radiobiological Effects of Heavy Ions on Mammalian Cells and Bacteria. In: Life Science and Space Research. Acad.-Verlag, Berlin, 1973, p.247-259.
28. Harrop H.A. et al. Br.J.Radiol. 1978, 51, p.559.
29. Alper T. Int.J.Biol. 1961, 3, p.369-77.
30. Johansen I. et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1975, 72, p.167.
31. Town CH.D. et al. Radiat.Res. 1973, 55, p.334-345.
32. Alper T., Bryant P.E. Int.J.Radiat.Biol. 1974, 26, p.203-8.
33. Serna F.R., Samoylenko I.I. Biochem and Biophys.Research. 1975, 67, p.1415-21.
34. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. Радиобиология, 1981, 21, с.3-7.
35. Cramp W.A., Petrussek R. Int.J.Radiat.Biol. 1974, 26, p.277-84.
36. Безлепкии В.Г., Газиев А.И. Радиобиология, 1983, 23, с.3-8
37. Kampf G. Studia Biophysica. 1982, 88, p.87.
38. Baverstock K.F., Burns W.G. Nature, 1976, 260, p.316-18.
39. Shenoy M.A. et al. Radiat.Res. 1975, 62, p.498-512.
40. Watts M.E. et al. Int.J.Radiat.Biol. 1978, 33, p.195-9.
41. Johansen I., Gulbransen R., Pettersen R. Radiat.Res. 1974, 58, p.384-397.
42. Chapman J.D. et al. Int.J.Radiat.Biol.1974, 26, p.383-9.
43. Baverstock K.F., Burns W.G. Radiat.Res. 1981, 86, p.20-33.

Рукопись поступила в издательский отдел  
29 сентября 1983 года

Козубек С., Красавин Е.А. 19-83-685

Роль репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии /теоретический анализ/. Основные закономерности проявления кислородного эффекта

Рассматриваются основные закономерности реализации кислородного эффекта /КЭ/ при действии на клетки ионизирующих излучений разного качества: зависимость КЭ от парциального давления кислорода в среде, от физических характеристик излучения, условий культивирования клеток и репарационного генотипа. Проведен критический анализ гипотез, объясняющих механизм КЭ и его зависимость от линейной передачи энергии /L/ излучений. Показано, что ни гипотеза "взаимодействующих радикалов", ни альтернативная гипотеза "кислорода в треке" не в состоянии непротиворечиво объяснить главные закономерности проявления КЭ и, в первую очередь, его зависимость от L. На основании имеющихся экспериментальных данных проведена оценка выходов кислородозависимых повреждений в клетках. Показано, что вероятность фиксации радиационных повреждений ДНК кислородом, образующимся в треке частицы, крайне мала и не вносит существенного вклада в механизм реализации КЭ.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Kozubek S., Krasavin E.A. 19-83-685

The Role of DNA Repair in the Realization of Oxygen Effect in Bacteria *Escherichia Coli* Cells Irradiated with Various Types of Radiation. Basic Experimental Facts and Regularities.

Basic regularities of the oxygen effect realization after irradiating cells with various particles are considered: the dependence of OER on the oxygen pressure, the physical characteristics of ionizing radiation, the culture conditions, and the repair possibilities of given cell strain. A critical look at the hypotheses explaining the mechanism of the oxygen effect is given. It is shown, that neither the hypothesis of "interacting radicals" nor the alternative "oxygen in track" hypothesis explain the main features of the oxygen effect, in the first place the dependence of OER on the linear energy transfer of the given radiation. On the basis of available experimental data, the estimation of the yield of oxygen-dependent injuries fixed in the track of heavy particle, is given. The induction of injuries fixed by the oxygen formed in the track of a heavy particle is shown to be negligible. This process does not greatly contribute to diminishing of OER values with increasing LET.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградовой