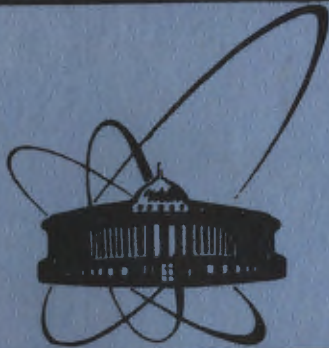


2/IV-84



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

1678/84

19-83-883

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)

Зависимость кислородного эффекта от ЛПЭ.
Кислородный эффект
в условиях влияния
химических радиомодификаторов

Направлено в журнал "Радиобиология"

1983

В^{1/} мы рассмотрели основные закономерности реализации кислородного эффекта /КЭ/ у разных штаммов *E. coli* при γ -облучении в присутствии аноксических сенсibilизаторов и сульфгидрильных радиопротекторов. Было показано, что в условиях влияния сенсibilизаторов можно ожидать возрастания выхода не восстанавливаемых быстрым типом репарации и не модифицируемых кислородом повреждений (OP_1^{ir}) ДНК. Это приводит к увеличению чувствительности в аноксических условиях некоторых штаммов *E. coli* /клеток дикого типа, rec^- , uvr^- -мутантов/ и в ряде случаев /у rec^-uvr^- -мутантов/ - к появлению "обратного" КЭ. Вместе с тем у $pol A^-$ -мутанта, как это следует из развиваемых представлений, в аноксических условиях не должно наблюдаться изменения чувствительности в присутствии сенсibilизаторов, что действительно имеет место в эксперименте^{2/}.

При анализе радиозащитных эффектов аминотиолов в кислородных и аноксических условиях был сделан вывод о том, что указанные агенты реализуют свое защитное действие как на уровне первичных физико-химических реакций, так и на уровне ферментативных процессов, связанных с репарацией повреждений ДНК^{1/}. Радиозащитные свойства аминотиолов, реализуемые на физико-химическом уровне, как можно ожидать, в наибольшей степени проявляются при облучении клеток в аноксических условиях. В присутствии кислорода защитное действие этих препаратов обусловлено в основном их влиянием на ферментативные процессы репарации повреждений ДНК^{3/}.

На основе развитых представлений, а также с учетом особенностей индукции и репарации повреждений ДНК в кислородных и аноксических условиях излучениями, различающимися по величине линейной передачи энергии (L)^{4/}, рассмотрим основные закономерности реализации КЭ у разных штаммов *E. coli* в зависимости от L при действии химических радиомодификаторов. Прежде чем приступить к анализу зависимости радиочувствительности (D_0^{-1}) бактерий *E. coli* от L в условиях влияния радиомодификаторов, суммируем наши представления, касающиеся закономерностей индукции основных типов повреждений ДНК в указанных условиях.

В^{1/} показано, что выход OP_1^{ir} , равный $0,038 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$, при γ -облучении клеток в присутствии сенсibilизатора /НППН/ в кислородных условиях должен возрастать до $0,083 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$ при аноксическом облучении клеток. Соответственно возрастает в аналогичных условиях и суммарный выход OP_1 с $0,156 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$ до $0,25 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$. Причем наибольший вклад в возрастание выхода OP_1 вносят OP_1^{ir} /выход OP_1 в присутствии НППН возрастает на ~30%, а OP_1^{ir} - более чем на 100%/.

Ранее нами была проведена оценка выходов OP , возникающих в результате двойных актов передачи энергии в одной цепи ДНК,

в зависимости от $L^{1/4}$. Заметим, что для получения соответствия в рамках модели между зависимостью КЭ(L) для $гес^-$ -мутанта и теоретически определяемым выходом OP_1^{ir} , мы принимали фракцию OP_1 , возникающих в результате двойных актов передачи энергии, равной 30%, причем 10% из этого количества OP_1^{ir} приходится на долю повреждений, возникающих от отдельных актов передачи энергии, и 20% обуславливается взаимодействием этих актов. С учетом того, что при γ -облучении в присутствии НППН выход OP_1^{ir} возрастает в 2,2 раза, будет возрастать и доля OP_1^{ir} , образующихся из ОР в результате двух актов передачи энергии. И поскольку одиночные акты передачи энергии приводят к образованию OP_1^{ir} приблизительно в 5% случаев^{4/}, а вклад OP_1^{ir} , возникающих из двух актов передачи, составляет 10%, то в присутствии НППН можно ожидать увеличения фракции OP_1^{ir} от двух актов передачи до суммарного количества, равного $10\% \cdot 2,2 + 20\% = 42\%$.

В^{5/} показано, что выход прямых двухнитевых разрывов /ПДР/ ДНК в зависимости от концентрации кислорода в среде будет возрастать медленнее по сравнению с ОР. Аналогичную зависимость ПДР от концентрации кислорода можно ожидать и в условиях влияния аноксического сенсibilизатора, поскольку величина параметра b , отражающего вероятность образования OP_1 на одной нити ДНК, в аноксии составляет $0,015^{4/}$, а в присутствии аноксического сенсibilизатора - $0,016$.

С учетом определенных величин выходов повреждений ДНК можно рассчитать радиочувствительность разных штаммов *E. coli* в условиях влияния аноксических сенсibilизаторов. Результаты таких расчетов приведены в табл. 1. Как можно видеть, при γ -облучении величины фактора изменения дозы /ФИД/-наибольшие для $гес^-$ -мутанта. Это связано с тем, что в присутствии НППН возрастает выход OP_1^{ir} , оказывающих существенное влияние на радиочувствительность $гес^-$ -мутанта, не способного к медленному восстановлению. У $rol A^-$ -мутанта величина ФИД меньше, так как аноксические сенсibilизаторы существенно не влияют на суммарный выход $OP_1^{1/}$. Для излучения с высокой L в условиях действия НППН происходит нивелирование радиочувствительности всех рассматриваемых штаммов *E. coli*. Как можно видеть, для клеток дикого типа значения ОБЭ, наибольшие в аноксических условиях, уменьшаются в присутствии НППН. Это объясняется увеличением выхода энзиматических ДР /ЭДР/ ДНК при γ -облучении в условиях влияния НППН, что влечет за собой возрастание чувствительности клеток к γ -облучению^{1/}. Некоторое повышение чувствительности к γ -облучению в присутствии НППН наблюдается и у $гес^-$ -мутанта. Данное обстоятельство объясняется возрастанием роли флуктуаций энергии излучений по чувствительным микрообъемам клеток, что приводит к уменьшению величины ОБЭ излучений для $гес^-$ -мутанта.

Рассмотрим далее влияние сульфгидрильных радиопротекторов на выход повреждений ДНК в клетках при действии излучений, различаю-

Таблица 1

Радиочувствительность клеток и величины относительной биологической эффективности /ОБЭ/ частиц с $L = 20$ кэВ/мкм и $E = 4$ МэВ/нуклон при облучении разных штаммов *E. coli* в аноксических условиях без НППН /АУ/ и в присутствии аноксического сенсibilизатора /АУ + НППН/

Штамм	Радиочувствительность ($D_{0.1}^{-1}$), Гр ⁻¹						О Б Э	
	γ -лучи		L = 20 кэВ/мкм					
	АУ	АУ+НППН	ФИД*	АУ	АУ+НППН	ФИД*	АУ	АУ+НППН
Дикий тип	0,0036	0,0054I	1,6I	0,0112	0,0146	1,30	3,3	2,7
$гес A^-$	0,0485	0,0888	1,83	0,0458	0,0614	1,34	0,9	0,7
$rol A^-$	0,0229	0,031I	1,36	0,0265	0,0324	1,22	1,2	1,0

$$* \text{ ФИД} = \frac{(D_{0.1}^{-1})_{\text{АУ+НППН}}}{(D_{0.1}^{-1})_{\text{АУ}}}$$

щихся по L . Как отмечено в ^{1/}, указанные соединения в кислородных условиях неспособны конкурировать с молекулами кислорода в процессе образования первичных повреждений ДНК при облучении, и их присутствие в клетке не должно приводить к снижению выхода первично индуцируемых повреждений. В условиях же аноксии их выход, как можно ожидать, должен уменьшаться за счет более эффективного восстановления на физико-химическом уровне. При действии излучений с высокой L также можно ожидать восстановления на физико-химическом уровне повреждений, индуцируемых одиночными актами передачи энергии ^{4/}. Модифицируемость повреждений, возникающих в результате двойных актов передачи энергии, в этих условиях уменьшается. Существенного изменения выхода ПДР ДНК в условиях влияния аминотиолов по причинам, рассмотренным в ^{4/}, не ожидается.

В ^{1/} мы обсуждали возможные варианты модификации радиочувствительности разных штаммов *E. coli* при γ -облучении в условиях действия гипотетического радиопротектора, защитное действие которого реализуется только на уровне первичных физико-химических реакций. Защитное влияние такого "аноксического радиопротектора" должно проявляться лишь при облучении клеток в условиях аноксии. Причем наибольший защитный эффект должен иметь место у pol^- -мутанта, меньший - у клеток дикого типа и Gam^+ -мутанта, а на чувствительность rec^- -мутанта его влияние должно быть минимальным ^{1/}. Поскольку в кислородных условиях чувствительность разных штаммов *E. coli* в присутствии "аноксического радиопротектора" не должна меняться, величина КЭ в этом случае будет возрастать для клеток pol^- -мутанта и не должна меняться для rec^- -мутанта. С увеличением L наблюдается снижение КЭ для всех указанных штаммов *E. coli* /рис.1а/, причем наиболее резкое снижение характерно для клеток pol^- -мутанта. В диапазоне $L \geq 100$ кэВ/мкм величина КЭ в этих условиях примерно равна 1 для всех штаммов *E. coli*.

На рис.1 представлены также результаты расчетов зависимости КЭ(L) для *E. coli* в обычных условиях и в присутствии аноксического сенсibilизатора. Расчет проведен при значениях параметра

$$x = N_{OP1}^{HPPH} / N_{OP1}^{ir} = 3^{1/2}. \text{ Как можно видеть, у } pol^- \text{-мутанта ха-}$$

рактер зависимости КЭ(L) в обычных условиях и в присутствии НППН примерно одинаков, отмечается лишь небольшая сенсibilизация клеток НППН в диапазоне малых значений L . Клетки же дикого типа и Gam^+ -мутанта выявляют существенное уменьшение КЭ в присутствии НППН в области малых L . Для данных штаммов характерно отчетливое плато на кривой КЭ(L) до значений $L \leq 10$ кэВ/мкм. Для rec^- -мутанта ожидается "обратный" КЭ в области $L \leq 20$ кэВ/мкм, а при дальнейшем повышении L КЭ $\cdot 1$. Клеткам uvr^- -мутанта также существенно проявление "обратного" КЭ при $L \leq 10$ кэВ/мкм, который с возрастанием L изменяется на положительный КЭ при $L > 10$ кэВ/мкм.

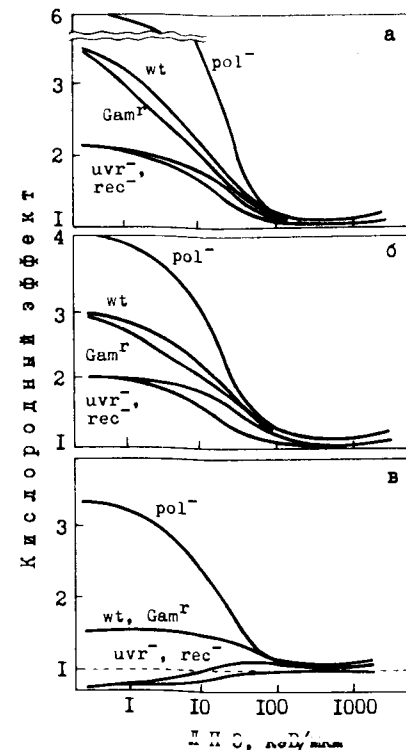


Рис.1. Зависимость КЭ от L у разных мутантов *E. coli* в присутствии "аноксического радиопротектора" /а/, в обычных условиях /б/ и в условиях влияния аноксического сенсibilизатора /в/. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: величина КЭ.

Резкое падение зависимости КЭ(L), характерное для pol^- -мутанта, с ростом L объясняется, с одной стороны, увеличением выхода OP_1^{ir} при повышении L , с другой - возрастанием флуктуаций энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток. Особенности зависимости КЭ(L) для клеток дикого типа и Gam^+ -мутанта в области плато могут объясняться, во-первых, возрастанием выхода OP_1^{ir} в области малых значений L , что приводит к существенному снижению КЭ, во-вторых - изменением типа детальных повреждений с увеличением L -возрастанием выхода ПДР ДНК. Для ПДР величина КЭ

почти не меняется в присутствии сенсibilизатора с возрастанием L и составляет $\sim 2^{1/5}$. Причины, обуславливающие возникновение "обратного" КЭ у uvr^- -мутанта в области низких значений L , мы рассмотрели ранее ^{1/}. Уменьшение "обратного" КЭ с ростом L объясняется возрастанием флуктуаций энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток и повышением выхода ПДР ДНК, не модифицируемых НППН.

Поскольку с возрастанием L величина КЭ снижается и, как можно ожидать, уменьшается влияние аноксических сенсibilизаторов, представляет интерес сравнить характер изменения модифицирующего влияния обоих факторов с возрастанием L . На рис.2а представлены результаты расчетов зависимости величины сенсibilизирующего эффекта от величины КЭ для разных штаммов *E. coli* при действии излучений с разной L . Для rec^- -мутанта по мере уменьшения КЭ с возрастанием L в одинаковой степени снижается и модифицирующее влияние аноксического сенсibilизатора. Аналогичная направленность характерна и для клеток дикого типа. У клеток же pol^- -мутанта с увеличением L модифицирующее действие сенсibilизатора /хотя и небольшое по абсолютной величине/ проявляется и при более высоких L , в то же время КЭ резко снижается. Характер по-

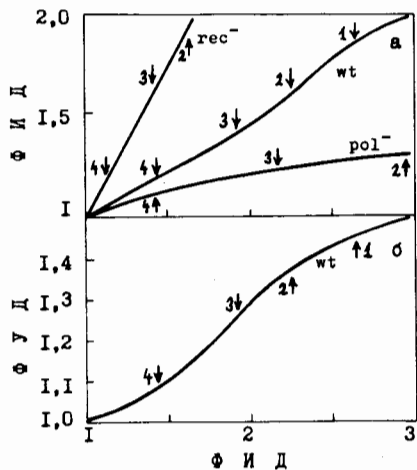


Рис.2. Зависимость эффективности модифицирующего влияния аноксического сенсibilизатора /а/ и защитного действия "репарационного радиопротектора" /б/ от величины КЭ у разных штаммов *E. coli* при действии излучений с разной L. Стрелками показаны: 1 - L = 2 кэВ/мкм, 2 - L = 8 кэВ/мкм, 3 - L = 20 кэВ/мкм, 4 - L = 50 кэВ/мкм. По оси абсцисс: величина КЭ /а - при ФИД=1 начальное условие соответствует аноксии; б - при ФИД=1 начальное условие соответствует нормальной оксигенации/; по оси ординат: величина ФИД в присутствии сенсibilизатора /а/, величина ФУД в присутствии радиопротектора.

лученных зависимостей может объясняться следующими причинами. Во-первых, с возрастанием L увеличивается выход первичных повреждений ДНК в результате двойных актов передачи энергии, и сенсibilизатор с большой вероятностью может фиксировать эти события в OP_{12}^1 . Во-вторых, с увеличением L возрастает флуктуация энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток, что приводит к более резкому снижению их чувствительности с повышением L при больших величинах D_0^{-1} . В-третьих, для клеток дикого типа с увеличением L возрастает выход ПДР, не модифицируемых сенсibilизатором.

Так же, как и в случае аноксического сенсibilизатора, представляет интерес рассмотрение вопроса о том, каким образом будет изменяться эффективность защитного действия протектора, влияющего на ферментативную репарацию /и, следовательно, защищающего в кислородных условиях/ в зависимости от модифицирующего влияния аноксии при разных величинах L. Как можно видеть из рис.2, для клеток дикого типа с уменьшением защитного влияния аноксии при возрастании L отмечается и снижение защитного действия радиопротектора. Модифицирующее влияние "репарационного радиопротектора" в области малых L уменьшается с возрастанием L несколько медленнее, чем защитное влияние аноксии. При дальнейшем же увеличении L, поскольку возрастает выход ПДР ДНК, наблюдается более быстрое снижение защитного влияния радиопротектора, чем защитного действия аноксии. Теоретическая зависимость величины КЭ от L в присутствии радиопротектора представлена на рис.3. Расчет проведен для клеток дикого типа в предположении, что механизм защитного действия радиопротектора реали-

Таблица 2
Влияние цистеина на радиочувствительность бактерий *E. coli* при действии излучений с разной L, теоретические и экспериментальные данные/

Вид излучения	L, кэВ/мкм	E, МэВ/нуклон	Радиочувствительность (D_0^{-1}), Гр ⁻¹		ФУД теорет. данные	ФУД эксперим. данные		
			Без протектора	С цистеином				
			теоретич. данные	эксперим. данные				
γ -лучи	0,3	-	0,0162	0,0166	0,0054	0,0069	3,0	2,9±0,3
H ⁺ _I	0,24	645	0,0162	0,0161	0,0054	0,0050	3,0	2,9±0,3
H ⁺ _{II}	150	6,9	0,0164	0,0122	0,0157	0,0106	1,04	1,1±0,1
Ct ² _{I2}	230	5,8	0,0112	0,0105	0,0109	0,0085	1,03	1,1±0,1
Ne ⁺ ₂₀	500	8,4	0,0084	0,0067	0,0079	0,0058	1,06	1,2±0,1

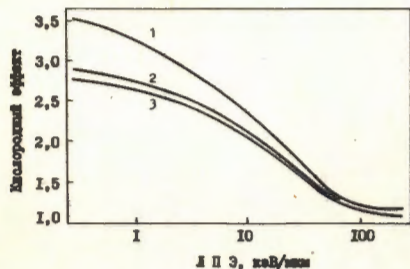


Рис.3. Зависимость КЭ от L у клеток дикого типа в присутствии "аноксического радиопротектора" /1/, в обычных условиях /2/ и в присутствии "репарационного радиопротектора" /3/. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: величина КЭ.

зается либо только на уровне физико-химических реакций, либо на уровне ферментативных процессов репарации ДНК. Как можно видеть, КЭ в присутствии "аноксического" радиопротектора резко выражен при действии излучений с малой L и наоборот, протектор, работающий на уровне ферментативной репарации, снижает величину КЭ. С возрастанием L происходит падение величин КЭ во всех рассмотренных случаях.

В рамках развитых модельных представлений проведем далее сопоставление теоретических и экспериментальных^{16/} данных, касающихся радиозащитного влияния β -меркаптоэтиламина на выживаемость бактерий *E. coli* при действии излучений с разной L . Как можно видеть из табл.2, защитное действие протектора, резко выраженное при γ -облучении клеток, практически исчезает с возрастанием L . Следует отметить хорошее соответствие экспериментальных и теоретических данных, полученных на основании модели.

Таким образом, мы рассмотрели основные закономерности реализации КЭ в условиях влияния модифицирующих факторов при действии излучений с разной L . На основании изложенного можно сделать вывод о том, что характер зависимости КЭ(L) в присутствии радиомодификаторов в значительной степени определяется репарационным генотипом клетки. С учетом этого можем перейти к рассмотрению роли баланса систем репарации клеток *E. coli* в их радиочувствительности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-743, Дубна, 1983.
2. Alper T. Cellular Radiobiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge-London-New York-Melbourne, 1981.
3. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с. 548-555.
4. Козубек С., Красавин Е.А., ОИЯИ, 19-83-744, Дубна, 1983.
5. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-788, Дубна, 1983.
6. Grigoriev Ju.G. et al. In Life Sciences and Space Research, Acad-Verlag, Berlin, 1973, p. 247-259.

Рукопись поступила в издательский отдел
23 декабря 1983 года.

Козубек С., Красавин Е.А. 19-83-883
Роль репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у бактерий *ESCHERICHIA COLI* при действии излучений с разной линейной передачей энергии /теоретический анализ/. Зависимость кислородного эффекта от ЛПЭ. Кислородный эффект в условиях влияния химических радиомодификаторов

Рассматриваются основные закономерности реализации кислородного эффекта /КЭ/ у разных штаммов *E. coli* при действии ионизирующих излучений разного качества (L) в условиях влияния радиопротекторов /РП/ и аноксических сенсibilizаторов /АС/. Показано, что КЭ в присутствии РП имеет наибольшие значения в области малых значений L . С возрастанием L для всех рассмотренных штаммов *E. coli* КЭ снижается до ~ 1 . В условиях влияния АС характер зависимости КЭ (L) для *pol A*⁻ мутанта близок к зависимости, реализуемой в обычных условиях. Для *uvr*⁻ мутанта в присутствии АС ожидается трансформация "отрицательного" КЭ, выявляемого в области малых L , в слабо выраженный положительный КЭ. Проведено сопоставление теоретической зависимости КЭ (L) с экспериментально полученной для *E. coli* В. Отмечено хорошее соответствие теоретических и экспериментальных данных.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Kozubek S., Krasavin E.A. 19-83-883
The Role on DNA Repair in the Realisation of Oxygen Effect In Bacteria *Escherichia Coli* Irradiated with Various Types of Radiation. The Dependence of the Oxygen Effect on LET. The Oxygen Effect in the Presence of Chemical Radiomodifiers

Basic regularities of the oxygen effect realisation for different mutants of *E. coli* irradiated by radiation of different LET in the presence of anoxic sensibilizers (AS) and radioprotectors are considered. The value of oxygen enhancement ratio (OER) is greatest for low values of LET. The greater is LET of the radiation the smaller is OER for all strains of *E. coli*. OER turns to 1 for high LET. The OER (LET) dependence in the presence of AS does not differ from that without sensibilizers in the case of *pol A*⁻ mutant. In the case of *uvr*⁻ mutants the value of OER is less than 1 for low LET radiation and increases with increasing LET to values greater than 1 ("negative" OE turns to "positive"); then it turns to 1 again. Theoretical dependence OER/LET is compared with experimental values determined for *E. coli* В. Good agreement of the theoretical and experimental values can be demonstrated.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С. Виноградовой.