

2/IV-84



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

1679/84

19-83-884

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)**

Баланс систем репарации
и радиочувствительность клеток

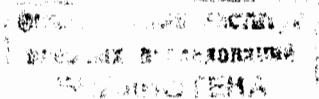
1983

Как известно, ферменты репарации у *E. coli*, осуществляющие деструкцию и ресинтез поврежденных участков ДНК, находятся в конкурирующих взаимоотношениях^{/1/}. Характер этих взаимоотношений можно понять на основе теории "репарационного баланса", разработанной С.Е.Бреслером^{/2/}. Согласно развитым представлениям, деградация ДНК является необходимым этапом репарации, предшествующим ресинтезу нарушенной структуры ДНК. Конкурирующие взаимоотношения разных типов ферментов репарации создают возможность изменения "репарационного баланса" либо путем повышения активности деструктивных ферментов - нуклеаз, либо это изменение сопряжено с возрастанием деятельности полимераз, осуществляющих процессы ресинтеза. Сдвиг "репарационного баланса" в ту или иную сторону отражается на величине чувствительности клеток к γ -облучению. Например, подавление активности эндо- и экзонуклеаз радиопротекторами создает условия для более эффективной работы полимераз и приводит к повышению радиорезистентности клеток^{/3/}. Из общих соображений можно сделать вывод, что сдвиг "репарационного баланса" у *E. coli*, по-видимому, отражается как на общем объеме восстановительных процессов в клетке, так и на эффективности работы разных типов репарации - быстрой и медленной системах восстановления. Есть основания полагать, что при подавлении медленного (III), зависящего от ростовой среды типа репарации, происходит определенное "переключение" быстрого (II) типа репарации в более напряженный режим работы, направленный на компенсацию возникающего дефекта. Например, у rec^- -мутанта, лишенного репарации III, быстрое восстановление при γ -облучении осуществляется не в меньшем объеме по сравнению с клетками дикого типа, а даже в несколько большем^{/4/}.

На основе развитых нами модельных представлений^{/5-10/} рассмотрим роль баланса систем репарации ДНК в радиочувствительности клеток *E. coli* в условиях, модифицирующих эффективность работы восстановительных систем.

1. РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК И БАЛАНС СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ

В^{/6/} главные этапы индукции и репарации основных типов повреждений ДНК в кислородных и аноксических условиях мы рассмотрели в виде схемы, описываемой экспериментально определяемыми параметрами. Из этой схемы видно, что при изменении параметров q_1 , q_2 , q_3 и p_1 , p_2 и p_3 - вероятностей индукции и репарации в единицу времени разных типов повреждений ДНК /при по-



стоянстве выходов прямых двухнитевых разрывов/ПДР/ ДНК и однонитевых разрывов, не восстанавливаемых репарацией II и не модифицируемых кислородом / OP_1^{ir} //, одинаковый выход летальных для *E.coli* дикого типа событий может достигаться разными путями. Возрастание вероятностей q , отражающих процессы, связанные с деятельностью эндо- и экзонуклеаз, в рамках модели может быть формально компенсировано увеличением до некоторого значения параметров p , отражающих полимеразную активность клеток. Наоборот, уменьшение параметров q может компенсироваться уменьшением параметров p .

Известно, что медленный тип репарации в отличие от быстрого зависит от среды роста клеток $1/1$. Поэтому в условиях бедной среды объем репарации III может уменьшаться. Репарация II, не зависящая от ростовой среды, по-видимому, может в некоторой степени компенсировать это снижение без изменения радиочувствительности (D_0^{-1}) клеток. Проведем модельный анализ указанной ситуации в рамках развиваемых представлений.

В соответствии с $1/6$ радиочувствительность клеток дикого типа описывается следующим уравнением:

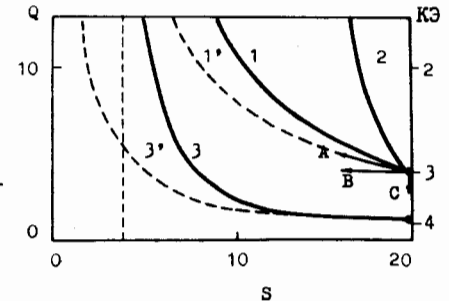
$$D_0^{-1} = \frac{N_{OP_1^r} + N_{OP_1^{ir}}}{S} = \frac{N_{OP_1^r}}{Q \cdot S} + \frac{N_{OP_1^{ir}}}{S} + N_{ПДР}, \quad /1/$$

где $N_{OP_1^r}$ - выход одонитевых разрывов /OP/ первого типа, восстанавливаемых репарацией II; $N_{OP_1^{ir}}$ - выход OP, не восстанавливаемых репарацией II; $N_{ПДР}$ - выход прямых двухнитевых разрывов /ДР/ ДНК; Q и S - коэффициенты, отражающие эффективность работы репараций II и III $1/6$. Предположим, что в результате изменений условий среды роста произошло уменьшение объема репарации III, т.е. параметр S приобрел меньшие значения за счет снижения вероятности p_3 . При условии, что $D_0^{-1} \approx const$, вероятность q_2 должна уменьшаться. При малых изменениях величины D_0^{-1} в некоторой области значений p_3 и q_2 можем предположить $q_2 \sim p_3$. Поскольку $Q \sim p_2/q_2$ и $S \sim p_3/q_3$, то $Q \cdot S = const$, и общий объем репарации повреждений не меняется. Чувствительность клеток к облучению, как это следует из /1/, определяется выходом OP_1 , OP_1^{ir} и ПДР. При увеличении $N_{OP_1^r}$ видно, что $D_0^{-1} \sim N_{OP_1^r}/Q \cdot S$, т.е. радиочувствительность будет оставаться постоянной. При возрастании же выхода OP_1^{ir} /например, в присутствии аноксического сенсibilизатора/ D_0^{-1} будет увеличиваться по мере уменьшения S . Возрастание выхода ПДР ДНК /что имеет место при действии излучения с высокой линейной передачей энергии (L)/ делает несущественными изменения параметров Q и S в величине D_0^{-1} .

На рис.1 представлена зависимость Q от S при условиях $Q \cdot S = const$ для двух случаев. Кривая $1'$ соответствует начальным значениям $Q = 3,5$; $S = 2,0$; кривая $3'$ - значениям $Q = 1$; $S = 20$. По мере уменьшения S /при подавлении медленной репа-

рации - направление А/ будет возрастать величина Q . Как указывалось выше, чувствительность клеток при подавлении репарации III не будет изменяться в некотором диапазоне значений Q и S . Это хорошо можно видеть при сравнении кривых $1'$; 1 и $3'$; 3 , поскольку кривые 1 и 3 описывают зависимости, соответствующие одинаковым величинам D_0^{-1} /при уменьшении параметра S величина Q возрастает так, что D_0^{-1} остается постоянной/. Кривая 2 соответствует постоянной величине D_0^{-1} при облучении клеток в аноксических условиях. Как можно видеть, характер зависимости, описываемой данной кривой, резко отличается от зависимости, описываемой кривой $1'$. Это различие обусловлено возрастанием в аноксических условиях вклада OP_1^{ir} в летальный эффект. Подавление медленной репарации не может быть компенсировано в данном случае возрастанием объема репарации II, поскольку быстрый тип восстановления не способен репарировать OP_1^{ir} . Уменьшение объема репарации III /направление В на рис.1/ приводит к отклонению от кривых 1 и 2 , что отражает возрастание радиочувствительности клеток. Стрелкой С показано уменьшение объема быстрой репарации, которое также приводит к возрастанию радиочувствительности.

Рис.1. Модификация радиочувствительности клеток дикого типа при уменьшении объема медленной репарации и компенсаторном возрастании объема быстрой репарации. Кривые 1 и 3 соответствуют постоянным значениям радиочувствительности клеток, равным 100 и 30 Гр. Кривые $1'$ и $3'$ - условию $Q \cdot S = const$. При больших величинах параметра S кривые 1 и $1'$, 3 и $3'$ отражают одинаковую радиочувствительность при условии $Q \cdot S = const$. С уменьшением S различия в радиочувствительности, отражающей одинаковый объем репарации, увеличиваются. В условиях аноксии /кривая 2/ отмечается резкое возрастание радиочувствительности при небольшом уменьшении объема медленной репарации. Возрастание объема быстрой репарации не может компенсировать снижения репарации III. Увеличение объема репарации II во всех случаях приводит к снижению КЭ. А - $Q \cdot S = const$; В - уменьшение объема медленной репарации; С - уменьшение объема быстрой репарации. По оси абсцисс: величина параметра S , по оси ординат: величина параметра Q /слева/, величина КЭ /справа/.



Поскольку параметр Q однозначно связан с величиной кислородного эффекта /КЭ/, изменение параметров Q и S /в направлении А, В и С/ будет иметь различное влияние на величину КЭ. В случае А наблюдается некоторое уменьшение КЭ, в случае В

/возрастание параметра q_3 / величина КЭ не меняется, и в случае С /уменьшение параметра p_2 / КЭ возрастает. По характеру изменения величин КЭ можно судить об особенностях влияния факторов среды на репарационные процессы быстрого и медленного типов.

Рассмотрим далее более подробно вопрос о влиянии медленного типа репарации на чувствительность клеток к γ -облучению. Существуют два варианта уменьшения объема репарации III: вариант 1 соответствует случаю, когда уменьшается вероятность p_3 без изменения вероятности q_3 ; вариант 2 соответствует случаю возрастания вероятности q_3 . Оба варианта могут быть реализованы у клеток дикого типа, $rol A^-$ и uvr^- -мутантов, но не у rec^- -мутанта, имеющего дефект в системе медленного восстановления. Как известно, ингибитором медленного восстановления является 2,4-динитрофенол^{/11/}. С помощью этого агента можно проверить, какой из указанных вариантов реализуется в клетке. Согласно^{/11/}, динитрофенол /ДНФ/ в 1,5 раза увеличивает чувствительность к γ -облучению клеток дикого типа, $rol A^-$ и uvr^- -мутантов, но не влияет на чувствительность rec^- -мутанта. Поскольку ДНФ не повышает чувствительности rec^- -мутанта и одновременно сенситивизирует $rol A^-$ -мутант с такой же величиной фактора изменения дозы /ФИД/, что и клетки дикого типа, можно сделать вывод о том, что ДНФ подавляет репарацию III. Реализацию варианта 1 или варианта 2 в условиях влияния ДНФ можно проверить по характеру кинетики репарации метастабильных состояний /МС/ методом эласто-вискозиметрии^{/12/}. На рис.2 представлена зависимость дозы γ -облучения, при которой в среднем на геном регистрируется один ДР ($D_{\overline{DP}}$), от времени пострadiaционной инкубации клеток при облучении в обычных условиях /кривая 1^{/12/} и в присутствии ДНФ /кривые 2,3/. Зависимость, описываемая кривой 2, соответствует варианту 2, а кривая 3 - варианту 1. Можно заметить, что выход на плато кривых 1 и 2 происходит примерно в тот же период пострadiaционной инкубации клеток. В то же время кривая 3 выходит на плато в более поздний период. Это связано с тем, что при уменьшении вероятности p_3 /вариант 1/ уменьшается скорость элиминации МС. В случае 2 эта скорость остается такой же, как и в отсутствие ДНФ.

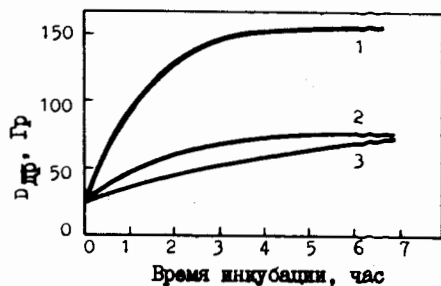


Рис.2. Зависимость величины $D_{\overline{DP}}$ от времени пострadiaционной инкубации клеток при облучении в обычных условиях /1/ и в присутствии ДНФ /2,3/. Пояснения в тексте. По оси абсцисс: время пострadiaционной инкубации, ч; по оси ординат: величина $D_{\overline{DP}}$, Гр.

2. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РАДИОПРОТЕКТОРОВ И БАЛАНС СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ

В^{/8/} при рассмотрении механизма защитного действия аминотиолов у *E.coli* при γ -облучении мы отмечали, что их влияние не может реализоваться только на уровне первичных физико-химических реакций. В пользу такого вывода свидетельствует ряд обстоятельств. Во-первых, известно, что защитное действие аминотиолов генетически детерминировано, указанные агенты защищают только клетки дикого типа, но практически не оказывают влияния на выживаемость чувствительных мутантов^{/1/}. Во-вторых, радиозащитное действие этих препаратов в одинаковой степени проявляется как при облучении клеток в кислородных условиях, так и в условиях аноксии, хотя в кислородных условиях их защитное влияние должно бы быть менее выраженным, поскольку константы скоростей реакций аминотиолов с радикалами молекул-мишеней существенно ниже, чем у молекул кислорода. В-третьих, трудно связать защитное действие радиопротекторов с развитием внутриклеточной гипоксии, поскольку известно, что защитный эффект /несколько менее выраженный/ наблюдается и при введении протекторов непосредственно после облучения^{/1/}. К тому же, если принять гипоксический механизм действия радиопротекторов, то следует ожидать и выраженного защитного влияния аминотиолов на клетки $rol A^-$ -мутанта, поскольку величина КЭ у данного штамма больше, чем у клеток дикого типа. Радиозащитное действие аминотиолов на уровне первичных физико-химических реакций, как было показано в^{/8/}, может в определенной степени реализоваться лишь при облучении клеток в аноксических условиях.

У клеток дикого типа защитное действие, реализуемое на уровне ферментативной репарации в аноксических условиях, должно уменьшаться^{/8/}. Постоянные значения факторов уменьшения дозы /ФУД/ радиопротекторов, независимые от концентрации кислорода в среде, свидетельствуют о "переключении" механизма их защитного влияния в аноксических условиях на физико-химический уровень. Одинаковые величины ФУД протекторов при изменении парциального давления кислорода будут сохраняться, если будет выполняться условие:

$$\frac{N_{OP1}^N - N_{OP1}^{ir}}{N_{OP1}^{ir} \cdot Q} = \frac{m_1 \cdot a \cdot (b-1) - (a \cdot b - 1)}{m_1 (a-1)}, \quad /2/$$

где N_{OP1}^N - выход OP_1 в условиях аноксии, a и b - коэффициенты, отражающие возрастание объемов репарации соответственно на физико-химическом уровне и на уровне репарации II, m_1 - соотношение фиксированных повреждений в кислородных и аноксических условиях от одиночных актов передачи энергии, приводящих к образованию OP_1 . Для клеток дикого типа при $N_{OP1}^N = 0,156 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$, $N_{OP1}^{ir} = 0,038 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$, $Q = 3,5$

и $m_1 = 5$ получаем левую часть уравнения /2/ ~ 1 и, следовательно:

$$a = \frac{3}{5 - 2b} \quad /3/$$

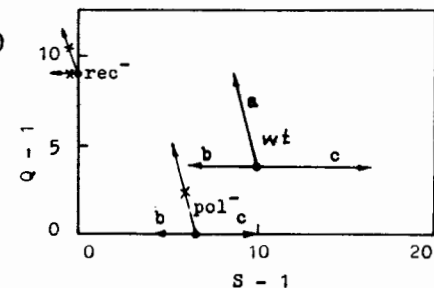
/3/ является необходимым условием сохранения постоянства эффективности защитного действия радиопротектора, которое не зависит от наличия кислорода в среде.

У rec^- - и $pol A^-$ -мутантов, имеющих дефекты соответственно в медленной и быстрой системах репарации, защита на уровне ферментативного восстановления реализоваться не может, что и наблюдается в эксперименте /1/.

Ранее мы рассмотрели возможность увеличения объема быстрой репарации при подавлении репарации III у клеток в условиях бедной ростовой среды. Возникает вопрос - можно ли увеличить объем репарации II какими-либо агентами при несущественном изменении объема репарации III. При введении радиопротекторов такая ситуация может реализоваться за счет селективного подавления эндо- и экзонуклеазной активности клеток /уменьшение вероятности q_2 / при несущественном уменьшении вероятности p_3 . Влияние радиопротектора на клетки дикого типа по указанному механизму отражено на рис.3. Здесь представлена зависимость величины $Q-1$ /характеризующей объем быстрой репарации/ от значений параметра $S-1$ /характеризующего объем медленной репарации/. В указанных координатах клетки дикого типа и чувствительные мутанты с параметрами Q и S , определенными ранее на основании экспериментальных данных, занимают положение, отраженное на рисунке: клетки дикого типа расположены на плоскости, а чувствительные мутанты - на осях координат /на оси абсцисс расположен $pol A^-$ -мутант, на оси ординат - rec^- -мутант/. Величина $Q \cdot S$ характеризует общий объем репарации клетки. Как можно видеть, для клеток дикого типа /стрелка а/ в присутствии радиопротектора увеличивается параметр Q при несущественном изменении параметра S , что приводит к возрастанию радиорезистентности клетки /величина $Q \cdot S$ увеличивается/. У rec^- - и $pol A^-$ -мутантов в присутствии аминоктиолов возрастания величины $Q \cdot S$ происходить не может, поскольку у rec^- -мутанта это возрастание не может достигаться уменьшением S , а в случае $pol A^-$ -мутанта не может увеличиваться $Q = 1$, т.е. на данной диаграмме защитное влияние радиопротекторов должно выражаться изменением обеих координат, а поскольку у rec^- - и $pol A^-$ -мутантов такое изменение происходить не может, то, следовательно, не должно наблюдаться и защитного влияния радиопротекторов, механизм действия которых реализуется на уровне ферментативной репарации.

На рис.3 отражено также влияние ДНФ /стрелка б / на клетки дикого типа и чувствительные мутанты. Как видно, сенсibiliзирующее действие ДНФ может реализоваться путем уменьшения параметра S , что может происходить у клеток дикого типа и $pol A^-$ -мутан-

Рис.3. Модификация радиочувствительности клеток дикого типа (wt) $pol A^-$ и rec^- -мутантов при изменении параметров Q и S в результате воздействия сульфидрильного радиопротектора /а/, ДНФ (б) и мексамина (с). По оси абсцисс: величина параметра $S-1$; по оси ординат: величина параметра $Q-1$.



та /смещение по оси абсцисс/. Такого смещения не может быть у rec^- -мутанта, расположенного на оси ординат.

Аналогичное ДНФ, но противоположное по направлению изменение параметров S и Q у разных штаммов *E.coli* отмечается в условиях влияния мексамина, который защищает только клетки дикого типа и $pol A^-$ -мутанта, но не оказывает защитного действия на rec^- -мутант /3,14/. При сопоставлении радиозащитных эффектов аминоктиолов и мексамина можно заметить одно важное обстоятельство. Если принять, что аминоктиолы защищают клетки *E.coli*, влияя на вероятность q_2 , то они не должны оказывать защитного действия на клетки $pol A^-$ -мутанта. В отличие от этого, мексамин должен защищать клетки $pol A^-$ -мутанта, поскольку его влияние, как можно полагать, осуществляется посредством уменьшения вероятности q_3 . Действительно, судя по данным /3,14/, величина ФИД для $pol A^-$ -мутанта в присутствии цистеамина составляет 0,95, а в присутствии мексамина - 1,7, как и для клеток дикого типа. Радиочувствительность rec^- -мутанта в присутствии мексамина не меняется.

Ранее мы указывали, что в аноксических условиях возможно "переключение" механизма радиозащитного влияния протекторов на физико-химический уровень. В таком случае должен уменьшаться выход OP_1^+ , что будет приводить к снижению чувствительности $pol A^-$ -мутанта, но не rec^- -мутанта. В связи с этим можно ожидать, что у $pol A^-$ -мутанта, в отличие от rec^- -мутанта, в аноксических условиях должно проявляться радиозащитное влияние аминоктиольных радиопротекторов, отсутствующее при облучении клеток в кислородных условиях.

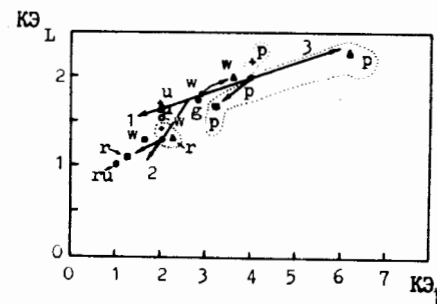
Таким образом, мы рассмотрели влияние баланса систем репарации на радиочувствительность клеток *E.coli* при γ -облучении. Рассмотрим далее особенности этого влияния при действии на клетки излучений с высокой L . При действии излучений с промежуточными /20 < L < 100 кэВ/мкм/ значениями L на *E.coli* характер баланса систем репарации не изменяется, однако его роль в радиочувствительности клеток уменьшается. Это связано с возрастанием выхода ПДР при увеличении L . Как видно из /1/, возрастание $N_{ПДР}$ приводит к тому, что первые два слагаемых уравнения перестают

существенно влиять на D_0^{-1} . Следовательно, у клеток дикого типа при больших значениях L модифицируемость их радиочувствительности может быть связана с модифицируемостью выхода ПДР ДНК. Как показано в ^{9/}, ПДР являются повреждениями, репарировать которые клетки *E.coli* не могут, и их модификация возможна лишь на физико-химическом уровне. В кислородных условиях по причинам, рассмотренным нами ранее ^{9/}, модификации выхода ПДР на физико-химическом уровне ожидать нельзя. Вследствие этого модифицируемость радиочувствительности клеток *E.coli* при действии излучений с высокой L практически отсутствует. В анаоксических же условиях модификация выхода ПДР, как мы ранее указывали ^{9/}, по-видимому, возможна.

При промежуточных значениях L существенный вклад в радиочувствительность $pol A^-$ и rec^- мутантов, как можно видеть, вносят первые два слагаемых уравнения /1/. Поскольку с возрастанием L увеличивается выход OP_1^{ir} и уменьшается выход OP_1^r , то удельный вклад в радиочувствительность клеток первого слагаемого уравнения /1/ будет уменьшаться по сравнению со вторым слагаемым. Так как $pol A^-$ и rec^- мутанты отличаются параметрами Q и S , то следует ожидать, что при возрастании $N_{OP_1}^{ir}$ с увеличением L клетки $pol A^-$ мутанта будут являться менее радиочувствительными в области промежуточных значений L . Действительно, для rec^- мутанта получаем $D_0^{-1} = N_{OP_1}^r / Q + N_{OP_1}^{ir}$, для $pol A^-$ мутанта $D_0^{-1} = (N_{OP_1}^r + N_{OP_1}^{ir}) / S$.

Рассмотрим далее роль баланса систем репарации у разных штаммов *E.coli* при действии излучений, различающихся по L , в реализации КЭ. На рис. 4 представлена диаграмма, отражающая связь между величинами КЭ при действии частиц с высокой L и при γ -облучении в условиях влияния анаоксических сенсibilизаторов и "аноксических" и "репарационных радиопротекторов". Расчет проведен для частиц с $L = 26$ кэВ/мкм и энергией 4 и 14 МэВ/нукл. Как можно видеть, имеется общая тенденция возрастания $KЭ_L$ с увеличением $KЭ_\gamma$ для всех рассмотренных штаммов *E.coli* и условий их облучения. В присутствии анаоксических сенсibilизаторов наблюдается снижение величин КЭ для всех штаммов *E.coli* в одинаковой степени как для излучений с высокой L , так и для γ -излучения. При введении "аноксического радиопротектора" отмечается увеличение КЭ у всех рассмотренных штаммов, причем наибольшее защитное влияние отмечается у $pol A^-$ мутанта при γ -облучении. Для "репарационного радиопротектора" характерно влияние на балансировку механизмов быстрой и медленной репарации, что находит отражение в уменьшении КЭ у клеток дикого типа, главным образом, при γ -облучении и отсутствии такового у rec^- и $pol A^-$ мутантов. Смещение положения разных штаммов *E.coli* в данных координатах в направлении 1 на рис. 4 отражает следующие возможные модификации: влияние радиопротектора, механизм действия которого реализуется на уровне ферментативной репарации; возрастание удельного вклада быстрой репарации в общий

Рис. 4. Влияние анаоксических сенсibilизаторов, "аноксических" и "репарационных" радиопротекторов на величину КЭ, выявляемого у клеток дикого типа (w), $uvr^-(w)$, $rec^-(r)$, $rec^-uvr^-(ru)$, $pol A^-(p)$ и $Gam^r(g)$ мутантов при действии частиц с $L = 26$ кэВ/мкм и при γ -облучении. Стрелка 1 отражает: влияние "репарационного радиопротектора"; повышение объема быстрой репарации; уменьшение удельного вклада быстрой репарации в условиях анаоксии в общий объем репарации. Стрелка 2 отражает подавление медленной репарации. Стрелка 3 отражает подавление быстрой репарации или влияние "аноксического радиопротектора". По оси абсцисс: величина КЭ при γ -облучении; по оси ординат: величина КЭ при действии частиц с $L = 26$ кэВ/мкм.



объем репарации клетки; снижение эффективности быстрой репарации в анаоксических условиях. Смещение в направлении 2 соответствует ситуации подавления медленной репарации при одновременном усилении быстрой репарации /наличие мутации в rec^- гене/. Смещение в направлении 3 соответствует подавлению быстрой репарации или влиянию "аноксического радиопротектора".

Таким образом, в данном сообщении мы рассмотрели влияние баланса систем репарации на радиочувствительность клеток *E.coli* при действии излучений с разными физическими характеристиками. В заключение данного цикла работ суммируем наши представления о роли репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у бактерий *E.coli* при действии излучений с разной L в условиях влияния радиомодификаторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ионизирующие излучения индуцируют в ДНК клеток широкий спектр первичных повреждений. Выход их при γ -облучении в анаоксических условиях в 4 раза меньше по сравнению с облучением в кислородных условиях. Часть этих повреждений может модифицироваться кислородом и восстанавливаться на физико-химическом уровне, либо на уровне ферментативной репарации. Другая часть индуцируемых повреждений - OP_1^{ir} , не модифицируется кислородом и не восстанавливается быстрым типом репарации; их восстановление возможно лишь на уровне медленной репарации. Основную долю в суммарном выходе OP_1^r , образующихся из первичных γ -сайтов, составляют OP_1^r , восстанавливаемые репарацией II. Выход OP_1^{ir} в кислород-

ных условиях составляет лишь 1/20 часть от общего выхода OP_1 . После завершения репарации II у клеток дикого типа и rec^- -мутанта это соотношение составляет соответственно 1/6 и 1/3. В условиях аноксии для клеток дикого типа, rec^- - и $pol A^-$ -мутантов отношение выходов OP_1^{ir} и OP_1 уменьшается соответственно до 1/2 и 1/4.

У rec^- -мутанта быстрое восстановление устраняет OP_1^r как в кислородных, так и в аноксических условиях, оставляя не восстановленными лишь OP_1^{ir} . Поскольку отношение $N_{OP_1^{ir}}^r/N_{OP_1}^r$ у данного штамма равно ≥ 1 , КЭ у rec^- -мутанта, дефектного по репарации III, резко понижен. У $pol A^-$ -мутанта, имеющего дефект в репарации II, величина КЭ по выходу OP_1 и ЭДР одинакова, поскольку репарация III восстанавливает в равной степени OP_1^r и OP_1^{ir} . Следовательно, КЭ, равный 4 по критерию образования OP_1 , соответствует величине КЭ по выживаемости клеток.

У клеток дикого типа величина КЭ определяется в основном степенью балансировки механизмов репарации II и III. При подавлении репарации III величина КЭ уменьшается. Клетки uvr^- -мутанта, имеющие примерно одинаковую с клетками дикого типа чувствительность к γ -облучению в присутствии кислорода, в условиях аноксии более чувствительны, чем клетки дикого типа. Снижение КЭ у uvr^- -мутантов можно объяснить, с одной стороны, возрастанием объема репарации II, что делает более значимым вклад OP_1^{ir} в летальный эффект, с другой - ее подавлением в аноксических условиях. Последнее обстоятельство должно приводить к увеличению выхода OP_2 из нововосстановленных OP_1 и, в конечном счете, - к возрастанию выхода летальных ЭДР ДНК. Уменьшение КЭ у uvr^- -мутантов можно связать с еще одним обстоятельством. Как показано в /7/, при γ -облучении клеток в среде возникает черенковское излучение, индуцирующее специфические для ультрафиолетового облучения повреждения - тиминовые фотодимеры. У uvr^- -мутанта, не способного к репарации указанных повреждений, удельный вклад их в суммарный выход поврежденных ДНК при облучении в кислородных условиях относительно мал. Однако при облучении в условиях аноксии, когда выход первичных γ -сайтов снижается более чем в 4 раза, их вклад значительно возрастает, поскольку выход фотодимеров не модифицируется кислородом. В этой связи тиминовые димеры имеют все свойства OP_1^{ir} , влияющих на величину КЭ.

КЭ при γ -облучении клеток в присутствии аноксических сенсibilизаторов уменьшается, а у некоторых чувствительных мутантов выявляется "обратный" КЭ. Уменьшение КЭ в присутствии сенсibilизаторов можно связать с возрастанием выхода OP_1^{ir} в результате взаимодействия этих агентов с первичными повреждениями ДНК на уровне физико-химических реакций.

В присутствии радиопротекторов величина КЭ при γ -облучении либо слабо уменьшается, либо остается постоянной. Уменьшение радиозащитного влияния протекторов в аноксических условиях может

свидетельствовать о реализации механизма его действия на уровне ферментативных процессов репарации повреждений ДНК. Это связано с тем, что при торможении активности эндо- и экзонуклеаз уменьшается объем медленной репарации и одновременно возрастает объем репарации II, что приводит к более отчетливому проявлению OP_1^{ir} в инактивирующем действии γ -облучения на клетки. В тех случаях, когда эффективность действия радиопротектора не зависит от присутствия кислорода, можно полагать, что в аноксических условиях происходит "переключение" механизма его защитного влияния на физико-химический уровень. В связи с этим у $pol A^-$ -мутанта можно ожидать появления защитного влияния аминотиолов при облучении клеток в аноксических условиях.

При действии на *E. coli* излучений с возрастающими L величина КЭ падает. Зависимость КЭ от L нельзя объяснить с позиций гипотез "кислорода в треке" и "взаимодействующих радикалов", не учитывающих особенности индукции и репарации повреждений ДНК излучениями с разной L. С возрастанием L увеличивается выход повреждений, не модифицируемых кислородом и не восстанавливаемых репарацией II - OP_1^{ir} , а также резко возрастает выход ПДР ДНК. В диапазоне $L < 200$ кэВ/мкм отмечается постоянное соотношение выходов ПДР в кислородных и аноксических условиях, равное 2. При дальнейшем возрастании L величина этого соотношения уменьшается.

В диапазоне малых значений L наблюдаются большие различия в величине КЭ у разных штаммов *E. coli*: $pol A^-$ -мутанту свойственна наибольшая величина КЭ, наименьшая - $rec A^-$ и uvr^- -мутантам. С возрастанием L у всех штаммов *E. coli* величина КЭ уменьшается. Наиболее резкое снижение КЭ отмечается у $pol A^-$ -мутанта. Зависимость $D_0^{-1}(L)$ для rec^- и $pol A^-$ -мутантов в аноксических условиях описывается ниспадающей кривой без максимума. Клеткам дикого типа, uvr^- и суперрезистентному мутантам свойственна зависимость $D_0^{-1}(L)$ с максимумом, причем максимум в аноксических условиях более резко выражен по сравнению с клетками, облучаемыми в кислороде. Для аноксических клеток по сравнению с нормально оксигенированными максимум зависимости $D_0^{-1}(L)$ приходится на область больших значений L. Это обуславливается меньшим выходом в аноксических условиях ЭДР и ПДР ДНК.

Величина "половинного" КЭ для чувствительных мутантов не зависит от L и имеет такие же значения, как и при γ -облучении. У клеток дикого типа для частиц с высокой L ожидается ее возрастание в 1,75 раза. Неоднозначность величины $[O]_{1/2}$ обуславливается различием в характере повреждений ДНК, приводящих к летальному эффекту: у чувствительных мутантов такими повреждениями являются преимущественно ОР ДНК, а у клеток дикого типа - ДР ДНК.

Зависимость КЭ (L) в условиях влияния радиопротекторов для разных штаммов *E. coli* описывается ниспадающими кривыми. В об-

ласти малых значений L наибольший КЭ в присутствии радиопротектора ожидается для клеток $rol A^-$ -мутанта, наименьший - для $гес^-$ и $увг^-$ -мутантов. С увеличением L для всех рассмотренных штаммов *E.coli* КЭ снижается до 1. В присутствии аноксического сенсibilизатора у клеток дикого типа и $rol A^-$ -мутанта КЭ с возрастом L уменьшается до 1. Наиболее резкое падение зависимости КЭ (L) отмечается для клеток $rol A^-$ -мутанта, поскольку аноксические сенсibilизаторы слабо влияют на его чувствительность при действии излучений с малой L . У $увг^-$ -мутантов "обратный" КЭ, реализуемый в присутствии сенсibilизаторов в области низких значений L , трансформируется в слабо выраженный положительный КЭ, так как с ростом L увеличивается выход ПДР ДНК, не модифицируемых сенсibilизатором, а также возрастают флуктуации энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с.548-555.
2. Бреслер С.Е. Успехи современной биологии, 1976, 82, с.181-198.
3. Bresler S.E. et al. Molec.Gener.Genet., 1978, 163, p.75-85.
4. Serna F.R., Samoilenko J.J. Biochem. and Biophys.Res. Commun., 1975, 67, p.1415-1421.
5. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-685, Дубна, 1983.
6. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-715, Дубна, 1983.
7. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-716, Дубна, 1983.
8. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-743, Дубна, 1983.
9. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-744, Дубна, 1983.
10. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-788, Дубна, 1983.
11. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.
12. Schueren E., Smith K.S., Kaplan H.S. Radiat.Res., 1973, 55, p.346-356.
13. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Сулов А.В. Радиобиология, 1981, 21, с.3-7.
14. Bresler S.E. et al. Studia biophysica, 1975, 53, p.163-166.
15. Селева Н.Г., Скворцов В.Г., Мясник М.Н. I Всесоюзный биофизический съезд. Тезисы докл.стендовых сообщений. М., 1982, т.2, с.302.

Рукопись поступила в издательский отдел
23 декабря 1983 года.

Козубек С., Красавин Е.А. 19-83-884

Роль репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии /теоретический анализ/.
Баланс систем репарации и радиочувствительность

Рассматривается роль баланса систем репарации ДНК у бактерий *E.coli* в инактивирующем действии излучений с разной линейной передачей энергии (L). Проведен анализ влияния модифицирующих факторов на баланс систем быстрой (II) и медленной (III) репарации. Показано, что при γ -облучении клеток в кислородных условиях уменьшение репарации III в определенных пределах может быть компенсировано возрастанием объема репарации II при постоянных значениях радиочувствительности (D_{01}^{-1}) клеток. В условиях аноксии ограничение объема репарации III приводит к резкому возрастанию D_{01}^{-1} . Обсуждаются возможные варианты влияния радиопротекторов на баланс быстрой и медленной репарации в кислородных и аноксических условиях. Показано, что при возрастании L роль баланса репарации II и III в радиочувствительности клеток уменьшается, поскольку резко возрастает выход прямых двухнитевых разрывов ДНК.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Kozubek S., Krasavin E.A. 19-83-884

The Role of DNA Repair in the Realisation of Oxygen Effect in Bacteria *Escherichia Coli* Irradiated with Various Types of Radiation.

The Balance of Repair Systems and the Sensitivity to Radiation

The role of the balance of *E.coli* repair systems in the sensitivity to ionizing radiation of different LETs is considered. The influence of modifying factors on the balance between fast (II) and slow (III) repair systems is analysed. It is shown that in the case of γ -irradiation of aerobic cells the decreased power of repair III in some limits can be compensated by increased power of repair II so that the sensitivity remains constant. In anaerobic conditions decreasing power of repair III leads inevitably to markedly increased sensitivity. Different mechanisms of the action of radioprotectors on the repair balance in aerobic or anaerobic state are discussed. The role of repair balance in the radiosensitivity of irradiated wild type cells is shown to become unimportant for high LET radiation owing to the presence of markedly increased ratio of direct double-strand breaks.

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