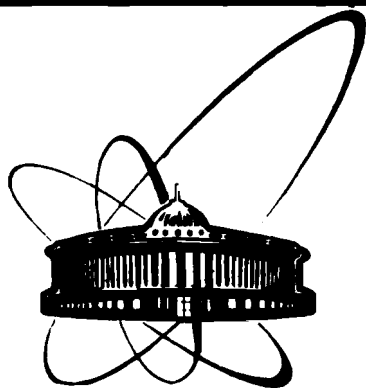


89-337



**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

Б 33

19-89-337

**С.Г.Баша, С.Козубек, Е.А.Красавин,
К.Г.Амиртаев**

**ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА
НА ГАММА-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ
У КЛЕТОК
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

Направлено в журнал "Радиобиология"

1989

Известно, что многоатомные спирты, и, в частности, глицерин, эффективно защищают клетки про- и эукариот от летального действия ионизирующих излучений^{/1,2/}. Их защитное влияние связано с перехватом OH* радикалов, участвующих в формировании различных типов повреждений ДНК^{/3/}. Есть основания полагать, что влияние OH* радикалов на выход этих повреждений различно^{/4/}. В связи с этим представляет интерес изучить модифицирующее действие глицерина на мутационный процесс у тест-штаммов Эймса *Salmonella typhimurium*, мутантный фенотип которых обусловлен разными по характеру повреждениями ДНК^{/5,6/}. У двух штаммов, использованных в работе, такими повреждениями являются замены оснований, у третьего имеется "сдвиг рамки считывания". Изучение закономерностей мутирования γ -облученных штаммов Эймса в условиях влияния глицерина и явилось целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использованы следующие бактериальные штаммы: TA98, TA100, TA102, их характеристики приведены в работе^{/7/}.

Инкубация культуры: клетки выращивали в питательной среде Oхoid №2, при интенсивной аэрации до плотности $2-3 \cdot 10^9$ кл/мл. Для предотвращения потери плазмид в питательную среду добавляли 25 мкг/мл ампициллина. В случае штамма TA102 добавляли 2 мкг/мл тетрациклина.

Известно^{/8/}, что одномолярный раствор глицерина эффективно защищает бактериальные клетки от γ -излучения. После выращивания клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин /2000 об/мин/. Культуру ресуспендировали в M9 буфере и к части образцов добавляли глицерин в необходимой концентрации. Инкубацию образцов с протектором осуществляли в течение 20 мин перед облучением.

Облучение клеток проводили на установке с γ -источником ^{137}Cs при температуре 0°C . Мощность дозы облучения составляла 25 гр/мин. После облучения клетки высевали на чашки Петри.

Чашки для тестирования мутаций: использовали 1,5% агар-агара с 0,5 мг/л моногидрата лимонной кислоты и 50 мл/л 40% раствора глюкозы. На поверхность агара заливали "верхний"

агар /0,6% агар-агара и 0,5% NaCl/ вместе с 0,1 мл тестируемой суспензией клеток и гистидин с биотином в количестве 0,1 мл из первоначального раствора /120 мкг/мл биотина и 100 мкг/мл гистидина/.

Подсчет ревертантных колоний осуществляли через 48 ч инкубации при 37°C под стереоскопическим микроскопом МБС-9 при 16-кратном увеличении. Опыты проводили в трех и более повторностях. Частоту мутирования клеток $M(D)$ определяли как отношение числа индуцированных мутантов $N_1(D)$ к количеству всех выживших клеток $N_0S(D)$. Полученные результаты подвергали статистической обработке.

Зависимость $M(D)$ аппроксимировали степенной функцией $M(D) = kD^x$, где D - доза облучения. Параметры k и x определяли методом минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических величин. Экспериментальную ошибку определяли как квадратный корень из количества подсчитанных мутантов. Фактор изменения дозы /ФИД/ рассчитывали как отношение средних летальных доз при облучении с глицерином и при нормальных условиях. В этом случае ошибку определяли по наибольшей ошибке любой из двух сопоставляемых величин, полученных в параллельных опытах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены кривые выживания исследуемых штаммов при γ -облучении в обычных условиях и в присутствии глицерина. Во всем интервале доз зависимость $S(D)$ описывается экспонентой $S(D) = \exp(-D/D_0)$, где D_0 - средняя летальная доза. При облучении с глицерином величина D_0 составляет 65 Гр, без глицерина - 32 Гр. Таким образом, величина ФИД радиопротектора составила $2,05 \pm 0,20$.

Зависимость выхода индуцированных γ -излучением мутаций от дозы облучения $N_1(D)$ для всех штаммов описывается кривой с максимумом /рис. 2/. Величину $N_1(D)$ определяли по формуле:

$$N_1(D) = N(D) - M_{s1} S(D) - M_{s2} \quad /1/$$

где $N(D)$ - общее количество ревертантов на чашку, $S(D)$ - выживаемость, M_{s1} - количество спонтанных ревертантов, возникающих в течение роста ночной культуры в суспензии, M_{s2} - количество спонтанных ревертантов, возникших в течение роста культуры на чашках после облучения.

Величины M_{s1} и M_{s2} для каждого штамма отличались незначительно в случае облучения с глицерином и в обычных условиях.

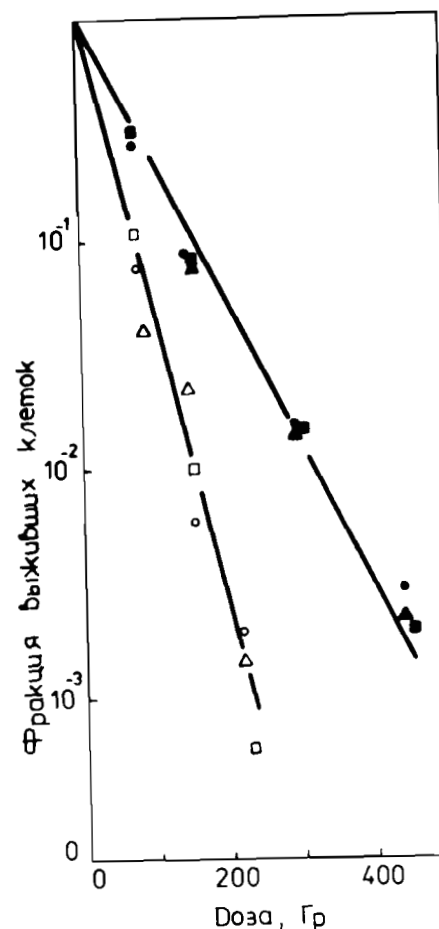


Рис. 1. Кривые выживания γ -облученных клеток *Salmonella typhimurium* в присутствии глицерина и в обычных условиях \bullet - TA98, Δ - TA100, \blacksquare - TA102. Темные символы - облучение с глицерином, светлые - нормальные условия. По оси абсцисс: фракция выживших клеток, отн. ед., по оси ординат: доза, Гр.

Суммарное количество спонтанных ревертантов $M_s = M_{s1} + M_{s2}$ для используемых штаммов определяли методом подсчета колоний на чашках, не подвергавшихся облучению. Для штаммов TA98, TA100 и TA102 эта величина соответственно составляет примерно 50, 180 и 230 ревертантных колоний при посеве на чашку $/2-3/ \cdot 10^8$ клеток. Величина M_{s2} зависит от

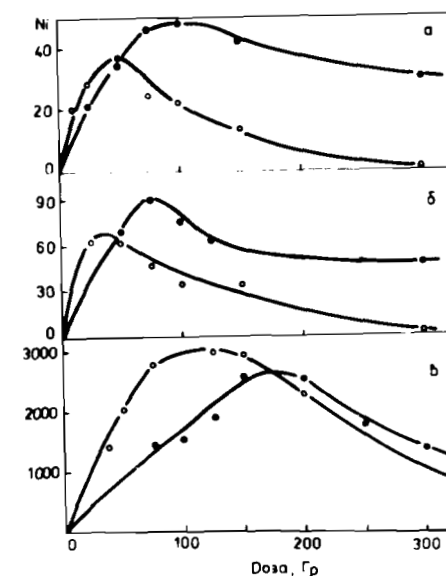


Рис. 2. Зависимость выхода индуцированных ревертантов (N_1) у штаммов TA98 /а/, TA100 /б/ и TA102 /в/ от дозы облучения (D) в присутствии глицерина / \bullet / и в обычных условиях / \circ /. По оси абсцисс: число индуцированных реверсий на 10^8 клеток, по оси ординат: доза облучения, Гр.

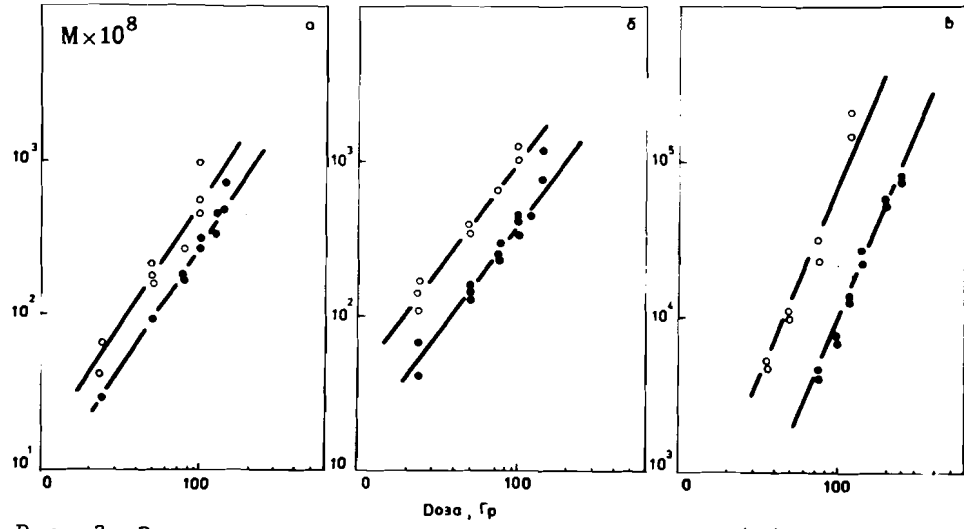


Рис. 3. Зависимость частоты мутирования клеток /M/ от дозы облучения (D) в логарифмическом масштабе у штаммов TA98 /а/, TA100 /б/ и TA102 /в/ в присутствии глицерина /●/ и в обычных условиях /○/. По оси абсцисс: частота мутирования, количество мутантов на чашку, по оси ординат: доза облучения, Гр.

количества гистидина на чашках перед инкубированием и определяется методом подсчета ревертантных колоний после облучения клеток достаточно большой дозой, при которой погибают все имеющиеся в суспензии ревертанты, но выживает достаточное количество his-клеток для дальнейшего размножения.

Для всех используемых штаммов максимум кривой выхода индуцированных мутантов с глицерином сдвинут в область больших доз облучения по сравнению с максимумом кривой $N_1(D)$ в обычных условиях /рис. 2/. Величина максимума для штаммов TA98 и TA100 выше в случае облучения с глицерином, а у штамма TA102 максимум кривой $N_1(D)$ выше при облучении в обычных условиях.

У всех штаммов наблюдалась степенная зависимость частоты мутирования $M(D)$ при облучении в нормальных условиях и в присутствии глицерина. Характер этой зависимости можно точнее определить из графика в логарифмическом масштабе, на котором степенная зависимость типа $M(D) = kD^x$ является прямой с наклоном, равным x . Фактор изменения дозы индуцированного мутагена /ФИД₁/ вычисляли как отношение доз, полученных клетками, в присутствии глицерина и в обычных условиях при одинаковой частоте мутирования. Значения параметров и ФИД₁, соответствующих рис. 3 а,б,в, приведены в таблице.

Таблица. Значения параметров степенной функции, описывающей зависимость частоты мутирования от дозы облучения штаммов *Salmonella typhimurium* при облучении с глицерином и в обычных условиях

Штаммы	С глицерином		без глицерина		x*	ФИД ₁ ***
	x ₁	k ₁ **	x ₂	k ₂ **		
TA98	1,49 ± 0,08	0,151 ± 0,007	1,76 ± 0,11	0,298 ± 0,017	1,625	1,52 ± 0,15
TA100	1,52 ± 0,03	0,366 ± 0,008	1,51 ± 0,006	0,991 ± 0,025	1,515	1,93 ± 0,07
TA102	2,53 ± 0,02	0,0312 ± 0,0003	2,85 ± 0,03	0,273 ± 0,003	2,69	2,24 ± 0,04

* x - среднее значение параметра с глицерином и без глицерина.

** k₁, k₂ рассчитано в предположении, что x - среднее значение.

*** ФИД₁ = (k₂/k₁)^{1/x}.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже указывалось, ревертанты в тест-штаммах Эймса возникают благодаря индукции разных премутационных повреждений ДНК^{5,6/}. Так, мишенью для ревертирования в случае штамма TA98 является последовательность нуклеотидов -С-Г-С-Г-С-Г-С-Г-, штамма TA100 - последовательность -С-С-С-, штамма TA102 - последовательность -Т-А-А-. Выявлено^{8/}, что существенная роль в радиационном мутагенезе принадлежит повреждениям оснований /ПО/ ДНК и "комплексным односторонним разрывам" /КОР/, не восстанавливаемым *polA*-зависимой репарацией. В работе^{9/} на основании различий зависимости частоты мутирования от ЛПЭ при малых дозах облучения показано, что мутационный процесс у разных тест-штаммов Эймса характеризуется разными премутационными событиями. У штамма TA98, как полагают авторы, в реализации мутации существенными являются ПО, однако вероятность их закрепления в мутацию в виде сдвига рамки считывания крайне мала ($< 2 \cdot 10^{-3}$). У штаммов TA100 и TA102 существенный вклад в мутагенез, по-видимому, вносят повреждения типа КОР.

Выше отмечалось, что спирты эффективно реагируют с радикалами ОН*, на долю которых приходится около 60% всех индуцированных повреждений в клетке^{3/}. Это может приводить к снижению премутационных повреждений ДНК, возникающих в результате взаимодействия ОН-радикалов с молекулой ДНК. Анализ защитного действия глицерина при изучении выживаемости репарационных мутантов *E. coli*^{4/} показал, что глицерин хуже защищает клетки *tesA*-мутанта по сравнению с клетками *polA*-мутанта, в то время как клетки дикого типа занимают промежуточное положение. Иными словами, повреждения ДНК, репарируемые быстрым типом репарации, модифицируются глицерином эффективнее, чем повреждения, репарируемые медленным типом репарации.

Как уже указывалось, дозовые зависимости выхода индуцированных γ -излучением ревертантов являются кривыми с максимумом при облучении с глицерином и в обычных условиях /рис. 2/. Если учесть, что зависимость частоты мутирования для всех штаммов описывается степенной функцией, то дозовую зависимость индуцированного мутагенеза можно представить выражением:

$$N_1(D) = k N_0 D^x \exp(-D/D_0). \quad /2/$$

Зависимость /2/ имеет локальный максимум при дозе D_{max} , которая определяется из уравнения:

$$x k N_0 D^{x-1} \exp(-D/D_0) = (1/D_0) k N_0 D^x \exp(-D/D_0). \quad /3/$$

Из этого уравнения следует, что $D_{max} = x D_0$. Очевидно, что если частота мутирования описывается линейной функцией /т.е. $x = 1/$, то $D_{max} = D_0$. Если максимум кривой индуцированного мутагенеза смещен в область больших доз /т.е. $D_{max} > D_0/$, то можно предполагать наличие двухударного механизма образования мутаций. Это справедливо для всех трех штаммов в присутствии и в отсутствие глицерина.

Сравним величины максимумов кривых индуцированного мутагенеза $N_1(D)$ с глицерином и в обычных условиях:

$$(N_1)_{max} / (N_{1g})_{max} = (k/k_g) (D_0/D_{0g})^x, \quad /4/$$

где $(N_1)_{max}$ и $(N_{1g})_{max}$ - количество индуцированных мутантов в максимуме в обычных условиях и с глицерином. Выражение /4/ было получено в предположении, что параметр x одинаков с глицерином и без него. Легко показать, что фактор изменения дозы индуцированного мутагенеза - ФИД₁, определенный как отношение доз при одинаковых частотах мутирования с глицерином и без него, описывается следующей формулой:

$$\text{ФИД}_1 = (k/k_g)^{1/x}. \quad /5/$$

Выражение /4/ можно представить как:

$$(N_1)_{max} / (N_{1g})_{max} = (\text{ФИД}_1)^x (\text{ФИД}_0)^{-x}, \quad /6/$$

где ФИД₀ - фактор изменения дозы для глицерина, определяемый как отношение средних летальных доз. Выше отмечалось, что для всех трех штаммов ФИД₀ = $2,05 \pm 0,20$. Следовательно, используя выражение /6/ и на основании рис. 2, можно оценить величину ФИД₁. Например, в случае штаммов TA98 и TA100, когда максимум кривой индуцированного мутагенеза с глицерином выше максимума мутагенеза в обычных условиях, ФИД₁ < 2. В отличие от этого, для штамма TA102 - ФИД₁ > 2. Эти оценки совпадают со значениями, приведенными в таблице. Анализируя зависимость $N_1(D)$ с учетом положения максимума, можно предположить наличие двухударного механизма мутагенеза и с высокой достоверностью оценить величину ФИД₁ для всех использованных штаммов.

Таким образом, из приведенных в таблице значений параметра x можно сделать вывод о наличии двухударного механизма индуцированного мутагенеза при γ -облучении клеток с глицерином и в обычных условиях. Это утверждение справедливо для всех использованных в данной работе штаммов. Полученные результаты позволяют уточнить спектр премутационных событий, вызванных γ -излучением. Значения ФИД₁ для штаммов TA100 и TA102 составляют

≈ 2 , что совпадает с результатами, полученными на репарационных мутантах 14 . Для штамма TA98 ФИД₁ = 1,5, из чего следует, что премутационные события типа ПО модифицируются глицерином хуже событий типа КОР. Модификация первичных повреждений ДНК, репарируемых быстрым типом репарации, характеризуется величиной ФИД = 2,7 14 . Следовательно, премутационные повреждения, выявляемые у штамма TA98, составляют только часть первичных повреждений, репарируемых быстрым типом репарации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cramp W.A., Jut J. - Radiat. Biol., 1969, 15, p.227.
2. Sammer T., Phil A. - Radiat. Res., 1969, 37, p.216.
3. Alper T. - Cellular Radiobiology, Cambridge Univ. Press, 1979.
4. Amirtayev K.G., Krasavin E.A. - Studia Biophysica, 1985, 106, No.2, p.131.
5. Ames B.N. - A Bacterial System for Detecting Mutagens and Carcinogens. In: E.Sutton and M.Marris (eds). Mutagenic Effects of Environmental Contaminants, Academic Press, New York, 1972, p.57.
6. Maron D.M., Ames B.N. - Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 1983, 113, p.173.
7. Козубек С. и др. - ОИЯИ, Д19-89-143, Дубна, 1989, с.15.
8. Жестяников В.Д. - В кн.: Итоги науки и техники. Микробиология, 1985, т.15, с.5.
9. Козубек С. и др. - ОИЯИ, Д19-89-143, Дубна, 1989, с.28.

Рукопись поступила в издательский отдел
15 мая 1989 года.

Баша С.Г. 19-89-337
Влияние глицерина на гамма-индуцированный мутагенез
у клеток *Salmonella typhimurium*

Изучено модифицирующее влияние глицерина на выживаемость и γ -индуцированный мутагенез клеток тест-штаммов Эймса *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 и TA102. Данные свидетельствуют об эффективной защите глицерином тест-штаммов Эймса от γ -облучения. Величина фактора изменения дозы составляет $2,05 \pm 0,20$. Для всех трех штаммов в присутствии глицерина и в обычных условиях зависимость выхода индуцированных γ -излучением мутантов от дозы облучения описывается кривой с максимумом, частота мутирования $M(D)$ хорошо описывается степенной функцией $M(D) = kD^x$. Значения фактора изменения дозы индуцированного мутагенеза для штаммов TA100 и TA102 составляют ≈ 2 . Для штамма TA98 ФИД₁ = 1,5. Полученные данные анализируются на основании развитых ранее авторами представлений.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.
Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989

Перевод авторов

Basha S.G. et al. 19-89-337
Influence of Glycerol on γ -Induction Mutagenesis
in *Salmonella Typhimurium* cells

The protective effect of glycerol on the survival and γ -induction mutagenesis in Ames test-strain *Salmonella typhimurium* cells has been investigated. The value of dose modifying factors for glycerol in the case of cells survival is 2.05 ± 0.20 for all three strains. The number of revertants induced by γ -rays as a function of the radiation dose can be described by a curve with a local maximum, the mutation frequency $M(D)$ is well described by a power function $M(D) = kD^x$. The dose modifying factor for glycerol in the case mutagenesis is ≈ 2 for TA100 and TA102 strains and 1.5 for TA98 strain. The experimental data are discussed in terms of the results obtained earlier.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1989