

сообщения  
объединенного  
института  
ядерных  
исследований  
дубна

P19-84-647

С.Козубек, Е.А.Красавин

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕР КРИВЫХ  
ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ  
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ.  
Форма кривых выживания клеток дикого типа  
при  $\gamma$ -облучении

1984

В<sup>1/</sup> рассмотрены некоторые особенности репликации, рекомбинации и пострадиационной деградации ДНК у бактерий *E. coli* и возможная роль указанных процессов в нелинейном характере зависимости выживания (S) клеток от дозы (D) облучения. В настоящей работе предпринята попытка количественной оценки влияния вышеуказанных факторов на форму кривых выживания бактерий *E. coli* при  $\gamma$ -облучении. Прежде чем приступить к анализу факторов, определяющих форму зависимости S(D) с позиций развиваемых представлений, коротко рассмотрим некоторые аспекты, касающиеся кривых выживания клеток экспоненциального характера.

Из принципов попадания и мишени следует, что при пуассоновском характере распределения актов передачи энергии /попаданий/ по чувствительным мишеням клеток и при условии, что для инактивации клетки необходимо хотя бы одно попадание в мишень, кривые выживания будут описываться простой экспоненциальной функцией. Известно, что при  $\gamma$ -облучении бактерий *E. coli* часто выявляются экспоненциальные зависимости S(D). При этом необходимо заметить, что радиочувствительность клеток дикого типа одного и того же штамма варьирует в широких пределах в зависимости от многих внешних условий и, в частности, от условий пред- и пострадиационного культивирования. Согласно <sup>2/</sup>, выход первичных одностранных разрывов /ОР/ ДНК, оцениваемый с помощью метода сверхбыстрого лизиса клеток и техники импульсного облучения, составляет  $5 \cdot 10^{-12}$  сГр<sup>-1</sup> дальтон<sup>-1</sup>. Из этого следует, что при дозе облучения, соответствующей средней летальной ( $D_0$ ) и равной 70 Гр, в среднем в геноме возникает около 100 первичных повреждений <sup>3/</sup>. Иными словами, одному "инактивирующему событию попадания" соответствует указанное количество первичных повреждений ДНК, распределенных случайно и независимо друг от друга. Хорошо установлено, что первично индуцируемые повреждения ДНК элиминируются из клетки в дорепликативный период путем сложного, многоступенчатого процесса репарации быстрого /II/ и медленного типов /III/<sup>4/</sup> и кинетика элиминации повреждений носит экспоненциальный характер. В<sup>5/</sup> проведена количественная оценка закономерностей индукции и репарации разных типов повреждений ДНК у *E. coli* механизмами репарации II и III. С учетом имеющихся в литературе данных было показано, что чувствительность клеток дикого типа к  $\gamma$ -облучению определяется, в основном, выходом энзиматических двустранных разрывов /ЭДР/ ДНК, образующихся в процессе репарации из первично-индуцируемых повреждений. Выход ЭДР определяется медленным, зависящим от среды роста, *lexA*-гес А - типом репарации. От эффективности репарации III,

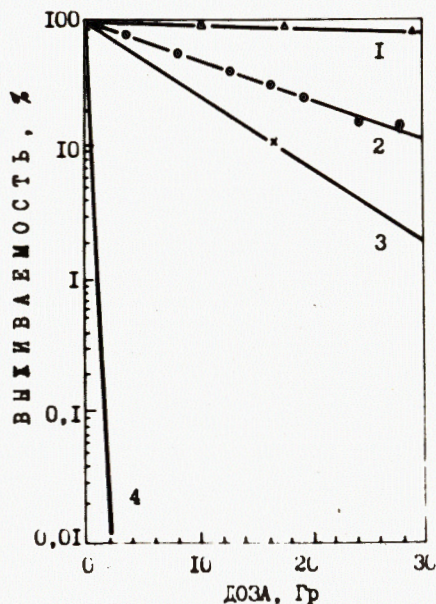


Рис. 1. Выживаемость клеток *E. coli* K-12 дикого типа и чувствительных мутантов при  $\gamma$ -облучении. 1 - клетки дикого типа AB1157<sup>/7/</sup>; 2 - *rec A*<sup>-</sup> мутант AB2463<sup>/7/</sup>; 3 - *pol A*<sup>-</sup> мутант в присутствии 2,4-динитрофенола<sup>/10/</sup>; 4 - гипотетические клетки с полностью ингибированной системой репарации. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

следовательно, зависит и чувствительность клеток дикого типа при  $\gamma$ -облучении.

У репарационных мутантов, как известно, повышение радиочувствительности обусловлено нарушением определенных этапов репарации ДНК<sup>/4/</sup>. Генетический блок

какого-либо звена в механизме репарации приводит к возрастанию угла наклона экспоненциальной зависимости  $S(D)$ . С учетом вышеизложенного можно прийти к выводу о том, что если репарация каждого возникающего в клетке при облучении повреждения происходит случайно и независимо друг от друга на всех этапах восстановления, то характер распределения по клеткам повреждений, остающихся не восстановленными, должен соответствовать пуассоновскому. Форма кривой выживания в таком случае должна быть экспоненциальной. При этом величина угла наклона экспоненты, отражающая радиочувствительность клеток, соответствует выходу нерепарируемых повреждений ДНК. Для клеток дикого типа такими повреждениями являются двунитевые разрывы ДНК<sup>/4,6/</sup>.

На рис. 1 представлены экспериментальные и теоретические /расчитанные на основании<sup>/5,8,9/</sup> / кривые выживания *E. coli* K-12 дикого типа и чувствительных мутантов с генетическим блоком репарации II и III, а также зависимость  $S(D)$  для гипотетических клеток с полностью ингибированной системой восстановления. Как можно видеть, генетический блок механизма репарации II и III приводит к возрастанию радиочувствительности клеток. Следует заметить, что клетки *pol A*<sup>-</sup> мутанта с подавленной репарацией II и высокой радиочувствительностью становятся еще более чувствительными при частичном подавлении репарации III 2,4-динитрофенолом<sup>/10/</sup>. Для гипотетических клеток с полностью выключенными механизмами восстановления величина радиочувствительности должна составить  $\sim 3 \text{ Гр}^{-1}$ .

Таким образом, экспоненциальные кривые выживания бактерий *E. coli*, имеющие сравнительно простую формальную интерпретацию, отражают сложную цепь биологических процессов, направленных на восстановление нарушенных генетических структур. Еще более усложняется интерпретация механизмов, обуславливающих сигмоидную форму кривых выживания. Как указывалось в<sup>/1/</sup>, процессы, приводящие к нелинейной зависимости  $S(D)$ , могут реализовываться на различном уровне биологической организации: популяционном, клеточном и молекулярном. Рассмотрим влияние этих процессов на форму кривых выживания бактерий *E. coli*.

#### ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ И НЕЛИНЕЙНОСТЬ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ

Одной из причин нелинейности зависимости  $S(D)$  в полулогарифмическом масштабе является гетерогенный характер облучаемой популяции клеток. Эта гетерогенность может обуславливаться рядом причин. У бактерий *E. coli* дикого типа наиболее существенной из них является распределение клеток по разным стадиям клеточного цикла. Например, если облучаемая популяция состоит из двух субпопуляций клеток, содержащих одну и две копии генома, то форма кривых выживания клеток данной популяции будет описываться в виде суммы одномишенных и многомишенных формул. Такие кривые будут отличаться от кривых, описывающих выживаемость гомогенной популяции. Так, если для субпопуляции клеток с одной мишенью характерна экспоненциальная зависимость  $S(D)$ , то для двухмишенной субпопуляции будет свойственна кривая сигмоидного вида, с плечом и нулевой производной при  $D = 0$ . Для гетерогенной популяции клеток кривая выживания также будет иметь плечо, но одновременно ее производная при  $D = 0$  будет отличаться от нуля.

Кривую выживания для асинхронной популяции клеток в общем виде можно получить путем суммирования по отдельным состояниям клеток на протяжении клеточного цикла:

$$S(D) = \sum_{(i)} S_i \cdot (D) \cdot f_i = \int_{x=0}^T S(x, D) f(x) dx, \quad /1/$$

где  $f_i$  - фракция клеток в  $i$ -том состоянии;  $f(x)$  - плотность распределения клеток в период  $x$  после клеточного деления;  $S_i$  - выживаемость клеток  $i$ -того состояния;  $S(x, D)$  - выживаемость клеток, находящихся в момент  $x$  после деления при облучении дозой  $D$ ;  $T$  - время клеточного цикла. Для экспоненциально растущей популяции в предположении, что все клетки имеют одинаковое значение  $T$ , можно записать:

$$f(x) = 2k e^{-kx}, \quad x \in \langle 0, T \rangle, \quad k = \frac{\ln 2}{T}. \quad /2/$$

Другой возможной причиной гетерогенности популяции клеток могут быть спонтанные повреждения генетического материала, возникающие в процессе репликации ДНК у некоторых чувствительных мутантов, например, у гес А<sup>-</sup>, гес В<sup>-</sup>С<sup>-</sup> и гес А<sup>-</sup>В<sup>-</sup>С<sup>-</sup>-мутантов<sup>/11/</sup>. У таких штаммов в процессе деления образуются три класса клеток: способных к образованию макроколоний, клетки с ограниченным числом делений и неделящиеся клетки, подвергающиеся впоследствии лизису. Повреждениями, которые вызывают образование клеток, не способных к формированию макроколоний, могут быть физиологические ОР, возникающие в процессе репликации ДНК<sup>/12/</sup>. Поскольку в клетках E.coli при определенных условиях роста может существовать более чем одна хромосома, то очевидно, что популяция гес<sup>-</sup>-мутантов весьма гетерогенна по своему составу, и это должно отражаться на характере зависимости S(D).

Гетерогенность популяции бактерий E.coli, как это следует из приведенных выше данных, в значительной степени обусловлена распределением клеток по разным стадиям клеточного цикла. В связи с этим рассмотрим более подробно особенности репликации ДНК у клеток E.coli,

#### ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ХРОМОСОМЫ У E.COLI И ФОРМА КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ

В<sup>/1/</sup> мы указывали, что на бактериальной хромосоме еще до окончания раунда репликации при определенных условиях /например, в богатой среде роста/ на вновь реплицированных участках ДНК образуются новые репликативные вилки. Это приводит к тому, что в условиях богатой среды наблюдается существенное возрастание количества ДНК на клетку<sup>/13/</sup>. Данное обстоятельство, как отмечено в<sup>/1/</sup>, может приводить к образованию плеча на кривой выживания. Опишем указанный процесс количественно в предположении, что вероятность инактивации генома, т.е. нарушение способности клеток к делению, не зависит от других факторов.

Предположим, что репродуктивная гибель бактерий E.coli происходит в том случае, когда в клетках с однокопийным геномом возникает по одному инактивирующему повреждению, а у "многокопийных" клеток реализация летального события происходит при возникновении инактивирующего повреждения в каждом из них. Примем далее, что событиями, вызывающими репродуктивную гибель клеток E.coli дикого типа, являются энзиматические или прямые двунитевые разрывы /ДР/ ДНК, и репарации ДР не происходит<sup>/6/</sup>. Количество копий генома в клетке, как отмечено в<sup>/1/</sup>, зависит от скорости роста культуры, времени цикла и от положения клетки в клеточном цикле /параметра x/. Пусть на единицу дозы облучения возникает S' инактивирующих повреждений. Вероятность инактивации единичного генома, в этом случае будет: I = 1 - S<sub>1</sub>, где S<sub>1</sub>(S', D) = S<sub>1</sub> = e<sup>-S'D</sup>.<sup>/3/</sup>

При наличии в геноме репликативной вилки вероятность инактивации будет зависеть от размера реплицированного участка хромосомы. Пусть этот участок хромосомы составляет ее y-ю часть. В таком случае вероятность инактивации клетки будет:

$$S_2(S', D, y) = S_2 = e^{-S'D}(2 - e^{-yS'D}). \quad /4/$$

При наличии двух геномов в клетке вероятность инактивации будет описываться известной двухмишенной формулой:

$$S_3(S', D) = S_3 = 1 - (1 - e^{-S'D})^2. \quad /5a/$$

В том случае, когда в клетке имеется двойная репликативная вилка, получаем:

$$S_4(S', D, y, T) = e^{-(1-y_1)S'D} \cdot p_1(2 - p_1) = e^{-S'D} \cdot e^{-yS'D} \cdot p_1(2 - p_1), \quad /5б/$$

где

$$p_1 = p_1(S', D, y, T) = S_2(y_1 \cdot S', D, y_2/y_1), \quad /5в/$$

причем

$$y_1 = y \text{ и } y_2 = y - T/40. \quad /5г/$$

На основании уравнений /3-5/ вероятность инактивации реплицирующейся хромосомы клеток (I = 1 - S) при разных значениях параметров x и T можем описать следующим образом:

1/ T > 60 мин /в предположении, что новый раунд репликации хромосомы наступает после времени T - 60/:

$$S(S', D, T, x) = \exp(-S'D) \quad \text{для } 0 < x < T - 60, \quad /6a/$$

$$= \exp(-S'D)(2 - e^{-yS'D}) \quad \text{для } T - 60 < x < T - 20, \quad /6б/$$

$$= 1 - (1 - e^{-S'D}) \quad \text{для } T - 20 < x < T, \quad /6в/$$

$$\text{где } y = \frac{x - T + 60}{40}.$$

$$2/ 40 \leq T \leq 60.$$

$$S(S', D, T, x) = S_2(S', D, y) \quad \text{для } 0 < x < T - 20, \quad /7a/$$

$$\text{где } y = \frac{60 - T + x}{40};$$

$$S(S', D, T, x) = S_3(S', D) \quad \text{для } T - 20 < x < 2T - 60, \quad /7б/$$

$$S(S', D, T, x) = 1 - [1 - S_2(S', D, y)]^2 \quad \text{для } 2T - 60 < x < T, \quad /7в/$$

$$\text{где } y = \frac{x - 2T + 60}{40};$$

$$3/ \quad 30 \leq T \leq 40.$$

$$S(S', D, T, x) = S_2(S', D, y) \quad \text{для } 0 < x < 2T - 60, \quad /8a/$$

$$\text{где } y = \frac{60 - T + x}{40};$$

$$S(S', D, T, x) = S_4(S', D, y, T) \quad \text{для } 2T - 60 < x < T - 20, \quad /8б/$$

$$\text{где } y = \frac{60 - T + x}{40};$$

$$S(S', D, T, x) = 1 - [1 - S_2(S', D, T, y)]^2 \quad \text{для } T - 20 < x < T, \quad /8в/$$

$$\text{где } y = \frac{60 + x - 2T}{40};$$

$$4/ \quad 20 \leq T \leq 30.$$

$$S(S', D, T, x) = S_4(S', D, y, T) \quad \text{для } 0 < x < T - 20, \quad /9а/$$

$$\text{где } y = \frac{x - T + 60}{40};$$

$$S(S', D, T, x) = 1 - [1 - S_2(S', D, y)]^2 \quad \text{для } T - 20 < x < 3T - 60, \quad /9б/$$

$$\text{где } y = \frac{-2T + x + 60}{40};$$

$$S(S', D, T, x) = 1 - [1 - S_4(S', D, y, T)]^2 \quad 3T - 60 < x < T, \quad /9в/$$

$$\text{где } y = \frac{-2T + x + 60}{40}.$$

Кривую выживания клеток для асинхронной популяции можно вычислить на основании уравнения /1/ в зависимости от времени клеточного цикла /6-9/ и дозы облучения. На рис.2 представлены теоретические кривые выживания клеток дикого типа, рассчитанные

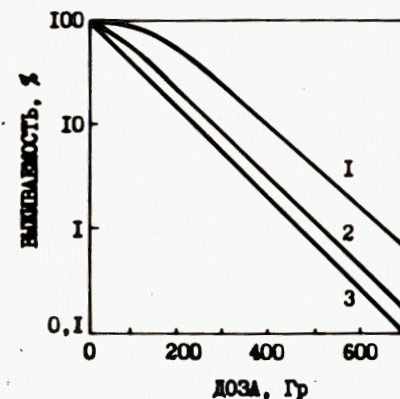


Рис.2. Влияние скорости роста бактерий *E. coli* дикого типа на форму кривой выживания при  $\gamma$ -облучении. 1 - активно растущая культура с  $T=20$  мин; 2 - культура с  $T=60$  мин; 3 - культура с  $T > 60$  мин. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

в предположении, что летальные события возникают с частотой  $0,01 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$  при разных значениях  $T$ . Видно, что с уменьшением значений параметра  $T$  и одновременно увеличением числа копий геномов на клетку/ кривая  $S(D)$  из экспоненциальной трансформируется в сигмоидную.

В<sup>1/</sup> отмечено, что одной из причин, обуславливающих нелинейность кривой выживания, может быть процесс образования протяженных одностеppedых брешей в молекуле ДНК, приводящий к возникновению ЭДР. Рассмотрим возможное влияние указанного фактора на форму кривой  $S(D)$  количественно.

#### ДЕГРАДАЦИЯ ДНК У *E. COLI* И ФОРМА КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ

Ранее<sup>/5/</sup> мы указывали на один из возможных механизмов образования особых "метастабильных состояний" /МС/ в ДНК клеток, которые могут формироваться из обширных экзонуклеазных брешей, не перекрывающихся между собой, но расположенных в непосредственной близости друг от друга. Такие повреждения могут репарироваться как два независимых ОР, но в эксперименте выявляться как ДР ДНК. В соответствии с предложенным механизмом выход регистрируемых ДР в зависимости от дозы облучения в таком случае должен быть нелинейным в области малых доз облучения и приводить к образованию плеча на кривой выживания. Действительно, пусть в клетке после облучения дозой  $D$  образуется  $N_1$  одностеppedых разрывов ДНК, которые трансформируются в обширные экзонуклеазные брешы. После облучения в клетке в среднем будет  $\bar{n} = N_1 D$  таких повреждений. Распределение указанных повреждений по клеткам носит случайный характер, и вероятность возникновения  $n$  повреждений в клетке описывается формулой Пуассона. В клетках, в которых сформировалось  $n$  повреждений, в среднем возникает  $\bar{n}_{\text{МС}}$  метастабильных состояний /см. также<sup>/5/</sup> /:

$$\bar{n}_{MC} = \frac{n-1}{2} (1 - e^{-m \cdot \frac{2\ell_0}{M}}), \quad /10/$$

где  $\ell_0$  - максимальная длина экзонуклеазной расщипки, выраженная в количестве нуклеотидов;  $M = 9 \cdot 10^6$  - количество нуклеотидов на геном;  $m = N_2 D$  - количество повреждений, приводящих к возникновению MC / $N_2$  - выход таких повреждений на единицу дозы/. Следует заметить, что величина  $m$  не обязательно должна быть равна величине  $n$  - числу повреждений, из которых образуются протяженные бреши. Можно предположить, что в образовании MC участвуют и ОР ДНК, восстанавливаемые быстрым типом репарации /ОР<sub>1</sub>/ /5/, а также ОР, возникающие из щелочеллабильных и щелочестабильных сайтов /4/. В образовании MC в этом случае могут участвовать указанные типы повреждений, если с ними связывается гес А-белок, и обширные экзонуклеазные бреши, расположенные на оппозитных нитях ДНК. В зависимости от того, какие типы повреждений ДНК могут участвовать в образовании MC, величина  $\ell_0$  может варьировать в пределах  $\sim 10^4 - 10^5$  нуклеотидов.

В процессе медленной репарации среднее количество MC уменьшается в  $k$  раз и после ее завершения будет составлять  $\bar{n}_{MC}/k$ . Вероятность того, что в клетке не останется ни одного MC, есть  $e^{-\bar{n}_{MC}/k}$ , и выживаемость в таком случае будет:

$$S = \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left\{-\frac{n-1}{2 \cdot k} \cdot (1 - e^{-m \cdot \frac{2\ell_0}{M}}) - \bar{n}\right\} \frac{\bar{n}^n}{n!}. \quad /11/$$

Если  $\bar{m}$  - среднее количество ОР<sub>1</sub>, то  $\bar{m}$  - достаточно большая величина /для клеток дикого типа она составляет  $\sim 10^2$  на  $D_0$  на геном/ и ее статистические флуктуации значительно меньше, чем величины  $n$ . С учетом этого выживаемость клеток будет описываться как:

$$S = \exp\left\{-\bar{n} \left(1 - e^{-\frac{m \cdot \frac{2\ell_0}{M}}{2k}}\right) + \frac{(1 - e^{-\frac{m \cdot \frac{2\ell_0}{M}}{2k}})}{2k}\right\}. \quad /12/$$

В предельном случае, когда  $(1 - e^{-\frac{m \cdot \frac{2\ell_0}{M}}{2k}})/2k \ll 1$ , получаем

$$S = \exp\left\{-\frac{\bar{n}-1}{2k} (1 - e^{-m \cdot \frac{2\ell_0}{M}})\right\}. \quad /13/$$

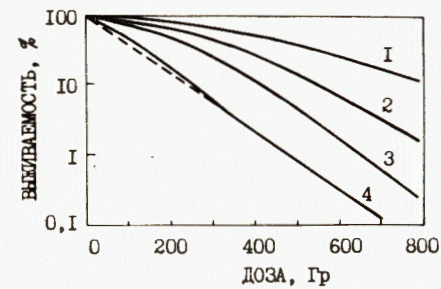


Рис.3. Кривые выживания бактерий *E. coli* дикого типа при разных значениях параметра  $\eta = N_{OP2}$

/или  $N_{OP1} \cdot \frac{2\ell_0}{M}$ , рассчитанные для  $N_{OP1} = 6 \cdot 10^{-12}$  сГр<sup>-1</sup> дальтон<sup>-1</sup>. и  $N_{OP2} = 6 \cdot 10^{-13}$  сГр<sup>-1</sup> дальтон<sup>-1</sup>.  $1/\eta = 0,0004$  при  $\ell_0 = 9 \cdot 10^3$

/для  $N_{OP2}$ / и  $\ell_0 = 9 \cdot 10^2$  /для  $N_{OP1}$ /; 2/  $\eta = 0,001$  при  $\ell_0 = 2,25 \cdot 10^4$  /для  $N_{OP2}$ / и  $\ell_0 = 2,25 \cdot 10^3$  /для  $N_{OP1}$ /; 3/  $\eta = 0,002$  при  $\ell_0 = 4,5 \cdot 10^4$  /для  $N_{OP2}$ / и  $\ell_0 = 4,5 \cdot 10^3$  /для  $N_{OP1}$ /; 4/  $\eta = 0,2 \div 0,02$  при  $\ell_0 = 4,5 \cdot 10^6 - 4,5 \cdot 10^5$  /для  $N_{OP2}$ / и  $\ell_0 = 4,5 \cdot 10^5 - 4,5 \cdot 10^4$  /для  $N_{OP1}$ /. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

На основании /11/-/13/ можно описать зависимости с большими экстраполяционными числами. На рис.3 приведены кривые S(D) для разных значений  $\ell_0$ . Видно, что при малых значениях  $\eta = N_2 \cdot \frac{2\ell_0}{M}$

выявляются кривые с ярко выраженным плечом и большим экстраполяционным числом. Однако при  $\eta > 0,02$  имеет место зависимость практически экспоненциального типа. Величина  $\eta = 0,02$  соответствует длине деградации  $\sim 5 \cdot 10^5$  нуклеотидов, если  $N_2$  соответствует выходу ОР<sub>2</sub>, и  $\sim 5 \cdot 10^4$ , если  $N_2$  - выходу ОР<sub>1</sub>.

В /1/ при анализе роли генетической рекомбинации в радиочувствительности клеток *E. coli* отмечено, что рекомбинационная репарация, по-видимому, не оказывает существенного влияния на чувствительность клеток к  $\gamma$ -облучению. Однако указанный механизм может быть одним из факторов, обуславливающих нелинейность зависимости S(D). В связи с этим представляется необходимым более детально рассмотреть возможное влияние рекомбинационной репарации /PP/ на форму кривых выживания бактерий *E. coli* при  $\gamma$ -облучении.

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ И ФОРМА КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ

Хорошо известно, что одной из форм пострепликативной репарации /PPP/ у бактерий при УФ-облучении является репарация пробелов путем рекомбинационных обменов между дуплексами по нуклеотидной гомологии /4/. Учитывая это, можно предположить, что

и при  $\gamma$ -облучении клеток *E. coli* происходит репарация поврежденных рекомбинационным механизмом, хотя ПРР у бактерий при  $\gamma$ -облучении не обнаружена<sup>/4/</sup>. Если допустить, что РР при  $\gamma$ -облучении *E. coli* происходит так же, как и при УФ-облучении, то можно ожидать, что РР будет осуществляться лишь на реплицированных участках бактериальной хромосомы, в некоторой области за репликативной вилкой. Пусть эта область составляет  $\xi_0$ -тую часть длины кольцевого генома *E. coli*. В таком случае РР будет происходить в области генома, равной:

$$\xi = \begin{cases} y & \text{при } \xi > y \\ \xi_0 & \text{при } \xi < y. \end{cases} \quad /14/$$

Предположим, что в этой области механизмом РР в значительной степени восстанавливаются повреждения, остающиеся не восстановленными механизмами дорепликативной репарации. Следовательно, реплицированные участки генома будут иметь меньшее количество повреждений по сравнению с нереплицированной частью генома, и инактивация клеток будет происходить от повреждений, возникающих главным образом в  $(1 - \xi)$ -той части целого генома. Рассмотрим два предельных варианта: вариант 1, когда наличие гомологического дуплекса всегда приводит к реализации РР, и вариант 2, когда РР возможна лишь в некоторой небольшой области за точкой репликации.

**Вариант 1.** Для данного случая характерна значительная гетерогенность по радиочувствительности облучаемой популяции клеток, например, для культуры с временем клеточного цикла, равном 60 мин  $\xi(x) = y(x) = \frac{x}{40}$  для  $x \in \langle 0, 40 \rangle$  и  $\xi = 1$  - для  $x \in \langle 40, 60 \rangle$ . Вычислим выживаемость клеток в предположении, что наибольший вклад в летальный эффект вносят повреждения, возникающие в нереплицированных участках генома. Обозначив  $b_1$  - чувствительность нереплицированных участков, а  $b_2 \ll b_1$  - чувствительность реплицированных участков, можем записать:

$$S(D) = \int_0^{60} e^{-(1-\xi(x)) \cdot b_1 \cdot D - \xi(x) \cdot b_2 \cdot D} \cdot 2ke^{-kx} dx, \quad /15/$$

где  $S$  - чувствительность одной копии генома. Зависимость  $S(D)$ , рассчитанная по /15/ при значениях  $b_1 = 0,1 \text{ Гр}^{-1}$  и  $b_2 = 0,01 \text{ Гр}^{-1}$ , представлена на рис. 4. Резистентный участок этой кривой соответствует фракции клеток с полностью реплицированной хромосомой. Начальная нелинейность приведенной зависимости может быть частично компенсирована фактором "многокопийности генома", обуславливающего появление плеча на кривой  $S(D)$ , поскольку уравнение /15/ его влияния не учитывает. Зависимость /2/ на рис. 4 рассчитана в предположении, что для инактивации клетки в каждой реплици-

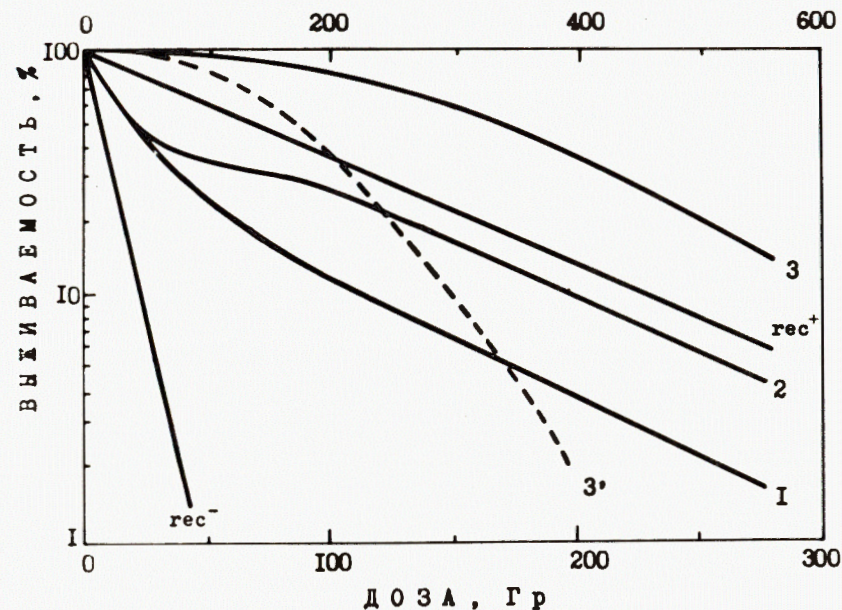


Рис. 4. Влияние рекомбинационной репарации на форму кривой выживания бактерий *E. coli*. 1 - кривая выживания, рассчитанная по /15/ в предположении, что наличие гомологического хромосомного дуплекса всегда приводит к осуществлению РР; 2 - кривая выживания, аналогичная кривой 1, но рассчитанная с учетом фактора "копийности генома"; 3 и 3' - зависимость  $S(D)$ , рассчитанная по /16/ в предположении, что длина участков ДНК, на которых может происходить РР, составляет  $\sim 10^5$  нуклеотидов. Нижняя дозовая шкала на оси абсцисс соответствует кривой 3, верхняя - кривой 3'. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

рованной области хромосомы необходимо возникновение по крайней мере по одному инактивирующему повреждению. Видно, что начальная нелинейность компенсируется плечом, однако прогиб кривой выживания в области малых доз облучения остается. Очевидно, что чем больше время клеточного цикла, тем меньше будет фракция резистентных клеток и, следовательно, резистентный "хвост" на кривой  $S(D)$  в таком случае будет возникать при больших дозах. Так, например, при  $T=120$  мин зависимость  $S(D)$ , рассчитанная на основании /15/ с учетом плеча, будет близка к кривой 1 на рис. 4. Заметим, что приведенные зависимости, как правило, не наблюдаются в эксперименте и, по-видимому, вариант 1 не отражает реальной ситуации.

**Вариант 2.** Если РР происходит лишь в некоторой малой области за точкой репликации, то чувствительность реплицированных участ-

ков хромосомы будет несколько меньше лишь в этой области по сравнению с остальными участками реплицированной хромосомы. Эта небольшая разница в чувствительности не приводит к нелинейности зависимости  $S(D)$ . Наклон кривых выживания в таком случае будет в  $1/(1 - \xi_0)$  раз меньше, а соответственно  $D_0$  - в  $1 - \xi_0$  раз больше. Следовательно, в случае реализации условий варианта 2 PP не может вносить существенного вклада в радиорезистентность клеток.

При обсуждении влияния PP на величину плеча зависимости  $S(D)$  у диплоидных дрожжей в [14] предполагалось, что PP может восстанавливать повреждения в гомологичных хромосомах при условии их нахождения на значительном расстоянии друг от друга - примерно на расстоянии  $10^4$  нуклеотидов. Проведем оценку возможного вклада PP в величину плеча у бактерий *E. coli*. У клеток *E. coli* при выходе MC /или измеряемых ДР/, равно  $2 \cdot 10^{-13}$  сГр<sup>-1</sup> дальтон<sup>-1</sup> [5], при  $D_0 = 200$  Гр в геноме возникает около 12 ДР. Если обозначить  $g$  - количество гомологичных участков ДНК, то вероятность повреждения такого участка будет  $\frac{12}{g} \ll 1$ , и вероятность повреждения двух гомологичных участков -  $(12/g)^2$ . Поскольку в клетке имеется  $g/2$  гомологичных пар, то среднее количество поврежденных гомологичных пар будет  $g/2 \cdot (12/g)^2 = 72/g$ . Если на  $D_0$  приходится одно летальное событие, получаем  $g = 72$ . Из вышеизложенного следует, что длина участков, на которых может происходить PP, составляет  $\sim 10^5$  нуклеотидов. Учитывая это, рассмотрим влияние PP, реализуемой при указанных условиях, на форму кривых выживания клеток.

Принимая количество повреждений равным  $0,06 \cdot D$ , получаем, что среднее количество поврежденных гомологичных пар будет  $g/2 \cdot \left(\frac{0,06 \cdot D}{g}\right)^2 = 2,5 \cdot 10^{-5} \cdot D^2$ . Предполагая пуассоновский характер распределения "гомологичных парных повреждений" по клеткам, кривую выживания можно описать как

$$S = e^{-a \cdot D^2}, \quad /16/$$

где коэффициент  $a = 2,5 \cdot 10^{-5}$  зависит от выхода повреждений и величины  $g$ . Зависимость /16/ представляет собой параболическую функцию в полулогарифмическом масштабе, которая описывает кривую с большим плечом без конечного наклона /рис.4/. Сопоставляя кривые, рассчитанные по уравнению /16/, с экспериментально получаемыми зависимостями  $S(D)$  сигмоидного характера, можно прийти к выводу о несоответствии теоретических и экспериментально получаемых кривых. Необходимое соответствие можно получить, если допустить, что длина гомологичных участков ДНК, которые могут участвовать в рекомбинационной репарации, еще большая, чем  $\sim 10^5$  нуклеотидов.

Таким образом, мы количественно рассмотрели влияние ряда факторов биологической природы, реализуемых на популяционном, клеточном и молекулярном уровнях, которые могут обуславливать, по нашим представлениям, сигмоидный характер кривых выживания бактерий *E. coli*. Нелинейность зависимости  $S(D)$ , по-видимому, является следствием реализации указанных механизмов при определенных условиях, поскольку процессы репликации, генетической рекомбинации и деградации ДНК находятся в органичной связи между собой. Для выяснения вклада конкретных механизмов в проявлении нелинейности зависимости  $S(D)$  целесообразно рассмотреть характер кривых выживания репарационных мутантов *E. coli* при  $\gamma$ -облучении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-645, Дубна, 1984.
2. Johansen I. et al. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 1975, 72, p. 167-171.
3. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-715, Дубна, 1983.
4. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.
5. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, 24, с.456-461.
6. Бреслер С.Е. и др. Радиобиология, 1981, 21, с. 3-7.
7. Амиртаев К.Г. и др. ОИЯИ, 19-83-904, Дубна, 1983.
8. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, 24, с. 462-467.
9. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, 24, с. 520-525.
10. Schueren E. et al. Radiat.Res., 1973, 55, p. 346-355.
11. Capaldo F.N. et al. J.Bacteriol., 1974, 118, p. 242-249.
12. Capaldo F.N., Barbour S.D. In: Molecular mechanisms for repair of DNA N.Y., Plenum Press, 1975, p. 405-418.
13. Cooper S., Helmstetter C. J.Mol.Biol., 1968, 31, p.519-540.
14. Amirtaev K.G. et al. JINR, E19-82-786, E19-82-792, Dubna, 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел  
24 сентября 1984 года.



Козубек С., Красавин Е.А.

P19-84-647

Факторы, определяющие характер кривых выживания бактерий *E. coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии. Форма кривых выживания клеток дикого типа при  $\gamma$ -облучении

Рассматриваются условия, при которых реализуются экспоненциальный и сигмоидный типы зависимости выживания ( $S$ ) бактерий *E. coli* дикого типа от дозы ( $D$ )  $\gamma$ -облучения. Показано, что величина угла наклона кривой выживания экспоненциального характера определяется энзиматическими двуниевыми разрывами ДНК, выход которых зависит от эффективности работы репарационных систем клетки. Нелинейный участок зависимости  $S(D)$  сигмоидного типа определяется рядом биологических механизмов, реализуемых на молекулярном, клеточном и популяционном уровнях. Проведен количественный анализ особенностей деградации ДНК и репликации бактериальной хромосомы. Обсуждается роль рекомбинационной репарации в нелинейном характере зависимости  $S(D)$ .

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Kozubek S., Krasavin E.A.

P19-84-647

Factors Determinating the Shape of Survival Curves of *Escherichia Coli* Cells Irradiated by Ionizing Radiation with Different LET. The Shape of Survival Curves of the Wild Type Cells Irradiated

The conditions of realization of exponential and sigmoidal types of dependences of the cell survival ( $S$ ) on the dose ( $D$ ) are considered. It is shown that radiosensitivity of the cell is determined by enzymatic double strand breaks (eDSB) of DNA. The induction of eDSB is determined by the repair systems of the cells. The shape of survival curves with shoulder is formed by biological mechanisms realized on molecular, cellular and population levels. Quantitative analysis of the peculiarities of DNA degradation and replication has been performed. The influence of the recombinational repair on sigmoidal type of the  $S(D)$  dependence is discussed.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984