

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-84-655

С.Козубек, Е.А.Красавин, Ч.Файси

ФАКТОРЫ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕР КРИВЫХ
ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ
Зависимость формы кривых выживания от ЛПЭ

1984

В^{1-3/} рассмотрено влияние ряда факторов биологической природы на форму кривых выживания бактерий *E.coli* при γ -облучении. Отмечено, что нелинейный характер зависимости выживания (S) клеток от дозы (D) γ -облучения может обуславливаться процессами, реализуемыми на популяционном, клеточном и молекулярном уровнях организации. Сигмоидная форма зависимости $S(D)$ у про- и эукариот, как известно, часто трансформируется в экспоненциальную при возрастании линейной передачи энергии (L) излучений^{4,5/}. На основе подходов, развитых в^{1-3/}, представляется возможным проведение теоретического анализа зависимости формы кривых выживания клеток от L у разных штаммов бактерий *E.coli*. Проведение такого анализа и явилось целью настоящей работы.

Закономерности изменения радиочувствительности бактерий *E.coli* с возрастанием L для клеток с экспоненциальной кривой выживания при γ -облучении рассмотрены нами ранее^{6/}. Для расчета характера зависимости от L сигмоидных при γ -облучении кривых выживания бактерий *E.coli* необходимо определить:

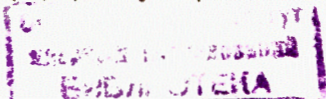
1/ доминирующий биологический механизм, обуславливающий наличие плеча на кривой выживания при γ -облучении;

2/ определить выход повреждений, являющихся летальными для *E.coli* дикого типа и чувствительных мутантов;

3/ рассчитать флуктуации энергии излучений с разной L по чувствительным микрообъемам клеток.

Из^{1-3/} следует, что среди биологических факторов, определяющих нелинейный характер зависимости $S(D)$ у *E.coli*, наиболее существенным является многокопийность генома, имеющая место в условиях богатой среды роста. Экспоненциальные кривые выживания клеток с геномом, близким к однокопийному, трансформируются в сигмоидные при большем количестве геномов на клетку. Экстраполяционное число сигмоидных кривых в этом случае достигает 6-7 и зависит от продолжительности клеточного цикла (T). С учетом этого, при анализе зависимости формы кривых выживания от L ограничимся рассмотрением фактора многокопийности генома.

Уравнения, по которым можно провести расчет кривых выживания для разных значений L при γ -облучении, представлены в^{2/}. Для этого необходимо иметь сведения о величине T и выходе летальных для клетки повреждений (S') на единицу дозы облучения. Для плотнoионизирующих излучений можем принять, что полученные уравнения справедливы и при расчете вероятности выживания клетки в результате выделения в ее нуклеоиде специфической энергии z . В таком случае от L и энергии частиц (E) зависит лишь выход повреждений S' : $S' = S'(L, E)$. Суммарное количество повреждений



на клетку при выделении энергии z будет равным $S' \cdot z$. Величину S' в зависимости от L можно рассчитать на основе представлений, развитых в^{7,9}, где рассмотрены закономерности образования одностранных разрывов /ОР/ и двунитевых разрывов /ДР/ ДНК разного происхождения: энзиматических ДР /ЭДР/ и прямых ДР /ПДР/. Согласно^{7,8}, ПДР возникают при формировании на оппозитных нитях ДНК двух ОР первого типа /ОР₁/. ОР₁ могут быть либо восстановлены, либо не восстановлены быстрым типом репарации (II). С возрастом L количество ПДР увеличивается, поскольку они могут возникать от нескольких одновременно происходящих актов передачи энергии излучения в цепи ДНК. В отличие от ПДР, ЭДР возникают преимущественно при γ -облучении.

В⁷ показано, что количество летальных для *E.coli* повреждений зависит от репарационного генотипа клетки. В общем виде для S' можем записать:

$$S' = \left(\frac{F - H}{Q_0} + H \right) / S_0 + \theta, \quad /1/$$

где F - выход ОР₁, H - выход ОР₁, не восстанавливаемых быстрым типом репарации^{7,8}, θ - выход ПДР ДНК, Q_0 и S_0 - коэффициенты, отражающие уменьшение количества повреждений системами быстрой и медленной репарации соответственно. При расчете величины F и θ в зависимости от L необходимо знать параметры излучения $/L$ и E и вероятность образования ОР₁ (w) на один акт передачи энергии излучения /60 эВ/⁹. Для расчета величины H необходима дополнительная информация о количестве не восстанавливаемых репарацией II ОР, приходящихся на один, два и более актов передачи энергии в одной нити ДНК. Согласно¹⁰, можем принять, что эти количества соответственно равны 5%, 30% и 100% из общего выхода ОР₁. Величину w на основании⁹ прием равной 0,8.

Расчет флуктуаций энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток был выполнен на основании распределений Ландау-Вавилова^{11,12} с использованием программы DISVAV /ЦЕРН/, которая позволяет вычислить для тонкого $/\sim 1$ мкм/ слоя вещества распределение потерь энергии при прохождении через этот слой заряженной частицы. Для расчета необходимо определить параметры λ и β^2 , связанные с характеристиками слоя вещества и излучения следующими уравнениями:

$$\lambda = \frac{\Delta - \bar{L}}{\xi \cdot i} - \ln \frac{\xi \cdot i}{E_{\max}} - \beta^2 - 0,423, \quad /2/$$

где

$$\Delta = \frac{z}{k_0}; \quad k_0 = \frac{160,2}{\sigma \cdot \rho \cdot x}; \quad \bar{L} = \bar{L}_1 \cdot i; \quad \bar{L}_1 = \xi \left(\ln \frac{2m_e \beta^2 \cdot E_{\max}}{(1 - \beta^2) \cdot J^2} - 2\beta^2 \right);$$

$$\xi = 3 \cdot 10^{-5} \cdot \rho \cdot x \cdot m_e \cdot \frac{Z}{A} \cdot Z^2 / \beta^2; \quad x = \frac{\xi}{E_{\max}} \cdot i; \quad E_{\max} = \frac{2m_e \beta^2}{1 - \beta^2};$$

$$\beta^2 = 1 - \frac{1}{(1 + E/m_n)^2}.$$

В этих уравнениях: z - специфическая энергия, Гр; σ - поперечное сечение нуклеоида, равное 0,3 мкм²; ρ - плотность вещества, г/см³; x - толщина мишени /нуклеоида/, равная 0,55 мкм; i - число частиц, проходящих через чувствительный объем; J - потенциал ионизации, равный 0,00007 МэВ; m_e - масса электрона, МэВ/с² /0,511 МэВ/с²/; c - скорость света в вакууме; Z/A - для вещества ткани равно 0,55; Z - заряд частицы; E - энергия частицы, МэВ/нуклон; m_n - масса нуклона, МэВ/с² /938 МэВ/с²/.

Интерпретация промежуточных параметров представлена в^{11,12}. Результатом вычислений, которые можно выполнить на основании изложенного выше, является вероятность передачи энергии чувствительному объему $f(z) = \text{DISVAV} / \xi$, нормированная на единицу, т.е. $\int_0^{\infty} f(z) dz = 1$. Учитывая, что толщина чувствительной мишени в нашем случае весьма мала и составляет 0,5 мкм, можно предположить, что при прохождении i частиц через слой указанной толщины получается распределение, соответствующее слою в i раз большей толщины /в распределении Ландау-Вавилова не учитываются краевые эффекты/.

Для той доли популяции клеток, у которой через нуклеоид прошло i частиц, выживаемость можно вычислить как:

$$S(i, S', T) = \int_0^{\infty} f(z, i) \cdot S(z, S', T) dz. \quad /3/$$

Поскольку вероятность прохождения i частиц через мишень при среднем их количестве

$$\bar{i} = \frac{D \cdot \sigma}{16 \cdot L} \quad /4/$$

будет определяться распределением Пуассона

$$P(i) = e^{-\bar{i}} \cdot \frac{\bar{i}^i}{i!}, \quad /5/$$

то выживаемость клеток при дозе D будет описываться как

$$S = \sum_{i=1}^{\infty} P(i) \cdot S(i, S', T). \quad /6/$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис.1 представлены расчетные кривые выживания бактерий *E.coli* дикого типа при γ -облучении и действии частиц с возрастающими значениями L : протонов, He₂, Li₃ и Be₄ с энергией 4 МэВ/нуклон. Указанная энергия частиц при проведении расчетов

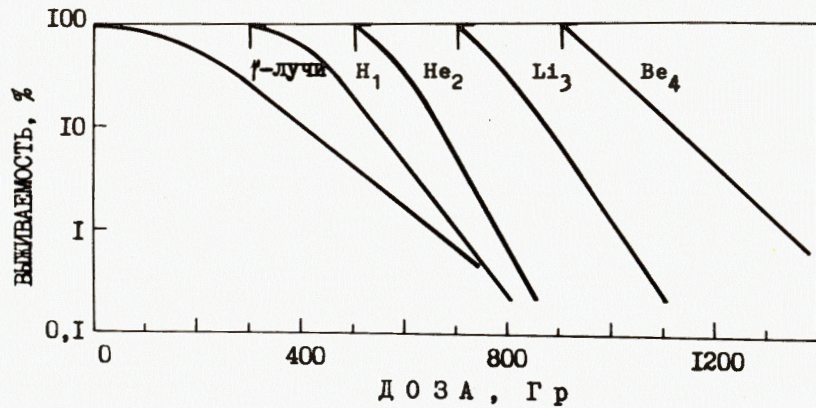


Рис.1. Кривые выживания бактерий *E.coli* дикого типа, рассчитанные для частиц с энергией 4 МэВ/нуклон при значении расчетных параметров: $Q_0 = 3,5$; $S_0 = 21,5$; $\sigma = 0,3 \text{ мкм}^2$ и $T = 20$ мин. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

была выбрана вследствие того, что размеры трека частиц с данной энергией еще сопоставимы с размером чувствительной мишени, и вкладом δ -электронов в величину флуктуации энергии можно пренебречь. Кривые $S(D)$ получены при значениях параметра $T = 20$ мин. Как можно видеть, плечо, резко выраженное на кривой выживания клеток при γ -облучении, постепенно уменьшается с возрастанием L . Если для протонов и ионов гелия плечо на кривой выживания сохраняется, то для ионов с $Z = 4$ зависимость $S(D)$ экспоненциальна. Экспоненциальный характер кривой выживания объясняется резким возрастанием флуктуаций энергии по чувствительным микрообъемам клеток. Это приводит к тому, что в результате попадания тяжелой ионизирующей частицы в нуклеоид с многокопийным геномом, одновременно инактивируются все чувствительные мишени клетки. Как можно видеть из представленных материалов, радиочувствительность клеток (D_0^{-1}) вначале возрастает с увеличением L , а затем происходит падение чувствительности при больших значениях L . Особенности зависимости $D_0^{-1}(L)$ для разных штаммов *E.coli* рассмотрены нами ранее^{/6/}.

На рис.2 приведены кривые выживания rec^- и $pol A^-$ -мутантов, вычисленные для тех же условий, что и для клеток дикого типа. Видно, что у чувствительных мутантов уменьшение плеча с ростом L происходит быстрее, чем у клеток дикого типа, и кривые выживания становятся экспоненциальными при меньших значениях L . Обращает на себя внимание снижение чувствительности клеток с увеличением L в отличие от клеток дикого типа. Это обстоятельство и обуславливает более быстрое исчезновение плеча у мутантов с увеличением L . Разный характер уменьшения экстраполяционного числа на кривых выживания у клеток дикого типа и чувст-

Рис.2. Кривые выживания rec^- и $pol A^-$ -мутантов бактерий *E.coli*, рассчитанные для частиц с энергией 4 МэВ/нуклон при значении расчетных параметров: $Q_0 = 10$; $S_0 = 1$ и $T = 20$ мин. Пунктирными линиями представлены зависимости $S(D)$ для $pol A^-$ -мутанта. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

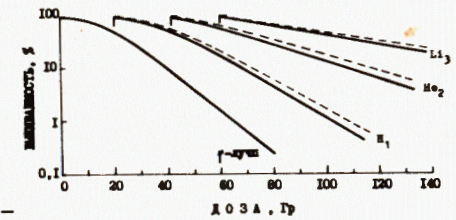
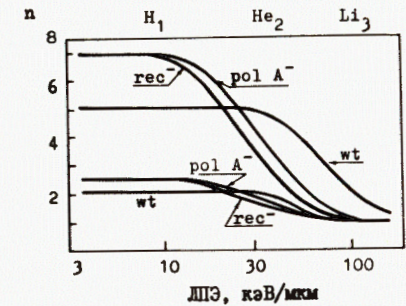


Рис.3. Величина экстраполяционного числа кривых выживания клеток дикого типа (wt) и чувствительных мутантов в зависимости от L . Верхние кривые для rec^- и $pol A^-$ -мутантов рассчитаны при значении параметра $T = 20$ мин, нижние - при $T = 40$ мин. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: величина экстраполяционного числа.



вительных мутантов с ростом L хорошо виден на рис.3. Расчет этих зависимостей был проведен в предположении экспоненциальности кривых $S(D)$ при $D = 400$ Гр. Поскольку у клеток дикого типа при указанной дозе γ -облучения кривая выживания еще не становится полностью экспоненциальной, при расчете получаем несколько заниженную величину экстраполяционного числа по сравнению с теоретически предельной величиной, равной ~ 8 для $T = 20$ мин.

Из кривых выживания, представленных на рис.1 и 2, можно определить значения радиочувствительности клеток /конечных наклонов кривых/ при разных величинах L . Представляет интерес сравнить полученные результаты с зависимостью $D_0^{-1}(L)$ для клеток *E.coli*, вычисленную нами ранее^{/6/} с использованием представлений, развитых в^{/13/}. Как видно из рис.4, результаты, полученные с помощью двух указанных методов, практически полностью совпадают. Хорошее согласие имеется для разных значений T , т.е. радиочувствительность клеток не зависит от наличия плеча на кривой выживания. Следует, однако, заметить, что полное соответствие наблюдается лишь для частиц с энергией 4 МэВ/нуклон. Для ионов с большей энергией степень соответствия меньшая, поскольку в этом случае существенную роль в инактивации клеток начинают играть δ -электроны, не учитываемые в расчете с использованием распределения Ландау-Вавилова.

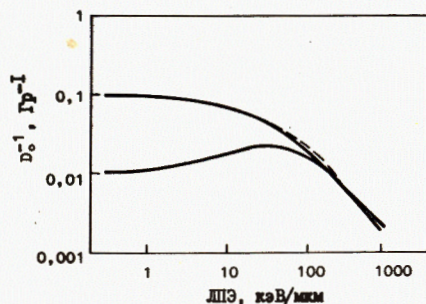


Рис.4. Зависимость радиочувствительности клеток дикого типа /1/ и his^- -мутанта /2/ от L , рассчитанная с использованием распределений Ландау-Вавилова /11,12/ и в соответствии с /13/. Зависимость $D_0^{-1}(L)$, рассчитанная на основании /13/, показана пунктиром. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: радиочувствительность, Gr^{-1} .

Таким образом, мы рассмотрели зависимость формы кривых выживания разных штаммов бактерий *E.coli* от L . Сигмоидные зависимости $S(D)$, получаемые для клеток с малым временем клеточного цикла, с увеличением L трансформируются в экспоненциальные, что связано с возрастанием флуктуаций энергии по чувствительным микрообъемам клеток. У чувствительных мутантов исчезновение плеча происходит при меньших значениях L , что обусловлено более быстрым падением радиочувствительности мутантов с ростом L по сравнению с клетками дикого типа. На основании проведенного цикла работ суммируем наши представления о факторах, определяющих характер кривых выживания бактерий *E.coli* при действии излучений с разной L .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При γ -облучении бактерий *E.coli* выявляются как сигмоидные, так и экспоненциальные кривые выживания. Экспоненциальный характер зависимости $S(D)$ обуславливается физической природой излучения, индуцирующего по случайному закону в генетическом аппарате клеток первичные повреждения, и биологическими механизмами, направленными на репарацию индуцированных повреждений. В том случае, когда репарация каждого возникающего в клетке при облучении первичного повреждения происходит случайно и независимо друг от друга на всех этапах восстановления и характер распределения по клеткам повреждений, остающихся не восстановленными, соответствует пуассоновскому, зависимость $S(D)$ будет носить экспоненциальный характер. Величина угла наклона экспоненциальной кривой выживания, отражающая радиочувствительность клеток, соответствует выходу нерепарируемых повреждений ДНК. Для клеток дикого типа такими повреждениями являются двунитевые разрывы ДНК, преимущественно энзиматического происхождения. Выход ЭДР ДНК связан с экспрессией $lex A$ -гес A -системы и зависит от среды роста. Изменение условий среды роста обуславливает разный выход ЭДР ДНК, а следовательно, и разную величину

угла наклона кривых выживания. Ингибирование механизмов репарации быстрого или медленного типов приводит к возрастанию радиочувствительности клеток, отражающейся в увеличении угла наклона кривых выживания.

Процессы, обуславливающие наличие плеча на кривых выживания, могут реализоваться на различном уровне биологической организации: молекулярном, клеточном и популяционном.

Механизмами, обуславливающими нелинейный характер зависимости $S(D)$ у клеток дикого типа на молекулярном уровне, могут являться процессы, связанные с образованием обширных участков деградации ДНК и приводящими к возникновению энзиматических двунитевых разрывов. Выход таких повреждений нелинеен в области малых доз облучения, что может приводить к образованию плеча на кривой выживания.

Особенности репликации бактериальной хромосомы, приводящие в определенных условиях к возникновению многокопийности генома, по-видимому, являются доминирующим фактором в формировании плеча на кривой выживания. Сигмоидность кривых выживания клеток с многокопийным геномом обуславливается тем, что для их инактивации необходимо возникновение нескольких инактивирующих повреждений в каждой из копий генома.

Генетическая рекомбинация у *E.coli* дикого типа не является фактором, играющим роль в радиочувствительности клеток. Высокая чувствительность his^- -мутантов к γ -облучению обусловлена не утратой у них способности к рекомбинационной репарации, а нарушением генетической регуляции синтеза гес A -белка, ограничивающего деградацию ДНК и обуславливающего выход ЭДР ДНК. Поскольку РР возможна лишь на реплицированных участках бактериальной хромосомы, можно полагать, что указанный механизм наряду с фактором многокопийности генома может участвовать в формировании плеча на кривой выживания клеток дикого типа.

Фактором, обуславливающим нелинейность зависимости $S(D)$ на популяционном уровне, является гетерогенный характер облучаемой популяции клеток. Наиболее существенной причиной такой гетерогенности у клеток дикого типа является распределение клеток по стадиям клеточного цикла. У чувствительных his^- -мутантов причиной гетерогенности популяции по радиочувствительности являются спонтанные повреждения генетического материала, возникающие при репликации ДНК. У гес $A^-B^-C^-$ и гес B^-C^- -мутантов, в отличие от гес A^- -мутантов, имеется класс клеток, промежуточный между жизнеспособными, образующими макроколонию, и нежизнеспособными клетками. Такие клетки более чувствительны к облучению, вследствие чего зависимость $S(D)$ у гес $A^-B^-C^-$ -мутантов описывается сложной кривой с прогибом в области малых доз облучения.

Кривые выживания сигмоидного типа γ -облученных клеток с малым временем клеточного цикла с увеличением L трансформируются в экспоненциальные. Указанная трансформация связана с возрастанием флуктуаций энергии по чувствительным микрообъемам клеток.

У чувствительных мутантов исчезновение плеча на кривой выживания происходит при меньших значениях L по сравнению с клетками дикого типа. Это связано с более быстрым снижением чувствительности rec^- -мутантов к действию излучений с возрастающими L .

В заключение выражаем глубокую благодарность профессору В.И.Корогодину за внимание к проведенному циклу работ и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-645, Дубна, 1984.
2. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-647, Дубна, 1984.
3. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-653, Дубна, 1984.
4. Munson R. et al. Int.J.Radiat.Biol., 1967. 13, p.205-224.
5. Todd P. Radiat.Res., 1975, 61, p.288-297.
6. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-884, Дубна, 1984.
7. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, 24, с.456-461.
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. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-743, Дубна, 1983.
11. Landau L. J. of Phys., 1944, 8, p.201-205.
12. Вавилов В.И. ЖЭТФ, 1957, 32, с.920-923.
13. Губин А.Т. и др. Радиобиология, 1977, 17, с.550-557.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 сентября 1984 года.

Козубек С., Красавин Е.А., Файси Ч.

P19-84-655

Факторы, определяющие характер кривых выживания бактерий *E.coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии. Зависимость формы кривых выживания от ЛПЭ

Рассматривается зависимость формы кривых выживания бактерий *E.coli* дикого типа, rec^- и $pol A^-$ -мутантов от величины линейной передачи энергии (L) излучений. Показано, что с увеличением L сигмоидные кривые выживания клеток дикого типа превращаются в экспоненциальные. Трансформация сигмоидных кривых в экспоненциальные у чувствительных мутантов, в отличие от клеток дикого типа, происходит при меньших значениях L . Проведено сопоставление результатов расчетов зависимости радиочувствительности клеток от L , полученных с использованием распределения Ландау-Вавилова и других методов. Показано, что для ионов с энергией 4 МэВ/нуклон наблюдается хорошее согласие результатов, полученных на основе разных методов расчета.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Kozubek S., Krasavin E.A., Fajszl Cs.

P19-84-655

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

The dependence of the shape of bacterial survival curve in the case of *Escherichia coli* wild type, rec^- and pol^- mutants on linear energy transfer has been considered. When increasing LET of the radiation the shouldered survival curves are transformed to exponential ones. In the case of sensitive mutants the transformation is observed for smaller values of LET. The dependence of cell sensitivity on LET calculated on the basis of Landau-Vavilov distributions has been compared with earlier calculations. The comparison showed good agreement between the two methods of calculation for ions with energy 4 MeV per nucleon.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984