

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-721

Е.А.Красавин, К.Г.Амиртаев, С.Козубек,
Б.Токарова, Н.В.Симонян*, Н.Л.Джанполадян*,
Л.Г.Степанян*, А.П.Череватенко

РОЛЬ ГЕНОТИПА
В ПРОТЕКТОРНОМ ВЛИЯНИИ ЦИСТЕАМИНА
И ГЛИЦЕРИНА НА КЛЕТКИ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ

* Ереванский физический институт,
Ереван

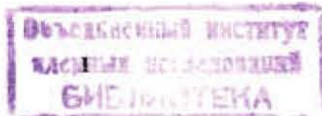
1985

Введение

Результаты исследований протекторного влияния аминотиолов и многоатомных спиртов на выживаемость бактерий *Escherichia coli* при γ -облучении свидетельствуют о неоднозначной зависимости их радиозащитного эффекта от генотипа клеток. Выяснено, что многие мутации, повышающие радиочувствительность бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, снижают защитное действие аминотиолов и индоллилалкиламинов ^{/1,2/}. В присутствии указанных радиопротекторов, как установлено, происходит снижение выхода энзиматических двуниевых разрывов (ЭДР) ДНК — основных летальных событий у клеток дикого типа, поскольку активность эндонуклеаз, производящих инсизию ферментлабильных сайтов, угнетается ^{/1,3/}. Вследствие того, что у чувствительных мутантов летальными являются не только двуниевые разрывы (ДР), но и другие типы повреждений ДНК, возникающие в большем количестве, чем ДР, лучшая сбалансированность процессов деградации и репарации ДНК при влиянии аминотиолов и индоллилалкиламинов не реализуется в виде радиозащитного эффекта. Глицерин — представитель класса многоатомных спиртов — эффективно защищает от летального действия γ -лучей не только клетки дикого типа, но и *rec A⁻*, *pol A⁻*-мутанты ^{/4/}. Показано, что глицерин реализует своё защитное действие не на уровне ферментативной репарации, а на уровне первичных физико-химических процессов ^{/4/}. С учётом указанных обстоятельств можно полагать, что при действии на клетки *E. coli* излучений с высокой линейной передачей энергии (1), когда возрастает выход прямых ДР (ЦДР) ДНК и однострунчатых разрывов (ОР), не восстанавливаемых *pol A⁻*-зависимой репарацией ^{/5,7/}, эффективность защитного действия аминотиолов и многоатомных спиртов будет проявляться по-разному: резко снижаться при влиянии цистеаминна и в меньшей степени — в присутствии глицерина. При этом радиозащитный эффект глицерина должен иметь место не только при облучении клеток дикого типа, но и чувствительных мутантов. Для проверки этих предположений и была выполнена настоящая работа.

Материалы и методы

В работе использованы следующие штаммы бактерий *E. coli*: дикий тип АВ 1157, чувствительные мутанты АВ 2463 (*rec A13*), Р 3478



(*pol A*⁻) и суперрезистентный мутант *Gam*^T444. Выращивание бактериальных культур проводили до стационарной фазы ($2-3 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл) либо на полной питательной среде, приготовленной на основе аминокислот, либо на среде YEP. В качестве радиопротекторов использовали цистеамин (фирма Sigma) и глицерин в концентрациях, соответственно равных $2 \cdot 10^{-2}$ М и 1 М. После выращивания клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 г). Культуру ресуспендировали в 1/3 объема M9 буфера и к части образцов добавляли протекторы в необходимой концентрации. Инкубация образцов с протекторами осуществлялась в течение 30 мин перед облучением. Условия аноксии создавали путем барботации суспензии азотом в течение 30 мин перед облучением.

Эксперименты с ускоренными ионами углерода с энергией 7,5 МэВ/нуклон проводили на ускорителе тяжелых ионов У-200 ДЯР ОИЯИ на специально созданной установке с комплексом электронно-физической аппаратуры. Облучение монослоев клеток проводили на поверхности 2% голодного агара. Мощность дозы облучения составляла 1,5 Гр/с.

Источником γ -лучей являлась установка с γ -источником ¹³⁷Са. Облучение клеток рентгеновыми лучами проводили с использованием аппарата РУП-200-20-5 (нефильтрованное излучение, напряжение на трубке 200 кВ, сила тока 14 мА). Мощность дозы γ - и рентгенооблучения составляла 0,58 Гр/с. В опытах с γ - и рентгеновыми лучами облучение клеток проводили во флаконах объемом 10 мл. Специально поставленные эксперименты показали, что способ облучения (на поверхности агара или в суспензии) не влиял на величину радиочувствительности клеток.

Опыты повторяли 3-5 раз. Полученные результаты подвергали статистической обработке на ЭВМ/4/.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены кривые выживания клеток АВ II57, АВ 2463 и Р 3478 при γ -облучении в обычных условиях и в присутствии цистеамина. Видно, что цистеамин эффективно защищает клетки дикого типа с фактором уменьшения дозы (ФУД), равным $2,28 \pm 0,35$. Однако его радиозащитный эффект практически исчезает при облучении клеток *rec A*⁻ и *pol A*⁻-мутантов. Величина ФУД в этом случае соответственно составляет $1,00 \pm 0,04$ и $1,39 \pm 0,21$. Аналогичная картина наблюдается и при облучении *rec A*⁻-мутанта рентгеновыми лучами (рис. 2). В отличие от клеток дикого типа, где величина ФУД составляет $2,31 \pm 0,18$, у *rec A*⁻-мутанта ФУД = $0,91 \pm 0,14$.

Анализ материалов, представленных на рис. 1, 2 и в таблице, показывает, что не только мутации в генах *rec A* и *pol A*, повышающие

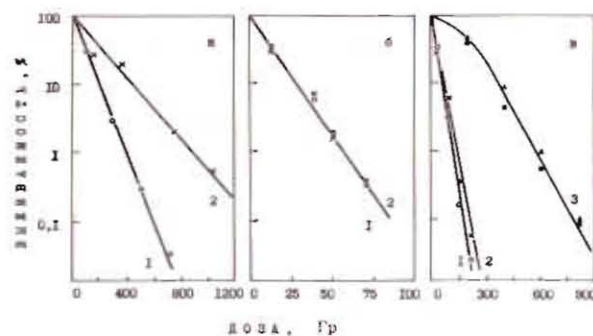


Рис. 1. Влияние цистеамина на выживаемость клеток АВ II57 (а), АВ 2463 (б) и Р 3478 (в) при γ -облучении: 1 — без протектора; 2 — с цистеамином; 3 — в условии аноксии без протектора (●), с цистеамином (Δ). По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

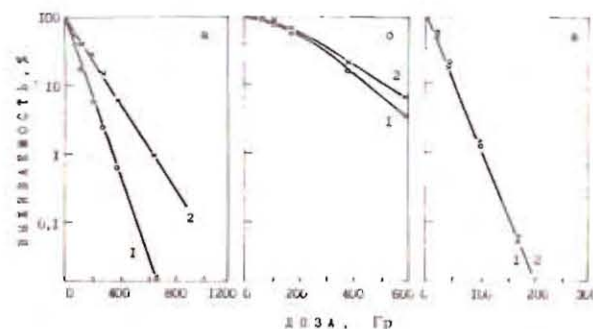


Рис. 2. Влияние цистеамина на выживаемость клеток АВ II57 (а), АВ III4 (б) и АВ 2463 (в) при рентгенооблучении: 1 — без протектора; 2 — с цистеамином. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

радиочувствительность клеток, снимают радиозащитный эффект цистеамина, но и мутанты *Gam*^T444, радиорезистентность которых существенно выше, чем у клеток дикого типа. Аналогичные наблюдения сделаны и другими авторами [5].

Таким образом, полученные нами материалы свидетельствуют о генетической детерминированности радиозащитного влияния цистеамина при γ -облучении клеток *E. coli*, что согласуется с данными, представленными в [1, 2]. Указанная детерминированность выражается в резком уменьшении величины радиозащитного эффекта у чувствительных и суперрезистентного мутантов, свидетельствующем о том, что реализация

протекторного действия цистеамин осуществляется на уровне ферментативной репарации ДНК /1,2,5/. В этой связи следует обратить внимание на незначительное модифицирующее влияние цистеамин при облучении клеток Р 3478 (рис.1). Действительно, если бы защитное действие протектора реализовалось на уровне первичных физико-химических процессов, в результате чего снижался бы выход первичных повреждений ДНК, то наиболее отчетливо протекторный эффект выявлялся бы у клеток $rol A^-$ мутанта /4,6/, что имеет место, например, при облучении штамма $rol A^-$ в условиях аноксии (рис.1). Из представленных материалов также видно, что у клеток данного штамма кислороднезависимый компонент защитного действия цистеамин полностью отсутствует.

Таблица. Влияние цистеамин и глицерин на радиочувствительность (D_0^{-1}) разных штаммов *E. coli* при действии γ -, рентгеновых лучей и ускоренных ионов углерода

Генотип	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, Gr^{-1}$		ФУД	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, Gr^{-1}$		ФУД
	без протектора	с цистеамином		без протектора	с глицерином	
γ-лучи ^{137}Cs						
Дикий тип	1,12±0,15	0,49±0,09	2,28±0,35	1,00±0,06	0,39±0,04	2,52±0,25
гес A^-	7,60±0,12	7,58±0,28	1,00±0,04	6,20±0,37	3,06±0,18	2,33±0,12
$rol A^-$	5,27±0,70	3,79±0,12	1,39±0,21	4,90±0,44	1,75±0,23	2,80±0,26
Рентгеновы лучи						
Дикий тип	1,69±0,13	0,73±0,05	2,31±0,18	-	-	-
гес A^-	4,21±0,22	4,62±0,29	0,91±0,13	-	-	-
$rol A^-$	0,74±0,08	0,62±0,09	1,19±0,17	-	-	-
Ионы углерода						
Дикий тип	3,05±0,31	2,72±0,26	1,12±0,11	2,76±0,11	2,03±0,11	1,36±0,12
гес A^-	1,79±0,18	1,77±0,17	1,00±0,10	1,79±0,14	1,34±0,09	1,34±0,11

В отличие от цистеамин глицерин эффективно защищает не только клетки дикого типа, но и чувствительные мутанты (рис.3, таблица). При этом можно заметить, что в наибольшей степени, по сравнению с гес A^- мутантом и клетками дикого типа, защитное действие глицерина выражено при облучении клеток $rol A^-$ мутанта, т.е. эффективность протекторного влияния последовательно возрастает в ряду изученных

штаммов *E. coli*: гес A^- мутант → дикий тип → $rol A^-$ мутант. Аналогичная картина наблюдается и при изучении кислородного эффекта /4/. Величина кислороднезависимого компонента у клеток $rol A^-$ мутанта, так же как и у клеток дикого типа и гес A^- мутанта /4/, равна ~2 (рис.3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отличие от аминокислот радиопротекторное влияние глицерина реализуется на физико-химическом уровне, а не на уровне ферментативной репарации.

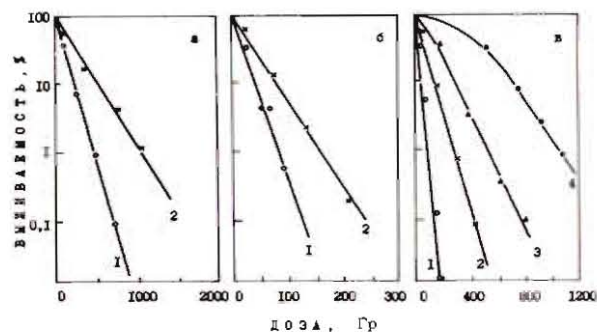


Рис.3. Влияние глицерина на выживаемость клеток AB II57 (а), AB 2463 (б) и P 3478 (в) при γ -облучении. 1 - без протектора; 2 - с глицерином; 3 - в условиях аноксии без протектора; 4 - в условиях аноксии с глицерином. По оси абсцисс: доза облучения, Gr; по оси ординат: выживаемость, %.

Модельный анализ генетической детерминированности защитного влияния глицерина, проведенный в /4/, показал, что его протекторный эффект можно объяснить снижением выхода односторонних разрывов ДНК, восстанавливаемых $rol A^-$ зависимой репарацией (OR_I^R). Показано, что снижение OR_I^R , которое может происходить за счет способности глицерина перехватывать OH^- радикалы, должно по-разному отражаться на уменьшении радиочувствительности клеток гес A^- мутанта, дикого типа и $rol A^-$ мутанта /4/. Как можно видеть из рис.3, это действительно имеет место: наименее выражено защитное влияние глицерина при облучении клеток гес A^- мутанта и наибольший защитный эффект наблюдается для $rol A^-$ мутанта.

Одинаковая величина кислороднезависимого компонента для гес A^- мутанта, клеток дикого типа и $rol A^-$ мутанта может указывать на то, что в присутствии глицерина снижается не только выход OR_I^R , но и выход OR ДНК, не восстанавливаемых $rol A^-$ зависимой репарацией (OR_I^R) /4/. С учетом этого можно полагать, что при действии на клетки излу-

чений с высокой I , когда выход OP_I^{ir} и ЦДР увеличивается^{/7/}, защитное действие глицерина также будет иметь место. Действительно, анализ материалов, представленных на рис.4 и в таблице, показывает, что глицерин защищает клетки дикого типа и $rec A^-$ -мутанта от летального действия ускоренных ионов с ФУД, соответственно равными $1,36 \pm 0,12$ и $1,32 \pm 0,11$. В то же время цистеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным (рис.4).

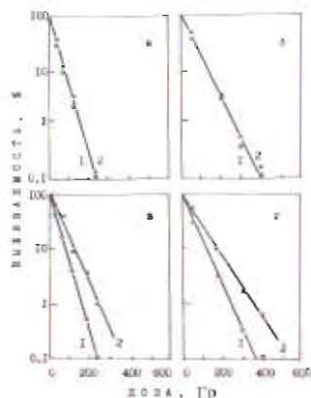


Рис.4. Влияние цистеамина (а,б) и глицерина (в,г) на выживаемость клеток AB II57 (а,в) и AB 2463 (б, г) при действии ионов углерода. 1 - без протектора; 2 - с протектором. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

На основе полученных материалов по защитному влиянию глицерина при действии ускоренных ионов углерода, а также модельных представлений, развитых ранее^{/8/}, приведем оценку модифицирующего влияния глицерина на выход OP_I^{ir} и ЦДР - повреждений, являющихся летальными для клеток $rec A^-$ -мутанта и дикого типа. Расчеты, выполненные на основе модели, показывают, что выход OP_I^{ir} и ЦДР у $rec A^-$ -мутанта при действии ускоренных ионов углерода соответственно составляет 54 % и 33 % от общего выхода летальных повреждений. У клеток дикого типа эти величины равны 7 % и 86 %. Используя значения ФУД глицерина при облучении клеток $rec A^-$ -мутанта и дикого типа ионами углерода, а также учитывая флуктуации энергии тяжелых заряженных частиц по чувствительным микрообъемам клеток, получаем суммарный выход OP_I^{ir} и ЦДР в присутствии глицерина в случае $rec A^-$ -мутанта, который в 1,7 раза меньше, чем в обычных условиях. У клеток дикого типа выход ЦДР под влиянием глицерина в этом случае уменьшается примерно в два раза. Полученные величины соотношений выходов летальных событий у клеток, облученных ионами углерода в присутствии глицерина, не коррелируют со значениями ФУД по выживаемости клеток, наблюдаемыми нами

в эксперименте. Это объясняется тем, что при действии на клетки ускоренных ионов углерода имеют место большие флуктуации энергии по чувствительным клеточным объемам, что обуславливает высокую степень неравномерности их облучения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что защитное действие цистеамина и глицерина генетически детерминировано, однако выявленная детерминированность неоднозначна: в случае цистеамина она выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае глицерина - возрастании протекторного влияния в ряду изученных штаммов *E. coli*: $rec A^-$ -мутант \rightarrow клетки дикого типа \rightarrow $pol A^-$ -мутант. Это обусловлено тем, что аминополиолы реализуют своё защитное действие на уровне ферментативной репарации, а спирты - на уровне первичных физико-химических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bresler S.K. et al. *Molec. Gen. Genet.*, 1978, v.163, p.75.
2. Калинин В.Л. и др. *Радиобиология*, 1979, т.19, с.548.
3. Кузнецова Е.А. и др. *Радиобиология*, 1983, т.23, с.730.
4. Амиртаев К.Г. и др. *Studia Biophysica*, 1985, v.106, p.131.
5. Калинин В.Л., Вербенко В.Н. В кн.: *Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности*. М, Наука, 1983, с.95.
6. Козубек С., Красавин Е.А. ОИИ, 19-83-744, Дубна, 1983.
7. Козубек С., Красавин Е.А. ОИИ, 19-83-743, Дубна, 1983.
8. Kozubek S., Krasavin E.A. *Neoplasma*, 1984, v.31, p.685.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 октября 1985 года.