

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

P19-86-450

О.В.Комова, Е.В.Головачева

**КИСЛОРОДНЫЙ ЭФФЕКТ У КЛЕТОК *E.coli* K-12  
С РАЗЛИЧНЫМ РЕПАРАЦИОННЫМ ГЕНОТИПОМ  
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ НЕЙТРОНАМИ И  $\gamma$ -ЛУЧАМИ**

Направлено в журнал "Радиобиология"

**1986**

Одной из ключевых в радиобиологии является проблема кислородного эффекта (КЭ). Ее исследованию посвящена обширная литература, в которой представлен большой фактический материал, касающийся феноменологии этого явления, и предпринимаются попытки объяснения его природы. Вместе с тем экспериментальные данные о зависимости КЭ от способности клеток репарировать повреждения ДНК весьма ограничены. Особое место занимают работы, выполненные на изогенных чувствительных мутантах *E. coli* K-12, имеющих различные дефекты в системе репарации ДНК. Эта группа штаммов является наиболее удобным объектом для изучения влияния биологических факторов на КЭ. На этих штаммах было показано, что дефекты в механизме репарации ДНК, как правило, приводят к уменьшению КЭ, но при наличии в геноме *pol A<sup>-</sup>*-мутации наблюдается его возрастание по сравнению с клетками дикого типа<sup>/1-3/</sup>. Указанные работы выполнены с использованием редкоизионизирующих излучений. Такого рода исследования для излучений с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ), к которым относятся и быстрые нейтроны спектра деления, не проводились. На клетках про- и эукариот было показано, что с возрастанием ЛПЭ излучений величина КЭ снижается<sup>/4/</sup>. Однако роль различных типов ферментативной репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у клеток при действии плотнoионизирующих излучений не изучалась. Исследованию этого вопроса и посвящена наша работа.

#### Материал и методика

В работе использовались клетки *coli* K-12 дикого типа АВ I157 (гес  $A^+$  *uvr A^+*), KS I20 (*pol A^+*), а также репарационные мутанты АВ 2463 (гес  $A^-$ ), АВ 2480 (гес  $A^-$  *uvr A^-*) и KS I63 (*pol A^-*).

Ночную культуру клеток, выращенную до стационарной фазы ( $5 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл) на полной питательной среде (мясо-пептонный бульон)\*, центрифугировали и ресуспендировали 1:5 в M-9 буфере. Приготовленную таким образом суспензию помещали во флаконы по 3 мл. Условия аноксии создавали путем барботации исходной суспензии азотом в течение 20 минут перед облучением. В экспериментах с нейтронами

\* Все используемые в работе питательные среды изготовлены предприятием по производству питательных сред при Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи.

продувку осуществляли и в процессе самого облучения, что было обусловлено длительностью экспозиции образцов в нейтронном пучке. После облучения клетки в соответствующем разведении высевались на твердую питательную среду (мясо-пептонный агар) и инкубировались в течение суток при 37°C. Число выживших клеток определяли по количеству образованных колоний.

В качестве источника  $\gamma$ -лучей использовался  $^{137}\text{Cs}$ . Мощность дозы  $\gamma$ -излучения составляла 35 Гр/мин. Облучение нейтронами проводили в биофизическом канале импульсного реактора на быстрых нейтронах ИБР-2 Объединенного института ядерных исследований [5]. Спектр нейтронов данного реактора при энергиях выше 0,5 МэВ близок к спектру деления, а в результате замедления быстрых нейтронов он смягчается и его средняя энергия становится равной 0,75 МэВ. Для уменьшения плотности потока тепловых и резонансных нейтронов в пучке был установлен фильтр из 1 см  $\text{B}_4\text{C}$ . Средняя мощность дозы составляла 0,7 Гр/мин, вклад  $\gamma$ -лучей в общую дозу - 25%. Нейтронная доза измерялась при помощи тканезквивалентной ионизационной камеры и кремниевого детектора с полиэтиленовым конвертором, а доза от  $\gamma$ -лучей - ионизационной камерой с алюминиевыми стенками.

Полученные данные по выживаемости клеток подвергались статистической обработке на ЭВМ с использованием метода наименьших квадратов.

### Результаты

На рис.1 представлены кривые выживания при  $\gamma$ -облучении исследованных в работе штаммов *E.coli* K-12 в условиях аноксии и нормальной оксигенации.

Как видно, отсутствие кислорода в среде существенным образом влияет не только на радиочувствительность клеток, но и на форму кривых выживания. В аэробных условиях (рис.1 а) дозовые зависимости строго экспоненциальны. Значения средней летальной дозы ( $D_{50}$ ) для мутантных клеток варьируют в узком диапазоне и составляют  $15,2 \pm 1,1$  Гр,  $18,8 \pm 0,72$  Гр,  $21,1 \pm 0,96$  Гр для гес  $\text{A}^- \text{uvrA}^-$ ;  $\text{polA}^-$ -и гес  $\text{A}^-$ -мутантов соответственно (таблица). Эти величины приблизительно в 3,5 - 4,5 раза ниже, чем для клеток дикого типа.

Иная картина наблюдается для аноксических условий (рис.1 б). В этом случае дозовые зависимости имеют выраженное в большей или меньшей степени плечо. Лишь кривая для гес  $\text{A}^- \text{uvrA}^-$ -мутанта всегда сохраняет экспоненциальную форму. Клетки всех штаммов проявля-

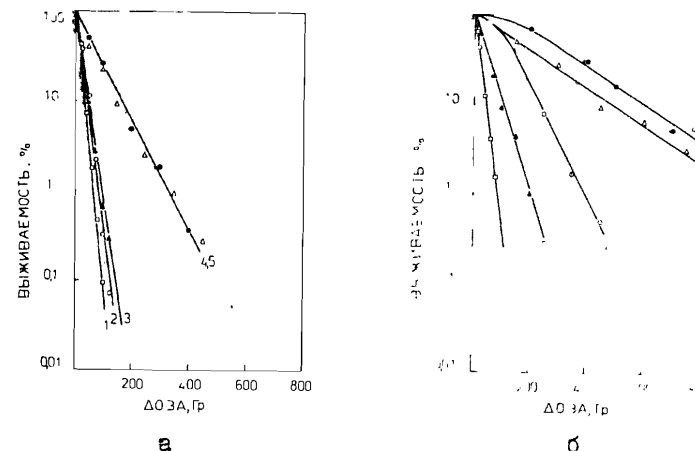


Рис.1. Кривые выживания клеток *E.coli* K-12 при  $\gamma$ -облучении в аэробных (а) и аноксических (б) условиях: 1 - АВ 2480, 2 - КS 163, 3 - АВ 2463, 4 - КS 120, 5 - АВ 1157. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, %.

ют в этих условиях большую радиорезистентность. Степень её увеличения отражает значения ККУ, которые приведены в таблице. Анализируя эти данные, можно заключить, что кислородный эффект при действии

$\gamma$ -лучей существенным образом зависит от репарационного генотипа клеток и увеличивается в ряду изученных штаммов АВ 2480 → АВ 2463 → АВ 1157, КS 120 → КS 163. У последнего ККУ оказывается даже выше, чем у клеток дикого типа и составляет  $3,74 \pm 0,14$ .

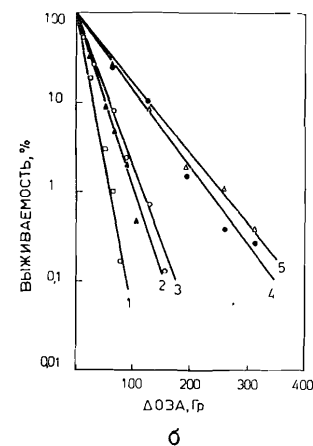
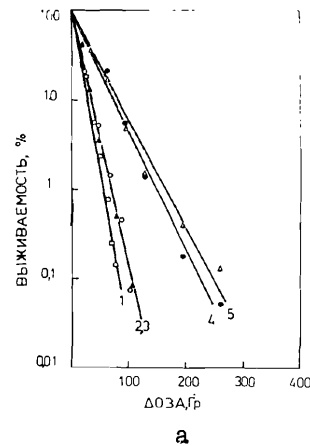
Кривые выживания для клеток, облученных нейтронами в аэробных и аноксических условиях, представлены на рис.2. Видно, что независимо от газовых условий кривые имеют экспоненциальную форму. В условиях нормальной оксигенации (рис.2 а) их наклон и взаимное расположение у мутантных штаммов практически не отличаются для нейтронов и  $\gamma$ -лучей. Это находит своё отражение в величинах относительной биологической эффективности (ОБЭ) нейтронов, которые приведены в таблице. Значения данного параметра для репарационных мутантов близки к 1, и только для клеток дикого типа нейтроны оказываются примерно вдвое эффективнее  $\gamma$ -лучей.

В аноксических условиях (рис.2 б) радиочувствительность уменьшается по сравнению с аэробными незначительно и почти в равной степени для всех штаммов (ККУ = 1,41 - 1,57). Исключением является

**Таблица.** Коэффициенты кислородного усиления и ОБЭ нейтронов у клеток *E. coli* K-12 с различными репарационным генотипом

Штамм	γ-облучение			Нейтронное облучение			ОБЭ
	Д <sub>0</sub> в аэробных условиях, Гр	Д <sub>0</sub> в аноксических условиях, Гр	ККУ *	Д <sub>0</sub> в аэробных условиях, Гр	Д <sub>0</sub> в аноксических условиях, Гр	ККУ	
AB II57 (гес <sup>+</sup> uvrA <sup>+</sup> )	73,3±2,15	214,8±14,7	2,93±0,20	36,2±2,82	55,8±5,2	1,54±0,14	2,02±0,16
KS I20 (pol A <sup>+</sup> )	72,4±3,00	211,5±13,1	2,92±0,18	32,8±3,1	50,5±4,87	1,54±0,15	2,21±0,21
KS I63 (pol A <sup>-</sup> )	18,8±0,72	70,3±2,15	3,74±0,14	16,2±0,46	25,5±1,67	1,57±0,10	1,16±0,04
AB 2463 (гес A <sup>-</sup> )	21,1±0,96	42,0±2,46	1,99±0,12	15,9±0,75	22,4±1,58	1,41±0,10	1,33±0,06
AB 2480 (гес <sup>-</sup> uvrA <sup>-</sup> )	15,2±1,1	19,2±0,63	1,26±0,09	12,6±1,08	13,3±1,3	1,06±0,10	1,21±0,10

\* ККУ =  $\frac{D_0 \text{ условия аноксии}}{D_0 \text{ аэробные условия}}$



**Рис.2.** Кривые выживания клеток *E. coli* K-12 при нейтронном облучении в аэробных (а) и аноксических (б) условиях: 1 - AB 2480, 2 - KS I63, 3 - AB 2463, 4 - KS I20, 5 - AB II57. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, %.

двойной мутант AB 2480, у которого КЭ вообще не выявляется.

Сравнивая значения ККУ при облучении клеток *E. coli* K-12 γ-лучами и нейтронами, можно заключить, что в последнем случае величина кислородного эффекта снижается, а характерная для γ-лучей зависимость КЭ от репарационного генотипа клеток при действии нейтронов практически отсутствует.

### Обсуждение

Роль восстановительных процессов в реализации кислородного эффекта является твердо установленным фактом. Причем до недавнего времени считалось общепринятым, что наличие любого дефекта в системе ферментативной репарации приводит к уменьшению ККУ. Это нашло свое отражение во всех ранее выдвинутых гипотезах о механизме КЭ [6]. Эти теории в схематическом виде отображают феноменологию данного явления и не затрагивают молекулярных основ индукции и репарации основных типов повреждений ДНК в аэробных и аноксических условиях при действии излучений разного качества, без учета которых невозможно, по-видимому, непротиворечивое объяснение всего многообразия в проявлении КЭ.

Так, в рамках современных представлений не находят объяснения полученные в настоящей работе, а также в работах некоторых других авторов /1-3/, экспериментальные данные о величине КЭ у репарационных мутантов *E. coli* K-12. В частности, утверждению, что любые дефекты в механизме ферментативной репарации уменьшают величину КЭ, противоречит тот факт, что у *pol A*<sup>-</sup>-мутанта значение этого параметра при  $\gamma$ -облучении оказалось выше, чем у клеток дикого типа. Кроме того, в современных теориях кислородного эффекта не дифференцируется роль различных типов ферментативной репарации ДНК в его проявлении. Тем не менее эта особенность при  $\gamma$ -облучении ясно просматривается. Так, КЭ в наших опытах варьировал в широких пределах в зависимости от того, был ли в клетках заблокирован быстрый (т.н. *pol A*-зависимый) тип репарации, медленный (т.н. *tes*-lex-зависимый) или, кроме того, они не могли осуществлять инцизию пиримидиновых димеров. По-видимому, следует допустить, что наличие модифицируемых и немодифицируемых кислородом первичных повреждений ДНК при действии на клетки радиации предполагает участие в их восстановлении разных типов ферментативной репарации.

Молекулярная интерпретация природы кислородного эффекта дана в /7/, в которой предполагается, что часть индуцируемых при облучении  $\gamma$ -сайтов, трансформируемых в одностранные разрывы (ОР) ДНК, не модифицируется или слабо модифицируется кислородом и не восстанавливается *pol A*-зависимой репарацией. Их восстановление возможно лишь по *tes*-зависимому пути. В рамках этих представлений возможно непротиворечивое объяснение роли различных систем репарации в реализации КЭ у *E. coli*.

Эти же авторы в /8,9/ предприняли попытку провести теоретический анализ особенностей проявления КЭ у *E. coli* с различным репарационным генотипом при действии плотнойизирующих излучений. Уменьшение КЭ с увеличением ЛПЭ они связывают с возрастанием числа ОР, не модифицируемых (или слабо модифицируемых) кислородом и не восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией, а также с возрастанием флуктуаций энергии по чувствительным микрообъемам клетки в области ЛПЭ свыше 100 кэВ. Для клеток дикого типа существенное влияние на уменьшение значения КЭ оказывает увеличение выхода прямых двустранных разрывов ДНК.

Следует заметить, что выдвинутые ранее другими авторами гипотезы, объясняющие уменьшение КЭ с ростом ЛПЭ образованием кислорода в треках заряженных частиц, взаимодействием "множественных" радикалов вблизи клеточных мишеней /10/ и др., не выдержали экспериментальной

проверки и выявили ряд противоречий. Поэтому вопрос о причинах уменьшения кислородного эффекта с ростом ЛПЭ, а также об отсутствии зависимости величины КЭ от репарационного генотипа клеток при облучении частицами с высокой плотностью ионизации остается открытым и нуждается в тщательном изучении. Необходимо, по-видимому, и разработка новых подходов в исследовании участия репарационных систем клетки в реализации кислородного эффекта, что позволило бы создать единую концепцию, отражающую все особенности проявления этого феномена.

Авторы признательны В.М.Назарову и Е.А.Красавину за полезные обсуждения, Ким Хи Сун - за помощь в работе.

#### Литература

1. Youngs D.A., Smith K.C.J. *Bacteriol*, 1973, v.114, No.1, p.121-127.
2. Sapora O., Fielden E.M., Loverock P.S. *Radiat.Res.*, 1977, v.69, No.2, p.293-305.
3. Красавин Е.А., Амиртаев К.Г., Козубек С., Токарова Б., Симонян Н.В., Джанполадян Н.Л., Степанян Л.Г., Череватенко А.П. ОИЯИ, Р19-85-721, Дубна, 1985.
4. Alper T. In: *Cellular Radiobiology*. Cambridge Univ. Press Cambridge-London-New York-Melbourne, 1979, p.123.
5. Назаров В.М., Павлов С.С., Переседов В.Ф., Фронтьева М.В. Краткие сообщения ОИЯИ, № 6-85, Дубна, 1985, с.37-45.
6. Эйбус Л.Х., Корыстов Ю.Н. В кн.: *Кислород в радиобиологии*. М., Энергоатомиздат, 1984, с.51.
7. Kozubek S., Krasavin E.L. *JINR*, E19-84-826, Dubna, 1984.
8. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-743, Дубна, 1983.
9. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-788, Дубна, 1983.
10. Alper T., Bryant P.E. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.26, No.2, p.203-208.

Рукопись поступила в издательский отдел  
7 июля 1986 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
D11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
D7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
D2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.
D13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
D2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
D1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
D17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р. 75 к.
D10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983	3 р. 50 к.
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984 /2 тома/	13 р. 50 к.
D4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра, Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
D11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.
D13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна 1985.	4 р. 80 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:  
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79  
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Комова О.В., Головачева Е.В. P19-86-450  
Кислородный эффект у клеток E.coli K-12 с различным репарационным генотипом при облучении нейтронами и  $\gamma$ -лучами

Показано, что при облучении  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  величина коэффициента кислородного усиления /ККУ/ существенным образом зависит от репарационного генотипа клеток E.coli K-12 и увеличивается в ряду исследованных штаммов  $\text{rec A uvr A}^+ \rightarrow \text{rec A}^+ \rightarrow$  дикий тип  $\rightarrow \text{pol A}$ . Эти различия нивелируются при действии быстрых нейтронов спектра деления со средней энергией 0,75 МэВ. При этом значения ККУ для всех штаммов снижаются, а у двойного  $\text{rec A uvr A}^-$  мутанта кислородный эффект /КЭ/ практически отсутствует.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод О.С.Виноградовой

Komova O.V., Golovatcheva E.V. P19-86-450  
Oxygen Effect of E.coli K-12 with Different Repair Genotype at the Bombardment by Neutrons and  $\gamma$ -Rays

It is shown that the value of oxygen enhancement ratio (OER) depends essentially on repair possibilities of cells E.coli K-12 at  $^{137}\text{Cs} - \gamma$ -irradiation. It increases in a range of investigated strains  $\text{rec A uvr A}^+ \rightarrow \text{rec A}^+ \rightarrow$  wild type  $\rightarrow \text{pol A}$ . These differences disappear under action of fast neutron fission spectra with 0.75 MeV mean energy. OER values for all strains have been reduced in this case, and double mutant  $\text{rec A uvr A}^-$  practically has not any oxygen effects.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986