

СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

Г 525

P19-88-842

А.В.Глазунов

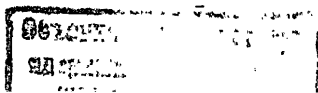
МЕХАНИЗМЫ ЛУЧЕВОЙ ИНАКТИВАЦИИ  
ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ

1988

Индукция и репарация двунитевых разрывов (ДНР) ДНК традиционно считаются основными процессами, определяющими чувствительность клеток к ионизирующей радиации. Однако попытки непосредственно связать количество двунитевых разрывов ДНК, остающихся в облученной клетке по завершении репарационных процессов, с вероятностью ее гибели особого успеха не имели. По мере изучения механизмов репарации ДНР ДНК становится все более ясным, что этот процесс является сложным и многоступенчатым, осуществление каждого этапа которого в значительной степени определяется условиями облучения и пострadiационного культивирования клеток. Данная работа представляет собой попытку выделить процессы (так или иначе связанные с индукцией и репарацией ДНР ДНК), которые, на наш взгляд, могут существенным образом сказываться на конечном радиобиологическом эффекте (выживание или гибель клетки после облучения).

Ионизирующее излучение индуцирует в клетках ДНР ДНК как прямым (одноударный механизм), так и косвенным путем (накопление одноститевых разрывов на оппозитных нитях, ошибки репарации одноститевых разрывов с образованием ДНР) <sup>1/1/</sup>. Соотношение эффективностей образования прямых и не прямых ДНР обсуждается на протяжении ряда лет, и мнения на этот счет расходятся: так, ряд исследователей считает, что при действии редкоионизирующего излучения ДНР образуются, в основном, за счет ошибок репарации ОНР ДНК (так называемые "энзиматические" ДНР <sup>2-4,5/</sup>). Другие, напротив, полагают, что вклад энзиматических ДНР незначителен даже при редкоионизирующем излучении <sup>6/</sup>.

Репарация ДНР ДНК наиболее изучена на дрожжевых клетках *S. cerevisiae*. Дрожжи являются одноклеточными эукариотическими организмами, для которых разработаны методы классической и молекулярной генетики. Впервые репарация ДНР ДНК была продемонстрирована на гаплоидных <sup>7/</sup> и диплоидных <sup>8/</sup> дрожжевых клетках *S. cerevisiae*, находящихся в экспоненциальной фазе роста культуры, при их выдерживании после облучения рентгеновскими лучами в питательной среде в течение нескольких часов. В.Г.Королев и Л.М.Грачева <sup>9/</sup>, а позднее М.Резник <sup>10/</sup> предложили гипотетическую модель, согласно которой двуцепочечные повреждения ДНК в клетках репарируются путем рекомбинации между гомологичными последовательностями ДНК, одна из которых повреждена. Впоследствии эта модель нашла подтверждение в экспериментах на дрожжевых клетках, облученных в G1-фазе клеточного цикла <sup>11/</sup>.



Здесь мы не будем касаться данных о репарации ДНР ДНК при выдерживании дрожжевых клеток, находящихся в S- или G2-фазе клеточного цикла, в питательной среде. Эти данные, на наш взгляд, не всегда могут быть интерпретированы однозначно. Кроме того, строго не показана связь этого типа репарации с выживаемостью клеток. В представленной работе обсуждается репарация ДНР ДНК, имеющая место в G1-фазе клеточного цикла у диплоидных клеток *S. cerevisiae* (2 генома на клетку). У диплоидных дрожжевых клеток в G1-фазе клеточного цикла обнаружены два типа репарации ДНР ДНК при их выдерживании в непитательной среде — быстрый и медленный. Медленная репарация завершается за 48 — 72 ч выдерживания<sup>/11,12/</sup> и сопровождается одновременным увеличением выживаемости облученных клеток (эффект пострадиационного восстановления жизнеспособности клеток, известный с конца 50-х годов<sup>/13/</sup>). Быстрая репарация завершается менее чем за 1 ч<sup>/14/</sup> и также сопровождается увеличением выживаемости клеток (быстрое пострадиационное восстановление жизнеспособности клеток<sup>/15/</sup>). Оба пути репарации ДНР ДНК (быстрый и медленный) осуществляются по рекомбинационному механизму, так как являются диплоидоспецифическими и контролируются генами RAD51, RAD52, RAD54<sup>/11, 16, 17/</sup>. В то же время быстрая и медленная репарация ДНР ДНК отличаются по генетическому контролю: мутация *rad55* блокирует первый, но не затрагивает второй путь репарации, тогда как *rad50* ингибирует медленную, не влияя при этом на быструю репарацию<sup>/17/</sup>.

Помимо двух указанных путей репарации ДНР ДНК у клеток в G1-фазе клеточного цикла не исключена также репарация, осуществляющаяся по механизму, не предполагающему взаимодействия гомологических хромосом. На возможность такого пути указали Ор-Вивер и Шостак: они предположили, что в районе ДНР может иметь место небольшая деградация ДНК, приводящая к спариванию коротких гомологичных последовательностей в пределах одной хромосомы, после чего происходит репаративный синтез в участках образовавшихся одностранных брешей и лигирование с восстановлением целостной структуры хромосомы<sup>/18/</sup>. Такой механизм был продемонстрирован для репарации ДНР плазмидной ДНК в клетках *E. coli*<sup>/19, 20/</sup>. Условно такой механизм репарации ДНР ДНК будем называть нерекомбинационным (в противоположность механизму, включающему взаимодействие между протяженными участками гомологичных хромосом), хотя для таких процессов в последнее время утвердился термин "незаконная рекомбинация".

По оценкам, сделанным в работе М.Франкенберг-Швагер и др.<sup>/12/</sup>, редкоизирующая радиация (электроны с энергией 30 МэВ) индуцирует в диплоидных дрожжевых клетках в среднем 60 ДНР на 1000 Гр на клетку. Не вполне ясно, в какой мере в условиях эксперимента, проведенного в цитируемой работе, завершилась быстрая репарация ДНР ДНК. По нашим данным<sup>/14/</sup> в стандартных условиях лизиса

облученных дрожжевых клеток с промежуточным этапом получения протопластов быстрая репарация ДНР ДНК может завершиться еще до нанесения протопластов на градиент нейтральной сахарозы. В любом случае по завершении быстрой репарации останется около 30 ДНР на 1000 Гр на клетку: в результате быстрой репарации элиминируется порядка 50 % от общего количества индуцированных ДНР<sup>/14/</sup>. Выживаемость диплоидных клеток *S. cerevisiae* 211\*В, использованных в работе<sup>/12/</sup>, составляет 40 — 50 %<sup>/21/</sup> при облучении в зоне 300 Гр (30 МэВ — электроны), при этом популяция облученных клеток содержит порядка 10 ДНР на клетку. С учетом пуассоновского распределения числа повреждений по клеткам получаем, что доля клеток в облученной популяции, содержащая хотя бы один нерепарированный ДНР, составляет величину, близкую к 100 % ( $1 - \exp\{-10\} = 1$ ). Можно, однако, представить, что оставшиеся нерепарированными в результате быстрой репарации ДНР могут элиминироваться в процессе инкубации клеток на твердой питательной среде до первого пострадиационного деления. Однако такая возможность представляется маловероятной. Действительно, быстрое пострадиационное восстановление (а следовательно, и ответственная за него быстрая репарация ДНР ДНК) одинаково эффективно как при выдерживании в воде, так и в питательной среде и завершается за 30 — 40 мин, после чего выживаемость облученных клеток не изменяется в течение 1 — 2 ч<sup>/22/</sup>. Если бы диплоидные клетки, облученные в G1-фазе клеточного цикла, были способны к репарации ДНР, отличной от быстрой и медленной репарации и эффективного увеличения выживаемости клеток при их выдерживании в питательной среде и по завершении быстрого восстановления (вплоть до момента первого пострадиационного деления). Таким образом, есть основания полагать, что выжившие облученные клетки (т.е. сохранившие способность к образованию макроколонии на твердой среде) имеют к первому пострадиационному делению нерепарированные ДНР. К такому же выводу пришел и М.Резник<sup>/23/</sup>, правда, на основании других соображений.

Какова же может быть судьба нерепарированного ДНР в дрожжевой клетке, вступившей в митоз и образовавшей затем макроколонию?

У диплоидных дрожжевых клеток, облученных ионизирующей радиацией в G1-фазе клеточного цикла, известен так называемый "эффект дорастания": часть клеток формирует макроколонию позже необлученного контроля<sup>/24/</sup>. Этот эффект связан с образованием "летальных секторов", а именно: гибелью части потомков облученной клетки<sup>/25/</sup>. Существуют модельные представления<sup>/26/</sup>, позволяющие объяснить многообразие радиобиологических реакций облученных клеток, в частности, летальный эффект и эффект дорастания. Согласно этим представлениям ионизирующая радиация индуцирует в клетках потенциально летальные повреждения (ПЛД), которые клетка способна репарировать, однако нерепарированные ПЛД не ведут

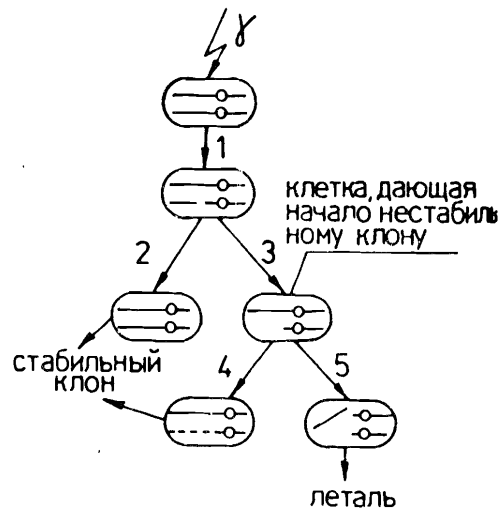


Рис. 1. Схематическое изображение событий, приводящих к образованию дорастающих клонов. 1 — индукция ДНР; 2 — репарация ДНР в G1-фазе клеточного цикла; 3 — деление; утрата концевой фрагмента хромосомой с ДНР; 4 — правильная репарация ДНР путем синтеза *de novo*; 5 — неправильная репарация ДНР.

облученную клетку к гибели с вероятностью 1, но снижают вероятность успешного деления клетки, при этом ПЛД наследуются потомками облученной клетки и могут по вероятностному закону вызывать гибель последних.

С учетом того, что в основе быстрого и медленного пострадиационного восстановления, в ходе которых элиминируются ПЛД, лежит репарация ДНР ДНК, естественно предположить, что именно эти молекулярные повреждения обуславливают эффект дорастания.

На рис. 1 схематично изображены события, предположительно имеющие место в клетке после завершения репарации ДНР ДНК. Непрорепаированный в G1-фазе клеточного цикла ДНР ДНК приводит к образованию хромосомы, утратившей концевой фрагмент и лишенной теломеры. Такая хромосома, по-видимому, может успешно реплицироваться и наследоваться потомками облученной клетки. В одном из пострадиационных делений с некоторой вероятностью может произойти рекомбинация поврежденной хромосомы с интактным гомологом. Результатом такой рекомбинации могут быть два, на наш взгляд, наиболее вероятных события. Во-первых, поврежденная хромосома может быть восстановлена путем синтеза *de novo* по матрице гомологичной хромосомы (условно назовем этот процесс "правильной постмитотической репарацией ДНР ДНК" — в отличие от репарации до первого пострадиационного деления) — возможность такого механизма репарации ДНР была указана А.Н. Лучником с сотр.<sup>/27/</sup>. Как следствие указанного события, некоторые отдаленные потомки облученной клетки не должны выщеплять летальные сектора, что и имеет место в опыте<sup>/28/</sup>. Другим исходом рекомбинации между поврежденной и неповрежденной гомологичными хромосомами может быть утрата фрагмента или полная деградация первоначально неповрежденной хромосомы, в результате чего необратимо теряется генетическая информация в обеих гомологичных хромосомах диплоидной клетки (этому процессу условно присвоим наименование "неправильная постмитотическая репарация ДНР ДНК"), что в свою очередь обуслов-

ливает ее гибель. Следствием неправильной постмитотической репарации ДНР ДНК является выщепление "летальных секторов". В пользу возможности существования неправильной репарации ДНР ДНК свидетельствуют данные, полученные недавно С. Булатом<sup>/29/</sup>: рекомбинация двухмикронной плазмиды с химерной хромосомой (дрожжевой хромосомой, в которую интегрирована плазида, несущая фрагмент 2 мк ДНК) приводит к деградации (полной или частичной) хромосомной ДНК.

Субклоны облученной клетки выщепляют летальные сектора с высокой вероятностью, в пределах 0,08 — 0,15, причем эта вероятность в ряде случаев практически не меняется в течение 10 генераций после облучения<sup>/28/</sup>.

Возникает вопрос, почему соотношение вероятностей правильной и неправильной репарации ДНР ДНК после первого пострадиационного деления сдвигается по нашему предположению в сторону последней (в противном случае мы бы наблюдали гибель потомков облученной клетки лишь на первых генерациях, причем в редких случаях)? Заметим, что в результате первого пострадиационного митоза концевой фрагмент хромосомы, возникший в результате нерепарированного ДНР, с высокой вероятностью должен теряться. В связи с этим механизм постмитотической репарации ДНР ДНК может отличаться от механизма репарации этих повреждений, имеющей место до первого пострадиационного деления: если в первом случае с неповрежденной хромосомой взаимодействует один двуцепочечный конец ДНК, то во втором — два.

Можно привести следующие факты, косвенно свидетельствующие в пользу рассматриваемого механизма эффекта дорастания.

1) Для гаплоидных клеток, для которых каждый ДНР летален в G1-фазе клеточного цикла, отсутствует и эффект дорастания<sup>/24/</sup>.

2) Мутация *rad55* блокирует как быструю репарацию ДНР ДНК<sup>/17/</sup>, так и эффект дорастания<sup>/30/</sup>.

3) Диплоидный мутант, гомозиготный по *rad52*, дефектный по репарации ДНР ДНК, обнаруживает эффект дорастания, сравнимый с таковым для клеток дикого типа<sup>/30/</sup>. С другой стороны, расчеты показывают, что для инактивации этих клеток достаточно около 1,5 ДНР на геном<sup>/8,31/</sup>. Между тем известно, что мутация *rad52* приводит к резкому повышению частоты индуцированных рентгеновскими лучами потерь хромосом<sup>/32/</sup>. Здесь возникает некоторое противоречие: с одной стороны, клетка гибнет почти от каждого ДНР ДНК, с другой стороны, потеря хромосомы не вызывает у этих же клеток летального эффекта. Объяснение рассматриваемого несоответствия может быть дано исходя из предложенного механизма эффекта дорастания. ДНР, индуцированные излучением в мутантных клетках, вызывает гомологичную рекомбинацию между поврежденной и неповрежденной хромосомой, которая с вероятностью, близкой к 1, приводит к неправильной репарации ДНР, следствием которой

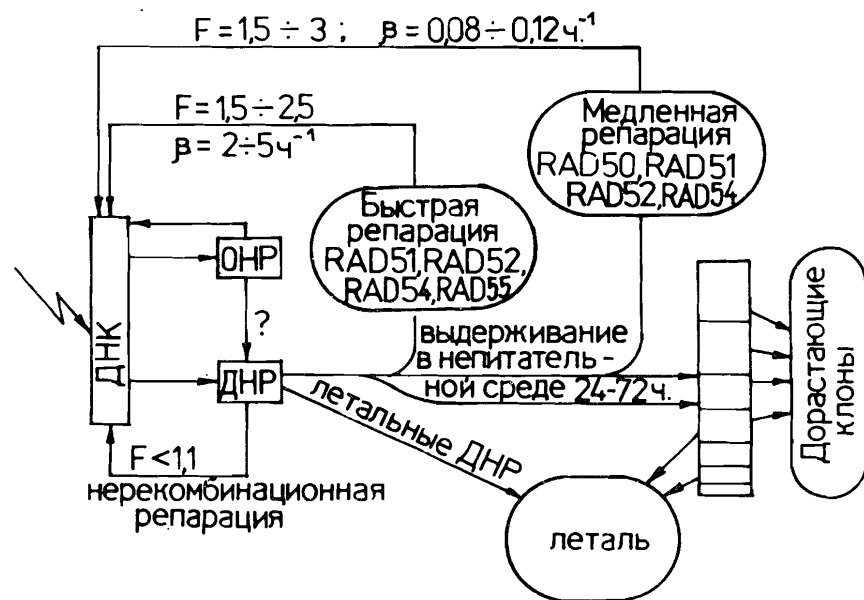


Рис. 2. Схема лучевой инактивации диплоидной дрожжевой клетки. Условные обозначения: ОНР, ДНР – однонитевые и двунитевые разрывы ДНК;  $F = D_0' / D_0$ , где  $D_0, D_0'$  – наклон экспоненциального участка кривой выживания до и после завершения репарации ДНР;  $\beta$  – скорость репарации,  $ч^{-1}$ ; RAD50 – RAD55 – гены, контролирующие репарацию ДНР.

может быть нерасхождение хромосом, деградация или фрагментация обеих гомологичных хромосом. Такая неправильная репарация ДНР вызывает гибель клетки. Сходная гипотеза, объясняющая высокую частоту индуцированных потерь хромосом у диплоидных мутантов rad52, предложена и авторами<sup>/32/</sup>. Однако примерно 30% ДНР не репарируется (не индуцируют рекомбинацию) и наследуются потомками облученной клетки в виде фрагментированной хромосомы и приводят по предложенному механизму к выщеплению летальных секторов.

4) Хлористый натрий, добавленный в питательную среду (1,5 моль), на которую высевали облученные клетки, подавляет как быструю репарацию ДНР ДНК<sup>/14/</sup>, так и эффект дорастания<sup>/33/</sup>.

Таким образом, на основании изложенного можно представить следующую схему лучевой инактивации диплоидных дрожжевых клеток. Схема приведена на рис. 2. ДНР, индуцированный в клетке, либо непосредственно при прохождении трека  $\delta$ -электрона через обе нити ДНК (прямой ДНР), либо в результате ошибки репарации ОНР (энзиматический ДНР) является субстратом для быстрой репарации ДНР

ДНК, которая по нашим оценкам, залечивает примерно 50–70% от общего числа ДНР, индуцированных в клетке. Скорость этого процесса составляет  $2–5 ч^{-1}$  (зависимость числа ДНР ДНК от времени репарации можно аппроксимировать экспоненциальной с показателем экспоненты  $2–5 ч^{-1}$ ). На данном этапе возможен также нерекомбинационный путь репарации ДНР (см. выше), однако он, по-видимому, для дрожжевых клеток не вносит сколь-нибудь заметного вклада в радиорезистентность клеток. Основания для подробного утверждения следующие. Ранее было показано, что плазмидная ДНК, несущая двунитевый разрыв, внесенный эндонуклеазой рестрикции, репарируется в дрожжевой клетке по механизмам, аналогичным репарации ДНР хромосомной ДНК<sup>/18/</sup>: так, в частности, совпадает генетический контроль репарации ДНР плазмидной и хромосомной ДНК<sup>/34/</sup>. Оказалось, что соотношение рекомбинационного (рекомбинация с гомологичной хромосомной ДНК) и нерекомбинационного (лигирование "липких" концов или незаконная внутримолекулярная рекомбинация) путей репарации ДНР плазмидной ДНК составляет примерно  $10:1$ <sup>/34/</sup>. Таким образом, даже при наличии липких концов, образование которых маловероятно при облучении ионизирующей радиацией, репарация ДНР плазмидной ДНК в большинстве случаев осуществляется путем рекомбинации. Другим фактом, свидетельствующим в пользу малого вклада нерекомбинационной репарации ДНР ДНК, является то обстоятельство, что ионизирующая радиация практически не индуцирует в дрожжевых клетках делеции (по крайней мере, они возникают с частотой, на 2 порядка меньшей, чем соответствующая величина для точечных мутаций). Поскольку в результате нерекомбинационной репарации ДНР должны возникать именно делеции<sup>/19,20/</sup>, приведенные данные также косвенно подтверждают вывод о незначительном вкладе рассматриваемого механизма репарации ДНР в радиорезистентность клеток. Исходя из сказанного, можно полагать, что нерекомбинационным путем в дрожжевых клетках репарируется не более 10% от общего числа ДНР ДНК (а скорее всего, много меньше этой величины).

В диплоидных клетках, высеванных на полноценный питательный агар сразу после облучения (стандартные условия опыта для определения величины выживаемости), быстрая репарация ДНР ДНК полностью завершается до первого пострadiационного деления клетки, когда ДНР фиксируется. Вклад быстрой репарации в регистрируемую радиорезистентность клеток дикого типа (в качестве меры радиорезистентности обычно берут величину  $D_0$ ) составляет примерно 50%, т.е. в результате быстрого восстановления величина  $D_0$  увеличивается приблизительно в 2 раза<sup>/14/</sup>. Часть из облученной популяции клеток (при  $D > D_0$  эта часть обычно составляет более 70% выжившей популяции) содержит нерепарированные ДНР, которые приводят к образованию клонов с летальными секторами (эффект дорастания).

Выдерживание в непитательной среде после облучения дает возможность клеткам осуществить в полном объеме медленную репарацию ДНР ДНК. Скорость этого процесса  $0,08 - 0,12 \text{ ч}^{-1}$  (см. выше). Вклад этого процесса в радиорезистентность для клеток дикого типа составляет в среднем  $50 - 70 \%$ , т.е. в результате медленного пострадиационного восстановления величина  $D_0$  увеличивается в  $2 - 3$  раза (для отдельных штаммов дрожжей этот вклад может достигать  $80 \%$ ).

Здесь уместно обсудить следующую проблему. Выход потенциально летальных повреждений (ПЛД) на единицу дозы ( $1/D_0$ ) после облучения электронами (энергия  $30 \text{ МэВ}$ ) для диплоидного штамма  $211^*В$ , использованного М.Франкенберг-Швагер с сотр.<sup>12/</sup> для определения выхода ДНР ДНК, составляет  $0,005 \text{ Гр}^{-1}$ <sup>21/</sup>, тогда как выход ДНР ДНК на единицу дозы по их расчетам составляет величину на порядок большую:  $0,06 \text{ Гр}^{-1}$ . Исходя из этого можно было бы сделать вывод, что ДНР ДНК не являются теми повреждениями, которые определяют репродуктивную способность облученных клеток. Однако следует учитывать ряд обстоятельств.

1) Как указывалось выше, неясно, в какой мере на момент определения выхода ДНР завершилась быстрая репарация. По данным авторов цитируемой работы в первые 3 ч выдерживания клеток в непитательной среде репарируется (при дозах облучения до  $1500 \text{ Гр}$ ) более  $50 \%$  от исходного количества ДНР. В то же время известно,

что в течение такого промежутка времени выживаемость диплоидных дрожжей, облученных в указанном интервале доз, изменяется незначительно: так, для родственного использованному штамма  $211В$  выживаемость клеток в первые 3 ч выдерживания в непитательной среде остается практически постоянной<sup>35/</sup>. В связи с этим основания полагать, что уменьшение числа ДНР на клетку в течение первых 3 ч (быстрая репарация завершается менее чем за 1 ч, но в обсуждаемой работе выход ДНР после выдерживания клеток в течение интервала времени, меньшего, чем 3 ч, не определялся) есть следствие быстрой репарации ДНР.

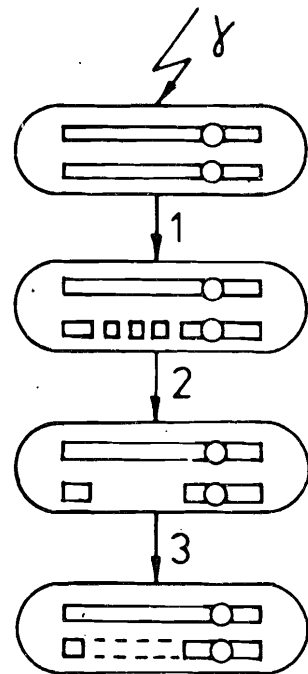


Рис. 3. Схематическое изображение событий, приводящих к сокращению числа потенциально летальных повреждений путем образования ДНБ; 1 - индукция ДНР в одной из гомологичных хромосом; 2 - образование ДНБ при выпадении центральных фрагментов; 3 - репарация ДНБ посредством рекомбинации гомологичных хромосом.

Таким образом, выход ДНР к первому пострадиационному делению может составлять около  $0,03 \text{ ДНР Гр}^{-1}$  на клетку.

2) С другой стороны, можно представить, что элементарным повреждением, элиминируемым в ходе рекомбинационной репарации ДНР, могут наряду с ДНР служить и двунитевые бреши (ДНБ), образовавшиеся из-за выпадения центральных фрагментов хромосомы (которые, в свою очередь, образовались в результате ДНР) (см. рис. 3). Известно, что ДНБ ДНК эффективно репарируются дрожжевыми клетками по рекомбинационному механизму<sup>18/</sup>, причем бреши размером до 5 т.п.н. репарируются примерно с той же эффективностью, что и "простой" ДНР<sup>34/</sup>. Не исключено, что и более протяженные ДНБ ДНК могут быть эффективно репарированы дрожжевой клеткой. Таким образом, несколько ДНР могут трансформироваться в одну двунитевую брешь. Предложенный механизм также уменьшает диспропорцию между выходом ПЛД и ДНР. На рис. 4 приведена гистограмма распределения 30 ДНР (такое количество их индуцируется на гаплоидный геном при дозе  $1000 \text{ Гр}$ ) по 16 хромосомам в предположении, что вероятность образования ДНР пропорциональна длине хромосомы. Как видно, 12 хромосом из 16 в данном случае получают в среднем более 1 ДНР, а 6 - более 2 ДНР на хромосому. Следовательно, максимум, что можно ожидать, из 27 ДНР может образоваться 12 ДНБ, а число элементарных повреждений (ПЛД = ДНР + ДНБ) при облучении в дозе  $1000 \text{ Гр}$  сократится с 30 до 15, или в 2 раза.

Реально же сокращение числа элементарных повреждений существенно менее значительно, так как для образования ДНБ необходимо, чтобы два ДНР, индуцированных в хромосоме, оказались в одном ее плече (правда, вероятность такого события не менее  $0,5$  при индукции двух ДНР на хромосому). Кроме того, репарация ДНБ возможна лишь в том случае, если не поврежден соответствующий участок на гомологичной хромосоме.

3) И третье обстоятельство. Расчет выхода ДНР на клетку по профилям седimentации ДНК из облученных и необлученных клеток в градиенте концентрации нейтральной сахарозы может давать большие погрешности. Так, например, указывается, что на плотность ДНК влияют ионная

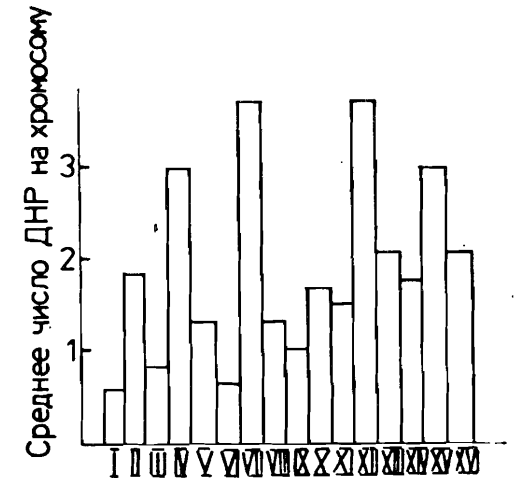


Рис. 4. Распределение ДНР по 16 гомологичным хромосомам диплоидной дрожжевой клетки, облученной в дозе  $1000 \text{ Гр}$  ( $30 \text{ МэВ}$  - электроны).

сила раствора и концентрация сахарозы, и, следовательно, последняя зависит от положения ДНК в градиенте сахарозы<sup>/36/</sup>. Не исключено поэтому, что выход ДНР на клетку, приведенный в работах Д.Франкенберга с сотр.<sup>/12,31/</sup>, существенно завышен.

Таким образом, с учетом указанных обстоятельств можно, хотя и не полностью, объяснить значительное расхождение между выходом ДНР и ПЛД на единицу поглощенной дозы, не отказываясь при этом от предположения о ведущей роли индукции и репарации ДНР (ДНБ) в формировании летальных эффектов у дрожжевых клеток.

Клетки, облученные в дозе  $D > 2-3D_0$  и высеванные на питательный агар после 48-72-часового выдерживания в непитательной среде, могут содержать значительное количество нерепарированных ДНР, что также приводит к образованию клонов с летальными секторами.

Природа ДНР ДНК, остающихся в клетках по завершении быстрой и медленной репарации, не ясна. Так, по мнению Д.Франкенберга, основанному на его собственных данных о квадратичной зависимости выхода ДНР от дозы облучения (после завершения медленного восстановления)<sup>/12/</sup>, не репарируются и приводят к летальному эффекту два ДНР, индуцированных в пределах небольших участков двух гомологических хромосом. Но скорее всего разрывами подобного типа не исчерпывается пул нерепарированных ДНР.

Действительно, выход нерепарируемых (по Франкенбергу) ДНР на клетку в зависимости от дозы облучения можно оценить из следующего соотношения:

$$N = YD(1 - \exp\{-2YDL/M\}), \quad (1)$$

где  $Y$  — начальный выход ДНР на единицу дозы;  $L$  — размер участка, в пределах которого индукция двух ДНР на гомологических хромосомах приведет к нерепарируемому повреждению;  $M$  — длина диплоидного генома;  $D$  — доза облучения. При  $2YDL/M \ll 1$  эта зависимость трансформируется в квадратичную:

$$N = 2Y^2L/MD^2. \quad (2)$$

Полагая, что  $M = 30 \cdot 10^3$  т.п.н.,  $Y = 0,067$  ДНР Гр<sup>-1</sup> на клетку,  $L = 1$  т.п.н. (известно, что участок взаимодействия гомологических хромосом при генной конверсии составляет величину порядка 1 т.п.н.<sup>/37/</sup>), получаем:  $N = 3,0 \cdot 10^{-7} D^2$ , что на порядок меньше, чем по данным М. Франкенберг — Швагер с сотр.<sup>/12/</sup>. Для того, чтобы привести в соответствие расчетную величину с экспериментальной, необходимо предположить, что критичным для клетки является возникновение двух ДНР в гомологических хромосомах на участке порядка 15 т.п.н.

Кроме того, если гибель клеток действительно определяется летальными ДНР указанного типа, то после завершения медленного

восстановления выживаемость клеток, облученных в дозе, например 2100 Гр, должна была бы составлять

$$S = \exp\{-N/2\} = \exp\{-10,9\} = 1,8 \cdot 10^{-5},$$

что на несколько порядков ниже, чем величина, наблюдаемая в эксперименте<sup>/12/</sup>.

Так или иначе, тот факт, что при немедленном высеве на твердую питательную среду в облученных клетках остаются ДНР, которые могут быть репарированы, если клетки выдержать в непитательной среде (в процессе медленной репарации ДНР), свидетельствует, что по крайней мере по завершении быстрой репарации нерепарированные ДНР отличаются от типа, предложенного Д.Франкенбергом, не являются абсолютно летальными и составляют большинство среди общего пула ДНР, индуцированных в клетке (более 80% при дозах до 2400 Гр).

Судьба нерепарированных ДНР в клетке, по нашему мнению, может быть следующей (см.рис.1). Во-первых, такие ДНР могут репарироваться клеткой после первого и последующих митозов путем синтеза de novo утраченного фрагмента ДНК (см.выше). Во-вторых, неправильная репарация ДНР (приводящая к потере фрагмента гомологической хромосомой, не имеющей первоначально ДНР) может приводить к гибели дочерней клетки с образованием летальных секторов. При этом вероятность неправильной репарации ДНР ДНК после первой генерации облученной клетки выше той, что дает в результате восстановления поврежденной хромосомы.

Представленная выше схема, конкретизирующая понятие потенциально летального повреждения, в целом согласуется с концепцией В.И.Корогодина с сотр.<sup>/26/</sup>, предположивших, что дискретные лучевые повреждения (в нашей схеме — ДНР ДНК) не являются абсолютно летальными для диплоидной клетки, но, во-первых, могут быть обратимы (репарация ДНР ДНК), во-вторых, наследуются и ответственны за появление клонов с летальными секторами: последние могут возникать за счет неправильной репарации ДНР.

Вероятностная модель лучевой инактивации клетки, предложенная Ю.Г.Капальцевичем<sup>/25/</sup>, количественно описывает эти представления. В ее простейшей версии (независимый вариант) летальный эффект, а также эффект дозирования в зависимости от дозы облучения описывается с помощью двух формальных параметров  $b$  (вероятность формирования повреждения на единицу дозы) и  $a$  (вероятность проявления повреждения). Исходя из изложенного выше, этим параметрам можно придать вполне определенный биологический смысл.

Итак, параметр  $b$  по нашим представлениям должен соответствовать выходу ДНР ДНК на единицу дозы облучения, тогда как  $a$  есть не что иное, как вероятность неправильной постмитотической репарации ДНР, в результате которой необратимо теряется генетическая информация на обеих гомологических хромосомах. Естественно предпо-

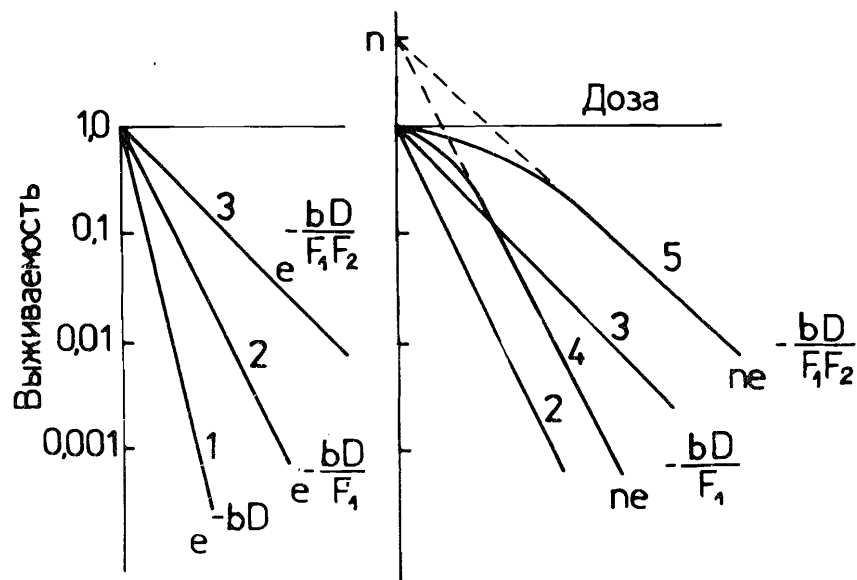


Рис.5. Кривые выживания диплоидных клеток после облучения редкоизирующей радиацией. 1 – КВ в условиях подавления репарации ДНР ДНК; 2 – КВ после завершения быстрой репарации ДНР ДНК; 3 – КВ после завершения медленной репарации ДНР ДНК; 4 – КВ после завершения быстрой репарации ДНР ДНК и дорастания клонов облученных клеток; 5 – КВ после завершения медленной репарации ДНР ДНК и дорастания клонов облученных клеток.

ложить, что  $\alpha$  будет пропорциональна вероятности синапсиса фрагментированной и интактной гомологичных хромосом и вероятности фрагментирования или деградации неповрежденной первоначально хромосомы в результате рекомбинации. Первая вероятность, по-видимому, должна зависеть от расстояния ДНР до центромеры, причем чем меньше это расстояние, тем менее вероятно взаимодействие гомологичных хромосом. Этим можно объяснить тот факт, что в некоторых случаях поврежденная хромосома сохраняется в потомках облученных клеток на протяжении большого числа генераций.

Выживаемость клеток в зависимости от дозы облучения для независимого варианта вероятностной модели определяется в виде:

$$S(D) = \sum_{k=0}^n \frac{e^{-bD}}{k!} (bD)^k \left\{ 1 - \left[ \frac{1-(1-\alpha)^k}{(1-\alpha)^k} \right]^2 \right\}, \quad (3)$$

где  $(1-\alpha)^n > 0,5 \geq (1-\alpha)^{n+1}$ .

В результате быстрой и медленной репарации ДНР ДНК уменьшается (в  $F_1$  и  $F_2$  раза соответственно) величина  $b$ , т.е. среднее число ДНР ДНК на единицу дозы ( $b = 1/D_0$ ), в то же время вероятность  $\alpha$  не меняется. Величина  $b$  определяет наклон экспоненциального участка кривой выживания (КВ), который, таким образом, зависит от способности клеток репарировать ДНР ДНК. Второй же параметр  $\alpha$  полностью определяет плечо КВ: чем меньше вероятность неправильной пострепликативной ДНР, тем более выражена сигмоидность рассматриваемой кривой. Эффект дорастания клеток можно подавить, добавляя в среду, на которую высевает облученные клетки, хлористый натрий<sup>/33/</sup>, что приводит к трансформации сигмоидной КВ в экспоненциальную — по-видимому, каждый ДНР в этом случае летален для клетки. Здесь также, на наш взгляд, наиболее естественно предположить, что в присутствии больших концентраций NaCl или KCl рекомбинационная репарация ДНР в большинстве случаев приводит к повреждению (деградации, фрагментации и пр.) обоих рекомбинирующих хромосом. Косвенным подтверждением этого предположения является подавление хлористым натрием митотической рекомбинации у дрожжей<sup>/38/</sup>. Схематично на рис.5 приведены кривые выживания диплоидных дрожжей на разных этапах репарации ДНР и по завершении репарационных процессов.

Для гаплоидной клетки в G1-фазе клеточного цикла ДНР ДНК летален с вероятностью, близкой к 100% (при этом полагается, что эффективность нерекombsионационной репарации ДНР ДНК мала), что приводит к пониженной по сравнению с диплоидами величине  $D_0$  и отсутствию плеча у дозовой кривой выживания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жестяников В.Д. *Репарация ДНК и ее биологическое значение*. Л.: Наука, 1979.
2. Bonura T., Smith K.C.-*J.Bacteriol.*, 1975, v.121, p.511.
3. Бреслер С.Е. и др.-*Радиобиология*, 1981, т. 21, с.3.
4. Kozubek S., Krasavin E.A.-*Neoplasma*, 1984, v. 31, p.675.
5. Kozubek S., Krasavin E.A. *Ibid.*, p. 685.
6. Обатуров Г.М. *Биофизические модели радиобиологических эффектов*. М.: Энергоатомиздат, 1987.
7. Ho K.S.Y.-*Mutat. Res.*, 1975, v. 30, p.327.
8. Resnick M.A., Martin P.-*Molec. Gen. Genet.*, 1976, v.143, p.119.
9. Королев В.Г., Грачева Л.М.-*Генетика*, 1972, т. 8, с. 111.
10. Resnick M.A.-*J. Theor. Biol.*, 1977, v. 59, p.97.
11. Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V.-*Molec. Biol. Repts.*, 1977, v. 3, p. 437.
12. Frankenberg-Schwanger M. et al.-*Radiat. Res.*, 1980, v. 82, p. 498.
13. Корогодин В.И.-*Биофизика*, 1958, т. 3, с. 703.
14. Глазунов А.В., Глазер В.М.-*Молек. генетика, микробиол., вирусол.*, 1988, № 8, с. 36.



НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

15. Глазунов А.В., Капульцевич Ю.Г.-Радиобиология, 1982, т. 22, с. 62.
16. Вишневецкая О.Ю. и др.-Генетика, 1983, т.19, с. 26.
17. Glasunov A.V., Glaser V.M., Kapultsevich Yu.G. JINR, E19-88-374, Dubna, 1988.
18. Orr-Weaver T.L., Szostak J.W.-Proc.Natl.Acad.Sci (USA), 1983, v. 78, p. 6354.
19. Conley T.C., Saunders V.A., Saunders J.R.-Nucl. Acids Res., 1986, v. 14, p. 8919.
20. Салганик Р.И., Тимченко Т.В., Дианов Г.А.-ДАН СССР, 1987, т. 296, с. 226.
21. Frankenberg-Schwager M. et al.-Int. J. Radiat. Biol., 1979, v. 36, p. 261.
22. Глазунов А.В., Капульцевич Ю.Г.-Радиобиология, 1983, т. 23, с. 344.
23. Resnik M.A.-Mutat.Res., 1977, v. 42, p. 131.
24. Корогодин В.И. Проблемы пострadiационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
25. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.
26. Корогодин В.И. и др.-Радиобиология, 1977, т.17, с. 700.
27. Лучник А.Н. и др.-ДАН СССР, 1979, т. 244, с. 213.
28. James A.P., Werner M.M.-Mutat. Res., 1966, v. 3, p. 477.
29. Булат С.А.-Генетика, 1987, т. 23, с. 2138.
30. Лобачевский П.Н., Мишонова В.-Радиобиология, 1987, т. 27, с. 195.
31. Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Blocher D.-Radiat. Res., 1981, v. 88, p. 524.
32. Mortimer R.K., Contopoulou R., Schild D.-Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 5778.
33. Кабакова Н.М., Капульцевич Ю.Г.-Радиобиология, 1969, т. 9, с. 892.
34. Глазунов А.В. и др.-Молек. генет., микробиол., вирусол., 1987, № 8, с. 19.
35. Bertshe U.-Radiat. Res., 1978, v. 76, p. 349.
36. Nieuwenhuysen P.-Biopolymers, 1979, v. 18, p. 227.
37. Vuung-Yoon Ahn, Livingston D.M.-Molec. Cell. Biol., 1986, v. 6, p. 3685.
38. Глазунов А.В., Борейко А.В., Эссер А.Х.-Генетика, 1988, т. 24, с. 428.

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.
D11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р. 00 к.
D13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р. 80 к.
D4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
D3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике Алушта, 1986.	4 р. 50 к.
—	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. (2 тома)	13 р. 50 к.
D1,2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. (2 тома)	7 р. 35 к.
D9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. (2 тома)	13 р. 45 к.
D7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986.	7 р. 10 к.
D2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа - 86". Дубна, 1986.	4 р. 45 к.
D4-87-692	Труды Международного совещания по теории малочастичных и кварк-адронных систем. Дубна, 1987.	4 р. 30 к.
D2-87-798	Труды VIII Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1987.	3 р. 55 к.
D14-87-799	Труды II Международного симпозиума по проблемам взаимодействия мюонов и пионов с веществом. Дубна, 1987	4 р. 20 к.
D17-88-95	Труды IV Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1987.	5 р. 20 к.

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

Рукопись поступила в издательский отдел  
6 декабря 1988 года.