

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

96-55

P19-96-55

А.В.Борейко, Е.А.Красавин

ЗАКОНОМЕРНОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ
ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ
НА КЛЕТКИ *BACILLUS SUBTILIS*

Направлено в журнал «Радиобиология»

1996

Результаты исследований мутагенного действия излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на клетки *Escherichia coli* [1,2], *Salmonella typhimurium* [3] и споры *Bacillus subtilis* [4] свидетельствуют о существенных различиях в закономерностях мутагенных эффектов облучения бактериальных клеток и спор. Показано, что при γ -облучении и действии ускоренных тяжелых ионов зависимости частоты мутирования клеток *E.coli* и *S.typhimurium* от дозы облучения имеют линейно-квадратичный вид. В то же время при облучении спор *B.subtilis* наблюдаются линейные дозовые зависимости мутагенеза [4]. Зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений от их ЛПЭ по критерию индукции мутаций у клеток *E.coli* и *S.typhimurium* описываются кривыми с локальным максимумом [1-3], а при облучении спор *B.subtilis* коэффициенты ОБЭ тяжелых заряженных частиц меньше 1 [4]. Значительные отличия в закономерностях индуцированного ионизирующими излучениями мутагенеза выявляются и у репарационно-дефицитных штаммов бактерий *E.coli* и спор *B.subtilis* [2, 4]. В связи с этим возникает вопрос, обусловлены ли наблюдаемые различия в индуцированном радиацией мутагенезе у бактерий *E.coli* и спор *B.subtilis* споровым состоянием клеток либо индуцированный мутационный процесс в вегетативных клетках споробразующих бактерий также отличается от клеток *E.coli*. С учетом этого нами была поставлена задача изучить закономерности мутагенного действия ионизирующих излучений с разной ЛПЭ на вегетативные клетки *B.subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие штаммы клеток *Bacillus subtilis* дикого типа: *BS168* (*hls A*, *trp C2*) и *HA 101* (*hls*, *met*, *leu*), полученные из

коллекции Института общей генетики РАН (Москва) и Института космической биологии и медицины (Кёльн, ФРГ). Для экспериментов выращивали ночные культуры при 37° С в NB-среде (питательный бульон "Difco" 8 г, NaCl 4 г на 1 л дистиллированной воды) до стационарной фазы (10⁸ клеток/мл). Суспензию клеток отмывали и ресуспендировали в буферном растворе следующего состава: 0,01 М NaHPO₄, 0,01 М Na₂HPO₄, 0,2 М NaCl.

В экспериментах с γ -облучением использовали источник ¹³⁷Cs с мощностью дозы ~ 24 Гр/мин. Облучение клеточных суспензий проводили в стеклянных пробирках при температуре 4° С. После облучения клеточные суспензии десятикратно концентрировали путём центрифугирования и рассеивали на чашки Петри с минимальной твёрдой питательной средой Спицайзена [5].

Облучение ускоренными ионами гелия осуществляли на ускорителе тяжелых ионов У-200 Объединенного института ядерных исследований (г.Дубна). Учитывая малый пробег тяжелых заряженных частиц с энергией ≤ 10 МэВ/нуклон в веществе, клетки облучали на поверхности ядерных фильтров (диаметр пор 0.5 мкм), помещая их на подложку из 3% минимального агара. Мониторинг пучка тяжелых частиц осуществляли с использованием проходной воздушной ионизационной камеры на установке "Геном" [6]. Облученные образцы помещали в стеклянные флаконы с фосфатным буфером, в котором ресуспендировали клетки путём встряхивания с помощью встряхивателя "Vortex". После этого клетки рассеивали на чашки Петри, как и при γ -облучении. Мутантные колонии подсчитывали через 72 ч инкубации при температуре 37°С. Для определения выживаемости клеток аликвоты после соответствующего разведения помещали на LB-агар. Колонии подсчитывали после 15 ч инкубации при температуре 37°С.

Споры получали путём высева клеток на чашки с твёрдой споруляционной средой [4] и выращивания их в течение 64 ч при



температуре 37°C. Затем клетки смывали фосфатным буфером и подвергали температурной обработке в течение 15 мин при 80°C. После соответствующего разведения образцы подвергали облучению.

Частоту индуцированных мутаций (M) оценивали согласно [7], используя следующую формулу:

$$M = (m - m_0) / N,$$

где m - количество *his*⁺ ревертантов на чашку после облучения; m₀ - число ревертантов на чашке без облучения; N - количество выживших клеток на чашке после облучения.

При статистической обработке полученных результатов зависимости частоты мутирования клеток ($N_m/N(D)$, где N_m - количество мутантов, N - количество выживших клеток) от дозы облучения (D) аппроксимировали степенной или линейно-квадратичной функцией, используя стандартный статистический метод для оптимизации параметров - метод Розенброка [1].

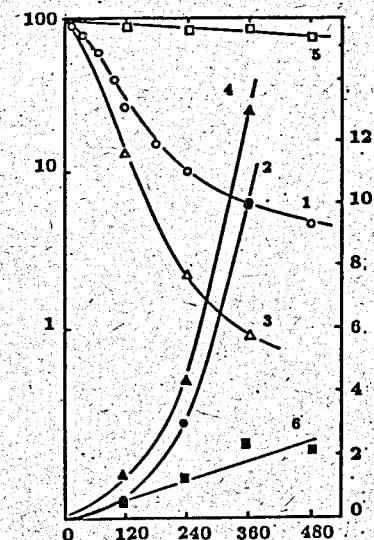
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 приведены дозовые кривые выживания и частота мутирования вегетативных клеток и спор двух использованных в экспериментах штаммов *B.subtilis* дикого типа при γ-облучении. Как можно видеть, чувствительность вегетативных клеток к облучению существенно выше по сравнению со спорами. Обращают на себя внимание различия в характере зависимости N_m/N(D) при облучении вегетативных клеток и спор. Полученные данные свидетельствуют о том, что для спор характерна линейная, а для вегетативных клеток - линейно-квадратичная зависимости мутагенеза. При дозах облучения, соответствующих значениям ≤ 100 Гр, дозовая зависимость аппроксимируется линейной функцией, а при более высоких уровнях доз - кривая близка к квадратичной (рис.2).

Аналогичный характер кривых сохраняется и при действии ускоренных ионов гелия с ЛПЭ, равными 20, 40 и 80 кэВ/мкм (рис.3). Это даёт

Рис. 1. Зависимости выживаемости и частоты мутирования вегетативных клеток (НА 101 - 1, 2; BS 168 - 3, 4) и спор (НА 101 - 5, 6) *Bacillus subtilis* от дозы γ-облучения.

По оси абсцисс - доза, Гр; по оси ординат слева - выживаемость, %; по оси ординат справа - частота мутирования, N_m/N × 10⁻⁶



возможность вычислить коэффициенты относительной биологической эффективности (ОБЭ) тяжелых заряженных частиц как отношение доз γ-излучения и ионов гелия при одинаковой частоте мутирования клеток. Коэффициенты ОБЭ частиц с указанными значениями ЛПЭ соответственно составляют 1,8 ± 0,2, 1,8 ± 0,2 и 1,2 ± 0,1. Зависимости ОБЭ от ЛПЭ, вычисленные для летального и мутагенного эффектов облучения вегетативных клеток *B.subtilis*, приведены на рис.4. Как можно видеть, в обоих случаях значения коэффициентов ОБЭ по указанным критериям облучения увеличиваются с ростом ЛПЭ, однако зависимость, отражающая мутагенный эффект облучения, достигает максимума при меньших значениях ЛПЭ по сравнению с летальным действием. Действительно, если значения ОБЭ по мутагенному эффекту облучения достигают максимума при ЛПЭ ≈ 30 кэВ/мкм (L_{max}), то по летальному действию величина L_{max} примерно равна 60 кэВ/мкм.

Рис. 2. Зависимость частоты мутирования вегетативных клеток *Bacillus subtilis* НА 101 от дозы γ -облучения.

По оси абсцисс - доза, Гр; по оси ординат - частота мутирования, $N_m/N \times 10^{-6}$

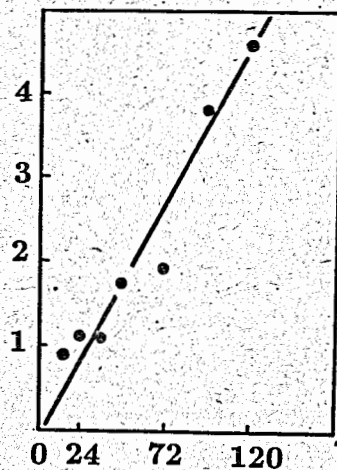
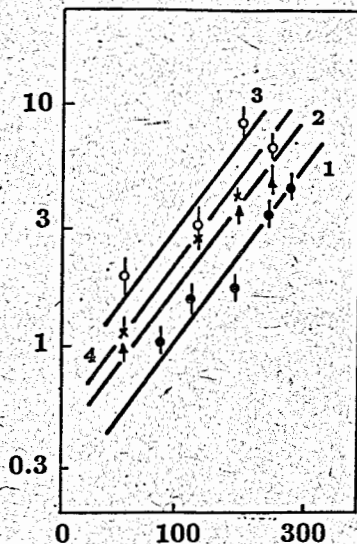


Рис. 3. Зависимость частоты мутирования клеток *Bacillus subtilis* НА 101 от дозы облучения γ -квантами (1) и ионами гелия с разной ЛПЭ (2 - 20 кэВ/мкм; 3 - 40 кэВ/мкм; 4 - 78 кэВ/мкм).

По оси абсцисс - доза, Гр; по оси ординат - частота мутирования, $N_m/N \times 10^{-6}$



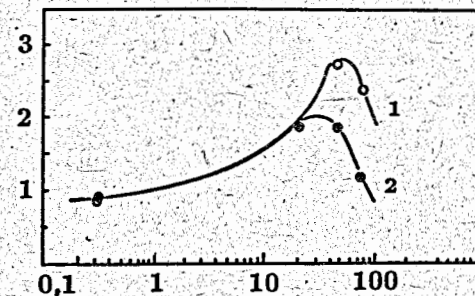
Таким образом, мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на вегетативные клетки *B. subtilis* характеризуется следующими особенностями: во-первых, дозовые кривые мутагенеза имеют линейно-квадратичный вид; во-вторых, характер дозовых зависимостей сохраняется при возрастании

ЛПЭ излучений; в-третьих, ОБЭ тяжёлых заряженных частиц с ЛПЭ ≤ 30 кэВ/мкм возрастает; в-четвертых, наблюдается сдвиг максимума зависимости ОБЭ(ЛПЭ) для мутагенных эффектов облучения в область меньших значений ЛПЭ по сравнению с летальным действием. Сопоставление этих результатов с ранее полученными данными на клетках *E. coli* [1,2] и *S. tiphymurium* [3] позволяет заметить, что закономерности мутагенного действия излучений с разными физическими характеристиками на вегетативные клетки *B. subtilis*, бактерии *E. coli* и *S. tiphymurium* аналогичны.

Как известно, линейно-квадратичный характер кривых мутагенеза у клеток *E. coli* и *S. tiphymurium* связывается с реализацией двух главных механизмов, определяющих линейный и степенной компоненты кривой мутагенеза. Линейный компонент зависимости $N_m/N(D)$, по-видимому, связан с повреждениями, которые закрепляются в процессе конститутивной репарации или в процессе репликации ДНК. Квадратичный участок кривой мутагенеза у клеток *E. coli* обусловлен функционированием индуцибельной

Рис. 4. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ по летальному (1) и мутагенному (2) действию излучений на вегетативные клетки *Bacillus subtilis* НА 101.

По оси абсцисс - ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат - ОБЭ.



или CD-зависимой ветви SOS-репарации [1,2], в ходе которой происходит закрепление премутационных повреждений. SOS-индуцируемыми повреждениями являются "комплексные" повреждения ДНК, не-

репарируемые в ходе *pol* A-зависимой репарации [2]. Микродозиметрический анализ свидетельствует о том, что выход таких повреждений увеличивается с ростом ЛПЭ [8]. Максимальный выход "комплексных" повреждений наблюдается при ЛПЭ $\approx 30-40$ кэВ/мкм. Этим объясняется возрастание мутагенной эффективности частиц с ростом ЛПЭ. Что же касается положения максимумов зависимостей ОБЭ(ЛПЭ) по летальному и мутагенному эффектам облучения, то данное обстоятельство связано с характером молекулярных нарушений, обуславливающих возникновение леталей и мутаций у бактериальных клеток. Показано [9], что положение L_{max} для летальных эффектов у клеток *E.coli* связано с индукцией двух типов двунитевых разрывов ДНК: прямых и энзиматических. Это обстоятельство определяет величину L_{max} по летальному действию излучений у бактерий *E.coli* в пределах 60-120 кэВ/мкм. Выход "комплексных" одонитевых разрывов ДНК, как уже указывалось, максимален при значительно меньших величинах ЛПЭ, чем для прямых двунитевых разрывов ДНК, что обуславливает сдвиг максимума зависимости ОБЭ(ЛПЭ) для мутагенных эффектов облучения в область меньших значений ЛПЭ.

Сохранение характера зависимости $N_m/N(D)$ с ростом ЛПЭ при действии тяжелых заряженных частиц объясняется тем, что мутагенный эффект облучения обуславливают δ -электроны, формирующие "шубу" трека частиц, характер энерговыделения которых в генетических структурах аналогичен γ -излучению [10].

Полученные нами материалы по мутагенному действию излучений с разной ЛПЭ на вегетативные клетки *B.subtilis*, как уже указывалось, аналогичны закономерностям, выявленным при облучении неспорообразующих бактерий. Это дает основание полагать, что механизмы, определяющие особенности мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на вегетативные клетки *B.subtilis* близки к тем, что имеют место у клеток

E.coli. Действительно, как показано в [11], решающую роль в индуцированном мутационном процессе у вегетативных клеток *B.subtilis*, так же как у *E.coli*, играют гены группы *rec*, объединенные в четыре эпистатические группы. При этом ключевая роль здесь, как и у *E.coli*, принадлежит *rec A*-белку. Ингибированием экспрессии *SOS*-индуцибельных генов у спор *B.subtilis*, по-видимому, объясняется линейный характер зависимости $N_m/N(D)$, выявленный в широком диапазоне доз облучения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что закономерности мутагенеза у вегетативных клеток *B.subtilis*, индуцированного ионизирующими излучениями, весьма близки к тем, которые выявляются при облучении бактерий *E.coli* и *S.tiphymurium*. Характер дозовой кривой мутагенеза, по-видимому, определяется особенностями экспрессии индуцибельных генов *SOS*-системы клеток. В связи с этим представляется весьма важным получение информации о закономерностях мутационного процесса у *rec* - мутантов, принадлежащих к различным эпистатическим группам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амиртаев К.Г., Токарова Б., Красавин Е.А., Козубек С. Радиобиология, 1989, т.29, вып.1, с. 23-29.
2. Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. Энергоатомиздат, М., 1991, 183 с.
3. Kozubek S., Krasavin E.A., Amirtayev K.G., Tokarova B., Soska I., Drasil V. and Bonev M. Mutation Research, 1989, v.210, p. 221-226.
4. Baltshukat K., Horneck G. Radiat. Environ. Biophys., 1991, v.30, p.87-103.
5. Spizizen J. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1958, v.44, p.1072-1078.
6. Череватенко А.П. Матер. V Всес. совещ. по микродозиметрии, М., МИФИ, 1986, с.102-103.

7. Kondo S., Ichikawa H., Iwo K., Kato T. *Genetics*, 1970, v.66, p.187-217.
8. Michalik V., M. Begusova *Int.J.Radiat.Biol.*, 1994, v.66, N 3, p.267-277.
9. Красавин Е.А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. Энергоатомиздат, М, 1989, 193 с.
10. Kozubek S., Horneck G., Krasavin E.A., Ryznar L. *Radiat. Res.*, 1995, v. 141, p.199-207.
11. Alonso J.C., Stiege A.C., Luder G. *Mol.Gen.Genet.*, 1993, v.239, p.129-136.

Борейко А.В., Красавин Е.А.

P19-96-55

Закономерности мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на клетки *Bacillus subtilis*

Изучены закономерности индукции $his^- \rightarrow his^+$ мутаций у вегетативных клеток *Bacillus subtilis* дикого типа при γ -облучении и действии ускоренных ионов гелия с разной передачей энергии (ЛПЭ). Показано, что зависимость частоты мутирования клеток от дозы γ -облучения описывается линейно-квадратичной функцией. Выявленные при γ -облучении кривые «доза—эффект» сохраняются и при действии тяжелых заряженных частиц. Зависимость относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений от их ЛПЭ как для летальных эффектов облучения, так и для мутагенного действия частиц описывается кривой с локальным максимумом. Выявлено, что максимум зависимости ОБЭ (ЛПЭ) для мутагенных эффектов облучения сдвинут в область меньших значений ЛПЭ.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 1996

Перевод авторов

Boreyko A.V., Krasavin E.A.

P19-96-55

Mutagenic Action of Radiation with Different Let on *Bacillus subtilis* Cells

The induction of the $his^- \rightarrow his^+$ mutants in vegetative and spores of *Bacillus subtilis* wild type cells irradiated with γ -rays and helium ions (LET=20—80 keV/ μ m) has been investigated. It was shown that the dose dependence of the mutation induction in vegetative cells is described by a linear-quadratic function of dose in case of both γ -rays and helium ions. RBE (LET) dependencies on the lethal and mutagenic effect of irradiation have a local maximum. The maximum of RBE (LET) dependence on the mutagenic assay is shifted at the low region of LET.

The investigation has been performed at the Department of Radiation Safety and Radiation Researches, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 1996

Рукопись поступила в издательский отдел
20 февраля 1996 года.