

## БИОФИЗИКА

УДК 577.391;547.963.3

**Շ. Մ. Ավաքյան, Ն. Ի. Մկրտչյան, Ն. Վ. Տիմոնյան, Գ. Յ. Խաչատրյան**

### **Биологическое действие электронов с энергией 7.5 МэВ на клетки бактерий E. coli K-12 разного репарационного генотипа**

(Представлено академиком М.А.Давтяном 26/VIII 2010)

Ключевые слова: *электроны, бактерии, выживаемость, репарационный генотип*

Проблема относительной биологической эффективности излучений разного качества и защиты организма от их повреждающего действия всегда была ключевой задачей радиобиологии. С началом космической эры эта задача стала еще более актуальной. В космическом пространстве были обнаружены высокие уровни доз различных типов ионизирующих излучений, характеризующиеся широким зарядовым составом от электронов и протонов до ядер урана, энергетическим диапазоном от десятков эВ до  $10^{18}$ – $10^{19}$  эВ и спектром линейной передачи энергии (ЛПЭ), определяющим характер локального воздействия на клетки и ткани биообъектов, от десятых долей кэВ/мкм до  $2 \cdot 10^3$  кэВ/мкм [1].

В секторе биологических исследований ОИЯИ (г. Дубна) были проведены многоплановые эксперименты по моделированию радиационно-генетических эффектов космических излучений на пучках ускоренных тяжелых ионов и выяснению механизмов, определяющих различия в биологической эффективности излучений, различающихся по ЛПЭ, на клетки разного генотипа. Сформулированы представления о том, что биологическая эффективность излучений разного качества определяется как физическими особенностями микрораспределения энергии разных типов излучений в генетических структурах клетки, в результате чего индуцируется широкий спектр первичных повреждений ДНК, так и биологическим фактором, направленным на репарацию этих повреждений. Снижение репарационной способности клеток с увеличением

ЛПЭ, а соответственно, и возрастание биологической эффективности в значительной степени связаны с индукцией нерепарируемых прямых двойных разрывов ДНК, играющих ведущую роль в летальном действии плотноионизирующих излучений [2-3].

Эти исследования в ОИЯИ были проведены на клетках как низших и высших эукариот, так и прокариот. Мы принимали участие в экспериментах ОИЯИ, выполненных на бактериальных клетках [4]. Как логическое продолжение вышеуказанных работ нами было проведено исследование биологической эффективности ускоренных электронов по их летальному действию на клетки бактерий *Escherichia coli* K-12 разного репарационного генотипа.

В работе использованы следующие штаммы бактерий *E. coli* K-12, любезно предоставленные нам В.Н. Вербенко из коллекции ПИЯФ РАН: дикий тип АВ 1157 (thr-1 leu-6 pro A2 his-4 arg E3 lac Y1 gal K2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 str A31 sup E37);  $\gamma$ -резистентный мутант BL 1114 (Gam<sup>r</sup> 444); радиочувствительный мутант АВ 2463 (гес A13<sup>-</sup>).

Выращивание бактериальных культур проводили на полноценной питательной среде УЕР ( дрожжевой экстракт – 10 г/л, пептон – 10 г/л, натрий хлористый – 10 г/л, агар-агар – 20 г/л) или МПА (мясная вода, пептон – 10 г/л, натрий хлористый – 5 г/л, агар-агар – 20 г/л) до стационарной фазы роста. Разведения клеточной суспензии для контрольных и облучаемых проб готовили в 0,85%-ном физиологическом растворе с таким расчетом, чтобы в каждой чашке выросло от 100 до 300 колоний. Облучение клеток электронами в монослое на поверхности “голодного агара” проводили на микротроне МК-7,5 Ереванского физического института. Энергия электронов – 7,5 МэВ. Значение ЛПЭ – 0,3 кэВ/мкм. Мощность дозы 25 Гр/мин. Радиационные характеристики электронного пучка определяли на основе “An International Codes of Practice” IAEA TRS 277 [5], с помощью электрометра UNIDOS (PTW, Freiburg, Germany) и ионизационной камеры фермеровского типа 30001 с объемом камеры 0,6 см<sup>3</sup>, откалиброванных в SSDL IAEA. Мощность дозы определяли в воздухе с помощью камеры фермеровского типа, снабженной колпачком из полиметилметакрилата.

Рентгеновскими лучами клетки облучали на установке РУП-200-20-5 (нефильтрованное излучение, напряжение на трубке – 200 кВ, сила тока – 14 мА, мощность дозы – 30 Гр/мин). Специально поставленные эксперименты показали, что способ облучения клеток (в монослое на поверхности “голодного агара” или в суспензии) не влиял на величину радиочувствительности клеток.

В качестве источника  $\alpha$ -частиц использовали плоский  $\alpha$ -источник <sup>239</sup>Pu. Мощность дозы 22 Гр/мин. Облучение проводили в монослое на поверхности “голодного агара”. Облучение клеток всеми типами излучений проводили при

комнатной температуре. Выживаемость клеток определяли подсчетом макроколоний, вырастающих на среде УЕР через 24-48 ч при температуре 37<sup>0</sup>С. Опыты повторяли 3-5 раз. Стандартная ошибка определения средних значений выживаемости клеток, как правило, не превышала 5-10%.

На рис. 1 представлены результаты экспериментов по облучению клеток дикого типа, суперрезистентного и чувствительного мутантов *E. coli* электронами с энергией 7,5 МэВ. Как можно видеть, у данных штаммов бактерий радиочувствительность клеток значительно различается. В варианте опыта, когда клетки дикого типа до облучения выдерживались в физиологическом растворе в течение двух часов при комнатной температуре, радиочувствительность их несколько увеличивается, но различия значений чувствительности клеток дикого типа и чувствительного мутанта сохраняются.

Ранее нами было показано, что уже в первые часы выдерживания клеток бактерий *E. coli* в так называемых «непитательных» средах, в зависимости от генотипа и исходной концентрации клеток, может наблюдаться как увеличение, так и уменьшение числа жизнеспособных клеток [6]. Исходя из вышесказанного для уточнения данных по модификации радиочувствительности клеток дикого типа в условиях предрадиационного выдерживания их в «непитательной» среде, мы провели наблюдения по регистрации числа жизнеспособных клеток данного штамма, внесенных в физраствор в разных концентрациях (табл. 1).

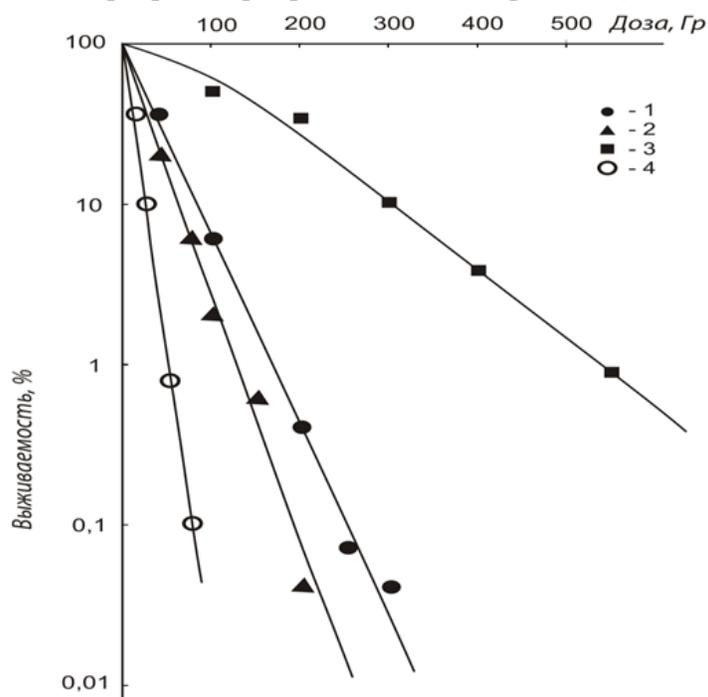


Рис. 1. Кривые выживания клеток бактерий *E. coli* К-12, облученных электронами: АВ 1157 – обычные условия облучения (1), АВ 1157 – 2-часовое выдерживание в физиологическом растворе (2), BL 1114 (3), АВ 2463 (4).

По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %

Таблица 1

Число жизнеспособных клеток *E. coli* К-12 дикого типа при выдерживании их в физиологическом растворе в разных концентрациях при комнатной температуре

Время инкубации, ч	Число жизнеспособных клеток, кл/мл				
	0	$2.0 \cdot 10^3 \pm 0.21$	$3.0 \cdot 10^4 \pm 0.22$	$1.8 \cdot 10^5 \pm 0.12$	$4.2 \cdot 10^6 \pm 0.31$
2	$2.1 \cdot 10^3 \pm 0.11$	$3.2 \cdot 10^4 \pm 0.20$	$1.7 \cdot 10^5 \pm 0.21$	$4.3 \cdot 10^6 \pm 0.28$	$6.0 \cdot 10^7 \pm 0.30$

Как следует из таблицы, в данных условиях опыта число колониобразующих клеток дикого типа не меняется.

Кривые выживания вышеуказанных клеток бактерий *E. coli* К-12 с разным репарационным генотипом при облучении их рентгеновскими лучами и  $\square$ -частицами приведены на рис 2 и 3.

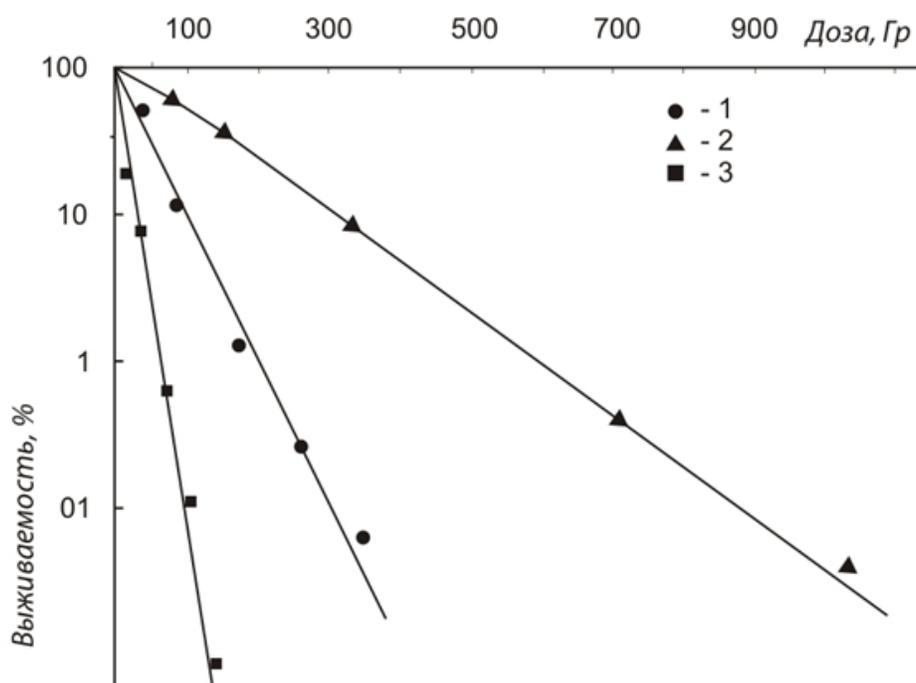


Рис. 2. Кривые выживания клеток бактерий *E. coli* К-12 штаммов АВ 1157 (1), ВL 1114 (2), АВ 2463 (3), облученных рентгеновскими лучами. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %.

В табл. 2 даны значения  $D_0$  кривых доза – эффект клеток дикого типа и репарационных мутантов, представленных на рис. 1-3.

Из таблицы следует, что наибольшие различия в радиочувствительности клеток разного генотипа наблюдаются при облучении их рентгеновскими лучами и электронами. С увеличением ЛПЭ излучений, в данном случае при

облучении  $\alpha$ -частицами, имеет место нивелирование чувствительности всех использованных в эксперименте штаммов *E. coli* К-12.

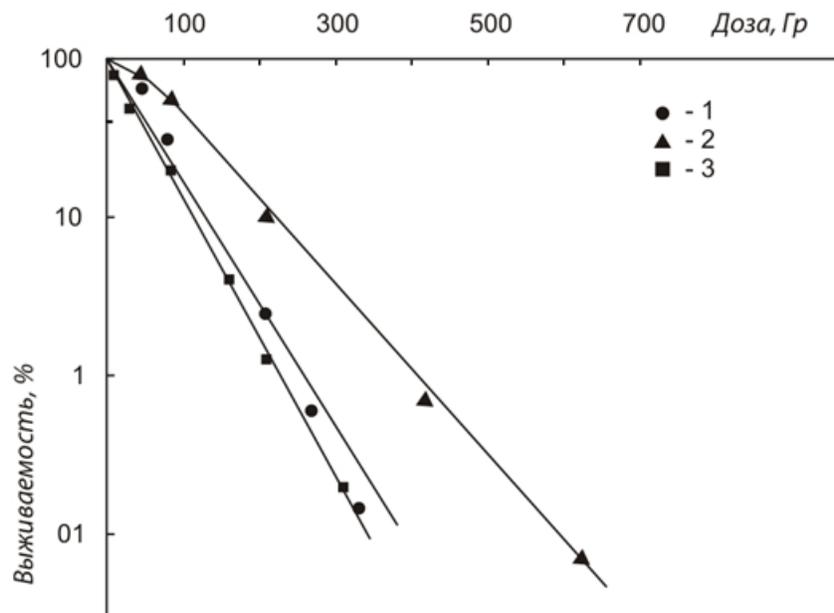


Рис. 3. Кривые выживания клеток бактерий *E. coli* К-12 штаммов АВ 1157 (1), BL 1114 (2), АВ 2463 (3), облученных  $\alpha$ -частицами. По оси абсцисс – доза облучения, Гр; по оси ординат – выживаемость, %.

**Таблица 2**

**Значения  $D_0$  кривых выживания клеток бактерий *E. coli* К-12, облученных ионизирующими излучениями разного типа.**

Штамм	Вид ионизирующего излучения	Мощность дозы, Гр/мин	ЛПЭ, кэВ/мкм	$D_0$ , Гр
АВ 1157	Электроны	25	0.3	$40 \pm 2.1$
	Рентгеновское излучение	30	2.5	$44 \pm 1.5$
	Альфа-частицы	22	110	$52.5 \pm 0.9$
BL 1114	Электроны	25	0.3	$100 \pm 6.2$
	Рентгеновское излучение	30	2.5	$115 \pm 5.6$
	Альфа-частицы	22	110	$77.7 \pm 6.3$
АВ 2463	Электроны	25	0.3	$12 \pm 1.0$
	Рентгеновское излучение	30	2.5	$15.8 \pm 1.0$
	Альфа-частицы	22	110	$50.4 \pm 2.5$

Известно, что решающую роль в летальном действии излучений на клетки играют одностебельные (ОР) и двустебельные (ДР) разрывы ДНК. Различают два типа

ДР ДНК: прямые двунитевые разрывы (ПДР) и энзиматические двойные разрывы (ЭДР), возникающие из перекрывающихся брешей при расчистке повреждений ДНК в результате действия репарационных ферментов. Реализация как одного ЭДР, так и ПДР ДНК в геноме клеток *E. coli* K-12 дикого типа и суперрезистентного мутанта приводит к летальному исходу. Выход ЭДР ДНК генетически детерминирован и определяется балансом нуклеазной и полимеразной активности репарационных ферментов. Большая устойчивость клеток суперрезистентного мутанта к излучениям с низкими значениями ЛПЭ объясняется лучшей координацией работы репарационных ферментов, приводящей к уменьшению выхода ЭДР ДНК. Низкая радиостойчивость чувствительного мутанта связана с тем, что для клеток данного штамма губительна реализация не только ДР, но, преимущественно, и ОР ДНК. С возрастанием ЛПЭ излучений выход ЭДР падает, а ПДР резко увеличивается и становится преобладающим в суммарном выходе ЭДР и ПДР: в диапазоне значений величины ЛПЭ ~ 150-200 кэВ/мкм практически все ДР являются ПДР ДНК.

Таким образом, поскольку выход ЭДР ДНК с возрастанием ЛПЭ снижается пропорционально уменьшению выхода ОР, то уменьшаются и различия радиочувствительности изогенных мутантов *E. coli* K-12, обусловленные генетическим дефектом в системе репарации клеток одного мутанта (AB 2463), либо, наоборот, эффективной работой восстановительных систем клеток другого мутанта (BL 1114).

Авторы выражают глубокую благодарность М.Л. Петросяну и Л.А. Габриэлянцу за предоставление возможности, обеспечение условий и техническое содействие в проведении экспериментов на микротроне МК-7,5, а также В.Н. Вербенко за предоставление штаммов *E. coli*.

Ереванский физический институт

**Ц. М. Авакян, Н. И. Мкртчян, Н. В. Симонян, Г. Э. Хачатрян**

**Биологическое действие электронов с энергией 7.5 МэВ  
на клетки бактерий *E. coli* K-12 разного репарационного генотипа**

Представлены результаты исследований биологической эффективности ускоренных электронов с энергией 7.5 МэВ по их летальному действию на клетки бактерий *Escherichia coli* K-12 разного репарационного генотипа. Полученные результаты обсуждаются с позиций существующих представлений о роли баланса работы репарационных ферментов в определении различий радиочувствительности клеток изученных штаммов бактерий к действию ионизирующих излучений разного качества.

**Ց. Մ. Ավագյան, Ն. Ի. Մկրտչյան, Ն. Վ. Սիմոնյան, Գ. Է. Խաչատրյան**

**Տարբեր վերականգնողական գենոտիպ ունեցող E. coli K-12 մանրէների բջիջների վրա 7.5 ՄԷՎ էներգիայով էլեկտրոնների կենսաբանական ազդեցության ուսումնասիրությունը**

Ներկայացված են 7,5 ՄԷՎ էներգիայով արագացված էլեկտրոնների փնջերի կենսաբանական ազդեցության հետազոտությունների արդյունքները՝ ըստ տարբեր վերականգնողական գենոտիպ ունեցող *Escherichia coli* K12 մանրէների բջիջների վրա փնջերի լետալ ազդեցության: Ստացված տվյալները քննարկվում են տարբեր որակի իոնիզացնող ճառագայթման նկատմամբ մանրէների տարբեր շտամերի բջիջների ռադիոզգայունության որոշման խնդրում վերականգնողական ֆերմենտների աշխատանքի հաշվեկշռի դերի մասին գոյություն ունեցող պատկերացումների տեսանկյունից:

**Ts. M. Avakyan, N. I. Mkrtchyan, N. V. Simonyan, G. E. Khachatryan**

**The Research of Biological Action of the Electrons with the Energy of 7.5 MeV on the Cells of E. coli K-12 Bacteria Having Different Reparation Genotype**

The results of the investigation of the biological efficiency of accelerated electrons with the energy of 7.5 MeV on their lethal action on the cells of *Escherichia coli* K-12 bacteria with the different reparation genotype are presented. The received results are discussed from the position of existing representations regarding the role of the balance of work of reparation enzymes in definition of distinctions in radiosensitivity of studied cells strains of bacteria to the action of an ionising radiation of different quality.

**Литературы**

1. *Петров В.М.* В кн.: Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии. Москва-Дубна. 2002. С. 111-125.
2. *Красавин Е.А.* Проблемы ОБЭ и репарация ДНК. М. Энергоатомиздат. 1991. 193 с.
3. *Красавин Е.А., Козубек С.* Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М. Энергоатомиздат. 1991. 193 с.
4. *Красавин Е.А., Амиртаев К.Г., Козубек С., Токарева Б., Симонян Н.В., Джанполадян Н.Л., Степанян Л.Г., Череватенко А.П.* - Сообщения Объединенного института ядерных исследований. 1985. P19-85-721.
5. Absorbed Dose Determination in Photon and Electron Beams. An International Code of Practice. TRS No.277, Second Edition. IAEA. Vienna. 1997.
6. *Симонян Н.В.* - Радиобиология. 1975. Т. 15. Вып. 2. С. 247-251.