

С. Е. БРЕСЛЕР, Л. А. НОСКИН, А. Г. СВЕРДЛОВ, И. М. СТЕПАНОВА

**ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИОННОГО СИНТЕЗА
ДНК ИНДОЛИЛАЛКИЛАМИНАМИ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В
РАДИОЗАЩИТНОМ ДЕЙСТВИИ ЭТИХ СОЕДИНЕНИЙ
У *ESCHERICHIA COLI***

(Представлено академиком Е. М. Кренсом 13 VIII 1974)

Действие радиозащитных соединений при γ -облучении клеток принято объяснять улавливанием активных радикалов, образованием смешанных дисульфидов и др. Однако возможно принципиально иное объяснение их действия — активированием репарационных ферментативных систем клетки. Целью нашего исследования явилось изучение влияния одного из индолилалкиламинов — мексамина (5-метокситриптамина) на различные системы репарации у *E. coli*.

Использовались следующие штаммы *E. coli*: дикий тип K12 и его мутанты, недостаточные по тиминову lig^- , $pol A^-$, $rec A^-$ и $rec ABC^-$. Исследо-

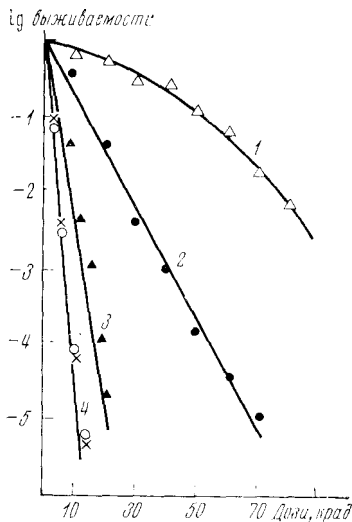


Рис. 1

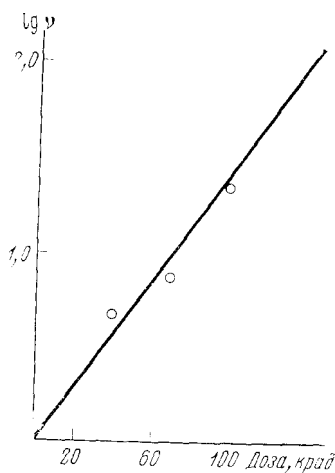


Рис. 2

Рис. 1. Дозовые кривые выживаемости различных штаммов *E. coli*. 1 — дикий тип K12; 2 — lig^- ; 3 — $pol A^-$; $rec A^-(+)$; 4 — $rec ABC^-$

Рис. 2. Дозовый выход одонитевых разрывов ДНК *E. coli* K12

вания проводились на культурах в логарифмической фазе роста при концентрациях $1-3 \cdot 10^8$ клеток/мл. Клетки выращивались в максимальной аминокислотной среде. Перед облучением культуры фильтровали на нитроцеллюлозных фильтрах и ресуспендировали в 0,01M фосфатном буфере pH 7,0 с 0,2M NaCl. Мексамин $5 \cdot 10^{-3}M$ и кофеин 0,5% добавляли к ресуспендированной культуре за 20 мин. до облучения при 37°. Облучение проводили на установке РХ- γ -30 при мощности дозы 12 крэд/мин. Для всех использованных штаммов была снята кривая зависимости выжива-

емости от дозы (рис. 1), по которой определяли фактор изменения дозы (ф.и.д.) для мексамина. Индукцию одностранных разрывов ДНК изучали при тех дозах, которые вызывают инактивацию незащищенной культуры в 1000 раз. Эти дозы составляли: для дикого типа 100 крад, для lig⁻ 50 крад, для pol A⁻ 14,4 крад, для гес А⁻ и гес АВС⁻ 7,2 крад. Метка ДНК бактерий ³H-тимидином (10 мкС/мл или 5 мкг/мл) осуществлялась в минеральной среде с 0,1% гидролизатом казеина и с 0,4% глюкозой в течение 4–5 генераций культуры. Пострадиационную инкубацию культуры проводили в течение 30 мин. при 37° в минеральной среде того же состава, но без меченого предшественника. Перед ультрацентрифугированием культуру концентрировали в 10 раз (до 1–3·10⁹ клеток/мл) путем фильтрования и ресуспендирования в меньшем объеме. 0,16 мл концентрированной суспензии паспавали на менск щелочного сахарозного градиента и добавляли 0,24 мл 0,1% саркозила с 0,5N NaOH и 0,02M ЭДТА. Пробы выдерживали 30 мин. при 20°. Число одностранных разрывов в ДНК определяли по общепринятому методу (1). Центрифугировали при 29000 об/мин 90 мин. при 20°. Каждый градиент разделяли на 30 фракций. ДНК осаждали на нитроцеллюлозные фильтры 8% ТХУ, добавив 1 каплю 0,1% сывороточного альбумина. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике «Isosap-300» с использованием толуольного сцинтиллятора. Константа седиментации рассчитывалась по формуле Стандера (2) и число одностранных разрывов ν определяли согласно теории (3):

$$\nu = \left[\frac{(s_{20,w})_0}{(s_{20,w})_1} \right]^{2,5} - 1.$$

На рис. 2 представлена дозовая зависимость выхода одностранных разрывов ДНК у клеток дикого типа. С помощью этой кривой оценивали в каждом опыте ф.и.д. в присутствии мексамина. Как оказалось, величины ф.и.д., установленные по выживаемости и по числу одностранных разрывов, хорошо согласуются друг с другом.

Из табл. 1 видно, что добавление мексамина перед облучением клеток приводит к заметному снижению индукции одностранных разрывов радиацией, определяемых сразу после облучения (ф.и.д. 1,4). Это может объясняться как прерадиационным эффектом, так и стимуляцией тех репа-

Таблица 1
Влияние мексамина на выход одностранных разрывов ДНК *E. coli*

Условия эксперимента	С мексимином		Без мексамина				Ф.и.д.
	ν	эквивалентная доза, крад	после облучения		после инкубации		
			ν	эквивалентная доза, крад	ν	эквивалентная доза, крад	
Мексамин введен до облучения	9,0	70,0	22,3	100,0	—	—	1,4
То же, но с пострадиационной инкубацией 30 мин.	0,9	16,5	—	—	2,2	30,0	1,8
Мексамин введен после облучения	17,8	89,0	22,9	100,0	—	—	1,1
То же, но с пострадиационной инкубацией 30 мин.	1,4	20,5	—	—	2,2	30,0	1,5
Мексамин и кофеин введены до облучения	17,8	89,0	22,9	100,0	—	—	1,1
То же, но с пострадиационной инкубацией 30 мин.	22,9	100,0	—	—	30,6 *	107,0 *	1,1

* Инкубация проводилась в присутствии 0,5% кофеина; ν — число одностранных разрывов ДНК.

Таблица 2

Радиозащитное действие мексамина на мутантные штаммы *E. coli*

Штамм <i>E. coli</i>	Выживаемость после облучения (исходный титр $1-3 \cdot 10^8$)				Ф.и.д.
	без мексамина		в присутствии мексамина		
	титр клеток (10^{-5})	эквива- лентная доза, град	титр клеток (10^{-5})	эквива- лентная доза, град	
K12	$0,93 \pm 0,07$	97,5	$77,0 \pm 8,0$	55,0	$1,84 \pm 0,16$
lig ⁻	$0,74 \pm 0,1$	46,0	$1,1 \pm 1,3$	42,0	$1,1 \pm 0,06$
polA ⁻	$0,61 \pm 0,13$	15,0	$8,9 \pm 1,1$	9,5	$1,58 \pm 0,12$
recA ⁻	$0,86 \pm 0,11$	8,2	$2,7 \pm 0,9$	7,0	$1,17 \pm 0,05$
recABC ⁻	$0,77 \pm 0,14$	8,0	$2,2 \pm 0,8$	7,3	$1,1 \pm 0,07$

рационных процессов, которые проходят очень быстро. Дальнейшая пострадиационная инкубация в присутствии мексамина сопровождается увеличением ф.и.д. до 1,8. Вклад пострадиационной инкубации в защитный эффект мексамина особенно наглядно выявляется в том случае, когда препарат добавлялся к клеткам сразу после облучения: без инкубации ф.и.д. 1,1, а после 30-минутной инкубации ф.и.д. 1,5. Добавление кофеина — ингибитора пострадиационного восстановления ДНК — почти полностью снимало защитное действие мексамина (ф.и.д. 1,1).

Указанные данные позволяют предположить, что радиозащитный эффект мексамина в значительной степени связан с активацией пострадиационной репарации ДНК. Дальнейшие опыты подтверждают эту точку зрения и уточняют отношение мексамина к различным репарационным системам. Из табл. 2 видно, что величина радиозащитного эффекта мексамина зависит от характера мутационного повреждения системы репарации ДНК. Так, при облучении клеток polA⁻ снижение радиозащитного эффекта мексамина по сравнению с защитой клеток дикого типа мало существенно (ф.и.д. 1,58 и 1,84, соответственно). В то же время у lig⁻, recA⁻ и recABC⁻ клеток защитный эффект мексамина минимальный (ф.и.д. в пределах 1,1). Можно заключить, что мексамин избирательно стимулирует лигазную и рекомбинационную системы репарации и мало влияет на полимеразную систему. Такое заключение делает понятным, почему защитный эффект мексамина, добавленного до облучения, проявлялся в том случае, когда пострадиационная инкубация не проводилась (ф.и.д. 1,4): время от момента облучения до вскрытия клеток на мениске сахарозного градиента достаточно для лигазной репарации (4).

Институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР
Гатчина Ленинградской обл.

Поступило
27 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. A. McGrath, R. W. Williams, Nature, v. 212, 5061, 534 (1966). ² W. Studier, J. Mol. Biol., v. 11, 373 (1965). ³ B. H. Zimm, Biophys. Chem., v. 1, 279 (1974). ⁴ C. D. Town, K. C. Smith, H. S. Kaplan, Science, v. 172, № 3985, 851 (1971).