

2. Brusemer R. W., Veerabhadrappa P. S. Biochem. Biophys. Acta, 110, 102, 1965.
3. Dendinger S., Brill W. J. J. Bacteriol., 103, 144—152, 1970.
4. Frank L., Ranhand B. Arch. Biochem. Biophys., 107, 325—333, 1964.
5. Hertfeld A., Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J, 166, 95—102, 1977.
6. Jonson A B., Strecker H J. Biol. Chem., 237, 1876—1882, 1962.
7. Kovatoff E. M., Phang T. M., Granger A. S., Downings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5368—71, 1977.
8. Laishley E. J., Berthel R. A. J. Bacteriol., 96, 322, 1968.
9. Lundgren D., Ogur M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 147—149, 1972.
10. Monticello D. J., Costiloz R. V. Can. J. Microbiol., 27, 942—948, 1981.
11. Namer A. D., Stewart C. Plant Physiol., 53, 440—444, 1974.
12. Rena A. B., Splittstoesser W. F. Phytochemistry, 13, 2081—2084, 1974.
13. Sacter B., Chidress C. C. Arch. Biochem. Biophys., 124, 583—588, 1967.
14. Sacter B., Whermser—Sawell E. J. Biol. Chem., 241, 624, 1966.
15. Woods E., Kort C. A. D., Beenackers A. M. Insect Biochem., 10, 305—311, 1980.

Поступило 5.VIII 1987 г.

ВЛИЯНИЕ ЦИТЕАМИНА И ГЛИЦЕРИНА НА КЛЕТКИ *E. coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ

И. В. СИМОНЯН, И. Л. ДЖАННОЛЯДЯН, Л. Г. СТЕПАНЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ

На клетках *E. coli* K-12 разных генотипов показано, что защитное действие цитеамина и глицерина при действии γ -излучения и рентгеновых лучей генетически детерминировано: при использовании цитеамина это выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае применения глицерина—в возрастании протекторного влияния в ряду излученных штаммов *E. coli*: *rec A*-мутант—клетки «дикого типа»—роль *A*-мутант. Глицерин защищает клетки дикого типа и *rec A*-мутанта и от летального действия ускоренных ионов ультрафиолета и от летального действия ускоренных ионов ультрафиолета, в то время как цитеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным.

Տարբեր զենտիպերի *E. coli* K-12 բջիջների վրա ճառագայիտի և տրոնի, որ դիֆերենցիալ և քրոմոսոմների պաշտպանողական ազդեցությունը γ -առաքայիների և սինտրոնային ճառագայիտան ճառագայիտի զենտիպերին զենտիպերից է: Ֆրեմոնդների օգտագործման ճեպքում դա արտահայտվում է մուտանտների համար պաշտպանողական էֆեկտի բացակայությամբ, իսկ դիֆերենցիալ օգտագործման ճեպքում՝ ճեպքային ճեպքների պաշտպանողական նախկին անոթ ճեպքային ճեպքային օգտագործման համար: *rec A*-մուտանտ—օվայրի տիպի բջիջներ—*rec A*-մուտանտի բջիջներ պաշտպանում է օվայրի տիպի բջիջներ և *rec A*-մուտանտի բջիջներ արագագործի իոնների ճեպք (մանուցում) ազդեցությունը: Ֆրեմոնդների օգտագործումը բջիջ վրա ճեպք իոնների ազդեցության ճեպքում էֆեկտիվ չէ:

Сокращения: ОР—однонитевые разрывы, ДР—двунилевые разрывы, ЭДР—энзиматические двунилевые разрывы, ПДР—прямые двунилевые разрывы, Л—линейная передача энергии, ФУД—фактор уменьшения дозы.

It is shown on *E. coli* K-12 cells of different genotypes that the protecting effect of cysteamine and glycerol against γ -radiation and X-rays is genetically determined: there is no protection by cysteamine in repair deficient mutants, while the protective effects of glycerol increase among studied strains of *E. coli*: *rec A*⁻-mutant \rightarrow "wild type" cells \rightarrow *pol A*⁻-mutant. Glycerol protects wild type cells and *rec A*⁻-mutant from lethal action of accelerated carbon ions, whereas cysteamine does not influence the effect of heavy (carbon) ions in *E. coli* cells at all.

Бактерии *E. coli*—радиочувствительность—цистеамин—глицерин.

Результаты изучения протекторного влияния аминотиолов и многоатомных спиртов на выживаемость бактерий *E. coli* при γ -облучении свидетельствуют о неоднозначной зависимости их радиозащитного эффекта от генотипа клеток. Выяснено, что многие мутации, повышающие радиочувствительность бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, снимают защитное действие аминотиолов и индоллилалкиламинов [2, 7]. В присутствии указанных радиопротекторов снижается выход ЭДР ДНК—основных летальных событий у клеток «дикого» типа, поскольку активность эндонуклеаз, производящих ниснизью фермент-лабильных сайтов, угнетается [6, 7]. Вследствие того, что у чувствительных мутантов летальными являются не только ДР, но и другие типы повреждений ДНК, возникающие в большем количестве, чем ДР, лучшая сбалансированность процессов деградации и репарации ДНК при влиянии аминотиолов и индоллилалкиламинов не реализуется в виде радиозащитного эффекта. Глицерин—представитель класса многоатомных спиртов—эффективно защищает от летального действия γ -лучей не только клетки «дикого» типа, но и *rec A*⁻, *pol A*⁻-мутанты [1]. Показано, что он реализует свое защитное действие не на уровне ферментативной репарации, а на уровне первичных физико-химических процессов [1]. С учетом указанных обстоятельств можно полагать, что при действии на клетки *E. coli* излучений с высокой \dot{D} , когда возрастает выход ПДР ДНК и ОР, не восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией [3, 5], эффективность защитного действия аминотиолов и многоатомных спиртов будет проявляться по-разному: резко снижаться при влиянии цистеамин и в меньшей степени—в присутствии глицерина. При этом радиозащитный эффект глицерина должен иметь место не только при облучении клеток «дикого» типа, но и чувствительных мутантов. Для проверки этих предположений и была выполнена настоящая работа.

Материал и методика. Использовали следующие штаммы бактерий *E. coli* «дикой» тип АВ 1157, чувствительные мутанты АВ 2463 (*rec A13*⁻), Р3478 (*pol A1*⁻) и суперрезистентный мутант Сапг-441. Выращивание бактериальных культур проводили в стационарной фазе (2—3 $\cdot 10^8$ клеток в 1 мл) либо на твердой питательной среде, либо на основе аминокислоты, либо на среде МЕР. В качестве радиопротекторов использовали цистеамин (фирма «Sigma», США) и глицерин в концентрациях соответственно равных $2 \cdot 10^{-2}$ и 1 М. После выращивания клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000 g). Культуру ресуспендировали в 1/3 объема М₂ буфера и к части образцов добавляли протекторы в необходимой концентрации. Инкубацию образцов с протекторами осуществляли в течение 30 мин перед облучением. Условия аноксии создавали путем барботажки суспензии азотом в течение 30 мин перед облучением.

Эксперименты с ускоренными ионами углерода с энергией 7,5 Мэв/нуклон проводили на ускорителе тяжелых ионов У-200 ЛЯР-200 ОИЯИ на специально созданной установке с комплексом электронно-физической аппаратуры. Клетки облучали в моноэтом на поверхности 2%-ного голодного агара. Мощность дозы облучения составляла 1,5 Гр/с.

Источником γ -лучей являлась установка с γ -источником ^{137}Cs . Облучение клеток рентгеновыми лучами проводили с использованием аппарата РУП-200-20-5 (нефильтрованное излучение, напряжение на трубке 200 кВ, сила тока 14 мА). Мощность дозы γ и рентгенооблучения составляла 0,58 Гр/с. В опытах с γ и рентгеновыми лучами облучение клеток проводили во флаконах объемом 10 мл. Специально поставленные эксперименты показали, что способ облучения (на поверхности агара или в суспензии) не влияет на величину радиочувствительности клеток.

Опыты повторяли 3—5 раз. Полученные результаты подвергали статистической обработке на ЭВМ [1].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые выживания клеток АВ 1157, АВ 2463 и Р 3478 при γ -облучении их в обычных условиях и в присутствии цистеаминна. Видно, что цистеамин эффективно защищает клетки «дикого» типа с ФУД, равным $2,28 \pm 0,35$. Од-

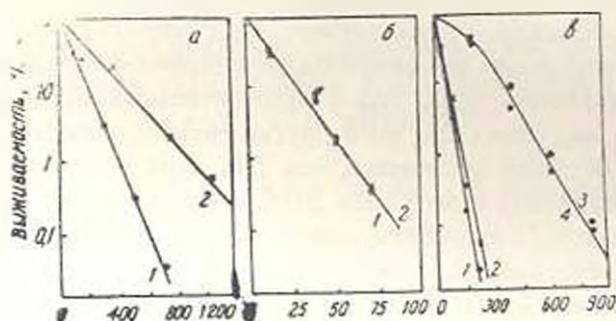


Рис. 1. Влияние цистеаминна на выживаемость клеток АВ 1157 (а), АВ 2463 (б) и Р 3478 (в) при γ -облучении: 1 — без протектора; 2 — с цистеаминном; 3 — в условиях анокиии бел цистеаминна, 4 — с цистеаминном. По оси абсциссе — доза облучения, Гр; по оси ординат — выживаемость, %.

нако его радиозащитный эффект практически исчезает при облучении клеток гес А⁻ и ро1 А⁻-мутантов. Величина ФУД в этом случае соответственно составляет $1,00 \pm 0,04$ и $1,39 \pm 0,21$. Аналогичная картина наблюдается и при облучении гес А⁻-мутанта рентгеновыми лучами (рис. 2). В отличие от клеток «дикого» типа, где величина ФУД составляет $2,31 \pm 0,18$, у гес А⁻-мутанта ФУД = $0,91 \pm 0,14$.

Анализ материалов, представленных на рис. 1, 2 и в таблице, показывает, что не только мутации гес А и ро1 А, повышающие радиочувствительность клеток, снимают радиозащитный эффект цистеаминна, но и мутация Gап₁ 444, уменьшающая радиочувствительность клеток. Аналогичные наблюдения сделаны и другими авторами [3].

Таким образом, полученные нами материалы свидетельствуют о генетической детерминированности радиозащитного влияния цистеаминна при γ -облучении клеток *E. coli*, что согласуется с литературными данными [27]. Указанная детерминированность выражается в резком уменьшении величины радиозащитного эффекта у чувствительных и суперрезистентного мутантов, свидетельствующем о том, что реализа-

ция протекторного действия цистеаминна осуществляется на уровне ферментативной репарации ДНК [2, 3, 7]. В этой связи следует обратить внимание на незначительное модифицирующее влияние цистеаминна при облучении клеток Р 3478 (рис. 1). Действительно, если бы защитное

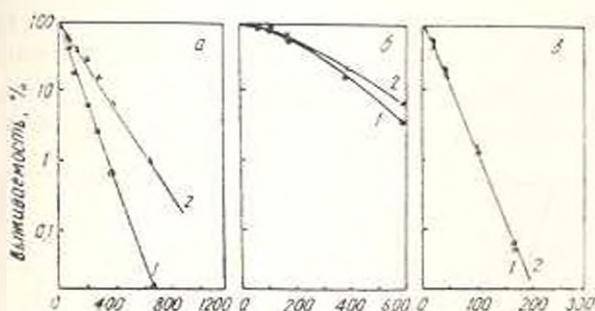


Рис. 2 Влияние цистеаминна на выживаемость клеток АВ 1157 (а), В1.1114 (б) и АВ 2463 (в) при рентген облучении: 1—без протектора; 2—с цистеаминном. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.

Влияние цистеаминна и глицерина на радиочувствительность (D_0^{-1}) разных штаммов *E. coli* при действии γ -, рентгеновых лучей и ускоренных ионов углерода

Генотип	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, \text{Гр}^{-1}$		ФУД	$D_0^{-1} \cdot 10^{-2}, \text{Гр}^{-1}$		ФУД
	без протектора	с цистеаминном		без протектора	с глицерином	
γ-лучи ^{137}Cs						
«Дикий» тип	1.12±0.15	0.49±0.09	2.28±0.35	1.00±0.66	0.39±0.04	2.52±0.25
гес А ⁻	7.60±0.12	7.58±0.28	1.00±0.04	6.20±0.37	3.06±0.18	2.33±0.12
роf А ⁻	5.27±0.70	3.79±0.12	1.39±0.21	4.96±0.44	1.75±0.23	2.80±0.26
Рентгеновы лучи						
«Дикий» тип	1.69±0.13	0.73±0.05	2.31±0.18	—	—	—
гес А ⁻	4.21±0.22	1.62±0.29	0.91±0.13	—	—	—
роf А ⁻	0.74±0.08	0.62±0.09	1.19±0.17	—	—	—
Ионы углерода						
«Дикий» тип	3.05±0.31	2.72±0.26	1.12±0.11	2.76±0.11	2.03±0.11	1.36±0.12
гес А ⁻	1.79±0.18	1.77±0.17	1.93±0.10	1.79±0.14	1.34±0.09	1.34±0.11

действие протектора реализовалось на уровне первичных физико-химических процессов, в результате чего снижался бы выход первичных повреждений ДНК, то наиболее отчетливо протекторный эффект выявлялся бы у клеток роf А⁻-мутанта [1, 4], что имеет место, например, при облучении штамма роf А⁻ в условиях аноксии (рис. 1). Из представленных данных также видно, что у клеток данного штамма кислороднезависимый компонент защитного действия цистеаминна полностью отсутствует.

В отличие от цистеаминна глицерин эффективно защищает не только клетки «дикого» типа, но и чувствительные мутанты (рис. 3, табл.). При этом в наибольшей степени, по сравнению с гес А⁻-мутантом и клетками «дикого» типа, защитное действие глицерина проявляется при об-

лучении клеток *pol A*-мутанта, т. е. эффективность протекторного влияния последовательно возрастает в ряду изученных штаммов *E. coli*: *hes A*-мутант—дикий тип—*pol A*-мутант. Аналогичная картина наблюдается и при изучении кислородного эффекта [1]. Величина кислороднезависимого компонента у клеток *pol A*-мутанта, так же как и у клеток «дикого» типа и *hes A*-мутанта [1], равна ~ 2 (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отличие от аминотрилов радиопротекторное влияние глицерина реализуется на физико-химическом уровне, а не на уровне ферментативной репарации.

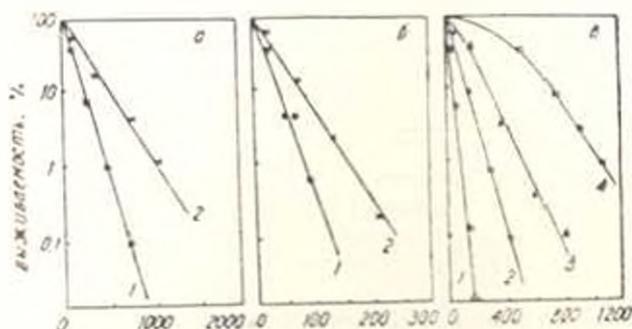


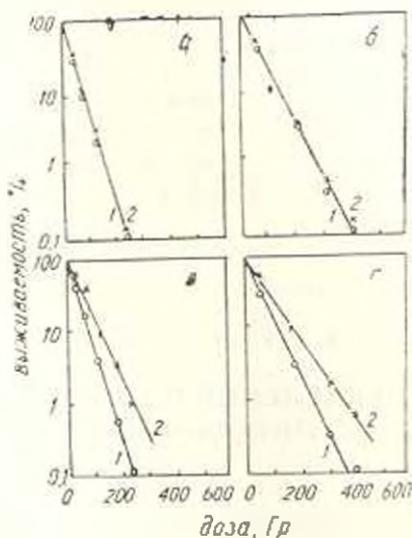
Рис. 3 Влияние глицерина на выживаемость клеток AB 1157 (а), AB 2463 (б) и P 3478 (в) при γ -облучении. 1—без протектора; 2—с глицерином; 3—в условиях аноксии без протектора; 4—в условиях аноксии с глицерином. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.

Модельный анализ генетической детерминированности защитного влияния глицерина, проведенный в [1], показал, что его протекторный эффект можно объяснить снижением выхода одностранных разрывов ДНК, восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией (OP'_1). Показано, что снижение OP'_1 , которое может происходить за счет способности глицерина перехватывать $OH\cdot$ -радикалы, должно по-разному отражаться на уменьшении радиочувствительности клеток *hes A*-мутанта, «дикого» типа и *pol A*-мутанта [1]. Как можно видеть из рис. 3, это действительно имеет место: наименее выражено защитное влияние глицерина при облучении клеток *hes A*-мутанта и наибольший защитный эффект его наблюдается для *pol A*-мутанта.

Одинаковая величина кислородзависимого компонента для *hes A*-мутанта, клеток «дикого» типа *pol A*-мутанта может указывать на то, что в присутствии глицерина снижается не только выход OP'_1 , но и выход OP ДНК, не восстанавливаемых *pol A*-зависимой репарацией (OP'_2) [1]. С учетом этого можно полагать, что при действии на клетки излучений с высокой L , когда выход OP'_1 и ПДР увеличивается [5], защитное действие глицерина также будет иметь место. Действительно, анализ материала, представленный на рис. 4 а и в таблице, показывает, что глицерин защищает клетки «дикого» типа и *hes A*-мутанта от латентного действия ускоренных ионов с ФУД, соответственно равными $1,36 \pm 0,12$ и $1,32 \pm 0,11$. В то же время цистеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным (рис. 4).

На основе полученных материалов по защитному влиянию глицерина при действии ускоренных ионов углерода, а также модельных представлений, развитых ранее [8], приведем оценку модифицирующего влияния глицерина на выход OP^{1+} и ПДР-повреждений, являющихся летальными для клеток гес A^- -мутанта и «дикого» типа. Расчеты, выполненные на основе модели, показывают, что выход OP^{1+} и ПДР у гес A^-

Рис. 4. Влияние цистеаминна (а, б) и глицерина (в, г) на выживаемость клеток АВ 1157 (а, в) и АВ 2463 (б, г) при действии ионов углерода. 1—без протектора, 2—с протектором. По оси абсцисс—доза облучения, Гр; по оси ординат—выживаемость, %.



мутанта при действии ускоренных ионов углерода соответственно составляет 54 и 33% от общего выхода летальных повреждений. У клеток «дикого» типа эти величины равны 7 и 86%. Используя значения ФУД глицерина при облучении клеток гес A^- -мутанта и «дикого» типа ионами углерода, а также учитывая флуктуации энергии тяжелых заряженных частиц по чувствительным микрообъемам клеток, получаем суммарный выход OP^{1+} и ПДР в присутствии глицерина в случае гес A^- -мутанта, который в 1,7 раза меньше, чем в обычных условиях. У клеток «дикого» типа выход ПДР под влиянием глицерина уменьшается примерно в два раза. Полученные величины соотношений выходов летальных событий у клеток, облученных ионами углерода в присутствии глицерина, не коррелируют со значениями ФУД по выживаемости клеток, наблюдаемыми нами в эксперименте. Это объясняется тем, что при действии на клетки ускоренных ионов углерода имеют место большие флуктуации энергии по чувствительным клеточным мишеням, что обуславливает высокую степень неравномерности их облучения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что защитное действие цистеаминна и глицерина генетически детерминировано, однако выявленная детерминированность неоднозначна: в случае с цистеамином она выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае с глицерином—возрастании протекторного влияния в ряду изученных штаммов *E. coli*: гес A^- -мутант→клетки «дикого» типа→*pol A^-*-мутант. Это обусловлено тем, что аминокислоты реализуют свое защитное действие на уровне фермен-

тативной репарации, а спирты — на уровне первичных физико-химических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амиртаев К. Г., Красавин Е. А., Козубек С., Нямсамбуу А. *Studia Biophysica*, 106, 131, 1985.
2. Калинин В. Л. и др. *Радиобиология*, 19, 548, 1979.
3. Калинин В. Л., Вербенко В. И. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. 95. М., 1983.
4. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—744, Дубна, 1983.
5. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—743, Дубна, 1983.
6. Кузнецова Е. А. и др. *Радиобиология*, 23, 730, 1983.
7. Bresler S. E. et al. *Molec. Gen. Genet.*, 163, 75, 1978.
8. Kozubek S., Krasavin E. A. *Neoplasma*, 31, 685, 1984.

Поступило 10.11 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.352.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ ССРС

Показано, что падение микровязкости мембраны лецитиновых липосом при действии детергента связано с формированием смешанных мицелл после достижения детергентом критической концентрации мицеллообразования. В этих условиях различная степень озвучивания не меняет «индекс окисления» липосомальной мембраны.

Ցույց է տրված, որ լեցիտինային լիպոսոմների թաղանթի միկրովիզկոսիտի ընկնելը կապված է խառը միցելների ձևավորման հետ զետերգենտի միջնակետային կրիտիկական կոնցենտրացիային հասնելուց հետո: Լիպոսոմների ուլտրասունդային ձայնաճարձան աստիճանը սովորական պայմաններում չի փոխում լիպիդի օքսիդացման ինդեքսը:

Microviscosity of lecithin liposome membrane modified by sodium deoxycholate has been studied. It has been shown that the decrease of microviscosity is due to the forming of mixed micelles when the detergent of critical micellization concentration is achieved. Also it has been demonstrated that various degrees of liposome sonication do not change the lipid "oxidation index" under these conditions.

Липосомальная мембрана — микровязкость — детергент — «индекс окисления».

Известно, что проницаемость липидной мембраны может существенно меняться в зависимости от жидкостности мембраны [1, 4] и степени

Сокращения: ДХХи — дезоксихолат натрия; ДФГТ — 1,6-дифенил-1,3,5-оксатриазин; ККМ — критическая концентрация мицеллообразования; ЯМР — ядерный магнитный резонанс