

19-98-81

На правах рукописи
УДК 577.34

3-981

ЗЮЗИКОВ
Николай Аркадьевич

РЕАКЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК
НА ДЛИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЕМ

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск 1998

Работа выполнена в Объединенном институте ядерных исследований, г.Дубна, Московской области

Научные руководители:

- доктор биологических наук **В.Г.Петин**
- кандидат биологических наук **В.Л.Корогодина**

Официальные оппоненты:

- доктор биологических наук **А.В.Севаньяев**
- доктор биологических наук **Б.И.Сынзыныс**

Ведущая организация:

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСН

Защита диссертации состоится "12" мая 1998 г. в 11.00 на заседании диссертационного Совета Д 001.11.01 при Медицинском радиологическом научном центре РАМН. Отзывы на автореферат просим отправлять по адресу: 249020, Калужская область, г.Обнинск, ул.Королева, 4. МРНЦ РАМН, диссертационный совет.

Автореферат разослан " " _____ 1998 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор медицинских наук

Куликов В.А.

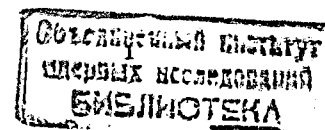
Актуальность проблемы

В ходе своей жизни человек постоянно подвергается воздействию ионизирующей радиации (природный радиационный фон и техногенный фон, возникший в результате деятельности человека). При определенных обстоятельствах может происходить увеличение в несколько раз мощности дозы выше естественного природного облучения на протяжении довольно длительного времени. Такое повышение облучаемости происходит при работе в шахтах, на объектах ядерной энергетики, при продолжительных полетах в космос, также превышение фона возможно и в жилых помещениях. Хорошо известно, что наиболее радиочувствительными клетками организма являются активно делящиеся и дифференцирующиеся клетки. В то же время в литературе редко встречаются данные по хроническому (в течение нескольких клеточных генераций) воздействию ионизирующего излучения на пролиферирующие клеточные системы и последствиям такого воздействия.

Особую актуальность проблема реакций клеток на длительное облучение приобрела в связи с авариями на объектах ядерной энергетики, таких как химические комбинаты "Маяк" и "Томск-7", Чернобыльская АЭС и в связи с испытаниями ядерного оружия, которые привели к загрязнению биосферы долгоживущими радионуклидами. Активно включаясь в круговорот веществ в биосфере, долгоживущие радионуклиды оказывают длительное радиационное воздействие на человека, растительный и животный мир. Актуальность этого направления исследований возрастает в связи с необходимостью оценки неблагоприятных последствий загрязнения окружающей среды радионуклидами.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось установление закономерностей проявления летальных и адаптационных эффектов хронического воздействия γ -излучения на растущие популяции дрожжевых клеток.



Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести серию исследований по длительному воздействию гамма-излучения на активно растущие популяции дрожжевых клеток разных генотипов;
2. Исследовать возможные пути адаптации популяций к длительному воздействию излучений;
3. Установить влияние мощности дозы облучения на проявление обнаруженных эффектов;
4. Описать полученные результаты с помощью математической модели.

Научная новизна

В работе получен целый ряд новых приоритетных научных данных. Впервые получена динамика роста-гибели клеточной популяции при хроническом облучении в широком диапазоне мощностей доз γ -излучения. Теоретически и экспериментально показано существование пороговой и критической мощностей доз. Показано, что популяция клеток уже через несколько часов после начала воздействия адаптируется к хроническому γ -облучению, что заключается в повышении устойчивости клеток к последующему острому облучению. С увеличением интенсивности хронического облучения в определенном диапазоне мощностей доз γ -излучения резистентность популяции к последующему острому воздействию повышается. Факт существования адаптивной реакции у дрожжевых клеток при длительном облучении также установлен впервые. Предложена математическая модель для качественного и количественного описания экспериментальных данных.

1.4. Практическая значимость

Полученные экспериментальные данные и предложенная модель могут иметь практическую значимость для прикладной радиобиологии, радиоэкологии, медицинской радиологии, а также для прогнозирования последствий длительного облучения. Результаты работы имеют и фундаментальное значение, поскольку дополняют современный уровень представлений о влиянии длительного воздействия ионизирующих

излучений. Математическая модель динамики роста-гибели позволяет оценить величины двух важных мощностей доз хронического облучения: пороговой, не влияющей на рост клеточной популяции, и критической, выше которой существование популяции невозможно. Результаты исследований позволили предложить способ увеличения чувствительности опухолевых клеток.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, практические предложения и рекомендации, заключение и выводы; содержит 125 страниц машинописного текста, 25 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 100 наименований, из них 42 на русском языке.

Апробация

Материалы диссертации доложены на International Workshop "Modern Problem of Radiobiology" (Dubna, 1996), Научной конференции "Хромосомы и радиация", посвященной памяти Н.В.Лучника (Обнинск, 1997), Международном симпозиуме "Проблемы биохимии, космической и радиационной биологии" (Москва, Дубна, 1997), Первой Открытой Научной Конференции Молодых Ученых и Специалистов ОИЯИ (Дубна, 1997), Третьем Съезде по Радиационным Исследованиям (Москва, 1997), Второй Открытой Научной Конференции Молодых Ученых и Специалистов ОИЯИ (Дубна, 1998). Диссертация апробирована на семинаре в Отделении Радиационных и Радиобиологических Исследований ОИЯИ.

На защиту выносятся:

- Результаты исследований динамики роста популяций дрожжевых клеток разных штаммов при различных мощностях доз γ -излучения;
- Результаты экспериментов по изучению адаптивной реакции дрожжевых клеток;
- Математическая модель динамики размножения-гибели при воздействии различными мощностями доз γ -излучения.

Штаммы дрожжей

В опытах использованы изогенные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа и их радиочувствительные мутанты: XS800 (RAD/RAD), XS1898 (rad52/rad52), S288C (RAD), g160/2d (rad52). В скобках указаны только те мутации, которые влияют на радиорезистентность клеток. Полностью генотипы штаммов приведены в работе ¹.

Среды и условия культивирования

Культивирование осуществляли при 30⁰C в суховоздушном термостате на поверхности питательного агар-агара. Облучение осуществляли в полной синтетической жидкой питательной среде в суховоздушном термостате при 30⁰C (если это не оговорено отдельно). Среды использовали стандартные ².

При изучении действия хронического излучения при различных мощностях доз на рост клеточной популяции брали петли трехдневную культуру клеток с косячка и после соответствующего разведения помещали в жидкую питательную среду. При изучении адаптивной реакции в экспериментах использовали популяцию клеток, предварительно культивированных в жидкой питательной среде в течение суток. Концентрация клеток во всех экспериментах по исследованию особенностей адаптивной реакции не превышала 10⁶ кл/мл.

Определение выживаемости и концентрации клеток

Концентрация жизнеспособных клеток при хроническом воздействии определялась через каждые 1-4 ч (в зависимости от мощности дозы гамма-излучения) капельным методом макроколоний, описанным в работе ³. Во всех других экспериментах долю жизнеспособной части популяции определяли стандартными методами макроколоний и микроколоний.

¹Saeki T., Machida I., Nakai S. // Mutation Research, v.73, n.2, p.151-265, 1980

²Захаров И.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984

³И.И.Морозов // Лабораторное дело, 1984

Источники ионизирующих излучений

Облучение осуществляли γ -квантами ⁶⁰Co и ¹³⁷Cs на 5-ти различных отечественных установках, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Источники γ -излучения, использованные в работе

Установка	Источник γ -излучения	Мощности доз, Гр/ч
"Исследователь"	⁶⁰ Co	3000
"ГУБ 20.000"	⁶⁰ Co	25; 150
"ЛУЧ-1"	⁶⁰ Co	1,6; 3; 7; 8; 12; 46
"Свет"	¹³⁷ Cs	5; 12; 18; 1500
"Панорама"	¹³⁷ Cs	10 ⁻²

Методы статистической обработки данных

Обработка данных заключалась в построении кривых, описывающих ту или иную экспериментальную зависимость. Такое построение осуществлялось после расчета оптимальных значений параметров методом наименьших квадратов, если для описания данного эксперимента имелась математическая модель, или графическим методом, в случае отсутствия такой модели. Ошибки среднего определяли по разбросу числа колоний по чашкам. Данный вид ошибок был максимальным из всех прочих.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Математическая модель

Для интерпретации экспериментальных данных по динамике роста-гибели популяции в ходе облучения в диссертации предложена следующая простейшая математическая модель. Динамика поведения популяций в питательной среде при прочих благоприятных условиях (температуре, кислотности, концентрации солей и т.д.) и действии на нее γ -излучения, то есть при одновременном протекании процессов деления,

роста и гибели клеток, описывается уравнением:

$$\frac{dN_s}{dt} = \mu \cdot N_s - \lambda \cdot N_s, \quad (1)$$

где N_s – число жизнеспособных клеток, μ – скорость размножения,

λ – вероятность гибели в единицу времени под действием облучения.

В случае независимости параметров μ и λ от времени для (1) получается довольно простое решение:

$$N_s = N_{s0} \cdot \exp[(\mu - \lambda) \cdot t], \quad (2)$$

где N_{s0} – число жизнеспособных клеток в момент времени $t=0$.

В зависимости от знака разности $(\mu - \lambda)$ будет происходить либо увеличение количества жизнеспособных клеток в популяции, либо гибель по экспоненциальному закону. График зависимости $\ln(N/N_0)$ от t должен представлять собой прямую линию с тангенсом угла наклона равным разности $(\mu - \lambda)$:

$$k = \mu - \lambda. \quad (3)$$

В общем случае k , а значит μ и λ могут зависеть от дозы (D) и мощности дозы (\dot{D}). Предположим, что коэффициенты μ и λ не зависят от t , то есть реализуется случай, описываемый выражением (2). Это означает, что при постоянной мощности дозы нет зависимости μ и λ от дозы, так как время и доза связаны соотношением:

$$D = \dot{D} \cdot t. \quad (4)$$

Дрожжевые клетки, находящиеся в логарифмической стадии роста, характеризуются экспоненциальной кривой инактивации:

$$N_s = N_{s0} \cdot \exp(-D / D_0). \quad (5)$$

Решением уравнения (1) в случае острого облучения является выражение:

$$N_s = N_{s0} \cdot \exp(-\lambda \cdot t). \quad (6)$$

Сравнивая (5) и (6) с учетом (4), имеем:

$$\lambda = \dot{D} / D_0. \quad (7)$$

Окончательное выражение для зависимости числа жизнеспособных клеток от времени:

$$N_s = N_{s0} \cdot \exp\left[\left(\mu - \dot{D} / D_0\right) \cdot t\right]. \quad (8)$$

Число инактивированных клеток можно вычислить по уравнению

$$\frac{dN_i}{dt} = \lambda \cdot N_s, \quad (9)$$

где N_i – число инактивированных клеток,

N_s – число жизнеспособных клеток, описываемых выражением (2).

Решением (9) с учетом (2), (3) и (8) будет:

$$N_i = \frac{\lambda}{k} \cdot N_{s0} \cdot (e^{k \cdot t} - 1) + N_{i0}, \quad (10)$$

где N_{i0} – число инактивированных клеток в момент времени $t=0$.

В наших экспериментах $N_{i0}=0$.

Рассмотрим случай $k > 0$, тогда соотношение жизнеспособных и инактивированных клеток будет:

$$\frac{N_i}{N_s} = \frac{\lambda}{k} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}). \quad (11)$$

При $t \gg 1/k$, когда $e^{k \cdot t} \gg 1$, имеем:

$$\frac{N_i}{N_s} \approx \frac{\lambda}{k} = \frac{\dot{D}}{k \cdot D_0}. \quad (12)$$

В случае $k < 0$, при $t \gg 1/|k|$ получаем:

$$N_i \approx \frac{\lambda}{k} \cdot N_{s0} = \frac{\dot{D}}{k \cdot D_0} \cdot N_{s0}. \quad (13)$$

Данная простейшая модель динамики роста-гибели применима к популяциям клеток, находящимся в логарифмической фазе роста, не ограниченным в ростовых ресурсах и подвергающимся воздействию облучением с постоянной мощностью дозы. Модель позволяет определить значение величины D_0 при хроническом облучении в ходе роста и размножения популяции клеток из соотношения числа жизнеспособных и инактивированных клеток $\left(\frac{N_i}{N_s}\right)$ и наклона кривой роста-гибели ($k = \mu - \lambda$).

Данная модель позволяет оценить значения мощностей дозы: пороговой (мощность дозы, при облучении ниже которой невозможно

определить отличие динамики роста популяции от контрольной) и критической (мощность дозы, при которой скорость роста равна по величине скорости гибели). При воздействии в критической мощности дозы на растущую клеточную популяцию, количество жизнеспособных клеток остается постоянным.

Экспериментальное исследование действия хронического облучения на растущую популяцию клеток

Для изучения хронического действия γ -излучения на растущую популяцию клеток нами были поставлены эксперименты по длительному (до 2 суток) непрерывному облучению изогенных клеток, различающихся по плоидности и радиочувствительности, в условиях наиболее благоприятных для роста и размножения (рис.1 и 2).

На рис.1 представлена зависимость относительной концентрации жизнеспособных клеток от времени при нескольких мощностях доз хронического облучения для дикого диплоидного штамма. Каждую кривую для анализа удобно разделить на несколько частей. Начальный участок, от 0 до 3-10 часов соответствует лаг-периоду. Этот период - переходный между стационарной и логарифмической фазами роста после помещения клеток в жидкую питательную среду. Микроскопические исследования показали, что образование почек у клеток начинается через 2 часа после начала эксперимента, независимо от мощности дозы. Однако, как видно из рис.1, длительность лаг-периода зависит от мощности дозы γ -облучения. Второй участок кривых (линейный) соответствует размножению-гибели клеток популяции во время облучения. Как видно из рис.1, мощности доз хронического облучения вплоть до величины 1,6 Гр/ч не влияют на скорость размножения популяций (нет различий с контролем). При более высоких мощностях доз скорость роста популяции клеток уменьшается, однако, при этом отсутствует зависимость от времени, а значит и от дозы хронического облучения, у всех изученных штаммов. Это означает, что в ходе хронического облучения растущей популяции не происходит накопления повреждений, влияющих на скорость роста (либо происходит, но с очень малой скоростью). Отсутствие зависимости скорости роста популяции от

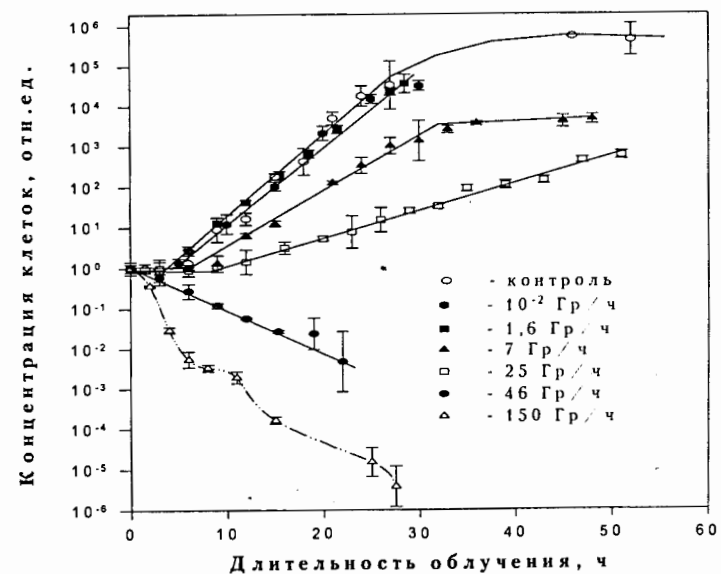


Рис. 1. Динамика роста-гибели популяции клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого диплоидного штамма XS800 в ходе длительного облучения при разных мощностях доз γ -излучения в благоприятных для роста и размножения клеток условиях

дозы при хроническом облучении можно объяснить репарацией всех возникающих повреждений и элиминацией поврежденных клеток. Только репарацией данный факт объяснить не удастся, т.к. в растущей в условиях хронического облучения популяции присутствует доля инактивированных клеток. По-видимому, в данном случае клетка либо полностью восстанавливается от таких повреждений, либо погибает.

При мощностях дозы выше 1,6 Гр/ч с увеличением мощности дозы облучения скорость увеличения числа жизнеспособных клеток в популяции уменьшается, а затем становится отрицательной. Замедление скорости размножения популяции клеток при хроническом облучении по сравнению с контролем может быть связано с гибелью части клеток под действием облучения и с увеличением длительности клеточного цикла. Для выяснения вопроса, с чем связано замедление роста клеточной

популяции при хроническом облучении, было определено значение величины радиорезистентности клеток (D_0) при остром облучении после хронического воздействия при нескольких мощностях доз и по формуле (3) с использованием (7) вычислена скорость размножения клеток при этих мощностях доз (табл. 2). Оказалось, что замедление роста обусловлено как инактивацией клеток, так и увеличением длительности клеточного цикла под действием облучения. Такие же результаты получены из соотношения жизнеспособных и инактивированных клеток.

Таблица 2. Радиорезистентность (D_0) и скорость размножения (μ) клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа в условиях роста популяции при 3-х мощностях доз хронического γ -излучения.

Штамм (генотип)		Мощность дозы хронического облучения			
		контроль	1,6 Гр/ч	3 Гр/ч	8 Гр/ч
XS800 (RAD/RAD)	D_0 , Гр	270	275	335	1500
	μ , ч ⁻¹	0,47	0,44	<0,44	<0,37
S288c (RAD)	D_0 , Гр	40	-	170	225
	μ , ч ⁻¹	0,38	-	-	0,13
XS1898 (rad 52/rad 52)	D_0 , Гр	35	35	-	-
	μ , ч ⁻¹	0,19	0,11	-	-

Кривая роста-гибели популяции клеток при мощности дозы 150 Гр/ч имеет сложный вид. Форма данной кривой говорит о том, что облучение даже при мощности дозы 150 Гр/ч не останавливает полностью продвижения клеток по циклу. В противном случае мы бы получили обычную (экспоненциальную) кривую выживания.

На рис.2 представлена динамика роста-гибели популяции клеток дрожжей дикого гаплоидного штамма в ходе хронического облучения при нескольких мощностях доз. Все особенности, характерные для дикого диплоидного штамма, наблюдаются и у гаплоидного. Однако сравнение наклонов прямолинейных участков кривых на рис.1 и рис.2 при одних и тех же мощностях доз позволяет заключить, что дикий диплоидный

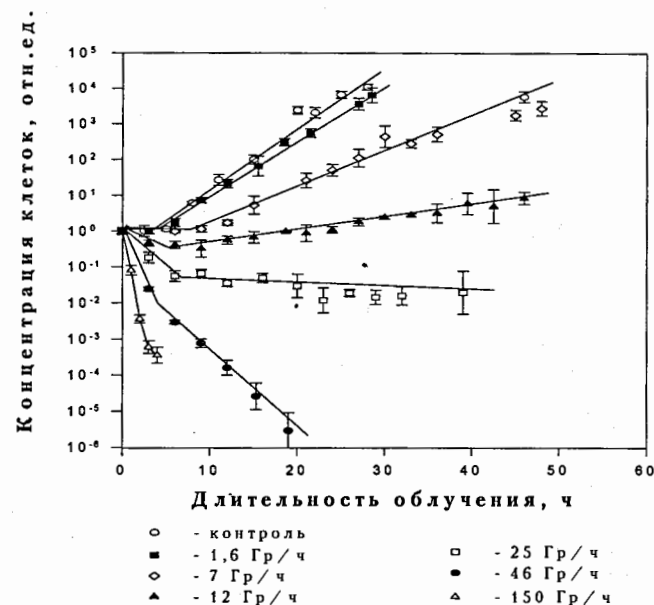


Рис. 2. Динамика роста-гибели популяции клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого гаплоидного штамма S288c в ходе длительного облучения при разных мощностях доз γ -излучения в благоприятных для роста и размножения клеток условиях

штамм является более резистентным по сравнению с диким гаплоидным в данных условиях эксперимента. При одинаковых мощностях доз хронического облучения скорость роста популяции клеток дикого гаплоидного штамма ниже, чем у дикого диплоидного.

В экспериментах на мутантных штаммах дрожжей получены качественно подобные кривые. Однако мутантные клетки оказались еще более чувствительными к облучению по сравнению с клетками дикого гаплоидного штамма, исходя из наклонов прямолинейных участков при равных мощностях доз.

В ходе экспериментов были обнаружены и некоторые другие интересные факты. Например, с увеличением продолжительности облучения повышается гетерогенность популяций по размерам и форме колоний, образующихся после посева облученных клеток (данные не

приведены). Наибольшая индуцированная гетерогенность наблюдается у дикого диплоидного штамма (XS800), наименьшая – у мутантного гаплоидного (g160/2d). Это свидетельствует о том, что, получив повреждение, мутантная клетка либо выживает, либо погибает. Клетки же диких штаммов, получив повреждение, с некоторой вероятностью могут погибнуть, но могут продолжать делиться, передавая в последующие поколения нелетальные повреждения, обуславливающие пониженную вероятность успешного деления.

Адаптивная реакция

Реакция адаптивного ответа проявляется в том, что предварительное воздействие на клетки повреждающего агента в малых дозах, практически не вызывающих повреждений, увеличивает их устойчивость к повторному воздействию этого же, а иногда и другого агента, в больших повреждающих дозах. Основные закономерности проявления адаптивного ответа при облучении исследованы на лимфоцитах человека, лимфоцитах кролика, клетках китайского хомячка линии V-79, клетках костного мозга и сперматоцитах мышей, дрожжах, а также на растительных объектах. Исследования механизма, обуславливающего развитие адаптивного ответа, показали, что в его основе лежит активация синтеза ферментов репарации ДНК⁴⁵⁶.

До настоящего времени адаптивной реакции при длительном облучении на клетках дрожжей обнаружено не было. Для выяснения особенностей адаптивной реакции у дрожжевых клеток нами была проведена серия экспериментов по острому облучению популяции клеток предварительно подвергавшейся действию гамма-излучения на протяжении 16-25 часов. На рис.3 представлены кривые выживаемости популяции клеток дикого диплоидного штамма предварительно облученных в условиях роста при различных мощностях доз γ -излучения.

Из рис.3 видно, что начиная с мощности дозы 1,6 Гр/ч длительного предварительного облучения возрастает устойчивость

⁴Газиев А.И. // Радиобиология, 1986 т.26, вып.4, с.447-452

⁵Volkert M.R. // Environ. Mol. Mutagen., 1988, V.11, № 2, p.241-255

⁶Lindahl T. // Ann. Rev. Biochem., 1988 V.57, p.133-157

популяции к последующему острому облучению. Такое повышение устойчивости можно объяснить индукцией системы репарации. Так как все кривые выживаемости являются экспоненциальными, то повышение устойчивости популяции к острому облучению за счет увеличения доли клеток, находящихся в более резистентной стадии клеточного цикла объяснить не удастся. В противном случае кривая не была бы экспоненциальной, а имела сложный вид (например двухкомпонентная кривая, в случае наличия в популяции части более резистентных клеток, возникших в результате предварительного облучения), и с увеличением мощности дозы изменялась бы не общая резистентность всех клеток (которая связана с наклоном кривой на графике), а доля резистентной части популяции. Повышение радиорезистентности невозможно объяснить за счет отбора облучением более резистентной части популяции или за счет возникновения мутантов по той же самой причине.

Адаптивная реакция обнаружена и на диком гаплоидном штамме. На рис.4 представлены кривые выживаемости дикого гаплоидного штамма после предварительного воздействия γ -излучением на растущую популяцию при нескольких мощностях доз. Из рис.4 видно, что величина адаптивной реакции, также как и в случае с диким диплоидным штаммом, зависит от мощности дозы предварительного облучения. Изменение формы кривой выживаемости после адаптирующего облучения свидетельствует о повышении устойчивости клеток во всех стадиях клеточного цикла.

Адаптивной реакции не наблюдалось для мутантного по системе репарации диплоидного штамма XS1898 (совпадают кривые выживаемости контрольных и облученных клеток). Это прямое подтверждение того, что адаптивный ответ связан с активацией системы репарации, в которой участвует продукт гена RAD 52.

Не наблюдалось увеличения резистентности ни для одного из изученных штаммов к ультрафиолетовому излучению после длительного γ -облучения. В этом случае также не было различий в кривых выживаемости при облучении ультрафиолетовым светом контрольной и длительно облученной γ -излучением популяций.

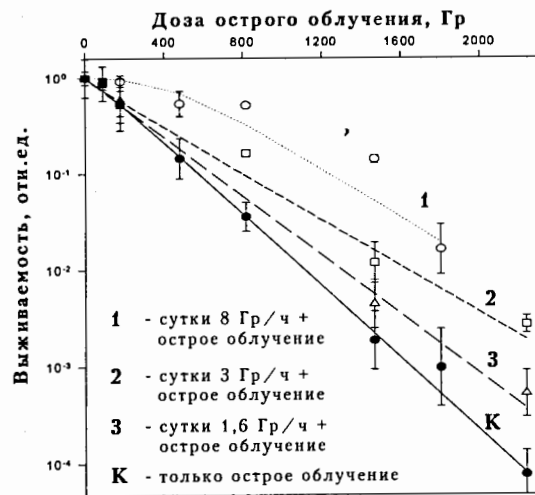


Рис. 3. Выживаемость клеток дрожжей *S. cerevisiae* дикого диплоидного штамма XS800 после последовательного действия адаптирующего (в течение суток) и тестирующего (острого) облучения при трех мощностях доз адаптирующего воздействия

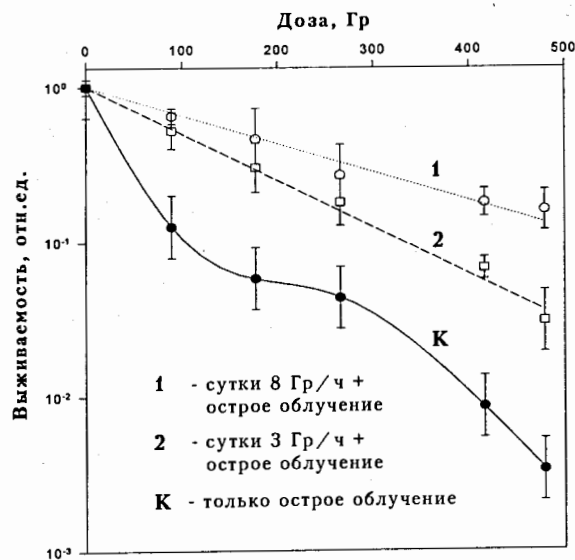


Рис. 4. Выживаемость клеток дрожжей *S. cerevisiae* дикого гаплоидного штамма S288c после последовательного действия адаптирующего (в течение суток) и тестирующего (острого) облучения при двух мощностях доз адаптирующего воздействия

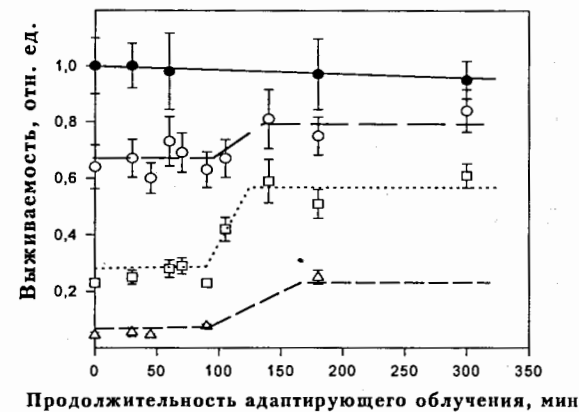


Рис. 5. Выживаемость клеток дрожжей *S. cerevisiae* дикого диплоидного штамма XS800 после последовательного действия адаптирующим и острым облучением на растущую популяцию при мощности дозы адаптирующего воздействия 8 Гр/ч и при 3-х дозах острого γ -излучения :
 ● - воздействие только адаптирующим излучением
 ○ - 210 Гр □ - 550 Гр △ - 890 Гр

Для изучения динамики повышения радиорезистентности при хроническом облучении нами были поставлены эксперименты по следующей схеме: хроническое облучение растущей популяции клеток + острое. На рис.5 представлены результаты экспериментов по определению выживаемости в различные моменты времени после начала хронического облучения при мощности дозы 8 Гр/ч при 3-х дозах острого облучения. Из рис.5 видно, что увеличение радиорезистентности происходит через 110-140 минут после начала облучения. Наши исследования показали, что в период увеличения радиорезистентности не происходит ни замедления, ни задержки в размножении популяции клеток. Изменение длительности клеточного цикла происходит сразу после начала облучения клеток, а, следовательно, связано с повреждением массовых структур клеток. Приведенные на рис.5 данные еще раз подтверждают, что адаптивный ответ у дрожжевых клеток не связан с увеличением доли клеток в более резистентной стадии клеточного цикла, с отбором облучением более резистентной части популяции, с мутациями, возникающими в ходе облучения, а по-видимому, связан с индукцией системы репарации.

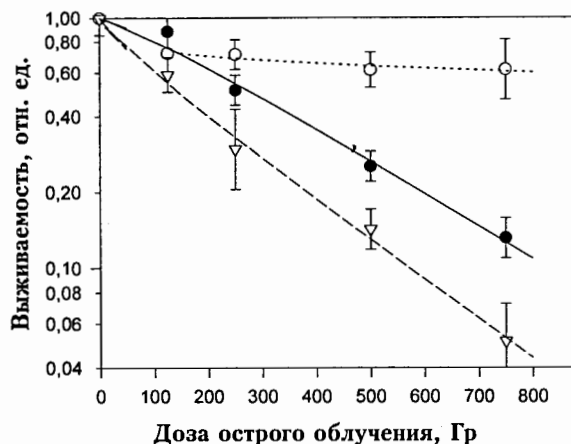


Рис. 6. Кривые выживаемости клеток дрожжей *S. cerevisiae* дикого диплоидного штамма XS800 после культивирования популяции при разных схемах экспериментов:

- - суточное культивирование без облучения при комнатной температуре ($\sim 20^{\circ}$) + острое облучение,
- - суточное облучение при мощности дозы 18 Гр/ч при комнатной температуре ($\sim 20^{\circ}$) + острое облучение,
- ▽ - суточное облучение при мощности дозы 18 Гр/ч при комнатной температуре ($\sim 20^{\circ}$) + дальнейшее культивирование без облучения при температуре 30° в течение 18 часов + острое облучение

На рис.6 представлены кривые выживаемости клеток дикого диплоидного штамма, полученные в различные моменты времени после начала и завершения хронического облучения. Ряд подобных опытов, поставленных при различных условиях культивирования, показал, что адаптивная реакция исчезает через некоторое время при культивировании клеток после прекращения облучения. Данный факт позволяет предположить, что индукция репарации происходит вследствие повреждений, возникающих непосредственно в ходе облучения. Кривая выживаемости клеток, культивированных после прекращения облучения в течение суток, располагается ниже контрольной кривой. Данный факт отражает наличие нерепарируемых сублетальных повреждений в популяции клеток после хронического облучения.

Моделирование адаптивной реакции дрожжевых клеток

Для объяснения полученных результатов по изучению адаптивной реакции предложена следующая математическая модель. Модель основана на ряде предположений:

1. Повреждения возникают в ядре клетки вероятностным образом под действием облучения и элиминируются ферментами репарации. Динамика возникновения-элиминации повреждений в каждой клетке описывается уравнением:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{\dot{D}}{k_1} - k_2 \cdot c \cdot p_n, \quad (14)$$

где p - общее количество повреждений, p_n - количество повреждений, возникших в данном клеточном цикле (репарабельных), \dot{D} - мощность дозы, c - концентрация ферментов репарации, k_i - соответствующие коэффициенты (параметры модели). Слагаемое $\frac{\dot{D}}{k_1}$ описывает возникновение повреждений под действием облучения пропорционально дозе. Слагаемое $k_2 \cdot c \cdot p_n$ описывает восстановление от репарабельных повреждений по механизму фермент-субстратной химической реакции.

2. Увеличение количества повреждений в каждой клетке, возникших в течение данного клеточного цикла, приводит к увеличению концентрации репаративных ферментов. Динамика изменения концентрации репаративных ферментов описывается выражением:

$$\frac{dc}{dt} = k_3 \cdot p_n - k_4 \cdot c + k_5, \quad (15)$$

где p_n - количество повреждений, возникших в течение данного клеточного цикла, c - концентрация ферментов репарации, k_i - параметры модели. Слагаемое $k_3 \cdot p_n$ описывает индукцию синтеза дополнительных ферментов, индуктором при этом являются репарабельные (незакрепленные) повреждения. Слагаемое $k_4 \cdot c$ описывает инактивацию ферментов репарации с течением времени, а k_5 - конститутивный уровень синтеза этих ферментов.

3. Закрепление повреждений происходит при делении клетки, после чего повреждения становятся нерепарабельными.

4. Инактивация клетки происходит при делении в случае, если в клетке на этот момент присутствует более n повреждений ($n > 1$).

Модель прогнозирует увеличение поврежденности клеток до уровня, который зависит от мощности дозы γ -излучения в течение нескольких десятков минут после начала облучения. Из модели также следует, что при последующем хроническом воздействии средняя поврежденность клеток с течением времени увеличивается медленно. Это означает, что в хронически облучаемой популяции быстро устанавливается динамическое равновесие между возникновением и репарацией повреждений. Очевидно, что степень поврежденности популяции, при которой устанавливается равновесие, зависит от мощности дозы, и с ее увеличением уровень "равновесной" поврежденности повышается. Одновременно с увеличением поврежденности клеток популяции (с некоторой задержкой) в них происходит повышение концентрации репаративных ферментов. Концентрация ферментов репарации повышается до определенного уровня, который также зависит от мощности дозы хронического облучения. Повышение концентрации репаративных ферментов обеспечивает большую емкость систем репарации, что проявляется при остром воздействии после хронического в виде адаптивной реакции.

После прекращения хронического облучения количество возникающих повреждений становится равным нулю и, как следует из модели, концентрация репаративных ферментов падает до контрольного уровня. Однако поврежденность клеточной популяции остается близкой к "равновесной". Этим объясняется большая чувствительность к острому облучению популяции клеток размножавшейся сначала в условиях хронического облучения, а затем без облучения.

Таким образом, модель качественно описывает результаты, полученные в эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. В широком диапазоне мощностей доз ионизирующего излучения от 10^{-7} до $3 \cdot 10^3$ Гр/ч получены экспериментальные данные по динамике

роста-гибели дрожжевых клеток различного генотипа, подвергавшихся облучению в условиях, оптимальных для их размножения. При этом выявлены некоторые новые, ранее неизвестные закономерности: отсутствие зависимости скорости роста популяции от дозы и повышение резистентности клеток в ходе хронического облучения.

2. Показано, что с увеличением мощности дозы хронического облучения выше некоторой пороговой происходит замедление роста клеточной популяции вследствие как инактивации клеток, так и замедления продвижения клеток по циклу.
3. Предложена математическая модель, постулирующая отсутствие зависимости скорости деления клеток и радиорезистентности от дозы хронического облучения и описывающая экспериментальные данные по динамике роста клеточной популяции в условиях хронического облучения при различных мощностях доз ионизирующего излучения.
4. Модель позволяет определить величину пороговой мощности дозы, начиная с которой можно выявить замедление роста клеточной популяции, и оценить величину критической мощности дозы, при которой гибель популяции полностью компенсируется ее приростом. Прогнозирование этих мощностей доз может представлять интерес в различных направлениях прикладной радиобиологии.
5. Адаптивная реакция, заключающаяся в повышении радиорезистентности хронически облучавшихся при малых мощностях доз дрожжевых клеток к последующему острому облучению, проявляется в растущей популяции дрожжевых клеток дикого типа. Величина адаптивной реакции, оцениваемая по изменению радиорезистентности (D_0), возрастает при увеличении мощности дозы хронического облучения от 3 до 18 Гр/ч.
6. Адаптивная реакция не связана с увеличением доли клеток в более радиорезистентной стадии клеточного цикла, с отбором в результате облучения более резистентной части популяции, с возникающими в процессе облучения мутациями, а обусловлена индукцией системы репарации, в которой участвует продукт гена RAD 52.

7. Предложена математическая модель адаптивного ответа, которая качественно объясняет экспериментальные данные, прогнозирует у растущей в условиях хронического облучения популяции быстрое установление динамического равновесия между возникновением и элиминацией повреждений, а также увеличение в процессе облучения средней по популяции поврежденности клеток, степень которой зависит от мощности дозы.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Зюзиков Н.А., Петин В.Г. Хроническое действие гамма-излучения на растущую популяцию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при различных мощностях доз. Радиационная биология. Радиоэкология, т.36, вып.6, с.888-894, 1996.
2. Зюзиков Н.А., Петин В.Г. Хроническое действие гамма-излучения на растущие клеточные популяции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при различных мощностях доз. Тезисы докладов международного симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". Москва, Дубна, с.49 (149), ОИЯИ, Дубна, 1997.
3. Петин В.Г., Зюзиков Н.А. Закономерности проявления адаптивной реакции у дрожжевых клеток. Тезисы докладов Третьего съезда по радиационным исследованиям. Т.1, с.161-162, Пущино, 1997.
4. Зюзиков Н.А. Модель адаптивного ответа дрожжевых клеток при длительном воздействии гамма-излучением. Тезисы докладов Третьего съезда по радиационным исследованиям. Т.1, с.150, Пущино, 1997.
5. Зюзиков Н.А., Петин В.Г. Особенности действия хронического гамма-излучения на растущие популяции клеток при различных мощностях доз. Труды международного симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". ОИЯИ, Д19-97-284. Т.2. с.133-144. Дубна, 1997.
6. Зюзиков Н.А. Адаптивный ответ дрожжевых клеток на хроническое гамма-облучение при сублетальных мощностях доз. Труды конференции Первая открытая научная конференция молодых ученых и специалистов ОИЯИ. ОИЯИ, Д-97-376. с.183-186. Дубна, 1997.

Рукопись поступила в издательский отдел
3 апреля 1998 года.