

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

3579 / 82

2/viii-82
P19-82-255

К.Г. Амиртаев, П.Н. Лобачевский,
Лю Гван Сон

ДЕЙСТВИЕ NaCl И KCl
НА ОБЛУЧЕННЫЕ КЛЕТКИ
ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Направлено в журнал "Радиобиология"

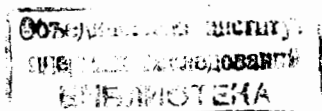
1982

В литературе описаны различные случаи модификации радиобиологического эффекта действием солей. Посев облученных диплоидных дрожжей на питательную среду, содержащую NaCl, приводит к уменьшению их выживаемости по сравнению с посевом на стандартную среду^{/1,2/}. Причины этого могут быть разные. В работе^{/1/} сделан вывод, что усиление летального действия излучения на диплоидные дрожжи при пострадиационной инкубации на солевой среде не связано с подавлением восстановления, а обусловлено уменьшением вероятности деления облученных клеток. Увеличение радиочувствительности при облучении в растворе клеток млекопитающих авторы работ^{/3,4/} объясняют подавлением хлористым натрием репарации радиационных повреждений. Целью данной работы было установить, чем обусловлено модифицирующее действие солей на радиобиологический эффект: подавлением репарационных процессов или какими-то другими причинами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, штамм 28-73-1В, генетические характеристики этих дрожжей и состав питательной среды приведены в^{/5,6/}. Клетки облучали γ -квантами (¹³⁷Cs) в водной суспензии /мощность дозы 0,62 Гр/с/. Для облучения использовали одиночные непочкующиеся клетки в стационарной фазе роста /5-суточная культура на твердой питательной среде/. После облучения клетки выдерживали в растворах солей или в воде, а затем высевали на чашки с агаризованной средой и инкубировали при 30°C для определения выживаемости и изучения распределения по формам инактивации. Подсчет микроколоний проводили через 24 часа после посева клеток, выдержанных в воде, и через 24-48 часов после посева клеток, выдержанных в растворах солей. Количество макроколоний подсчитывали через 5-7 суток после посева.

При учете форм инактивации микроколонии условно разделялись на следующие группы: M_1 - микроколонии, содержащие от 2 до 4 клеток, M_2 - микроколонии, содержащие от 5 до 40-50 клеток, S_M - микроколонии, в которых есть секторы почкующихся клеток, а общее число клеток превышает 50, считается, что эти



микроколонии образуют впоследствии макроколонии^{17/}. Клетки, погибающие на питательной среде без деления /"единички"/, исключались из рассмотрения. Это сделано по следующей причине. При посеве клеток на питательную агаризованную среду после облучения доля "единичек" мала /не превышает 5%/. В случае же выдерживания в растворе соли учет "единичек" затруднен, так как большая часть клеток погибает без деления и затем лигируется на питательной среде.

Как будет показано ниже, отмирание клеток при их выдерживании в солевом растворе, или солевая инактивация, происходит по экспоненциальному закону и описывается уравнением

$$S(t) = S_0 e^{-\beta t}$$

где S_0 - выживаемость при непосредственном посеве; $S(t)$ - выживаемость после выдерживания в растворе соли в течение t часов; β - коэффициент, отражающий скорость отмирания. Под термином "отмирание" будем подразумевать переход в "единички" как жизнеспособных клеток, так и клеток, образующих разные формы инактивации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ макроколоний

Выдерживание в воде необлученных диплоидных дрожжевых клеток при 30°C в течение 10 часов не приводит к изменению их жизнеспособности /рис.1, кривая 1/, а при выдерживании в 8%-ном растворе NaCl происходит их отмирание /рис.1, кривая 2/.

В случае облученных клеток при выдерживании в воде происходит их восстановление от лучевых повреждений, что ведет к увеличению выживаемости /рис.1, кривая 3/, а при выдерживании в растворе NaCl выживаемость клеток уменьшается и скорость отмирания больше, чем в случае необлученных клеток /рис.1, кривая 4/. Как показано в таблице, скорость отмирания облученных клеток в растворе NaCl возрастает с увеличением дозы облучения.

Обнаружено, что скорость отмирания клеток при выдерживании в растворе NaCl зависит также от температуры. Значения скоростей отмирания необлученных и облученных при 380 Гр клеток, выдержанных в 8%-ном растворе NaCl при температурах 4°C, 20°C, 30°C, приведены в таблице. Для необлученных клеток скорость отмирания при повышении температуры от 4°C до 30°C увеличивается всего в два раза, а для клеток, облученных при 380 Гр, - почти в 6 раз.

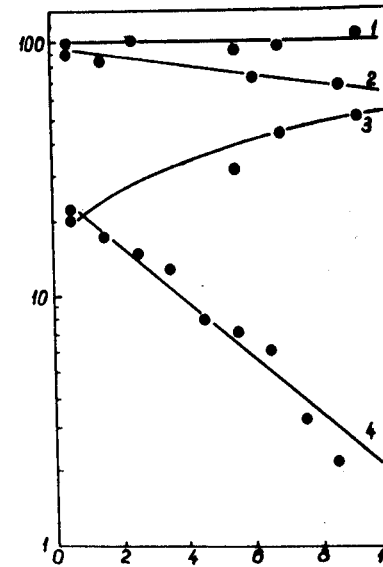


Рис.1. Зависимость жизнеспособности необлученных /кривые 1,2/ и облученных /3,4/ дрожжевых клеток от времени выдерживания при 30°C в воде /1,3/ и 8%-ном растворе NaCl /2,4/. Доза облучения - 760 Гр. Ось абсцисс - время /часы/; ось ординат - выживаемость /проценты/.

Таким образом, облученные клетки отмирают в растворе NaCl быстрее, чем необлученные, и скорость их отмирания быстро увеличивается с повышением дозы облучения и температуры инкубации. Это означает, что за ускоренное отмирание облученных клеток в растворе NaCl ответственны вызванные излучением повреждения.

Таблица

Скорость отмирания /час⁻¹ / необлученных и облученных диплоидных дрожжей при инкубации в 8%-ном растворе NaCl при различных температурах

Температура, °C	Доза облучения, Гр		
	0	380	760
4	0,033	0,043	-
20	0,049	0,089	0,247
30	0,062	0,232	-

На рис.2 приведены кривые отмирания необлученных и облученных дрожжевых клеток при выдерживании в эквимоллярных растворах NaCl /8%/ и KCl /10,2%/. В растворе KCl, как и в растворе NaCl, происходит отмирание клеток, причем облученные при 760 Гр клетки отмирают в 7 раз быстрее, чем необлученные /скорости отмирания 0,027 ч⁻¹ и 0,175 ч⁻¹ соответственно/. Таким образом, отмирание облученных клеток при их выдерживании в растворе KCl также обусловлено индуцированным излучением

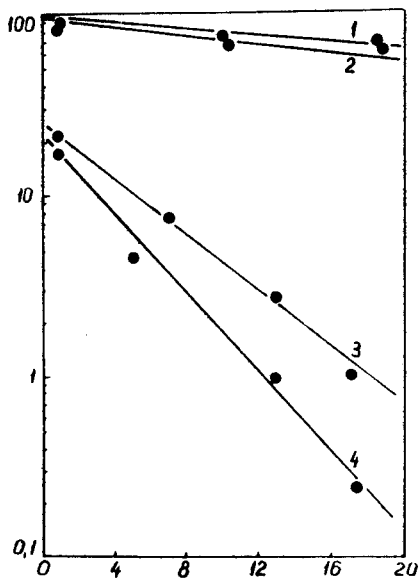


Рис.2. Зависимость жизнеспособности необлученных /кривые 1,2/ и облученных /3,4/ дрожжевых клеток от времени выдерживания в растворе NaCl /2,4/ и KCl /1,3/. Доза облучения - 760 Гр. Температура выдерживания - 30°C. Ось абсцисс - время /часы/; ось ординат - выживаемость /проценты/.

повреждениями. Однако скорость отмирания облученных клеток в растворе KCl $0,175 \text{ ч}^{-1}$ / существенно ниже, чем в растворе NaCl $0,232 \text{ ч}^{-1}$ /.

Анализ микроколоний

Какие же повреждения вызывают ускоренное отмирание облученных клеток в растворах NaCl и KCl: те, которые обуславливают радиационную инактивацию клеток в обычных условиях, или повреждения другого типа?

Считается, что соотношение разных форм инактивации при данной дозе характеризует распределение облученных клеток по числу повреждений, вызывающих радиационную гибель /1/. Если эти же повреждения ответственны и за полевую инактивацию, то ее скорость должна зависеть от числа повреждений в клетке. В таком случае в процессе солевого отмирания должно изменяться соотношение форм инактивации, а кривая отмирания клеток, определенная методом макроколоний, должна представлять собой суперпозицию кривых с разными скоростями отмирания. Конечный наклон этой кривой в полулогарифмическом масштабе, соответствующий скорости отмирания клеток, не имеющих повреждений, должен совпадать в таком случае с наклоном кривой солевой инактивации необлученных клеток. Экстраполяция конечного участка к моменту времени $t = 0$ должна давать долю клеток, не имеющих повреждений, которая, по нашим оценкам, составляет при использованных дозах /380 и 760 Гр/ от 25 до 50% от всех выживших клеток.

Определение влияния NaCl и KCl на эффективность пострадиационного восстановления возможно только путем комбинации методов микро- и макроколоний /7/. Действительно, изменение соотношения форм инактивации в процессе пострадиационного восстановления должно иметь качественно тот же вид, что и в случае более быстрого отмирания клеток с большим числом повреждений. Следовательно, сделать вывод о наличии пострадиационного восстановления и о типе повреждений, ответственных за инактивацию при выдерживании в растворах солей, можно лишь в результате анализа данных о форме и наклоне кривой отмирания и об изменении соотношения форм инактивации, получаемых в одних и тех же экспериментах.

Кривые изменения соотношения форм инактивации и отмирания облученных клеток при выдерживании в воде и в растворах NaCl и KCl приведены на рис.3. При выдерживании в воде /рис.3а/

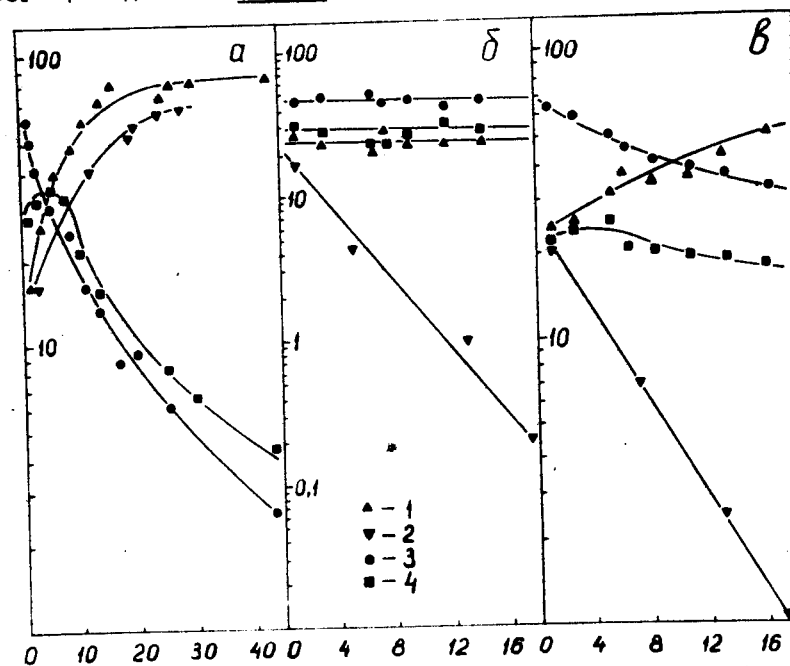


Рис.3. Зависимость соотношения форм инактивации и выживаемости облученных при 760 Гр дрожжевых клеток от времени выдерживания в воде /а/, в 8%-ном растворе NaCl /б/ и в 10,2%-ном растворе KCl /в/. Ось абсцисс - время /часы/; ось ординат - относительное содержание форм инактиваций и выживаемость /проценты/; 1 - выживаемость /по методу микроколоний/; 2 - выживаемость /по методу макроколоний/; 3 - микроколонии, содержащие от 2 до 4 клеток; 4 - микроколонии, содержащие от 5 до 50 клеток.

наблюдается картина, типичная для осуществления пострадиационного восстановления ⁷⁷. При выдерживании в растворе NaCl /рис. 3б/ соотношение форм инактивации не изменяется, а кривая отмирания облученных клеток имеет форму экспоненты с наклоном, в 8 раз превышающим наклон кривой отмирания необлученных клеток. В результате быстрого отмирания облученных клеток в растворе NaCl их выживаемость уменьшается почти в 100 раз; если бы скорость отмирания отдельных клеток зависела от числа имеющихся в них повреждений, конечный наклон кривой отмирания был бы достигнут. Этого, однако, не наблюдается. Следовательно, в растворе отмирание облученных клеток происходит независимо от числа содержащихся в них дискретных повреждений, ответственных за радиационную инактивацию, а пострадиационное восстановление полностью подавлено.

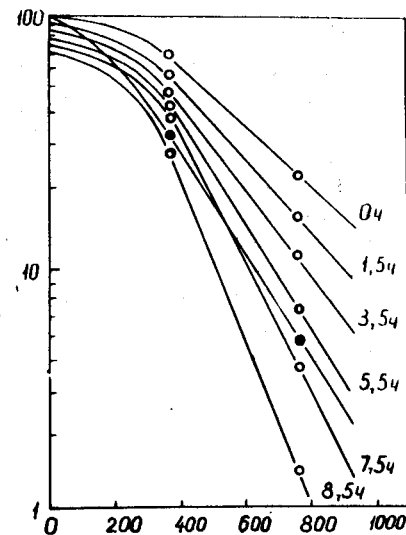
При выдерживании в растворе KCl /рис. 3в/ соотношение форм инактивации изменяется. Направление этого изменения то же, что и при выдерживании в воде /рис. 3а/, но в растворе KCl оно происходит в 2-3 раза медленнее. Кривая отмирания в растворе KCl облученных клеток имеет форму экспоненты с наклоном, в 7 раз превышающим наклон кривой отмирания необлученных клеток. Это означает, что отмирание облученных клеток в растворе KCl также происходит независимо от числа дискретных повреждений, ответственных за радиационную инактивацию, а изменение соотношения форм инактивации обусловлено наличием пострадиационного восстановления. Скорость восстановления от лучевых повреждений при выдерживании в растворе KCl в 2-3 раза меньше, чем при выдерживании в воде.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в растворах NaCl и KCl отмирание облученных клеток происходит независимо от числа повреждений, ответственных за их радиационную инактивацию. Следовательно, солевая инактивация облученных клеток обусловлена повреждениями другого типа. Тот факт, что кривые отмирания в растворах солей имеют форму экспоненты, означает, что эти повреждения распределены по клеткам равномерно. Можно предположить, что за солевую инактивацию облученных клеток ответственны повреждения массовых структур клетки /оболочки, мембран, цитоплазмы/.

Одинаковый характер отмирания облученных клеток в растворах NaCl и KCl позволяет предположить, что в солевой инактивации главную роль играют ионы Cl⁻. Несколько меньшую скорость отмирания в растворе KCl по сравнению с NaCl можно объяснить тем, что в первом случае одновременно происходит пострадиационное восстановление клеток, а во втором оно полностью подавлено.

Рис. 4. Кривые выживания дрожжевых клеток при посеве на среду, содержащую 8% NaCl /темные символы/, и при посеве на обычную питательную среду /светлые символы/ после выдерживания в 8%-ном растворе NaCl в течение разного времени /время выдерживания указано на рисунке/. Ось абсцисс - доза /Гр/; ось ординат - выживаемость /проценты/.



Различное влияние солей NaCl и KCl на пострадиационное восстановление позволяет предположить, что в случае выдерживания в растворе NaCl подавление пострадиационного восстановления обусловлено главным образом действием ионов Na⁺. Ионы K⁺, по-видимому, слабо влияют на процессы восстановления.

На основе сделанных выводов можно следующим образом объяснить модифицирующее действие NaCl при посеве облученных клеток на питательную среду, содержащую эту соль /рис. 4/. Очевидно, что в этом случае клетка не образует макроколонию, если она инактивируется солью до первого деления; после первого деления возникают две клетки и вероятность формирования макроколонию возрастает. Можно думать, что посев облученных клеток на питательную среду, содержащую NaCl, эквивалентен выдерживанию их в растворе NaCl в течение времени, необходимого для осуществления одного-двух делений, с последующим посевом на обыкновенную среду. На рис. 4 приведены кривые выживания клеток, выдержанных в растворе NaCl от 0 до 9 часов, а затем высеянных на обычную питательную среду: видно, что кривая выживания облученных клеток, высеянных на питательную среду, содержащую соль, близка к кривым выживания, соответствующим выдерживанию облученных клеток в растворе NaCl в течение 7-9 ч, т.е. в течение времени, достаточного для осуществления одного-двух делений при последующем посеве на обычную питательную среду.

Авторы благодарят профессора В.И.Корогодина за критические замечания и ценные советы при проведении работы и оформлении полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. Атомиздат, М., 1978.
2. Okasava G. et al. Bull.Agr.Soc.Jap., 1960, vol.24, p.235.
3. Raaphorst B.P., Dewey W.C. Rad.Res., 1979, 77, 2, p.328-340.
4. Utsumi H., Elkind M.M. Rad.Res., 1979, 77, 2, p.346-366.
5. Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Биологические науки, 1971, №9, с.92-94.
6. Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Генетика, 1972, 8,3, с.95-100.
7. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. Атомиздат, М., 1966.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 апреля 1982 года.