

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

35/80

2/III-82

P19-82-256

+

А.В.Глазунов, П.Н.Лобачевский

ПОСТРАДАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ  
У ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК *Pichia pinus*

Направлено в журнал "Радиобиология"

1982

Известно, что диплоидные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, являющихся природными диплоидными, значительно радиорезистентнее гаплоидных и способны к пострадиационному восстановлению, чего не наблюдается у гаплоидных клеток<sup>1-3/</sup>. Полученные искусственным путем диплоидные клетки дрожжей *Pichia pinus*, являющихся природными гаплоидными, оказались чувствительнее изогенных гаплоидных клеток<sup>3/</sup>. Поэтому представляло интерес изучить пострадиационное восстановление таких диплоидных клеток с целью определить, существует ли корреляция между радиорезистентностью и пострадиационным восстановлением.

В работе<sup>4/</sup> не обнаружено возрастания выживаемости облученных  $\gamma$ -квантами диплоидных клеток *Pichia pinus* после выдерживания их в пострадиационный период на непитательном агаре. Однако есть основания считать, что применение данной методики не дает возможности изучить пострадиационное восстановление, так как на непитательном агаре происходит деление клеток, и, следовательно, реализация радиационных повреждений.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В опытах использованы дрожжевые клетки *P. pinus*, штаммы МН4 /гаплоид/ и МН4Д /диплоид/ и *S. cerevisiae*, штамм 28-73-1В /диплоид/, методика получения и генетические особенности этих штаммов описаны в работах<sup>3,5,6/</sup>. Клетки облучали в стационарной фазе роста, которая достигалась культивированием их на минимальной /для *P. pinus*/ и полной /для *S. cerevisiae*/ питательных средах в течение пяти суток. Облучение клеток  $\gamma$ -квантами проводили в суспензии, содержащей  $10^8$  клеток, на установке "Стебель 3А" ( $^{137}\text{Cs}$ ). Мощность поглощенной дозы, определенная ферросульфатным дозиметром, составила  $0,12 \pm 0,01$  Гр/с. Для облучения  $\alpha$ -частицами готовили монослой клеток на поверхности непитательного агара, после облучения клетки ресуспендировали в воде. В качестве источника  $\alpha$ -частиц использовался изотоп  $^{239}\text{Pu}$ . Мощность поглощенной дозы определялась с помощью ионизационной камеры и фотозмульсий и составила  $0,25 \pm 0,06$  Гр/с. Показано, что обе методики облучения, в суспензии и в монослое, дают результаты по радиочувствительности клеток<sup>7/</sup>. Для определения выживаемости клетки высевались на чашки с агаризованной средой YEPD и инкубировались при  $30^\circ\text{C}$ . Подсчет макроколоний проводили через 5-7 суток.

При изучении пострадиационного восстановления облученные клетки выдерживались в растворе  $\beta$ -меркаптоэтанола / $\beta$ -МЭ/ в течение двух суток, так как дальнейшее выдерживание не приводило к увеличению выживаемости, а затем высевались на питательную среду. Применение данной методики необходимо для предупреждения размножения клеток дрожжей *P. pinus*, которые почкуются даже в дистиллированной воде, что приводит к реализации повреждений и к увеличению концентрации клеток в суспензии. Предполагается, что восстанавливающее действие  $\beta$ -МЭ обусловлено только задержкой деления клеток, обеспечивающей время для протекания репарационных процессов<sup>8/</sup>. Использовали концентрации  $\beta$ -МЭ  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  М/л, которые не влияют на жизнеспособность необлученных клеток, но предотвращают их размножение. Пострадиационное восстановление клеток дрожжей *S. cerevisiae* определялось путем выдерживания в растворе  $\beta$ -МЭ и в воде, причем кривые выживания после восстановления в обоих случаях совпадали.

Величина пострадиационного восстановления характеризуется необратимым компонентом<sup>1/</sup>. Так как кривые выживания клеток дрожжей *P. pinus* экспоненциальны, то величина необратимого компонента равна отношению:  $k = D_0'^{-1} / D_0^{-1}$ , где  $D_0^{-1}$  - наклон кривой выживания при непосредственном посеве;  $D_0'^{-1}$  - наклон кривой выживания при полном завершении процесса восстановления.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривые выживания при непосредственном посеве и после восстановления клеток дрожжей *P. pinus* и *S. cerevisiae* при облучении  $\gamma$ -квантами изображены на рис.1 и при облучении  $\alpha$ -частицами - на рис.2. В таблице приведены рассчитанные по экспериментальным данным значения радиочувствительности при непо-

Таблица  
Радиобиологические характеристики дрожжевых клеток различных видов и штаммов

| Вид и штамм          | $\gamma$ -кванты           |                             | $\alpha$ -частицы |                            | ОБЭ   |                             |     |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|-------|-----------------------------|-----|
|                      | $D_0^{-1}, \text{Гр}^{-1}$ | $D_0'^{-1}, \text{Гр}^{-1}$ | $k$               | $D_0^{-1}, \text{Гр}^{-1}$ |       | $D_0'^{-1}, \text{Гр}^{-1}$ | $k$ |
| <i>P. pinus</i>      |                            |                             |                   |                            |       |                             |     |
| МН4Д                 | 0,025                      | 0,018                       | 0,7               | 0,090                      | 0,068 | 0,8                         | 3,5 |
| МН4                  | 0,014                      | 0,014                       | 1                 | 0,047                      | 0,047 | 1                           | 3,4 |
| <i>S. cerevisiae</i> |                            |                             |                   |                            |       |                             |     |
| 28-73-1В             | 0,0054                     | 0,0019                      | 0,35              | 0,024                      | 0,010 | 0,42                        | 4,5 |

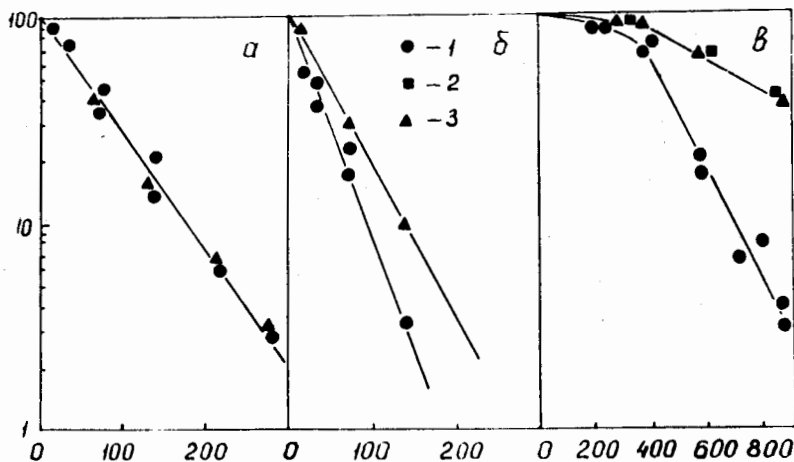


Рис.1. Кривые выживания дрожжевых клеток при облучении  $\gamma$ -квантами: а - *P. pinus*, гаплоид; б - *P. pinus*, диплоид; в - *S. cerevisiae*, диплоид; 1 - непосредственный посев, 2 - посев после 2-суточного восстановления в воде, 3 - посев после 2-суточного восстановления в растворе  $\beta$ -МЭ. По оси абсцисс - доза облучения /Гр/; по оси ординат - выживаемость /%/.

средственном посеве -  $D_0^{-1}$  и после 2-суточного восстановления -  $D'_0^{-1}$ , величины необратимого компонента  $k$  и относительной биологической эффективности /ОБЭ/  $\alpha$ -частиц по отношению к  $\gamma$ -квантам.

У гаплоидных клеток *P. pinus* пострадиационного восстановления не обнаружено, необратимый компонент  $k=1$ . У диплоидных клеток *P. pinus* наблюдается пострадиационное восстановление, но величина его мала по сравнению с пострадиационным восстановлением диплоидных клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Необратимый компонент у диплоидных клеток *P. pinus* составляет в случае облучения  $\gamma$ -квантами 0,7 и в случае облучения  $\alpha$ -частицами - 0,8, в то время как у диплоидных клеток *S. cerevisiae* необратимый компонент при облучении  $\gamma$ -квантами равен 0,35 и при облучении  $\alpha$ -частицами - 0,42. Сравнительно небольшую величину пострадиационного восстановления у диплоида *P. pinus* можно объяснить слабой эффективностью работы репарационной системы. С этой точки зрения становится понятным тот факт, что диплоидные клетки дрожжей *P. pinus* чувствительнее к излучению, чем гаплоидные, поскольку в случае малоэффективной репарационной системы радиочувствительность должна определяться

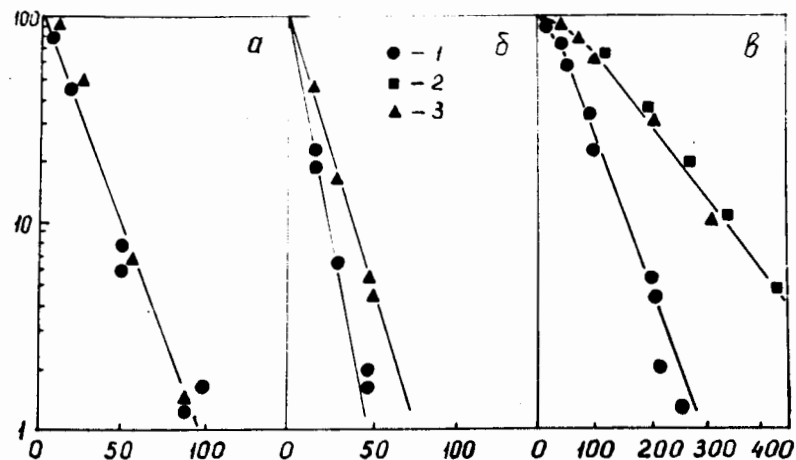


Рис.2. Кривые выживания дрожжевых клеток при облучении  $\alpha$ -частицами: а - *P. pinus*, гаплоид; б - *P. pinus*, диплоид; в - *S. cerevisiae*, диплоид; 1 - непосредственный посев, 2 - посев после 2-суточного восстановления в воде, 3 - посев после 2-суточного восстановления в растворе  $\beta$ -МЭ. По оси абсцисс - доза облучения /Гр/; по оси ординат - выживаемость /%/.

главным образом величиной чувствительного объема. В этом случае отношение радиочувствительностей диплоидных и гаплоидных клеток, близкое к 2 /1,9 для  $\alpha$ -частиц и 1,7 для  $\gamma$ -квантов/, отражает удвоение чувствительного объема у диплоидных клеток по отношению к гаплоидным.

Из сравнения ОБЭ  $\alpha$ -частиц /по отношению к  $\gamma$ -квантам/ следует, что дрожжевые клетки с малоэффективной репарационной системой, *P. pinus*, имеют более низкую величину ОБЭ, чем клетки *S. cerevisiae*, у которых репарация эффективна. Это позволяет сделать предположение, что величина ОБЭ в какой-то мере определяется эффективностью работы репарационной системы.

Авторы благодарят профессора В.И.Корогодина за полезные советы при обсуждении результатов и оформлении работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И. Проблемы пострadiационного восстановления. Атомиздат, М., 1966.
2. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток, Атомиздат, М., 1978.
3. Корогодин В.И. и др. Радиобиология, 1977, ХУП, 2, с. 700-709.
4. Петин В.Г., Матренина В.Л. Радиобиология, 1981, XXI, 4, с. 513-520.
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. Петин В.Г., Кабакова Н.М. Радиобиология, 1977, ХУП, 1, с. 31-36.
8. James A.P., Mary M.Werner. Canadian Journ. of Genetics and Cytology, 1969, XI, 4, p.848-856.