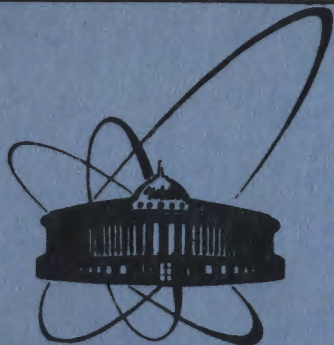


12/11-84



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

1386/84

P19-83-890

А.В.Глазунов, А.В.Борейко

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
ОТ ЛЕТАЛЬНЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПЕРТЕРМИИ

Направлено в журнал "Цитология"

1983

Способность восстанавливаться от летальных последствий воздействия гипертермии установлена для некоторых видов бактерий^{/1,2/}. Для дрожжевых клеток в этом отношении ситуация неясна. Так, например, отмечено, что в стационарной фазе роста культуры эффективность постгипертермического восстановления при выдерживании дрожжевых клеток в непитательной среде незначительна по сравнению с таковой после воздействия ионизирующей радиации^{/3/}. С другой стороны, для гаплоидных дрожжей *Sacch.cervisiae* в логарифмической фазе роста культуры продемонстрировано значительное /на несколько порядков/ увеличение выживаемости при их постгипертермическом выдерживании в непитательной среде при 28 °С в течение нескольких суток^{/4/}. Отметим, что предложенная в последней работе интерпретация данных как восстановления от летальных термopовреждений не является единственной. Действительно, при столь длительном выдерживании в непитательной среде первоначально активно растущей культуры клеток неизбежен переход ее в другое физиологическое состояние, близкое к стационарной фазе роста, что может вызвать эффект увеличения выживаемости. Можно, например, предположить, что в состав питательной среды, на которую производится высеv, входит некий компонент, чувствительность к которому подвергнутых гипертермии клеток существенно выше в логарифмической, нежели в стационарной фазе роста культуры. Тогда по мере выдерживания клеток в непитательной среде их выживаемость будет возрастать, что, однако, не означает восстановления от летальных термopовреждений. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что гаплоидные дрожжи в "поздней" стационарной фазе роста /6 сут. роста на питательной среде/ существенно резистентнее к повышенной температуре /52 °С/ по сравнению с клетками в логарифмической и "ранней" стационарной /2 сут. роста/ фазах роста^{/5/}. Кроме того, нами был проделан следующий опыт. Гаплоидные дрожжи *Sacch. cerevisiae* 28-73-2A^{/8/} в логарифмической фазе роста культуры либо сразу были подвергнуты гипертермической обработке /50 °С/, либо после предварительного выдерживания в воде при 28 °С в течение 72 ч. Как видно из рис.1, в первом варианте опыта /кривая 1/ клетки были значительно более чувствительны к гипертермической обработке, чем во втором /кривая 2/. Следовательно, по мере выдерживания дрожжевых клеток в непитательной среде, их терморезистентность возрастает. Таким образом, вопрос о способности дрожжевых клеток восстанавливаться от летальных термopовреждений, на наш взгляд, остается еще дискуссионным.

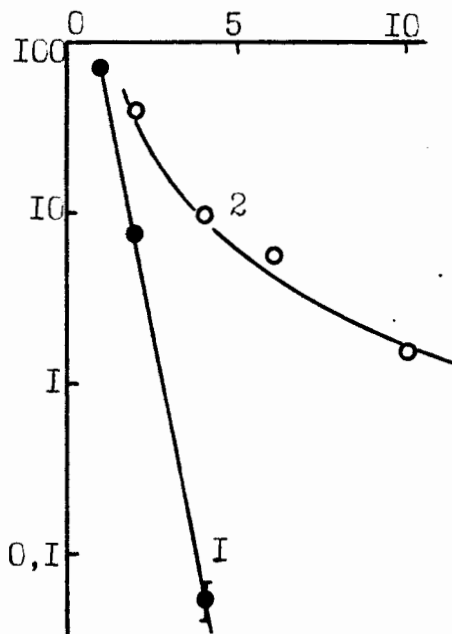


Рис. 1. Выживаемость гаплоидных дрожжей 28-73-2А в зависимости от времени гипертермической обработки /50°C/. 1 — немедленный высев на полноценную среду YEPD клеток, подвергнутых гипертермической обработке в логарифмической фазе роста культуры; 2 — высев после предварительного выдерживания в воде при 28°C в течение трех суток. По оси абсцисс — время, мин.; по оси ординат — выживаемость, %.

В данной работе показано, что выживаемость дрожжей *Sacch. cerevisiae*, подвергнутых гипертермической обработке /50°C/ в стационарной фазе роста культуры, существенно возрастает по мере их выдерживания в воде при 28°C перед посевом на питательную

среду, содержащую повышенные концентрации KCl /1,5 М/. При высеве на стандартную полноценную среду эффект увеличения выживаемости значительно снижен. Процесс практически завершается за 4-6 ч. Данные интерпретируются как восстановление дрожжевых клеток от летальных термopовреждений, которое можно подавить повышенными концентрациями хлористого калия. Как показано ранее /8,7/, хлористый калий подавляет также "быстрое" пострадиационное восстановление жизнеспособности дрожжевых клеток. В связи с этим было интересно сравнить характеристики рассмотренного здесь постгипертермического и "быстрого" пострадиационного восстановления дрожжей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В работе использовались изогенные гаплоидные и диплоидные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* 28-73-2А/гаплоид/и 28-73-1В/диплоид/. Кроме того, использован диплоидный штамм *Sacch. cerevisiae* XS800 (+/+) и радиочувствительный мутант XS1898, гомозиготный по локусу *rad 52*. Генотипы этих штаммов подробно описаны в /8/.

Дрожжи культивировали на твердой питательной среде YEPD/пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 20 г/л, агар-агар 20 г/л/ в течение 5 сут. при 28°C/ стационарная фаза роста культуры/. Для получения логарифмической фазы роста клетки инкубировали

в жидкой питательной среде YEPD при 28°C при слабом перемешивании в течение 15-17 ч. Фракцию одиночных клеток получали путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Клетки несколько раз отмывали от сахарозы путем центрифугирования и ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Перегрев клеточных суспензий, содержащих $1,0 - 2,0 \times 10^6$ клеток/мл, проводили в водяной бане /50±0,1°C/ в пробирках с ватными пробками. Суспензии /объем 1,5 мл/ набирали заданную температуру за 40-60 с. Процесс охлаждения клеточных суспензий в ледяной бане /0 - 2°C/ занимал не более 10 с. Далее суспензии либо выдерживали в течение определенного времени при 28°C, либо сразу разводили водой /при 0-2°C/ и рассевали в чашки Петри на стандартную /YEPD/ или солевую /YEPD + 12%KCl/ среды. Выживаемость определяли методом подсчета макроколоний, образующихся через 5-7 сут. роста при 28°C. Ошибка в определении выживаемости составляла 7-10% и, как правило, не превышала размеров символов на рисунках. Выживаемость дрожжей на солевой среде составляла в зависимости от штамма 60-100% по сравнению с клетками, посеянными на стандартную среду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены данные по выживаемости гаплоидных и диплоидных дрожжей *Sacch. cerevisiae* 28-73-2А и 28-73-1В /8/ после обработки температурой 50°C в течение 15 мин. Видно, что выживаемость гаплоидных и диплоидных клеток слабо зависит от времени выдерживания их в воде при 28°C, если клетки высевать на стандартную питательную среду /кривые 1 и 2/. Так, выживаемость диплоидных клеток возрастает за 5 ч выдерживания с 10 до 15%, а гаплоидных за 10 ч — с 3,2 до 6,0%. Иные результаты дал высев перегретых клеток на солевую среду: здесь по мере выдерживания в воде выживаемость как гаплоидов /кривая 3/, так и диплоидов /кривая 4/ существенно возрастает: с 0,10 до 6,0% за 10 ч выдерживания для гаплоидов и с 0,40 до 16% за 5 ч — для диплоидов. Отметим, что при немедленном высеве подвергнутых гипертермии клеток обоих штаммов их выживаемость на солевой среде на 2 порядка ниже, чем на стандартной, а после 4-6 ч выдерживания при 28°C выживаемости на обеих средах практически совпадают.

Таким образом, здесь мы имеем дело с процессом, аналогичным "быстрому" пострадиационному восстановлению дрожжей /8,7/: с существенным увеличением выживаемости подвергнутых гипертермической обработке клеток по мере их выдерживания в воде при 28°C перед посевом на солевую питательную среду. Представленные данные можно интерпретировать следующим образом. Гипертермия приводит к клеткам повреждения /термоповреждения/, от некоторой части которых дрожжи способны восстанавливаться /в пределах нескольких часов/. Это восстановление можно подавить повышенными

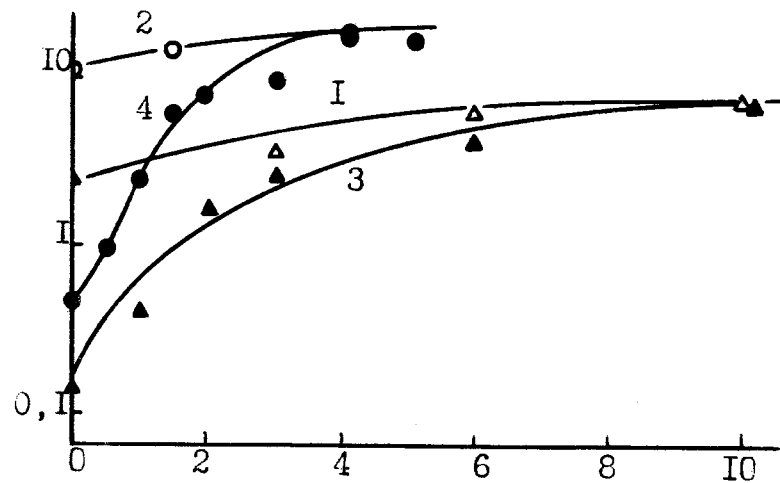


Рис.2. Выживаемость гаплоидных /1,3/ и диплоидных /2,4/ дрожжей 28-73-2А и 28-73-1В, подвергнутых гипертермической обработке /50°C, 15 мин/ в зависимости от времени постгипертермического выдерживания в воде при 28°C перед посевом на стандартную /1,2/ и солевую /3,4/ питательные среды. По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — выживаемость, %.

концентрациями KCl. При выращивании перегретых клеток на стандартной питательной среде /без KCl/ рассматриваемый тип восстановления в значительной степени успевает завершиться уже при немедленном после температурной обработки высеве клеток, поэтому выживаемость несущественно увеличивается в ходе постгипертермического выдерживания в воде при 28°C. Если же подвергнутые гипертермии клетки высевать на солевую среду, которая, по предположению, ингибирует рассматриваемый тип восстановления, их выживаемость существенно снижается по сравнению с таковой для клеток, высеянных на стандартную среду. Постгипертермическое выдерживание клеток в воде при 28°C в течение 4-6 ч позволяет им восстановиться от значительной части термopовреждений, в результате чего выживаемости на стандартной и солевой средах совпадают. Вообще говоря, неясно, являются ли термopовреждения, от которых дрожжи восстанавливаются в процессе выдерживания в воде до посева на солевую среду, "солеспецифическими", т.е. оказывающими летальное действие лишь в присутствии повышенных концентраций KCl, или здесь идет речь о тех же повреждениях, что приводят дрожжевую клетку к гибели и на полноценной среде. Анализ наших данных позволил сделать выбор в пользу последнего предположения. В таблице приведены данные по выживаемости гаплоидных дрожжей 28-73-2А,

Таблица

Выживаемость гаплоидных дрожжей 28-73-2А после воздействия гипертермии /50°C, 10 мин/

№ опыта	Немедленный высеv		Высеv после выдерживания в воде при 28°C в течение 6 ч.	
	Стандартная среда	Солевая среда	Стандартная среда	Солевая среда
I	17 ± 2	0,70 ± 0,05	51 ± 4	45 ± 4
II	26 ± 2	0,58 ± 0,05	59 ± 5	58 ± 5
III	19 ± 2	2,0 ± 0,2	47 ± 4*	36 ± 3*

* Клетки выдерживали в течение 5 ч.

подвергнутых гипертермической обработке /50°C, 10 мин/ при немедленном высеве на стандартную и солевую среды /2 и 3 колонки/ и после 6-часового выдерживания в воде при 28°C /4 и 5 колонки/. Даны результаты трех независимых опытов. Видно, что после 6-часового выдерживания выживаемость клеток на солевой среде во всех трех случаях достоверно превышает выживаемость дрожжей, высеянных на стандартную среду сразу после перегрева. Если бы в данном случае имело место восстановление от "солеспецифических" термopовреждений, то выживаемость на стандартной среде во всех вариантах опыта должна бы быть не меньше соответствующей величины на солевой среде. Таким образом, есть основания полагать, что описанный эффект увеличения выживаемости связан с восстановлением дрожжевых клеток от летальных термopовреждений. Сходство методических приемов, использованных для выявления как постгипертермического восстановления, рассмотренного здесь, так и описанного ранее /9/ "быстрого" пострадиационного восстановления /высев на солевую среду/, делает весьма интересным сравнение этих двух феноменов.

Выдерживание перегретых клеток при 2-3°C в течение нескольких часов в воде не изменяет выживаемости на солевой среде: так, выживаемость диплоидных дрожжей 28-73-1В при немедленном высеве на солевую среду после 15-минутной обработки при 50°C составила 0,29 ± 0,07%, а после выдерживания в воде в течение трех часов при 2-3° и 28°C — 0,23 ± 0,03% и 6,2 ± 0,5% соответственно. Напомним, что пониженная температура существенно подавляет "быстрое" пострадиационное восстановление диплоидных дрожжей /8/. Наряду со сходством этих процессов имеются существенные различия.

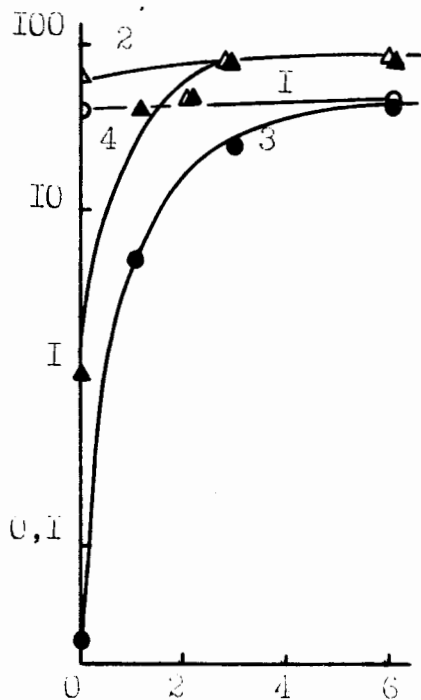


Рис.3. То же, что на рис.2, но для диплоидных дрожжей XS800 /1,3/ и XS1898 /2,4/. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - выживаемость, %.

Во-первых, скорость "быстрого" восстановления в несколько раз превышает соответствующую величину для постгипертермического восстановления. Во-вторых, гаплоидные дрожжи 28-73-2А лишены способности к "быстрому" восстановлению /речь идет о клетках в стационарной фазе роста культуры/^{8/}, тогда как постгипертермическое восстановление у них весьма эффективно /рис.1/. И третье: на рис.3 показана выживаемость диплоидных дрожжей *Sacch.cerevisiae* XS800 /"дикий" тип/ и радиочувствительного мутанта XS1898 /rad 52/rad 52/ в зависимости от времени постгипертермического выдерживания в воде при 28°C перед посевом на стандартную и солевую среду.

Видно, что как штамм "дикого" типа, так и мутант обладают способностью к весьма эффективному постгипертермическому восстановлению. Как было показано в^{9/}, радиочувствительный мутант XS1898 не способен к сколь-нибудь значительному "быстрому" восстановлению. Представленные факты позволяют сделать вывод о том, что субстратом для двух рассмотренных типов восстановления являются разные повреждения. Если в случае пострадиационного восстановления его зависимость от генотипа клетки позволила сделать предположение о том, что в основе этого феномена лежит репарация радиационных повреждений ДНК /например, двунитевых разрывов/, то для постгипертермического восстановления такое предположение выглядит малообоснованным. В пользу этого свидетельствует также тот факт, что как на полноценной среде, так и на солевой дрожжевые клетки /гаплоиды и диплоиды/ в большинстве гибнут в виде "единичек", не давая характерного для лучевого поражения^{10/} распределения по формам инактивации. Можно предположить, что в основе рассматриваемого феномена лежит ресинтез /или восстановление активности/ какого-либо жизненно важного белка. Не исключено, что рассмотренный здесь процесс в той или иной степени определяет терморезистентность дрожжевых клеток. Насколько эффективность постгипертермического восстановления коррелирует с термочувствительностью клеток, покажут дальнейшие

исследования. Представленные же данные показывают, что более резистентные к гипертермической обработке диплоидные штаммы XS800 и XS1898 по сравнению с гаплоидным и диплоидным штаммами 28-73-2А и 28-73-1В обладают способностью к более эффективному постгипертермическому восстановлению /ср.рис.2 и 3/.

Выражаем благодарность профессору В.И.Корогодину за полезные консультации в ходе выполнения данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iandolo J.J., Ordal Z.J. *J.Bacteriol.*, 1966, vol.91, p. 134-142.
2. Mukherjee P., Bhattacharjee S.B. *J.gen.Microbiol.*, 1970, vol.60, p.233-238.
3. Петин В.Г., Жураковская Г.П. В кн.: Радиация и организм. НИИМР АМН СССР, Обнинск, 1978, с.25-27.
4. Schenberg-Frascino A. *Molec.gen.Genet.*, 1972, vol.117, p.239-253.
5. Schenberg-Frascino A., Moustacchi E. *Molec.gen.Genet.*, 1972, vol.115, p.243-257.
6. Глазунов А.В., Капульцевич Ю.Г. *Радиобиология*, 1982, т.22, вып.1, с.62-69.
7. Борейко А.В., Насонова Е.А., Глазунов А.В. *ОИЯИ*, 19-83-318, Лубна, 1983.
8. Saeki T., Mashida J., Nakai S. *Mutat. Res.*, 1980, vol.73, No.2, p.251-263.
9. Глазунов А.В., Капульцевич Ю.Г. *Радиобиология*, 1982, т.22, вып.5, с.633-636.
10. Корогодин В.И. *Проблемы пострадиационного восстановления*. Атомиздат, М., 1966.

Рукопись поступила в издательский отдел
26 декабря 1983 года

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц, Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
D11-80-13	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
D4-80-271	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
D4-80-385.	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
D2-81-543	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
D10,11-81-622	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
D1,2-81-728	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
D17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
D1,2-82-27	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
P18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
D2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
D2,4-83-179	Труды XV Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Дубна, 1982.	4 р. 80 к.
	Труды VIII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Протвино, 1982 /2 тома/	11 р. 40 к.
D11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
D7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
D2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Глазунов А.В., Борейко А.В. P19-83-890
Восстановление дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* от летальных последствий воздействия гипертермии

Выживаемость дрожжевых клеток после гипертермической обработки /50°C/ существенно возрастает по мере выдерживания их в воде при 28°C перед посевом на питательную среду, содержащую -1,5 М КСl. Процесс завершается за 4-6 ч. Данные интерпретируются как восстановление дрожжевых клеток от летальных термоповреждений.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Glazunov A.V., Boreiko A.V. P19-83-890
Recovery of Yeast Cell *Saccharomyces Cerevisiae* from Lethal Action of Hyperthermic Treatment

Yeast cell survival after hyperthermic treatment /50°C/ substantially increases with the duration of holding them in water at 28°C before plating on the nutrient agar containing -1,5 M KCl. The process is completed in 4-6 hr. Experimental data are interpreted as recovery of yeast cells from lethal thermolesions.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградовой