

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-84-283

А.В.Глазунов, А.В.Борейко

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК
ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
ГИПЕРТЕРМИИ И ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1984

Как было показано ранее, дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* обладают способностью к "быстрому" пострадиационному ^{1,2/} и постгипертермическому ^{3/} восстановлению. Эффект в обоих случаях заключается в увеличении выживаемости облученных или подвергнутых гипертермической обработке клеток при их выдерживании в воде при 28 °С перед высевом на твердую питательную среду, содержащую повышенные концентрации NaCl или KCl /1,5M/. Анализ закономерностей двух рассматриваемых типов восстановления привел к заключению, что субстратом для них служат разные повреждения ^{3/}. Однако не исключена возможность того, что за указанные эффекты восстановления жизнеспособности клеток ответственны различные этапы одного и того же пути репарации ДНК. Так, например, гипертермическая обработка может инактивировать ферменты, участвующие в репарации повреждений ДНК, индуцированных ионизирующей радиацией /см., например, ^{4/}/. В этом случае подавление /повышенными концентрациями KCl / постгипертермического восстановления приведет к подавлению репарации ДНК, что может выразиться в неспособности дрожжевых клеток, подвергнутых гипертермической обработке, к "быстрому" пострадиационному восстановлению. Таким образом, несомненный интерес представляет изучение восстановления дрожжевых клеток после комбинированного воздействия гипертермии и радиации.

В настоящей работе представлены данные, касающиеся последовательного воздействия гипертермической обработки /50 °С, 5-10 мин/ и γ -облучения на дрожжевые клетки *Sacch. cerevisiae*. Известно, что последовательное воздействие указанных факторов /вне зависимости от очередности/ на дрожжевые клетки дает в результате аддитивный эффект ^{5/}. Здесь речь идет о последовательной обработке гипертермией и радиацией, после которой клетки высевали на питательный агар, содержащий 1,5 М KCl, либо сразу после воздействия /пострадиационное и постгипертермическое восстановление подавлено/, либо после выдерживания в воде при 28 °С /то есть в условиях, благоприятствующих рассматриваемым типам восстановления/.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гаплоидный S288C и диплоидный XS 800 штаммы дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Генотипы этих штаммов подробно описаны ^{6/}.

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 суток при 28 °С / стационарная фаза роста культуры/. Особенности подготовки клеток к облучению и гипертермической обработке описаны в ^{1,3/}.

Пробирки, содержавшие ~ 1,5 мл клеточной суспензии / $\sim 10^8$ клеток/мл/, помещали в водяную баню /50,0 \pm 0,1 °С /, прогревали, после чего охлаждали во льду до 3-4 °С в течение 10-15 с и облучали γ -квантами ¹³⁷Cs /мощность дозы ~35 Гр/мин/ при 0 °С. В других опытах клетки облучали при 0 °С, затем сразу же подвергали гипертермической обработке и охлаждали в ледяной бане. Температура суспензии достигала 50 °С в течение 40-60 с. Таким образом, учитывая, что пониженная температура ингибирует как "быстрое" пострадиационное ^{1/}, так и постгипертермическое восстановление ^{3/}, можно предполагать, что во время последовательной обработки клеток гипертермией и радиацией оба указанных процесса в значительной степени подавлены.

Далее клеточные суспензии либо выдерживали в течение определенного времени при 28 °С, либо сразу разводили водой /при 0-2 °С / и рассевали в чашки Петри на стандартную (YEPD) или солевую /YEPD, содержащую 1,5 М KCl / среды. Выживаемость определяли методом подсчета макроколоний, вырастающих через 5-8 суток при 28 °С. Выживаемость контроля на солевой среде составляла 70-100% по сравнению с клетками, высеянными на стандартную среду. Ошибка в определении выживаемости обычно не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены данные одного из типичных опытов по последовательному воздействию гипертермии /50 °С / и γ -облучения на диплоидные дрожжи штамма XS 800. Отметим, что, несмотря на количественные расхождения от опыта к опыту, качественные закономерности неизменно воспроизводились. Клетки высевали на стандартную /ПС/ и солевую /СС/ среды. Пусть выживаемость клеток после гипертермической обработки равна S_t , а после облучения - S_γ ; тогда при независимом, аддитивном действии обоих инактивирующих факторов выживаемость после комбинированного воздействия составит $S_{\gamma t} = S_{t\gamma} = S_t S_\gamma$ /здесь порядок индексов "t" и "γ" означает последовательность обработки гипертермией и радиацией/. Как видно из таблицы 1, при немедленном высеве последовательно облученных и подвергнутых гипертермической обработке клеток как на стандартную, так и солевую среды имеет место синергическое взаимодействие используемых инактивирующих факторов, то есть $S_{\gamma t} = S_{t\gamma} < S_t S_\gamma$, хотя в случае полноценной среды эффект синергизма слабо выражен.

Если обработанные гипертермией и радиацией клетки выдержать в течение 6 час. в воде при 28 °С / чтобы завершилось "быстрое" пострадиационное, а также постгипертермическое восстановление/,

Таблица 1
Последовательное воздействие гипертермии и радиации на диплоидные дрожжи штамма XS 800

| Режим обработки | Немедленный высев | | | | | | Выдерживание в воде при 28°C в течение 6 час | | | | | | K |
|---------------------|-------------------|---------------|--------|-----------------------------------|----|----------|--|---------|---------|-----------------------------------|--------|--------|-------|
| | Выживаемость, % | | | S _t S _y , % | | | Выживаемость, % | | | S _t S _y , % | | | |
| | ПС | СС | ИС | ПС | СС | ИС | ПС | СС | ИС | ПС | СС | ИС | |
| γ15 | 50 ± 5 | 3,8 ± 0,4 | - | - | - | 59 ± 5 | 33 ± 3 | - | - | - | - | - | - |
| t5 | 94 ± 9 | II ± I | - | - | - | - | 70 ± 6 | - | - | - | - | - | - |
| t5 γ15 [#] | - | 0,14 ± 0,01 | 47 ± 8 | 0,42 ± 0,11 | - | 30 ± 2 | 14 ± I | - | - | - | - | 23 ± 5 | ≤ 0,5 |
| γ15 t5 | 27 ± 3 | 0,11 ± 0,01 | 47 ± 8 | 0,42 ± 0,11 | - | 29 ± 2 | 10 ± I | - | - | - | - | 23 ± 5 | ≤ 0,6 |
| t7 | 90 ± 8 | 8,2 ± 0,8 | - | - | - | 100 ± 10 | 53 ± 5 | - | - | - | - | - | - |
| t7 γ15 | 13 ± I | 0,056 ± 0,006 | 45 ± 8 | 0,31 ± 0,07 | - | 19 ± I | II ± I | 60 ± 10 | 60 ± 10 | I7 ± 4 | I7 ± 4 | I7 ± 4 | ≤ 0,8 |
| γ15 t7 | I9 ± I | 0,031 ± 0,003 | 45 ± 8 | 0,31 ± 0,07 | - | - | 2,9 ± 0,3 | 60 ± 10 | 60 ± 10 | I7 ± 4 | I7 ± 4 | I7 ± 4 | ≤ 0,8 |

*t5, γ15 - последовательная обработка гипертермией /50°C, 5 мин/ и радиацией /15 мин при мощности дозы 35 Гр/мин/.

их выживаемость на солевой среде существенно возрастает в отличие от соответствующей величины на стандартной среде, которая практически не изменяется. Кроме того, для всех использованных режимов обработки /см. таблицу 1/ в результате выдерживания в воде синергическое взаимодействие гипертермии и радиации

уменьшается, то есть $\frac{\hat{S}_{ty}}{\hat{S}_t \hat{S}_y} > \frac{S_{ty}}{S_t S_y}$ и $\frac{\hat{S}_{yt}}{\hat{S}_t \hat{S}_y} > \frac{S_{yt}}{S_t S_y}$, где \hat{S}_{ty} , \hat{S}_t , \hat{S}_y - соответствующие значения выживаемостей на солевой среде после 6-часового выдерживания в воде.

Представленные данные допускают следующую интерпретацию. В результате воздействия гипертермии и радиации наряду с радиационными и термическими повреждениями в клетке возникают дополнительные летальные повреждения, обусловленные взаимодействием используемых инактивирующих факторов /будем для краткости называть их t_y -повреждениями/. Это приводит к тому, что $S_{ty} = S_{yt} < S_t S_y$. Заметим, что сходная точка зрения для случая одновременного воздействия гипертермии и радиации высказана в работе /7/. Выдерживание клеток после комбинированного воздействия рассматриваемых факторов в воде при 28°C позволяет им элиминировать часть лучевых и термических повреждений / в результате пострadiационного и постгипертермического восстановления/, а кроме того, и некоторую долю t_y -повреждений.

Действительно, предположим, что все указанные типы повреждений равноценны /в смысле их летального действия/ и независимо снижают общую выживаемость клетки. Тогда для выживаемости клеток на солевой среде после комбинированного воздействия гипертермии и радиации S_{ty} /для S_{yt} рассмотрение аналогично/ допустимо представление в виде $S_{ty} = S_t S_y r_{ty}$, где r_{ty} - вероятность того, что клетка не погибнет, имея соответствующее данному режиму обработки гипертермией и радиацией число t_y -повреждений /здесь мы не задаемся характером зависимости r_{ty} от доз облучения и температурной обработки/. В случае независимого восстановления в результате выдерживания клеток в воде при 28°C имеем $\hat{S}_{ty} = \hat{S}_t \hat{S}_y \hat{r}_{ty}$, где \hat{S}_t , \hat{S}_y , \hat{r}_{ty} - соответствующие величины после восстановления. Причем $\hat{S}_t < S_t$ и $\hat{S}_y < S_y$ за счет постгипертермического и пострadiационного восстановления. Если же, кроме того, имеет место и восстановление от t_y -повреждений, то $\hat{r}_{ty} > r_{ty}$, или $\frac{\hat{S}_{ty}}{\hat{S}_t \hat{S}_y} > \frac{S_{ty}}{S_t S_y}$, что и наблюдали в опыте /см. таблицу 1/.

Эффективность этого "восстановления" можно оценить, предполагая, что $r_{ty} = e^{-a t_y}$, где a_{ty} - среднее число t_y -повреждений на клетку при данной дозе облучения и температурной обработки. Тогда в результате выдерживания в воде при 28°C $\hat{r}_{ty} = e^{-k t_y a_{ty}}$, где k_{ty} - доля t_y -повреждений, оставшаяся после восстановления /аналог необратимой части лучевого поражения /8/. В силу этого имеем

$$k_{ty} \leq \frac{\ln(\hat{s}_t \hat{s}_y / \hat{s}_{ty})}{\ln(s_t s_y / s_{ty})}$$

Знак " \leq " появился из-за того, что, вообще говоря, эффективность пострадиационного и постгипертермического восстановления после комбинированного воздействия гипертермии и радиации может быть меньше соответствующих величин после действия каждого фактора в отдельности. Оценки эффективности "восстановления" клеток от t_y -повреждений приведены в последней колонке таблицы 1: существенно, что во всех случаях $k < 1$.

В следующих экспериментах изучали зависимость выживаемости диплоидных дрожжей штамма XS 800, последовательно обработанных гипертермией /50°C, 5 мин/ и радиацией /350 Гр/, от времени выдерживания клеток в воде при 28°C перед высевом на солевую среду /рисунок 1/. Видно, что скорость увеличения выживаемости практически не зависит от последовательности обработки гипертермией и радиацией /кривые 2 и 3/ и приблизительно совпадает с таковой для клеток, подвергнутых только гипертермической обработке /кр. 1/. Все три процесса завершаются за 3-6 час. Напомним, что "быстрое" пострадиационное восстановление завершается за 30-40 мин. /на рисунке не показано/. Однако не исключено, что скорость восстановления от лучевых повреждений в условиях комбинированного с гипертермической обработкой воздействия радиации может изменяться.

На рис.2 показана зависимость величин r_{ty} и r_{yt} /см. выше/ от времени выдерживания клеток в воде при 28°C. Эти величины рассчитаны на основании данных опыта, результаты которого приведены на рис.1. Как видно, r_{ty} и r_{yt} возрастают по мере увеличения времени выдерживания клеток в воде, что может характеризовать кинетику процесса "восстановления" дрожжевых клеток от t_y -повреждений.

На основании представленных данных трудно судить о влиянии гипертермической обработки /облучения/ на эффективность пострадиационного /постгипертермического/ восстановления, так как во время выдерживания в воде обработанных двумя рассматриваемыми инактивирующими агентами клеток идут оба процесса. Однако в рамках развитых выше представлений можно сделать некоторые простейшие оценки. Пусть в результате выдерживания последовательно обработанных гипертермией и радиацией клеток в воде при 28°C их выживаемость на солевой среде составляет $\hat{s}_{ty} = \hat{s}_t \hat{s}_y r_{ty}$, где $\hat{s}_t \leq \hat{s}_t$ и $\hat{s}_y \leq \hat{s}_y$ из-за возможного подавления постгипертермического и пострадиационного восстановления данными дозами гипертермической обработки и облучения соответственно. Тогда $\hat{s}_{ty} \leq \hat{s}_t \hat{s}_y$ и $\hat{s}_{ty} \leq \hat{s}_t \hat{s}_y$. Отсюда легко получить следующие оценки для эффективности пострадиационного и постгипертермического восстановления /определяемой в данном случае как \hat{s}_y / s_y и \hat{s}_t / s_t соответственно/ после комбинированного воздействия рассматриваемых факторов:

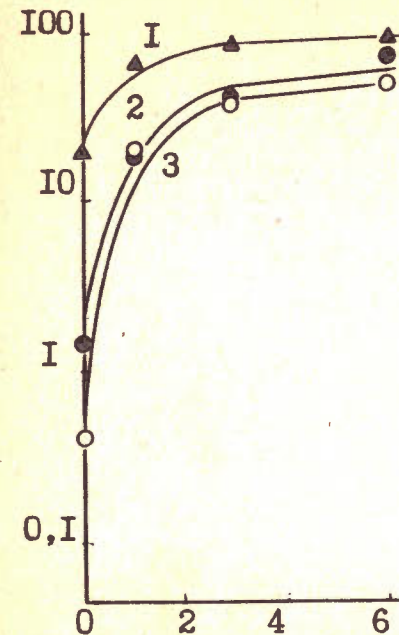
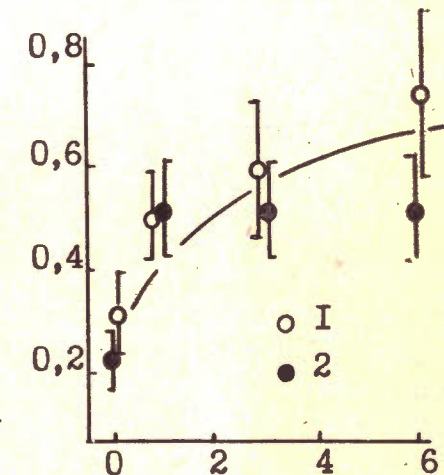


Рис.1. Выживаемость диплоидных дрожжей *Sacch. cerevisiae* XS800, подвергнутых последовательной обработке гипертермией /50°C, 5 мин/ и радиацией /350 Гр/ в зависимости от времени выдерживания в воде при 28°C перед высевом на солевую среду. 1 - гипертермическая обработка клеток; 2 - последовательная обработка гипертермией и радиацией; 3 - последовательная обработка радиацией и гипертермией. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - выживаемость, %.

Рис.2. Зависимость величин r_{ty} /1/ и r_{yt} /2/ от времени выдерживания обработанных гипертермией и радиацией клеток в воде при 28°C. Пояснения в тексте. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - относительные единицы.



$$l_1 = \frac{\hat{s}_{ty}}{s_y \hat{s}_t} \leq \frac{\bar{s}_y}{s_y} \leq \frac{\hat{s}_y}{s_y} = m_1, \quad l_2 = \frac{\hat{s}_{ty}}{s_t \hat{s}_y} \leq \frac{\bar{s}_t}{s_t} \leq \frac{\hat{s}_t}{s_t} = m_2,$$

где l_1, l_2, m_1, m_2 есть величины, непосредственно определяемые в эксперименте.

В таблице 2 приведены значения l_1 и m_1, l_2 и m_2 , определенные в независимых опытах с диплоидными дрожжами штамма XS 800. Видно, что если и имеется влияние одного фактора /при использо-

Таблица 2

Оценка эффективности пострадиационного и постгипертермического восстановления после комбинированного воздействия гипертермии и радиации. Пояснения в тексте

| № опыта | Режим обработки | $l_1 \leq \tilde{S}_t / S_t \leq m_1$ | | $l_2 \leq \tilde{S}_t / S_t \leq m_2$ | |
|---------|-----------------|---------------------------------------|------------|---------------------------------------|-----------|
| | | l_1 | m_1 | l_2 | m_2 |
| I | $t 5 \mu 15^*$ | 5 ± 1 | 10 ± 2 | 3 ± 1 | 6 ± 2 |
| | $\mu 15 t 5$ | 4 ± 1 | 10 ± 2 | 3 ± 1 | 6 ± 2 |
| | $t 7 \mu 15$ | 6 ± 1 | 10 ± 2 | 4 ± 1 | 6 ± 2 |
| II | $t 5 \mu 10$ | 3 ± 1 | 4 ± 1 | 4 ± 1 | 5 ± 1 |
| | $\mu 10 t 5$ | $2,0 \pm 0,5$ | 4 ± 1 | 3 ± 1 | 5 ± 1 |
| III | $t 5 \mu 15$ | 3 ± 1 | 5 ± 1 | 6 ± 2 | 9 ± 2 |
| | $\mu 15 t 5$ | 3 ± 1 | 5 ± 1 | 6 ± 2 | 9 ± 2 |

* см. таблицу 1

ванных режимах обработки/ на эффективность восстановления от повреждений, индуцированных другим, то оно не может быть значительным.

Представляют определенный интерес опыты по комбинированному воздействию гипертермии и радиации на гаплоидные дрожжи штамма S288C, которые не способны к "быстрому" пострадиационному /1/,^{3/} но обладают эффективным постгипертермическим восстановлением. Данные одного из типичных опытов приведены в таблице 3: в целом они аналогичны результатам экспериментов с диплоидными клетками /таблица 1/. Отметим, что в результате 6-часового выдерживания клеток в воде при 28°C синергическое взаимодействие гипертермии и радиации практически полностью исчезает, то есть $S_{ty} = S_{yt} < S_y S_t$, но $\tilde{S}_{ty} = \tilde{S}_{yt} = \tilde{S}_t \tilde{S}_y$. Это означает что γ -облучение /по крайней мере, в дозах до 140 Гр/ не снижает эффективности постгипертермического восстановления гаплоидных дрожжей. Так как в данном случае $\tilde{S}_{ty} = \tilde{S}_{yt} = \tilde{S}_t \tilde{S}_y$, то $k = 0$ /см. выше/, поэтому в качестве показателя эффективности "восстановления" от γ -повреждений взята величина \tilde{r}_{ty} / r_{ty} /или \tilde{r}_{yt} / r_{yt} /. Как видно из таблицы 3, для всех режимов обработки $\tilde{r} / r > 1$.

В заключение заметим, что предложенная здесь интерпретация полученных данных не является единственной: возможны и другие причины наблюдаемого уменьшения синергического взаимодействия гипертермии и радиации в результате выдерживания клеток в воде

Таблица 3
Последовательное воздействие гипертермии и радиации на гаплоидные дрожжи штамма S288C

| Режим обработки | Немедленный вывоз | | | | Выдерживание в воде при 28°C в течение 6 час | | | | \tilde{r} / r |
|------------------|-------------------|-----------------|---------------|---------------|--|------------|---------------|------------|-----------------|
| | Выживаемость, % | | $S_t S_y$, % | | Выживаемость, % | | $S_t S_y$, % | | |
| | ПС | СС | ПС | СС | ПС | СС | ПС | СС | |
| $\gamma 4$ | 19 ± 1 | 13 ± 2 | - | - | 20 ± 2 | 20 ± 2 | - | - | - |
| $t 5$ | 100 ± 10 | 21 ± 2 | - | - | 73 ± 7 | 71 ± 7 | - | - | - |
| $t 5 \gamma 4^*$ | 19 ± 2 | $1,6 \pm 0,2$ | 19 ± 3 | $2,7 \pm 0,5$ | 14 ± 1 | 19 ± 2 | 15 ± 2 | 14 ± 2 | $2,3 \pm 0,7$ |
| $\gamma 4 t 5$ | 23 ± 2 | $1,8 \pm 0,2$ | 19 ± 3 | $2,7 \pm 0,5$ | 21 ± 2 | 17 ± 2 | 15 ± 2 | 14 ± 3 | $1,8 \pm 0,5$ |
| $t 7$ | 63 ± 6 | $8,3 \pm 0,8$ | - | - | 71 ± 7 | 62 ± 6 | - | - | - |
| $t 7 \gamma 4$ | 21 ± 2 | $0,55 \pm 0,06$ | 12 ± 2 | $1,7 \pm 0,4$ | 14 ± 1 | 13 ± 1 | 14 ± 2 | 12 ± 2 | 3 ± 1 |
| $\gamma 4 t 7$ | 19 ± 2 | $0,68 \pm 0,07$ | 12 ± 2 | $1,7 \pm 0,4$ | 18 ± 2 | 16 ± 2 | 14 ± 2 | 12 ± 2 | 3 ± 1 |

* см. таблицу 1

при 28°C. Можно, например, представить себе, что KCl лишь частично подавляет пострадиационное и/или постгипертермическое восстановление, а в результате воздействия одного из факторов эффективность фиксации на солевой среде поврежденных, индуцированных другим, возрастает. Это приводит к тому, что $S_{ty} < S_{t_1} S_{t_2}$. Выдерживание в воде перед высевом на солевую среду позволяет клеткам восстановиться, что даст в результате уменьшение синергического взаимодействия инактивирующих факторов. Однако следует отметить, что гипотезе об усилении гипертермией подавления пострадиационного восстановления на солевой среде противоречит наличие синергического взаимодействия рассматриваемых инактивирующих агентов при немедленном высеве гаплоидных дрожжей /см. таблицу 3/, которые неспособны восстанавливаться от летальных лучевых повреждений.

Авторы благодарят профессора В.И.Корогодина за обсуждение представленных здесь результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глазунов А.В., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т. 22, вып. 1, с. 62-69.
2. Борейко А.В., Насонова Е.А., Глазунов А.В. ОИЯИ, Р9-83-318, Дубна, 1983.
3. Глазунов А.В., Борейко А.В. ОИЯИ, 19-83-890, Дубна, 1983.
4. Spiro I.J., Denman D.L., Dewey W.C. Int.J.Radiat.Biol., 1982, v. 41, No 6, p. 603-614.
5. Петин В.Г., Бердникова И.П. Радиобиология, 1979, т. 19, вып. 6, с. 910-912.
6. Saeki T., Mashida I., Nakai S. Mutat.Res., 1980, vol. 72, No 2, p. 251-265.
7. Комаров В.П., Петин В.Г. В кн.: 1 Всесоюзный биофизический съезд /тез.докл./; М., 1982, т. 2, с. 269-270.
8. Корогодина В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. Атомиздат, М., 1966.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 апреля 1984 года.

Борейко А.В., Глазунов А.В.

Р9-84-283

Восстановление дрожжевых клеток после комбинированного воздействия гипертермии и ионизирующей радиации

В работе изучали влияние последовательного воздействия гипертермической обработки /50 °С/ и γ -облучения на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что дрожжевые клетки способны восстанавливаться от летальных последствий комбинированного воздействия гипертермии и радиации. Эффективность восстановления не зависит от последовательности обработки. Гипертермическая обработка до или после облучения увеличивает радиочувствительность дрожжей при высеве клеток на питательный агар, содержащий 1,5М KCl. Синергический эффект уменьшается при выдерживании клеток в воде при 28 °С перед высевом. Произведены оценки влияния одного фактора на эффективность восстановления от повреждений, индуцированных другим.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой