

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

P19-84-667

П.Н.Лобачевский, С.Ю.Замолодчикова

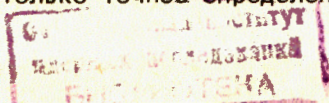
ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДРОЖЖЕЙ  
ПОСЛЕ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ:  
ЭФФЕКТ ДОРАСТАНИЯ  
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ  
НЕПОВРЕЖДЕННЫХ КЛЕТОК

Направлено в журнал "Радиобиология"

1984



Экспоненциальная форма кривых выживания гаплоидных дрожжевых клеток позволяет предположить, что для репродуктивной гибели гаплоидной клетки достаточно одного инактивирующего повреждения. Способность выжить, т.е. сформировать макроколонию на твердой питательной среде после воздействия ионизирующим излучением, сохраняют только те гаплоидные клетки, которые не имеют ни одного такого повреждения. Предполагается, что инактивирующими повреждениями являются двунитевые разрывы ДНК <sup>1,2/</sup>. Эти предположения основаны и на том, что выход двунитевых разрывов ДНК при действии на дрожжевые клетки редкоионизирующим излучением <sup>2/</sup> хорошо согласуется с начальным наклоном кривой выживания гаплоидных клеток <sup>3/</sup>. Диплоидные дрожжевые клетки в большинстве случаев значительно резистентнее гаплоидных, и их кривая выживания сигмоидна, т.е. имеет плечо <sup>3-5/</sup>. Существуют различные интерпретации сигмоидной формы кривой выживания диплоидных клеток <sup>6-8/</sup>. Однако наиболее обоснованным мы считаем предположение о том, что формировать макроколонии на твердой питательной среде способны даже те диплоидные клетки, которые имеют повреждения, каждое из которых является летальным для гаплоидной клетки <sup>4/</sup>. Это предположение основано на том, что часть облученных диплоидных клеток формирует макроколонии значительно меньших размеров и в более поздние сроки, чем необлученные клетки, в то время как необлученные и облученные гаплоидные клетки образуют колонии одновременно и одинаковых размеров. Это явление задержки формирования колоний из части облученных диплоидных клеток принято называть эффектом дорастания. Наличие эффекта дорастания у диплоидных клеток и отсутствие его у гаплоидных указывает на то, что способность формировать макроколонию не является адекватным критерием для сравнения радиочувствительности гаплоидных и диплоидных клеток. Изучение закономерностей эффекта дорастания подтверждает непротиворечивость вышеупомянутого предположения относительно сигмоидной формы кривой выживания диплоидных клеток <sup>4/</sup>. Математическая модель, предложенная в <sup>4/</sup>, позволяет оценить как величину эффекта дорастания, так и ту долю облученных диплоидных клеток, которые не имеют повреждений и формируют колонии одновременно с необлученными /назовем эту часть клеток "нулевым классом"/. Однако величина нулевого класса, определенная стандартным методом /путем подсчета макроколоний/, существенно больше, чем рассчитано по модели, а эффект дорастания, соответственно, меньше расчетного. Возможно, это обусловлено тем, что при стандартном методе определения нулевого класса многие дорастающие колонии принимают за колонии нулевого класса. Для проверки этого предположения необходим метод, позволяющий точно определить величину нулевого класса. Вместе с тем только точное определение величины нулево-





го класса позволяет сравнить радиочувствительность диплоидных и гаплоидных клеток по одному критерию, т.е. по нулевому классу, дает возможность оценить вклад эффекта дорастания в резистентность и форму кривой выживания диплоидных клеток и изучить роль других модифицирующих радиобиологический эффект процессов в радиочувствительности диплоидных клеток, определяемой по нулевому классу.

С учетом вышеизложенного целью настоящей работы являлось экспериментальное определение величины нулевого класса при воздействии ионизирующих излучений на гаплоидные и диплоидные клетки дрожжей.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, диплоидный штамм XS800 и гаплоидный штамм 28-73 2A<sup>9-11</sup>. Подготовку культуры к облучению и определение выживаемости проводили по стандартной методике, описанной ранее<sup>12</sup>. Клетки облучали у-квантами <sup>137</sup>Cs на установке с мощностью дозы -0,6 Гр/с. При культивировании клеток в жидкой питательной среде /ПС/ использовали среду следующего состава:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2 г/л,  $\text{MgSO}_4$  - 1 г/л,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1 г/л, глюкоза - 20 г/л, дрожжевой автолизат - 20 мл/л<sup>13</sup>. Концентрацию клеток при культивировании в жидкой ПС определяли фотометрическим методом / $\lambda = 530$  нм/. Предварительно определили зависимость оптической плотности суспензии от концентрации клеток, одновременно измеряя оптическую плотность и подсчитывая концентрацию клеток в камере Горяева. Для изучения формирования микроколоний из отдельных клеток в первые 10-15 ч после посева применяли метод микроколоний<sup>5</sup>.

#### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Культивирование облученных клеток дрожжей в жидкой ПС имеет существенное отличие от культивирования на чашках с твердой ПС. На твердой ПС каждая колония клеток выходит на стационарную фазу роста независимо от других колоний /если количество колоний на чашке не очень велико:  $50 \pm 100$ /. Поэтому выход на стационарную фазу роста одних колоний не препятствует росту других. В жидкой ПС на стационарную фазу роста выходит вся популяция в целом. Схематически это отличие показано на рис.1. На рис.1а изображены кривые роста на чашке с твердой ПС нормальных /кривая 1/ и дорастающих /кривая 2/ колоний. Видно, что после момента времени  $t_0$  /~2 сут/, когда нормальные колонии уже сформировались, рост дорастающих колоний продолжается, и через 4-5 сут они имеют размер нормальных колоний или несколько меньший.

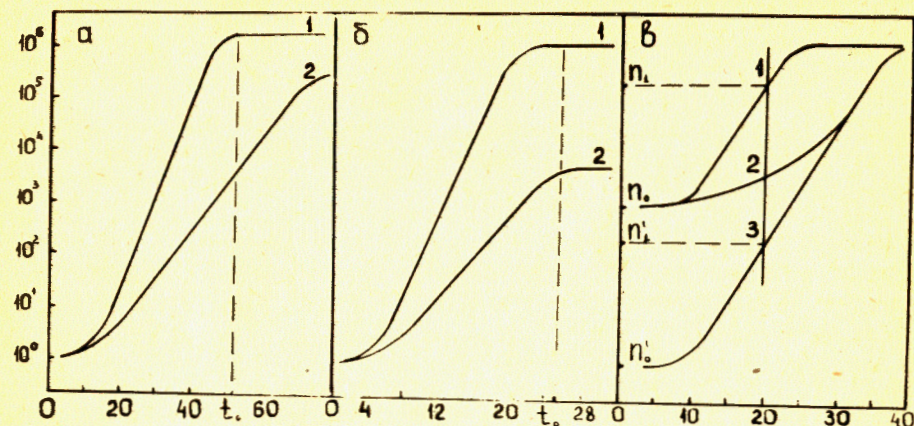


Рис.1. Схематические кривые роста популяций дрожжевых клеток: а - на твердой питательной среде, нормальной /1/ и дорастающей /2/ колоний; б - в жидкой питательной среде, нормальной /1/ и дорастающей /2/ субпопуляций; в - в жидкой питательной среде, популяции из необлученных клеток /1/ и популяции из облученных клеток /2/, экстраполяция /3/ экспоненциального участка кривой 2 подобно кривой 1. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат: а - количество клеток в колонии, б, в - концентрация клеток /кл./мл/.

На рис.1б изображены схематические кривые роста в одной пробирке с жидкой ПС субпопуляций из нормальных клеток /кривая 1/ и из клеток, которые образовали бы на твердой ПС дорастающие колонии /кривая 2/ /кривые нормированы на одну клетку/. Видно, что к моменту времени, когда субпопуляция из нормальных клеток выходит на стационарную фазу роста, прекращается рост и дорастающей субпопуляции, поэтому вклад ее в общую концентрацию клеток при определенных условиях достаточно мал. Этот вклад зависит от отношения скорости роста двух субпопуляций и от отношения конечной и начальной концентраций клеток в пробирке. Так, при уменьшении скорости роста дорастающей субпопуляции всего в 1,5 раза по сравнению с нормальной ее вклад в общую концентрацию составит ~1% при изменении концентрации в процессе роста на 6 порядков /например, от  $10^2$  до  $10^8$  кл/мл/.

Казалось бы, проводя подсчет макроколоний на чашке с твердой ПС в момент времени  $t_0$  /рис.1а/, можно различить нормальные и дорастающие колонии, поскольку последние имеют значительно меньшие размеры. Однако на практике размеры и время выхода колоний на стационарную фазу роста значительно варьируют, что и приводит к трудностям в точном определении эффекта дорастания.



При культивировании же клеток в жидкой ПС этого разброса нет, поскольку мы имеем дело с усредненной кривой роста и можем оценить вклад в эту кривую дорастающей субпопуляции.

Таким образом, выращиваемую в жидкой ПС культуру из облученных клеток можно разделить на две субпопуляции: нормальную /вырастающую из клеток, не имеющих повреждений/ и дорастающую /происходящую из клеток, имеющих после облучения повреждения/.

Вклад последней в концентрацию клеток в культуре уменьшается в процессе роста. Критерием малой величины этого вклада может являться равенство скоростей роста популяций из облученных и необлученных клеток.

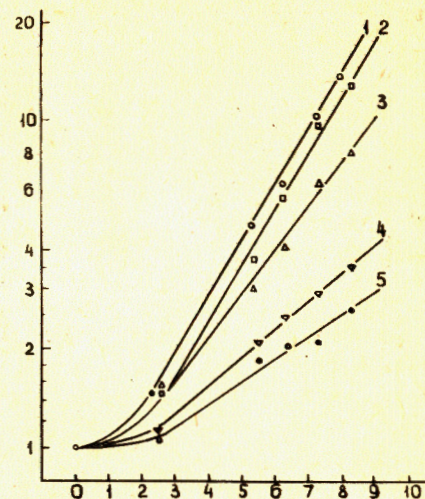
Для того чтобы найти долю клеток, не имеющих повреждений после облучения, необходимо сравнить кривые роста культур из необлученных /кривая 1, рис.1в/ и облученных /кривая 2, рис.1в/ клеток при одинаковых начальных концентрациях. /Приведенные кривые схематические/. Экспоненциальный участок кривой 2 необходимо экстраполировать к моменту времени  $t=0$  подобно кривой 1 /кривая 3/. Отношение  $n'_0/n_0$  отражает величину нулевого класса. Такую экстраполяцию можно заменить линейной экстраполяцией экспоненциальных участков кривых 1 и 2 на любую вертикальную прямую. В этом случае величина нулевого класса определяется отношением  $n'_1/n_1$ . Используя такой подход, в эксперименте достаточно определить только экспоненциальные участки кривых 1 и 2, близкие к стационарной фазе роста.

Однако все сказанное выше справедливо, если субпопуляция, происходящая из клеток нулевого класса, имеет такую же скорость роста и такую же лаг-фазу, что и популяция из необлученных клеток. Это предположение не очевидно, поскольку клетки нулевого класса могут иметь другие повреждения, не являющиеся летальными ни для диплоидных, ни для гаплоидных клеток, но либо уменьшающие скорость роста, либо увеличивающие лаг-фазу. Если это предположение справедливо, то в опытах среди облученных клеток мы должны обнаружить клетки, которые формируют колонии с такой же скоростью, что и необлученные клетки. Для проверки этого предположения нами было изучено формирование микроколоний на твердой ПС из отдельных необлученных и облученных клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.2 представлена зависимость среднего количества клеток в колонии от времени. Усреднение в разные моменты времени проведено по одним и тем же микроколониам. Кривая 1 представляет собой зависимость от времени среднего количества клеток в колонии, образованной необлученной клеткой. Усреднение произведено по 8 колониам. Для кривых 2 и 3 усреднение произведено по 6 и 12 колониам, выросшим из облученных клеток и имеющих максимальное среди всех колоний количество клеток к концу наблю-

Рис.2. Зависимость среднего количества клеток в колонии от времени. 1 - для колоний, сформированных необлученными клетками, 2-5 - для колоний, сформированных облученными клетками. Усреднение проведено: 2 - по 6, 3 - по 12 колониам, имеющим максимальное количество клеток в колонии, 4 - по всем наблюдаемым 66 колониам, 5 - по 60 колониам, имеющим минимальное количество клеток в колонии. По оси абсцисс - время /ч/; по оси ординат - количество клеток в колонии.



дения. Кривая 4 - усреднение по всем 66 колониам из облученных клеток, кривая 5 - усреднение по 60 колониам из облученных клеток, имеющим минимальное среди всех колоний количество клеток в колонии. Видно, что кривая 2 не отличается по скорости роста от кривой 1. Следовательно, можно сделать вывод о том, что в облученной популяции имеются клетки, которые формируют колонии с такой же скоростью, что и необлученные. Кривая 3 идет существенно ниже кривых 1 и 2, следовательно, среди 12 колоний, по которым произведено усреднение для этой кривой, есть дорастающие колонии. Поэтому можно оценить, что количество клеток, формирующих колонии с такой же скоростью, что и необлученные клетки, находится в интервале от 6 до 12, а их доля составляет соответственно 9-18%. Как будет видно ниже /рис.3/, нулевой класс при дозе, использованной в этом эксперименте /315 Гр/, составляет ~10%. Однако имеет место некоторая задержка роста для облученных, но не имеющих повреждений, клеток по сравнению с необлученными, поскольку кривая 2 несколько сдвинута вправо относительно кривой 1. Результаты опытов показывают /данные не опубликованы/, что эта задержка уменьшается при выдерживании облученных клеток в препятствующих росту условиях перед их посевом на питательную среду. В наших опытах эта задержка приводила к занижению величины нулевого класса не более чем на 10%.

На рис.3 изображены дозовые зависимости доли клеток нулевого класса и кривые выживания, определенные по стандартной методике. Величина нулевого класса рассчитывалась описанным в теоретической части методом на основании экспериментальных кривых роста культур из необлученных и облученных клеток. Следовало ожидать, что для гаплоидных клеток выживаемость совпадет с долей клеток нулевого класса. Однако в опыте доля клеток нулевого класса не-



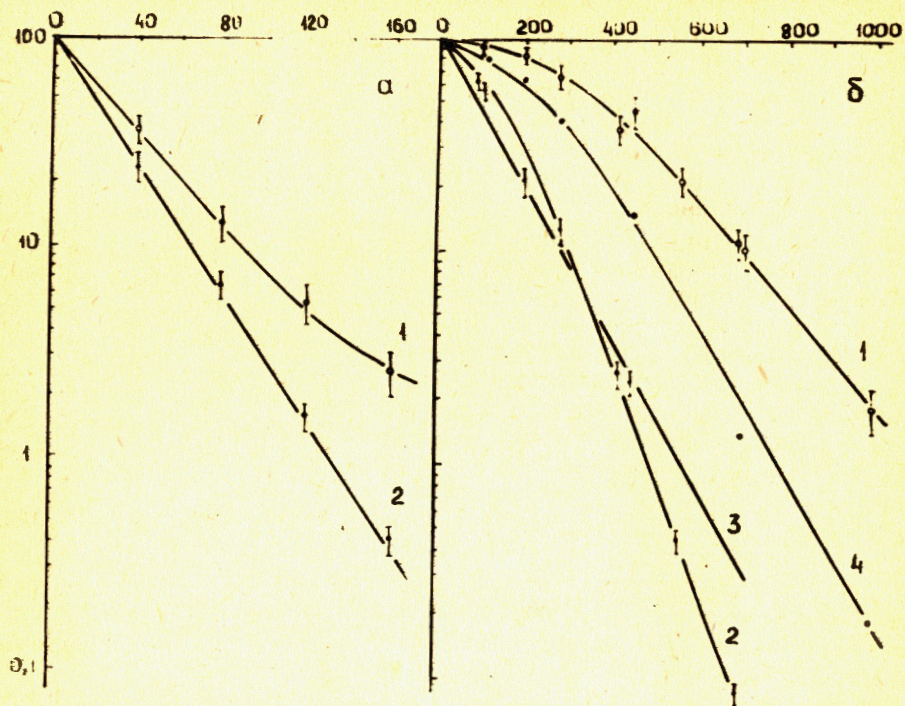


Рис. 3. Дозовые зависимости выживаемости /1/ и доли клеток нулевого класса /2/ для гаплоидных /а/ и диплоидных /б/ дрожжей; 4 - выживаемость без дорастания, определенная по стандартной методике, 3 - расчетная зависимость доли клеток нулевого класса. По оси абсцисс - доза облучения /Гр/; по оси ординат - выживаемость %/.

сколько меньше, чем выживаемость. Это может быть следствием того, что кривая выживания гаплоидных клеток имеет резистентный участок, обусловленный почкующимися клетками<sup>14/</sup>. Этот резистентный участок приводит к отклонению формы кривой выживания от экспоненциальной. Учитывая то, что выживаемость существенно отличается от нулевого класса именно на этом участке, и то, что дозовая зависимость доли клеток нулевого класса экспоненциальна, можно предположить, что почкующиеся клетки образуют дорастающие колонии.

Для диплоидного штамма дозовая зависимость доли клеток нулевого класса существенно отличается от выживаемости и представляет собой не экспоненциальную, как ожидалось, а сигмоидную кривую. Этот факт свидетельствует об отклонении распределения клеток по количеству повреждений от пуассоновского распределения со средним значением, пропорциональным дозе. Можно предположить, что это отклонение является следствием работы систем репарации

повреждений. В количественном же отношении величина нулевого класса удовлетворительно согласуется с расчетной величиной<sup>14/</sup>.

На рис. 3б приведена также кривая выживания диплоидных клеток без дорастания, определенная по стандартной методике. Как видно из рисунка, вклад клеток нулевого класса в выживаемость очень мал. При выживаемости 10% доля клеток нулевого класса от всех клеток, сформировавших колонии, составляет всего 1%, остальные 99% клеток формируют дорастающие колонии. При определении же по стандартной методике эти величины составили бы 20 и 80% соответственно.

Представленные результаты показывают, что высокая резистентность диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными в значительной мере обусловлена эффектом дорастания. При сравнении по нулевому классу диплоидные клетки оказываются в 3 раза резистентнее гаплоидных, а не на порядок, как в случае сравнения по выживаемости. Величины радиочувствительности гаплоидных и диплоидных клеток, рассчитанные по наклону /для диплоидных - по конечному наклону/ дозовой зависимости доли клеток нулевого класса, равны соответственно  $0,034 \text{ Гр}^{-1}$  и  $0,012 \text{ Гр}^{-1}$ . Эта разница радиочувствительности диплоидных и гаплоидных клеток, остающаяся после исключения эффекта дорастания, обусловлена, видимо, способностью диплоидных клеток к "быстрому" восстановлению<sup>15/</sup>.

Таким образом, для гаплоидных клеток дрожжей величина нулевого класса практически совпадает с выживаемостью, существенное различие между этими величинами имеется только на резистентном участке кривой выживания. Для диплоидных клеток дозовая зависимость доли клеток нулевого класса представляет собой сигмоидную кривую и количественно хорошо согласуется с расчетными данными. Эффект дорастания вносит значительный вклад в высокую резистентность диплоидных клеток. Но даже при сравнении по нулевому классу диплоидные клетки существенно резистентнее гаплоидных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ho K.S.Y. Mutation Research, 1975, vol.30, p.327-334.
2. Frankenberg-Schwager M. et al. Radiat.Res., 1980, vol.82, p.498-510.
3. Корогодина В.И. и др. Радиобиология, 1977, т. XVII, вып. 5, с. 700-710.
4. Капутьцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. Атомиздат, М., 1978.
5. Корогодина В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. Атомиздат, М., 1966.
6. Wideroe R. Kerntechnik, 1977, vol.19, p.237-240.
7. Amirtaev K.G. et al. JINR, E19-82-792, Dubna, 1982.
8. Frankenberg-Schwager M. et al. Int.Journ.Radiat.Biol., 1980, vol.37, p.207-213.



9. Saeki T., Mashida I., Nakai S. Mutation Res., 1980, vol.73, p.251-265.
10. Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Генетика, 1972, т.8, №3, с.95-100.
11. Наумов Г.И., Толсторуков И.И. Биологические науки, 1971, №9, с.92-94.
12. Глазунов А.В., Лобачевский П.Н., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т.ХХII, вып.1, с.54-61.
13. Захаров И.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. "Наука", Л., 1976, с.95.
14. Beam S.A. et al. Archives of Biochem. and Biophys., 1954, vol.49, p.110-122.
15. Глазунов А.В., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т.ХХII, вып.1, с.62-69.

Рукопись поступила в издательский отдел  
8 октября 1984 года.

Лобачевский П.Н., Замолодчикова С.Ю. P19-84-667  
Выживаемость дрожжей после  $\gamma$ -облучения:  
эффект дорастания и определение доли неповрежденных клеток

Предложена методика, позволяющая экспериментально определить относительное количество клеток, не имеющих инактивирующих повреждений, и величину эффекта дорастания после воздействия ионизирующим излучением на гаплоидные и диплоидные клетки дрожжей.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод М.И.Потапова

Lobachevskij P.N., Zamolodchikova S.Yu. P19-84-667  
Yeast Survival after  $\gamma$ -Irradiation:  
The Effect of the Delayed Appearance of Colonies  
and Determination of Relative Part of Undamaged Cells

An experimental method to determine both a relative number of cells without lethal damages and the effect of the delayed appearance of colonies of haploid and diploid yeast exposed to ionizing radiation is proposed.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984