

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

P19-87-470

П.Н.Лобачевский, Е.А.Красавин, А.П.Череватенко

**ЗАВИСИМОСТЬ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК ОТ ЛПЭ ИЗЛУЧЕНИЙ**

Эксперименты на гаплоидных клетках

Направлено в журнал "Радиобиология"

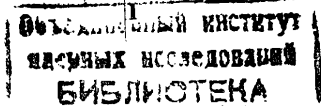
1987

Известно, что закономерности летального действия на клетки ионизирующих излучений, различающихся по линейной передаче энергии (ЛПЭ), обусловлены как физическими характеристиками излучений, так и рядом факторов биологической природы ^{1,2/}. Одним из важнейших биологических факторов является репарация индуцированных радиацией повреждений. Ранее нами была предложена математическая модель, учитывающая влияние репарационных процессов на характер зависимости радиочувствительности гаплоидных дрожжей от ЛПЭ ^{3/}. Поскольку молекулярные механизмы репарации радиационных повреждений у дрожжей в достаточной мере еще не изучены, эффективность неспецифической (общей для гаплоидных и диплоидных клеток) репарации оценивалась нами на основе сравнения кривых выживания гаплоидных клеток дикого типа и радиочувствительного мутанта. Предложенный математический подход допускает два альтернативных варианта интерпретации зависимости радиочувствительности гаплоидных дрожжей от ЛПЭ. Первый основывается на предположении о том, что эффективность неспецифической репарации с увеличением ЛПЭ излучений по тем или иным причинам уменьшается. Это означает, что репарация непосредственно влияет на характер указанной зависимости. Второй вариант предполагает, что неспецифическая репарация эффективна в равной степени при действии излучений с разной ЛПЭ. В таком случае процессы репарации не играют непосредственной роли в формировании характера зависимости радиочувствительности от ЛПЭ, который в данном случае определяется только физическим и геометрическим факторами.

Целью настоящей работы являлась экспериментальная проверка следствий развитых модельных представлений на основе анализа радиочувствительности гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа и радиочувствительного мутанта при действии излучений, различающихся по ЛПЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы следующие гаплоидные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* : S288 с - штамм дикого типа и Xs1828-3с, несущий мутацию повышенной радиочувствительности rad6 ^{4/}.



Клетки облучали следующими видами ионизирующих излучений: γ -лучами ^{137}Cs , α -частицами ^{239}Pu , ускоренными ионами гелия и углерода. Облучение клеток ускоренными ионами гелия и углерода проводили на ускорителе У-200 ОИЯИ. Для этих целей была специально создана установка с комплексом электронно-физической аппаратуры /5/. Основные физические характеристики использованных излучений приведены в табл. I.

Таблица I. Физические характеристики излучений

Вид излучения	Энергия МэВ/н	ЛПЭ кэВ/мкм	Мощность дозы Гр/с
γ -кванты*	0,667	0,3	0,58
^4He	8,5	21 ± 1	3-20
^4He	4	38 ± 3	3-20
^4He	2	$64 \pm \frac{8}{6}$	3-20
α -частицы**	5,495	110	0,35
^{12}C	7,5	$205 \pm \frac{6}{3}$	3-20
^{12}C	4	$330 \pm \frac{60}{25}$	3-20
^{12}C	3	$410 \pm \frac{90}{30}$	3-20

*Для γ -квантов приведены энергия (МэВ) и усредненное по спектру вторичных частиц значение ЛПЭ.

**Для α -частиц приведены максимальная энергия спектра (МэВ) и усредненное по потоку α -частиц в точке расположения облучаемого образца значение ЛПЭ.

Клетки перед облучением выращивали на агаризованной среде УЕРД (дрожжевой экстракт - 5 г/л, пептон - 10 г/л, глюкоза - 20 г/л, агар - 25 г/л) в течение 5-7 суток. Методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы получали суспензию одиночных клеток, находящихся в стационарной фазе. Для облучения α -частицами и ускоренными ионами готовили монослой клеток на поликарбонатном фильтре, которой располагали на поверхности 6%-ного непитательного агара. После облучения клетки ресуспендировали в воде. Облучение клеток γ -квантами проводили в водной суспензии.

Для определения выживаемости суспензию облученных клеток подходящей концентрации высевали в чашки Петри с агаризованной средой УЕРД. Подсчет макроколоний производили через 5-7 суток инкубации при 28°C.

Обработка полученных экспериментальных данных заключалась в расчете оптимальных значений параметров предложенной ранее математической модели /3/ и построении расчетных кривых выживания и кривых зависимости радиочувствительности от ЛПЭ. Расчет оптимальных значений параметров производили путем минимизации нормированной суммы квадратов отклонений экспериментальных значений от расчетных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате теоретических исследований, проведенных ранее /3/, показано, что кривую выживания $S_h(D, L)$ гаплоидных дрожжей при облучении их ионизирующей радиацией можно представить в следующем виде:

$$S_h(D, L) = \exp[-D/D_{oh}(L)], \quad (1)$$

где $D_{oh}^{-1}(L) = \sigma_h [1 - p_{oh}(L)] \rho / L$ (2)

представляет собой наклон кривой выживания, или радиочувствительность клеток; L - ЛПЭ, D - доза облучения, σ - геометрическое сечение чувствительной мишени клетки, ρ - удельная масса вещества мишени, $p_{oh}(L)$ - вероятность того, что при пересечении мишени ионизирующей частицей в клетке не образуется ни одного повреждения, летального для гаплоидной клетки. Зависимость $p_{oh}(L)$ рассчитывается исходя из геометрии чувствительной мишени и величины $q(L)$ - вероятности того, что при пересечении чувствительного участка ионизирующей частицей в нем образуется повреждение /3/.

$$p_{oh}(L) = \int_0^{S_{mh}} [1 - q(L)]^{k_h s} \rho(s) ds, \quad (3)$$

где $\rho(s)$ - закон распределения длин треков частицы в мишени, который определяется двумя параметрами: R_h - радиусом и t_h - толщиной сферического слоя мишени; k_h - количество чувствительных участков на единицу длины трека частицы, S_{mh} - максимальный пробег частицы в мишени,

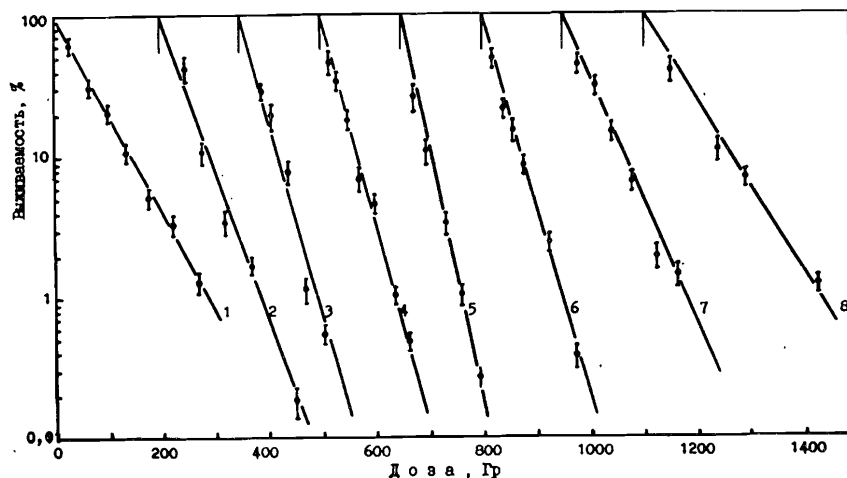


Рис.1. Кривые выживания галлоидных дрожжей S 288с (RAD) при действии излучений с разной ЛПЭ. 1 - γ -излучение; ионы ^4He с энергиями 8,5 МэВ/н - 2, 4,0 МэВ/н - 3, 2,0 МэВ/н - 4; 5 - α -частицы; ионы ^{12}C с энергиями 7,5 МэВ/н - 6, 4,0 МэВ/н - 7, 3,0 МэВ/н - 8.

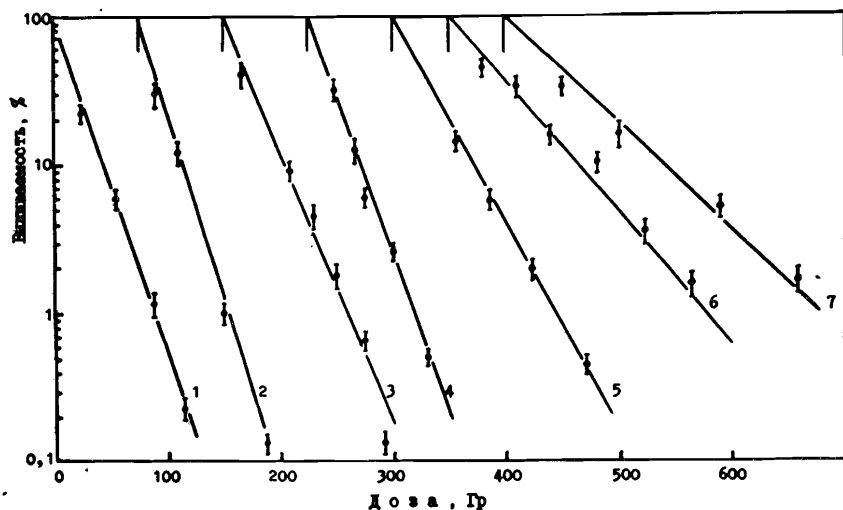


Рис.2. Кривые выживания галлоидных дрожжей XS 1828-3с (rad 6) при действии излучений с разной ЛПЭ. 1 - γ -излучение; ионы ^4He с энергиями: 8,5 МэВ/н - 2, 2,0 МэВ/н - 3; 4 - α -частицы; ионы ^{12}C с энергиями: 7,5 МэВ/н - 5, 4,0 МэВ/н - 6, 3,0 МэВ/н - 7.

Характер зависимости $q(L)$ определяется физическими характеристиками излучений и способностью клеток репарировать индуцированные радиацией повреждения.

В соответствии с двумя вышеупомянутыми альтернативными вариантами интерпретации зависимости $D_{0h}^{-1}(L)$ в работе ^{/3/} предложены выражения для описания зависимости $q(L)$. Для расчета параметров этой зависимости нами проведены эксперименты по определению чувствительности галлоидных дрожжей дикого типа и мутанта rad 6 к действию излучений, различающихся по ЛПЭ. Как полагают многие авторы ^{/6 - 8/}, мутация rad 6 блокирует репарацию повреждений, индуцированных ионизирующим излучением. Показано, что клетки дрожжей, мутантные по гену rad 6, в известной мере дефектны по репарации односторонних разрывов (ОР) ДНК, индуцированных метилметансульфонатом ^{/7/}. Как указывалось нами ранее ^{/3/}, способность репарировать ОР ДНК может отражать эффективность неспецифической репарации у дрожжей.

На рис.1 изображены кривые выживания клеток дикого типа, а на рис.2 - мутанта rad 6 при действии различных типов ионизирующих излучений.

В таблице 2 приведены значения ЛПЭ использованных излучений и рассчитанные по вышеприведенным кривым радиобиологические характеристики клеток: значения радиочувствительности и сечения инактивации.

Как видим, сечение инактивации у обоих штаммов достигает плато в области значений ЛПЭ ~ 200 кэВ/мкм. Величины сечения инактивации в области плато для клеток дикого типа и мутанта rad 6 практически совпадают. Поэтому эту величину можно считать геометрическим сечением ядра галлоидных клеток. Для дальнейших расчетов нами принято $\sigma_h = 1,02 \pm 0,06$ мкм². Указанное значение геометрического сечения использовано для определения одного из параметров в формуле (3) - радиуса мишени R_h . Выбор значений других параметров, характеризующих мишень, продиктован следующими соображениями.

Предположим, что чувствительные участки мишени расположены у поверхности сферической мишени в один слой, т.е. $K_h = 1/t_h$. Тогда в формуле (3) показатель $k_h S$ можно заменить на S/t_h , то есть параметр K_h исключается. Необходимость же введения этого параметра в теоретической модели заключалась в том, чтобы установить соответствие между характеристиками мишеней галлоидных и диплоидных клеток (формула (9) в работе ^{/3/}). Толщина сферического слоя t_h , как показывают численные расчеты по формуле (3), практически не влияет на результат при $t_h \ll R_h$, т.е. если сферический слой считать тонким. Это обусловлено тем, что конкретные физические механизмы образования повреждений не рассматриваются и не вводится такой параметр, как

критическая энергия, необходимая для образования одного повреждения. Параметр t_h , так же как и K_h , необходим в теоретической модели для установления соотношения между размерами мишеней гаплоидных и диплоидных клеток.

Таблица 2. Значения радиочувствительности и сечения инактивации гаплоидных клеток дикого типа и мутанта rad 6 при действии излучений с разной ЛПЭ

ЛПЭ кэВ/мкм	RAD		rad 6	
	D_{0h}^{-1} , Гр ⁻¹	$D_{0h}^{-1}L/\rho$, мкм ²	D_{0h}^{-1} , Гр ⁻¹	$D_{0h}^{-1}L/\rho$, мкм ²
0,3	0,016 ± 0,002	0,0010	0,054 ± 0,006	0,0035
2I	0,025 ± 0,003	0,082	0,067 ± 0,007	0,22I
38	0,033 ± 0,003	0,198		
64	0,034 ± 0,003	0,345	0,039 ± 0,004	0,396
110	0,043 ± 0,005	0,757	0,057 ± 0,007	I,0
205	0,031 ± 0,002	I,02	0,032 ± 0,002	I,05
330	0,020 ± 0,002	I,06	0,020 ± 0,002	I,06
410	0,014 ± 0,001	0,92	0,016 ± 0,002	I,05

С учетом вышеизложенного на основании приведенных в табл.2 экспериментальных данных были рассчитаны кривые зависимости радиочувствительности клеток дикого типа и мутанта rad 6 от ЛПЭ излучений. Эти кривые изображены на рис.3. На этом рисунке приведены также экспериментальные данные из табл.2.

Как указывалось выше, возможны два альтернативных варианта интерпретации зависимости радиочувствительности гаплоидных дрожжей от ЛПЭ излучений и влияния репарации на характер этой зависимости. Первый из них состоит в предположении о том, что эффективность неспецифической репарации с увеличением ЛПЭ излучений по тем или иным причинам уменьшается. Если инактивирующими повреждениями считать двуниевые разрывы (ДР) ДНК, то изменение характера зависимости $D_{0h}^{-1}(L)$ у чувствительного мутанта можно объяснить существованием двух типов ДР ДНК — прямых и энзиматических — и изменением с увеличением ЛПЭ соотношения выходов этих повреждений ^{/9/}. На основании такого предположения и рассчитаны изображенные на рис.3 зависимости $D_{0h}^{-1}(L)$ (кривые 1 и 2).

Как видим, это предположение позволяет удовлетворительно описать экспериментальные данные по чувствительности клеток дикого типа и мутанта rad 6 к действию излучений с разной ЛПЭ. В рамках этих

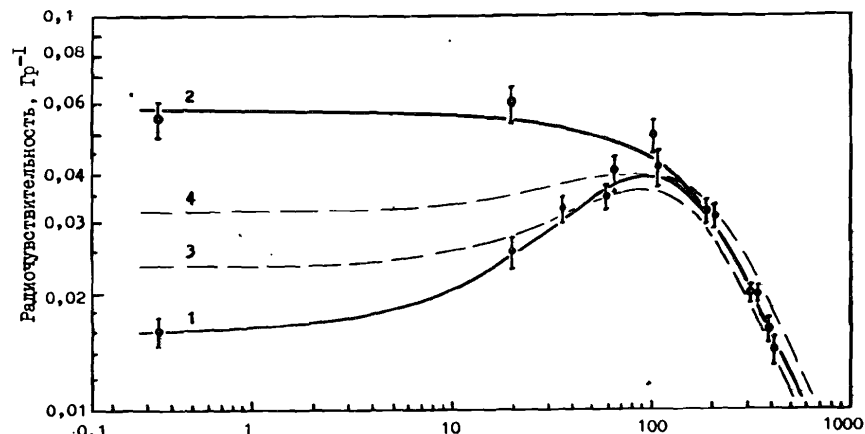


Рис.3. Зависимость радиочувствительности гаплоидных дрожжей дикого типа (темные символы, кривые 1,3) и радиочувствительного мутанта rad 6 (светлые символы, кривые 2,4) от ЛПЭ излучения. При расчете кривых 1 и 2 для величин $q(L)$ и $q'(L)$ приняты выражения (6) и (7), а при расчете кривых 3 и 4 — (8) ^{/3/}.

представлений у клеток дикого типа энзиматические ДР ДНК образуются из ОР ДНК с вероятностью $1 - \gamma_1 = 0,032$, а у клеток мутанта rad 6 эта вероятность гораздо выше и составляет $1 - \gamma_1' = 0,118$. Параметры γ_1 и γ_1' в формулах (6) и (7) ^{/3/} характеризуют вероятность успешной репарации ОР ДНК. Указанное обстоятельство обуславливает разницу в радиочувствительности рассмотренных штаммов при действии излучений с малой ЛПЭ. С увеличением ЛПЭ эта разница уменьшается, поскольку возрастает роль нерепарируемых прямых ДР ДНК. Зависимость радиочувствительности гаплоидных клеток дикого типа от ЛПЭ описывается кривой с максимумом, а соответствующая зависимость для клеток мутанта rad 6 — ниспадающей кривой. Таким образом, дефекты в системе репарации радиационных повреждений приводят к трансформации кривой зависимости радиочувствительности от ЛПЭ второго рода в кривую первого рода.

На рис.3 изображены также кривые зависимости $D_{0h}^{-1}(L)$, рассчитанные на основании альтернативного предположения (кривые 3 и 4). Это предположение заключалось в том, что неспецифическая репарация эффективна в равной степени при действии излучений с разной ЛПЭ ^{/3/}. В рамках модельных представлений это означает, что у клеток дикого типа инактивирующие повреждения образуются с меньшей вероятностью, чем у клеток мутанта, независимо от их происхождения. Как видим, это предположение не дает возможности удовлетворительно описать экспери-

ментальные данные. В области малых ЛПЭ разница между экспериментальными значениями радиочувствительности клеток дикого типа и мутанта $\text{rad } 6$ гораздо выше, чем между расчетными кривыми. В области больших ЛПЭ расчетные кривые не дают нивелировки радиочувствительностей клеток указанных штаммов, наблюдаемой в эксперименте.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. Характер зависимости радиочувствительности гаплоидных дрожжей от ЛПЭ в известной мере определяется способностью клеток репарировать радиационные повреждения. У клеток дикого типа указанная зависимость описывается кривой с максимумом, а у клеток радиочувствительного мутанта, дефектного по репарации радиационных повреждений, — ниспадающей кривой. Роль процессов репарации в радиорезистентности гаплоидных клеток дикого типа уменьшается с увеличением ЛПЭ. Механизмы этого явления у дрожжей пока окончательно не выяснены, однако можно предположить, что это обусловлено изменением соотношения выходов энзиматических и прямых ДР ДНК с увеличением ЛПЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодина В.И., Красавин Е.А. Радиобиология, 1982, т.22, вып.6, с. 727-738.
2. Корогодина В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г., Савченко Г.Б., Толсторуков И.И. Радиобиология, 1977, т.17, вып.5, с.700-710.
3. Лобачевский П.Н., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-87-469, Дубна, 1987.
4. Saeki T., Machida I., Nakai S. Mutation Res., 1980, v.73, p.251-265.
5. Череватенко А.П. Материалы У Всесоюзного совещания по микродозиметрии. М., МИИ, 1986, с.102-103.
6. McKee R.H., Lawrence C.W. Genetics, 1979, v.93, p.361-363.
7. Jachymczyk W.I., Chlebowicz E., Swietlinska Z., Zuk I. Mutation Res., 1977, v.43, p.1-10.
8. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Кожина Т.Н., Федорова И.В., Яровой Б.Ф. Мутационный процесс у грибов. Л., Наука, 1980.
9. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, т.24, вып.4, с.462-467.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 июня 1987 года.

Лобачевский П.Н., Красавин Е.А., Череватенко А.П.
Зависимость радиочувствительности дрожжевых клеток
от ЛПЭ излучений. Эксперименты на гаплоидных клетках

P19-87-470

Исследована зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (дикого типа и радиочувствительного мутанта) от линейной передачи энергии (ЛПЭ, L) излучений и проведен анализ полученных экспериментальных данных с позиций разработанных ранее модельных представлений. Показано, что характер зависимости $D_0^{-1}(L)$ у гаплоидных дрожжей в известной мере определяется способностью клеток репарировать радиационные повреждения. У клеток дикого типа указанная зависимость описывается кривой с максимумом, а у клеток радиочувствительного мутанта, дефектного по репарации радиационных повреждений, — ниспадающей кривой. Влияние репарационных процессов на радиорезистентность клеток уменьшается с увеличением ЛПЭ излучений.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод О.С.Виноградовой

Lobachevsky P.N., Krasavin E.A., Cherevatenko A.P.
The Radiosensitivity-LET Dependence In Yeast.
Experiments on Haploid Cells

P19-87-470

On the basis of the model reported earlier an analysis was made of the experimental dependence of radiosensitivity (D_0^{-1}) of haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* (wild type and radiosensitive mutant) upon linear energy transfer (LET, L). The dependence $D_0^{-1}(L)$ of haploid yeast was shown to be determined, to a certain extent, by ability of cells to repair radiation-induced damages. Whereas the radiosensitivity-LET dependence of wild type cells has a maximum, in the case of radiosensitive mutant defective in repair of radiation-induced damages, this dependence is described by a falling-down curve.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987