

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-87-720

П.Н.Лобачевский, В.Б.Мишонова, А.П.Череватенко

ЗАВИСИМОСТЬ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК ОТ ЛПЭ ИЗЛУЧЕНИЙ

Эффект дорастания и его вклад в резистентность
и форму кривой выживания диплоидных клеток

Направлено в журнал "Радиобиология"

1987

Как известно, одним из факторов, обуславливающих сигмоидную форму кривой выживания диплоидных дрожжей и их высокую, по сравнению с гаплоидными, резистентность к действию ионизирующих излучений, является эффект дорастания. Это явление заключается в том, что часть облученных диплоидных клеток формирует макроколонии на питательной среде в более поздние сроки и меньших размеров, чем необлученные клетки /1/. У гаплоидных клеток эффект дорастания незначителен. Анализ закономерностей эффекта дорастания показывает, что он обусловлен способностью диплоидных клеток, имеющих повреждения, формировать макроколонии, в то время как для инактивации гаплоидной клетки достаточно одного такого повреждения. Показано, что процессы, лежащие в основе эффекта дорастания, не связаны с диплоидспецифической репарацией /2/, которая также является важным фактором, обуславливающим высокую резистентность диплоидных клеток /3,4/.

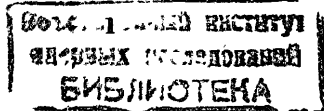
Ранее нами было исследовано влияние диплоидспецифической репарации на характер зависимости радиочувствительности диплоидных клеток от линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучений. Цель настоящей работы состоит в изучении вклада эффекта дорастания в радиорезистентность и форму кривой выживания диплоидных дрожжей при действии излучений, различающихся по ЛПЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы следующие диплоидные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: XS 800 - штамм дикого типа и XS 1898, несущий мутацию повышенной радиочувствительности rad 52 в гомозиготном состоянии /3/.

Клетки облучали ускоренными ионами углерода, обеспечивающими значения ЛПЭ 330 и 500 кэВ/мкм (энергии 4,0 и 2,3 МэВ/нуклон соответственно). Источником пучков ионов служил ускоритель У-200 ОИЯИ. Для целей облучения клеток была специально создана установка с комплексом электронно-физической аппаратуры /5/.

Клетки перед облучением выращивали на агаризованной среде YEPD (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 готовили монослой клеток на поликарбонатном фильтре, который располагали на поверхности 6%-ного питательного агара. После облучения клетки ресуспендировали в воде.

Корректное определение величины эффекта дорастания стандартным методом подсчета количества дорастающих макроколоний оказывается невозможным вследствие большого статистического разброса размеров и сроков формирования колоний даже необлученными клетками. Поэтому для анализа величины эффекта дорастания определяли выживаемость и долю клеток, не имеющих повреждений (нулевой класс) /2,6/. Для определения выживаемости суспензию облученных клеток подходящей концентрации высеивали в чашки Петри с агаризованной средой УЕРД. Подсчет макроколоний производили через 5 – 7 суток инкубации при 28°C. Определение нулевого класса проводили по специально разработанной для этих целей методике /6/. Для этого изучали кривые роста (зависимость концентрации клеток от времени) в жидкой питательной среде культур из облученных и необлученных клеток. Долю клеток нулевого класса определяли как отношение концентраций на экспоненциальных участках указанных кривых для облученных и необлученных клеток. Использовали жидкую питательную среду следующего состава: K_2PO_4 – 2 г/л, $MgSO_4$ – 1 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, глюкоза – 20 г/л, дрожжевой автолизат – 20 мл/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Теоретический анализ

В предыдущей работе /7/ нами предложен математический подход для интерпретации летального действия излучений с разной ЛПЭ на гаплоидные и диплоидные клетки дрожжей. Анализ экспериментальных данных с позиций этого подхода позволил определить такие параметры, как радиус мишени диплоидных клеток R_d и вероятность репарации повреждения τ_0 /8,9/. В работе /2/ осуществлен анализ эффекта дорастания с позиций вероятностной модели /1,10/, которая позволяет математически описать эффект дорастания при действии на клетки дрожжей γ -излучения, и определено значение параметра α (вероятность проявления повреждения), характеризующего величину этого эффекта. Опираясь на эти данные, можно предсказать величину эффекта дорастания при действии плотнойонизирующих излучений на диплоидные дрожжи.

Описание эффекта дорастания требует информации о характере рас-

пределения клеток по числу инактивирующих повреждений. Указанное распределение можно рассчитать на основе подхода, разработанного в /7/. В основе этого подхода лежит представление о мишени дрожжевой клетки, как о тонком сферическом слое, в котором равномерно распределены чувствительные участки. Мишень характеризуется следующими параметрами: R_d – радиус, t_d – толщина сферического слоя, $\rho_d(s)$ – плотность вероятности распределения длин треков частиц s в мишени, k_d – количество чувствительных участков, пересекаемых частицей на единицу длины трека, S_m – максимальный пробег частицы в мишени. Взаимодействие ионизирующей частицы с чувствительными участками характеризуется величиной $q(L)$ – вероятностью того, что в чувствительном участке образуется инактивирующее повреждение при пересечении его ионизирующей частицей. Распределение клеток по числу повреждений можно рассчитать для излучения с любой ЛПЭ = L , однако этот расчет существенно упрощается для случая $q(L) = 1$, т.е. для диапазона ЛПЭ от 300 кэВ/мкм и выше /7,8/. Тем не менее такое ограничение диапазона ЛПЭ не мешает сделать основные выводы, касающиеся влияния эффекта дорастания на радиорезистентность и форму кривой выживания диплоидных клеток при действии плотнойонизирующих излучений.

В случае $q(L) = 1$ вероятность образования в клетке k инактивирующих повреждений f_k при прохождении одной ионизирующей частицы есть вероятность того, что частица пересекла k чувствительных участков, т.е. ее пробег s в мишени находится в интервале от $\frac{k}{k_d}$ до $\frac{k+1}{k_d}$. Указанная вероятность выражается следующим интегралом:

$$f_k = \int_{\frac{k}{k_d}}^{\frac{k+1}{k_d}} \rho_d(s) ds, \quad k = 0, 1, \dots, i_m - 1, \quad (1)$$

где $i_m = [S_m k_d]$.

Вероятность того, что в клетке после завершения диплоидспецифической репарации останется i повреждений при прохождении одной частицы p_i^1 , выражается через f_k и τ_0 следующим образом:

$$p_i^1 = \sum_{k=i}^{i_m} f_k (1 - \tau_0)^i \tau_0^{k-i} \frac{k!}{i!(k-i)!}. \quad (2)$$

И, наконец, вероятность образования k повреждений при прохождении j частиц p_k^j можно рассчитать из соотношения

$$p_k^j = \sum_{i=0}^k p_{k-i}^{j-1} p_i^1. \quad (3)$$

Для определения вероятности выживания клетки S_k , имеющей k повреждений, используем выражение, предложенное в вероятностной модели (формула (9.1) /1/):

$$S_k = 1 - \left[\frac{1 - (1 - \alpha)^k}{(1 - \alpha)^k} \right]^2, \quad k = 0, 1, \dots, k_m, \quad (4)$$

где k_m удовлетворяет следующему условию:

$$(1 - \alpha)^{k_m + 1} < 0,5 \leq (1 - \alpha)^{k_m}$$

Проведя суммирование по всем частицам, пересекающим мишень при дозе D , для выживаемости диплоидных клеток получим выражение

$$S_d(D) = e^{-\sigma_d D \rho / L} \sum_{j=0}^{\infty} \alpha_j \frac{(\sigma_d D \rho / L)^j}{j!}, \quad (5)$$

где $\alpha_j = \sum_{k=0}^{k_m} S_k \rho_k^j$, ρ - удельная масса вещества мишени,
 $\sigma_d = \pi R_d^2$.

Учитывая, что при $q(L) = I$ дозовая кривая нулевого класса описывается выражением

$$S_0(D) = e^{-\sigma_{od} D \rho / L}, \quad (6)$$

где σ_{od} - сечение инактивации диплоидных клеток в области плато, формулу (5) можно представить в следующем виде:

$$S_d(D) = S_0(D) \sum_{j=0}^{\infty} \alpha_j \frac{[-\ln S_0(D) \sigma_d / \sigma_{od}]^j}{j!}. \quad (7)$$

Как следует из формулы (7), кривая выживания при $q(L) = I$ определяется однозначно кривой нулевого класса. Соотношение между выживаемостью $S_d(D)$ и долей клеток нулевого класса $S_0(D)$, отражающее величину эффекта дозревания, оказывается не зависящим от ЛПЭ. Это соотношение определяется вероятностью проявления повреждений α (посредством α_j) и вероятностью репарации повреждений γ_0 . Последняя определяет отношение σ_d / σ_{od} /9/ и также входит в α_j .

Анализ экспериментальных данных

На рис. I приведены экспериментальные данные по выживаемости и нулевому классу клеток штаммов XS 800 и XS 1898 в зависимости от дозы облучения ускоренными ионами углерода различных энергий. Изображенные на этом же рисунке кривые нулевого класса (кривые 1) рассчитаны на основании экспериментальных данных в соответствии с формулой (6), а кривые выживания (кривые 2) рассчитаны теоретически по формуле (7). При этом использованы следующие значения параметров, определенные ранее в независимых экспериментах /2,9/: для штамма XS 800 (длинный тип) $\gamma_0 = 0,65$, $\alpha = 0,152$, для штамма XS 1898 (рад 52/рад 52) $\gamma_0 = 0$, $\alpha = 0,156$.

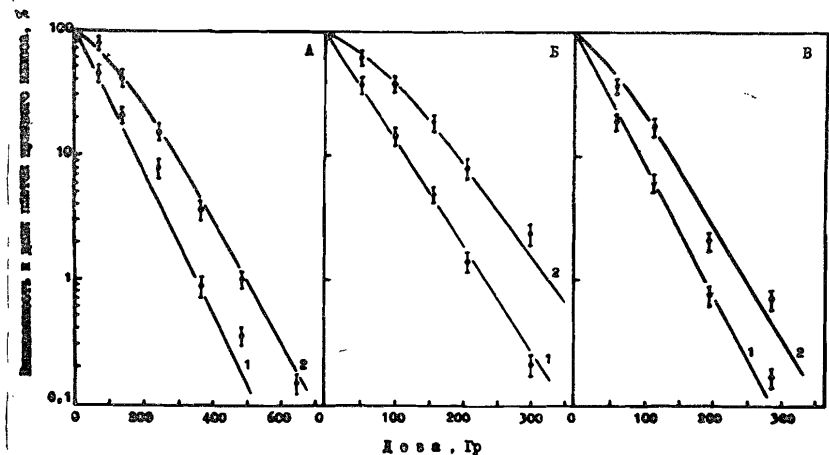


Рис. I. Кривые нулевого класса (1) и выживания (2) при облучении диплоидных дрожжей XS 800 (RAD/RAD) (А, Б) и XS 1898 (рад 52/рад 52) (В) ионами ^{12}C с энергиями 2,3 МэВ/н. (А, В) и 4,0 МэВ/н. (Б).

Прежде всего следует отметить, что кривые нулевого класса имеют экспоненциальную форму, а кривые выживания — сигмоидную. Это обстоятельство позволяет заключить, что эффект дорастания является единственным фактором, определяющим сигмоидную форму кривых выживания диплоидных дрожжей при действии ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ. Теоретические кривые выживания удовлетворительно описывают экспериментальные данные. Поскольку при расчете этих кривых использовано значение параметра α , рассчитанное для случая γ -облучения клеток, можно предполагать, что вероятность проявления повреждений не зависит от того, каким типом излучения эти повреждения индуцированы. Однако независимость параметра α от ЛПЭ еще не означает, что наблюдаемый вклад эффекта дорастания в выживаемость не изменяется с увеличением ЛПЭ. Так, у диплоидных клеток $x_s 800$ при выживаемости 10% эффект дорастания составляет 98% от всех колоний, формируемых клетками после γ -облучения ^{12/}, и 77% после облучения ионами углерода, ЛПЭ которых составляет 500 кэВ/мкм (рис.1). Разница во вкладе эффекта дорастания в выживаемость для двух рассмотренных случаев видна более наглядно, если сравнить доли клеток нулевого класса. Эти величины составляют соответственно 2% для γ -облучения и 23% для облучения ионами углерода. Это уменьшение наблюдаемой величины эффекта дорастания обусловлено изменением характера распределения клеток по числу инактивирующих повреждений при переходе от редкоионизирующего к плотноионизирующему излучению.

Как было показано в работе ^{12/}, диплоидные клетки дикого типа и радиочувствительного мутанта $rad 52/rad 52$ характеризуются одинаковой величиной эффекта дорастания при γ -облучении. Однако при действии частиц с высокой ЛПЭ величина эффекта дорастания у клеток дикого типа существенно выше, чем у клеток мутанта. Как видно из рис.1, при выживаемости 10% доля клеток нулевого класса составляет 23% у штамма дикого типа и 43% у мутанта, а эффект дорастания соответственно 77% и 57% выживаемости. Указанная разница в величине эффекта дорастания у клеток разных генотипов обусловлена различием этих штаммов по эффективности диплоидспецифической репарации. Эта разница следует из формулы (7), поскольку в нее входит характеризующий диплоидспецифическую репарацию параметр γ_0 . Полученное хорошее согласование теоретических данных с экспериментальными свидетельствует в данном случае в пользу сделанного ранее вывода о том ^{13/}, что диплоидспецифическая репарация одинаково эффективна при действии излучений с разной ЛПЭ.

Таким образом, результаты исследования величины эффекта дорастания у клеток дикого типа и радиочувствительного мутанта диплоидных дрожжей при действии излучений с высокой ЛПЭ позволяют сделать следующие выводы. Эффект дорастания является единственным фактором,

определяющим сигмоидную форму кривых выживания диплоидных дрожжей при действии излучений с высокой ЛПЭ. Вероятность проявления повреждений, определяющая величину эффекта дорастания, не зависит от типа излучения, индуцировавшего это повреждение. Наблюдаемый вклад эффекта дорастания в выживаемость диплоидных дрожжей уменьшается с ростом ЛПЭ, что обусловлено изменением характера распределения клеток по числу повреждений с изменением ЛПЭ. Результаты исследования согласуются со сделанным ранее выводом о том, что диплоидспецифическая репарация эффективна в одинаковой степени при действии излучений с разной ЛПЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М., Атомиздат, 1978.
2. Лобачевский П.Н., Машонова В.Б. Радиобиология, 1987, т.27, вып.2, с.195-200.
3. Saeki T., Machida I., Nakai S. Mutation Research, 1980, v.73, n.2, p.251-265.
4. Корогодни В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г., Савченко Г.В., Толсторуков И.И. Радиобиология, 1977, т.17, вып.5, с.700-710.
5. Череватенко А.П. Материалы У Всесоюзного совещания по микродозиметрии. М., МИИ, 1986, с.102-103.
6. Лобачевский П.Н., Замолодчикова С.Ю. Радиобиология, 1985, т.25, вып.4, с.483-488.
7. Лобачевский П.Н., Красавин Е.А. Р19-87-469, ОИЯИ, Дубна, 1987.
8. Лобачевский П.Н., Красавин Е.А., Череватенко А.П. Р19-87-470, ОИЯИ, Дубна, 1987.
9. Лобачевский П.Н., Череватенко А.П., Машонова В.Б. Р19-87-719, ОИЯИ, Дубна, 1987.
10. Лобачевский П.Н., Замолодчикова С.Ю. Р19-86-38, ОИЯИ, Дубна, 1986.

Рукопись поступила в издательский отдел
30 сентября 1987 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

Д7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р.55 к.
Д2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р.00 к.
Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р.50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р.30 к.
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р.50 к.
Д10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983.	3 р.50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р.75 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.00 к.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р.80 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р.75 к.
Д3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1986.	4 р.50 к.
-	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. /2 тома/	13 р.50 к.
Д1,2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. /2 тома/	7 р.35 к.
Д9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. /2 тома/	13 р.45 к.
Д7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986	7 р.10 к.
Д2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа-86". Дубна, 1986	4 р.45 к.

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

Лобачевский П.Н., Мишонова В.В., Череватенко А.П. P19-87-720
Зависимость радиочувствительности дрожжевых клеток от ЛПЭ излучений.

Эффект дорастания и его вклад в резистентность и форму кривой выживания диплоидных клеток

Исследован вклад эффекта дорастания в выживаемость диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и его влияние на форму кривой выживания при действии на клетки излучений, различающихся по линейной передаче энергии /ЛПЭ/. Показано, что эффект дорастания является единственным фактором, обуславливающим сигмоидную форму кривой выживания диплоидных дрожжей при действии излучений с высокой ЛПЭ. С ростом ЛПЭ вклад эффекта дорастания в выживаемость уменьшается, что обусловлено факторами физической и геометрической природы.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Lobachevsky P.N., Mishonova V.B., Cherevatenko A.P. P19-87-720
The Radiosensitivity-LET Dependence in Yeast.
The Effect of Additional Growth and Their Contribution
In Radioresistance and Shape of Survival Curve in Diploid Yeast

A study was made of the contribution of additional growth effect (AGE) in survival of diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of AGE on the shape of survival curve of cells, exposed to radiations with different linear energy transfer (LET). AGE was shown to be only factor determining the sigmoid shape of survival curve of diploid yeast, exposed to radiations with a high LET. The contribution of AGE in survival decreases by increasing LET, being conditioned by factors of physical and geometrical nature.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987