

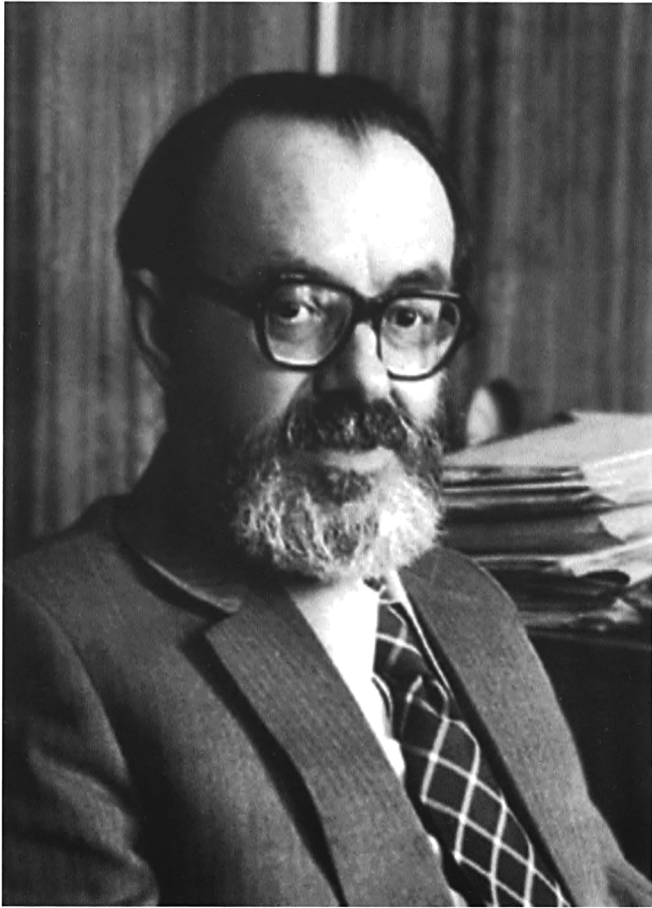
В. И. Корогодин

**Феномен
ЖИЗНИ**

*Избранные
труды*

Том 1

НАУКА



BT Ray

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РФ

МЕДИЦИНСКИЙ
РАДИОЛОГИЧЕСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

В. И. Корогодин

***Феномен
жизни***

Избранные труды

В двух томах



МОСКВА НАУКА 2010

В. И. Корогодин

***Феномен
ЖИЗНИ***

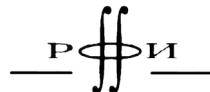
Избранные труды

Том 1



МОСКВА НАУКА 2010

УДК 575
ББК 28.04
К68



*Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проекту № 11-04-07005д*

Издание РФФИ не подлежит продаже

Ответственные редакторы:
академик *С.Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ*,
академик РАМН *А.Ф. ЦЫБ*

Рецензенты:
член-корреспондент РАН *И.А. ЗАХАРОВ-ГЕЗЕХУС*,
доктор биологических наук *Е.Б. БУРЛАКОВА*

Корогодин В.И.

Феномен жизни. Избранные труды: в 2 т. / В.И. Корогодина; Объединенный ин-т ядерных исследований; Медицинский радиологический научный центр РАМН. – М.: Наука, 2010 – ISBN 978-5-02-036691-6.

Т. 1. – 2010. – 434 с. – ISBN 978-5-02-036705-0 (в пер.).

В двухтомнике собраны труды выдающегося ученого XX века Владимира Ивановича Корогодина, внесшего существенный вклад в развитие радиобиологии, генетики, радиоэкологии и теоретической биологии. В Избранные труды включены неопубликованные и публиковавшиеся ранее статьи и монография по основным направлениям научной деятельности В.И. Корогодина: восстановление клеток от радиационных повреждений; каскадный мутагенез (хромосомная нестабильность клеток); функциональная концепция мутагенеза (адаптивный мутагенез); надежность генома; радиоемкость и надежность экосистем; анаэробный гликолиз и терапия рака; информация как основа жизни; история радиобиологии и методология научного исследования. В книгу вошли дополнительные материалы: даты жизни и деятельности. библиография, комментарии и очерки по истории развития идей в этих направлениях, в составлении которых приняли участие ведущие ученые и коллеги В.И. Корогодина.

Для широкого круга биологов, физиков, биофизиков, радиоэкологов, медиков.

По сети «Академкнига»

ISBN 978-5-02-036691-6
ISBN 978-5-02-036705-0 (Т. 1)

© Объединенный институт ядерных исследований,
Медицинский радиологический научный центр
РАМН, 2010
© Корогодина В.Л., составление, комментарии, 2010
© Редакционно-издательское оформление.
Издательство «Наука», 2010

ОТ СОСТАВИТЕЛЯ

Владимира Ивановича Корогодина характеризовали два взаимодополняющих и, возможно, взаимообусловленных свойства. Первое – он видел непрерывность научных открытий, хорошо знал историю исследований и исследователей от Аристотеля до наших дней. Второе – для него в мире науки все были равны: «вклады» были «на паритетных началах» – кто сколько сможет. В этом ключе, стараясь сохранить дух непрерывности и паритетности научных открытий, мы составили сборник избранных трудов В.И. Корогодина. В него вошли статьи по основным направлениям исследований Владимира Ивановича, включены его пионерские публикации и обзорные статьи, в которых обсуждается, по выражению Н.В. Тимофеева-Ресовского, «почему сие важно в-пятых». Как правило, предвидения Корогодина, основанные на его собственных исследованиях, подтверждались, порой через несколько десятков лет. Но главным достоинством публикуемых статей является другое. Казалось бы, прошло немало лет, эти научные данные давно известны, но стоит прочитать внимательно статьи Владимира Ивановича и снова появляется материал для размышления. Это совсем в духе Корогодина, который неоднократно цитировал: «ничего законченного я не обещаю...» (Г. Мелвилл «Моби Дик»).

В составлении и написании комментариев и небольших введений-обзоров к главам приняли участие С.А. Гераськин, Дж.В. Дрейк, Т.А. Дутова, В.Д. Жестяников, С.Г. Инге-Вечтомов, М.В. Корогодина, Ю.А. Кутлахмедов, Ю.И. Павлов, В.Г. Петин, Г.Г. Поликарпов, А.А. Сиренов, Э.А. Соснин, Б.С. Федоренко, Б.Ф. Чадов, Н.М. Чернавская, Д.М. Чернавский, А.А. Чиньи, М.Г. Шафранова, Н.Л. Шмакова, С.П. Ярмоненко. Публикации рукописи способствовали усилия дирекции МРНЦ РАМН и ОИЯИ – А.Ф. Цыба, А.Н. Сисакяна, А.И. Григорьева, В.Г. Петина, Н.Г. Горбушина, Д.В. Корогодина. Помощь в подготовке рукописи оказали Н.С. Российская, Н.В. Смирнова.

В.Л. Корогодина

ПРЕДИСЛОВИЕ

Имя Владимира Ивановича Корогодина хорошо известно в радиобиологии, радиозоологии, генетике, теоретической биологии и других областях науки. Многие, знавшие лично Владимира Ивановича, помнят его вопрос «чем отличается живое от неживого?», который в той или иной форме он вносил в научные дебаты. Выстроив по годам периоды его творчества, можно отчетливо видеть его основной интерес: феномен жизни. За свою жизнь ему удалось в своих исследованиях создать целостную мозаику «феномена жизни»: восстановление клеток; мутагенез; надежность генома и эволюция; надежность экосистем; информация как основа жизни. Исследования, или сами направления, в которых он работал, всегда были пионерскими. Одни темы он завершил, в других, по его выражению, он показал «где копать».

В.И. Корогодина считал своим учителем Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского. Свои первые значительные исследования по пострadiационному восстановлению клеток он показал Тимофееву-Ресовскому, приехав к нему на озеро Большое Миассово, где тогда была лаборатория Николая Владимировича. В начале 60-х годов XX в. В.И. Корогодина, а затем Николай Владимирович и Елена Александровна Тимофеевы-Ресовские со своими уральскими сотрудниками Н.В. Лучником, В.И. Ивановым, Н.В. Готовым и другими были приглашены в Обнинск в новый, организованный академиком Г.А. Зедгенидзе, Институт медицинской радиологии АМН СССР. В институте, а также вечерами за чайным столом Елены Александровны сформировалась Обнинская радиобиологическая школа Тимофеева-Ресовского.

В Обнинске В.И. Корогодина создал лабораторию радиобиологии клеток и тканей. Совместно со своими молодыми коллегами Ю.Г. Капульцевичем, В.Г. Петиним, К.М. Близник и другими он продолжил начатые им на кафедре биофизики МГУ исследования пострadiационного восстановления клеток. Корогодина с коллегами выяснили роль ploидности в пострadiационном восстановлении, а также связь восстановления с радиочувствительностью клеток, создали математическую модель и определили количественные закономерности этого феномена. В 1972 г. доказательство В.И. Корогодина реальности пострadiационного восстановления клеток получило статус открытия (диплом № 115 с приоритетом от марта 1957 г.). В тот же период были изучены закономерности и механизмы другого явления – каскадного мутагенеза. Основные закономерности каскадного мутагенеза были изучены Корогодиным и сотрудниками его лаборатории в Обнинске.

В 1972 г. директор Всесоюзного НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) проф. С.И. Алиханян пригласил В.И. Корогодина организовать в его институте лабораторию генетики и селекции

дрожжей. В Москве в лаборатории Корогодина тема каскадного мутагенеза на клеточном этапе экспериментов была завершена. Эта серия работ по изучению каскадного мутагенеза стала преддверием огромного направления исследований генетиков и радиобиологов нестабильности генома.

По мере изучения кривых выживаемости дрожжей разных штаммов возник вопрос о зависимости эффекта восстановления от физических характеристик излучений, а относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений – от линейной передачи энергии (ЛПЭ). Эксперименты для решения этой проблемы могли быть осуществлены в Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ). Весной 1977 г. на Ученом совете ОИЯИ был заслушан доклад В.И. Корогодина, в котором он предложил провести такие эксперименты с целью выяснить природу ОБЭ. Его предложение получило поддержку со стороны дирекции ОИЯИ, и в конце 1977 г. В.И. Корогодина переехал в г. Дубну.

В конце 70-х годов В.И. Корогодина организовал биологические исследования в ОИЯИ. Были начаты эксперименты на разных источниках ионизирующих частиц. Уже через три года стали публиковаться работы радиобиологов Объединенного института по изучению биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Эти исследования выполнялись совместно с Е.А. Красавиным и молодыми выпускниками МИФИ А.А. Глазуновым, П.Н. Лобачевским, К.Г. Амиртаевым. В дальнейшем радиобиологические исследования на базовых установках ОИЯИ продолжились под руководством Е.А. Красавина.

В этот период В.И. Корогодина опубликовал статьи по надежности генома. Он показал, что все организмы, с точки зрения радиобиолога, можно разделить на «кариотаксоны», различающиеся структурной организацией генома, и сделал вывод, что структура генома определяет его надежность, а переход из одной таксономической группы в другую возможен только в результате геномных перестроек. Следовательно, хромосомные аберрации могут служить материалом для эволюции, а мутации генов – только «пришлифовке» организма к экологической нише. В этих работах Корогодина впервые применил в биологии античный принцип поризма для определения перехода частной задачи, решаемой природой в ходе борьбы за существование, в разряд общей эволюционно значимой проблемы.

В Дубне В.И. Корогодина приступил к задуманным им ранее экспериментам по изучению зависимости мутационного процесса от внешней среды. Совместно с В.Л. Корогодиной и Ч. Файси им было впервые в мире показано, что частота мутирования генов зависит от их функциональной активности, т.е. мутационный процесс регулируется и зависит от внешних факторов. На западе феномен называли адаптивным мутагенезом, и это направление в настоящее время является одним из самых перспективных в генетике.

После Чернобыльской катастрофы (1986) В.И. Корогодина развил введенное им ранее совместно с А.С. Агре (1958) фундаментальное понятие радиоемкости непроточного водоема, – количества радионуклидов, которое может захоронить водоем без нарушения его функционирования. Это понятие было положено в основу методологии оценок радиоемкости, разработанных им совместно с Ю.А. Кутлахмедовым и Г.Г. Поликарповым для каскада

Днепровских водохранилищ. В тот период Корогодина активно работает в составе Научной комиссии по радиационной защите России, Международного союза радиэкологии, Международного союза экоэтики, участвует в разработке контрмер на загрязненных территориях.

В конце 80-х–начале 90-х годов XX в. В.И. Корогодина развивает теорию, что живое – это совокупность объектов, способных совершать целенаправленные действия, конечная цель которых – самовоспроизведение. В основе целенаправленного действия, повышающего вероятность его осуществления, лежит информация – «руководство к действию». Таким образом, он объединил в живых организмах информационный и динамический компоненты. В.И. Корогодина показал, что можно различать три типа биологической информации – генетическую, поведенческую и логическую, – и рассмотрел автогенез информации, основанный на присущем целенаправленному действию компоненте, – событиях, неизбежно сопутствующих достижению цели («побочных продуктах»). Именно они изменяют среду обитания, повышают размерность новых экологических ниш и создают «ярусы» жизни. Так В.И. Корогодина описал эволюцию информационных систем.

Владимир Иванович сразу стал проводить в лабораториях Объединенного института увлекательные семинары на понятном для физиков языке: о различиях в чувствительности клеток к гамма-лучам и тяжелым частицам, мутагенезе и трансформации клеток, принципах оценки радиационной опасности, надежности генома, феномене жизни. В Дубну стали съезжаться на консультации, семинары, конференции радиобиологи, генетики, радиэкологи из Обнинска, Москвы, Ленинграда, Новосибирска и других городов. Владимир Иванович установил тесные научные контакты с радиобиологами, генетиками, радиэкологами Армении, Украины, Белоруссии. Давние связи Корогодина с Центром молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка в Берлин-Бухе также привели к совместным с генетиками из Германии радиобиологическим исследованиям, продолжавшимся в течение многих лет. Под его руководством ученые из Польши, Болгарии, Венгрии, Чехословакии, Румынии вели исследования в разных областях генетики, радиобиологии, радиэкологии, теории эволюции.

Дубненский период научного творчества Владимира Ивановича был очень разносторонним и плодотворным. В.И. Корогодина познакомил с биологией и заинтересовал ее проблемами сотрудников ОИЯИ, создал базу для развития радиобиологии в Дубне. В Дубне он разработал концепцию мутагенеза, развил фундаментальное понятие радиоемкости экосистем и сформулировал принципы оценки радиационной опасности. Монография «Информация как феномен жизни» посвящена проблемам теоретической биологии. Биологическое направление в ОИЯИ заслужило признание генетиков и радиобиологов всего мира, и в этом большая заслуга Владимира Ивановича Корогодина. Несомненно, Объединенный институт сыграл немаловажную роль в творчестве самого Корогодина. ОИЯИ расширил его круг общения, прежде всего за счет личных дружеских контактов, дискуссий с учеными разных направлений, семинаров и конференций с их участием. Фундаментальность в физических исследованиях была близка ему по духу. В.И. Корогодина хорошо

вписался в особую атмосферу внутренней свободы и юмора среди физиков, которая была сродни и Тимофеевскому окружению.

В память о выдающемся российском ученом XX века в 2006 г. была учреждена именная медаль «Феномен жизни», концепция которой отражает основные направления научной деятельности Владимира Ивановича Корогодина.

*Директор Медицинского радиологического научного центра РАМН
академик РАМН А.Ф. Цыб*

*Директор Объединенного института ядерных исследований
академик РАН А.Н. Сисакян*

БЛАГОГОВЕНИЕ ПЕРЕД ЖИЗНЬЮ

Интервью В.И. Корогодина

Вопрос. В наши дни все острее ставится вопрос не только об этике научного творчества, но и об этике ученого. Какие основные требования профессиональной этики ученого вы бы выделили?

В.К. Мне наиболее близок, пожалуй, этический принцип Альберта Швейцера – «*Благоговение перед ЖИЗНЬЮ*», согласно которому этично то, что способствует сохранению и развитию жизни, и неэтично то, что противодействует этому. Этика А. Швейцера, думаю, близка большинству людей, которые не только по профессии, но и по призванию являются научными работниками.

Для научного работника также, думаю, исключительно важно наличие таких свойств, как честность, правдивость. Научные работники по профессии своей являются «добытчиками знания, добытчиками истины», – пусть по крупницам, по зернышкам. Новые представления научного работника о каком-либо явлении, о мире становятся всеобщим достоянием благодаря тем или иным средствам общения, связи, печати. Такие представления могут быть либо истинными, либо ошибочными. Ложь, то есть высказывание не того, что думаешь, – например, из конъюнктурных соображений, – и в первом случае (когда представления истинны) искажает истину, а во втором (когда представления ошибочны) препятствует возможности исправления этих представлений, корректировки их, так как разрушает обратную связь между отдельным человеком – научным работником – и обществом, наукой в целом. В обоих случаях ложь, пусть мелкая, превращает человека из слуги общества в паразита.

Ложь – сознательное искажение в высказывании того, что данное лицо считает истиной, – всегда физиологическое насилие над самим собой, над своей природой. Ложь – это оружие слабых, используемое для достижения своекорыстных целей. Но человек, человеческий мозг – явление целостное. Поэтому, начав лгать в одних каких-либо ситуациях, человек легче будет лгать и в других. И если это свойство – лживость, – вообще говоря, не всегда грозит профессиональной деградацией, например, дворнику, летчику или футболисту, то для научного работника оно губительно. Думаю, главным этическим принципом научного работника должна быть заповедь «не солги». Ложь, конечно, противодействует сохранению и развитию жизни.

Вопрос. А.И. Герцен заметил: «Человек и наука – два вогнутые зеркала, вечно отражающие друг друга». Как бы вы прокомментировали это высказывание?

В.К. Фраза «Человек и наука – два вогнутые зеркала, вечно отражающие друг друга» мне не понятна. Но можно сказать несколько иначе: «Человек и природа – два зеркала, вечно отражающие друг друга». Причем человек обычно от общения с природой становится лучше, а природа от такого общения часто становится хуже (чтобы убедиться в этом, достаточно сходить в лес в конце воскресного дня). Человек как бы отражает лучшие стороны природы, а природа – худшие стороны человека... Это, конечно, шутка.

Вопрос. Сегодня мы больше говорим не об одиночках-ученых, а об авторских коллективах. Какими чертами, на ваш взгляд, должны обладать члены научного коллектива как специалисты и личности, чтобы создать наиболее оптимальную творческую атмосферу?

В.К. Роль «одиночек» и «коллективов» в научной работе вряд ли вопрос дискуссионный. Обнаружение нового и генерирование идей обычно дело «одиночек» (открытия делаются случайно, но не случайными людьми и не в случайной ситуации), а разработка – удел коллективов, как официальных, так и неофициальных. «Творческая атмосфера», однако, важна в обоих случаях.

Высокий профессионализм членов научного коллектива, глубокое знание своего дела и ясное понимание задач, – это, конечно, необходимые условия для создания творческой атмосферы. Необходимые, но далеко не достаточные.

Творческая атмосфера в коллективе – это, думаю, когда интересы работы преобладают над другими интересами; именно «над другими», а не «над личными», то есть когда интересы работы ощущаются каждым членом коллектива как свои личные. Три условия здесь важны: во-первых, психологическая совместимость членов коллектива; во-вторых, наличие «ведущей идеи», вокруг которой и организуется работа; в-третьих, чтобы ожидание того, «что получится», довлекло над любопытством: «а кто же окажется прав?».

Роль административного руководителя (желательно, но не обязательно, чтобы он являлся и неофициальным лидером научного коллектива) в формировании творческой атмосферы велика и многообразна, но соблюдение им нескольких условий, пожалуй, является обязательным. Условия эти следующие. Первое – не вмешивайся в работу сотрудников, если не можешь ее улучшить. Второе – изгоняй из употребления термин «подтвердить предположения»: эксперименты всегда призваны установить, как на самом деле, «проверить», а не «подтвердить». Третье – сделай, чтобы тебя больше радовали такие результаты, полученные сотрудниками, которые не согласуются с высказывавшимися тобой предположениями, а не «подтверждают» их, – и чтобы сотрудники знали об этом. Четвертое – никогда не соглашайся быть соавтором работы, в которой ты не участвовал непосредственно.

Вопрос. Говорят: в научных спорах рождается истина...

В.К. Может быть. Афродита тоже, говорят, родилась из морской пены. Мне, однако, не известно ни одного случая, чтобы «истина родилась в спорах». Истина, скорее, рождается вопреки спорам...

Вопрос. Но что, на ваш взгляд, значит для ученого понятие «уметь спорить»?

В.К. Что такое уметь спорить для ученого, я не знаю. Скорее всего, это – уметь выявить дефекты в представлениях оппонента так, чтобы при этом

не пострадало его самолюбие. По себе знаю, это трудно. Но вот что научный работник должен обязательно уметь – это настолько ясно излагать свою точку зрения, чтобы она стала понятна даже тем, кто придерживается иных теоретических концепций.

Вопрос. Гражданская ответственность ученого – какой смысл Вы вкладываете в эти слова?

В.К. Мой учитель Н.В. Тимофеев-Ресовский любил задавать вопрос: «Почему сие важно в-пятых?». Это значит: понимаешь ли ты как можно более отдаленные значения, или последствия, своей работы?

Технический прогресс есть результат прежде всего научных разработок. Это означает, что будущее в значительной мере зависит от того, что сейчас делается в лабораториях. И это обязывает каждого научного работника стремиться к тому, чтобы ясно отдавать себе отчет (что, честно говоря, трудно – думать, вообще, трудно), к каким отдаленным результатам, и положительным, и отрицательным, может привести то, что он делает сегодня, и в соответствии с этим корректировать свою деятельность, руководствуясь этическим принципом Альберта Швейцера.

Конечно, всего предвидеть невозможно. Но стремиться к тому, чтобы до минимума сводить хотя бы те неблагоприятные последствия своей работы, которые можно предвидеть, – не только желательно, но и необходимо. Это, я думаю, и есть гражданский долг ученого.

КРАТКИЙ ОЧЕРК НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

*Ничего законченного я не обещаю,
потому что дело рук человеческих,
объявленное законченным,
тем самым уже является делом гиблым.*

Г. Мелвилл «Моби Дик»

Владимир Иванович Корогодин родился 4 января 1929 г. в г. Донецке на Украине. Школу окончил в 1947 г. в Полтаве, после чего поступил в Московский государственный университет на физический факультет. В 1948 г. он перешел на биологический факультет, который окончил по кафедре генетики в 1952 г. Отработав год зоотехником-оленоводом на Крайнем Севере в Межобластной комплексной землеустроительной экспедиции, он в 1953 г. вернулся в Москву и поступил старшим лаборантом на только что организованную кафедру биофизики биологического факультета МГУ. По совету заведующего кафедрой проф. Б.Н. Тарусова, он занялся проблемой действия ионизирующих излучений на живые клетки.

Поработав с разными биологическими объектами, В.И. Корогодин остановился на дрожжевых организмах. Основания для этого были следующие. Дрожжи – одноклеточные эукариоты, имеющие половой процесс и способные существовать как в гаплоидном, так и в диплоидном и полиплоидном состояниях. Каждая жизнеспособная клетка после двух-трех суток инкубации на твердой питательной среде образует макроколонию, видимую невооруженным глазом, что чрезвычайно облегчает процедуру определения кривых выживания, т.е. зависимости выживаемости от дозы облучения, и, следовательно, проведение экспериментов по радиобиологии клеток.

Изучая колонии, вырастающие из облученных дрожжей, В.И. Корогодин в 1956 г. обнаружил «эффект дорастания» – задержку роста колонии из облученных клеток. Микроскопируя препараты, в следующем году он обнаружил, что летально поврежденные клетки погибают не сразу, без деления (как считалось раньше), а спустя несколько циклов размножения, образуя разные формы «инактивации». В том же году, проверяя одну из гипотез своего руководителя проф. Б.Н. Тарусова, он установил, что если облученные клетки помещать на питательную среду не сразу после облучения, а выдерживая их предварительно то или иное время в непитательной среде, то процент выживающих клеток (т.е. клеток, образующих макроколонию) возрастает. В специальных экспериментах В.И. Корогодин совместно с Т.С. Малютиной показал, что это возрастание выживаемости является результатом «эффек-

та восстановления» – восстановления облученных клеток от летальных последствий облучения.

В то время общепризнанным было мнение, что живые клетки не способны восстанавливаться от повреждений, вызываемых ионизирующими излучениями. Якобы этим действие на клетки ионизирующих излучений коренным образом отличается от действия ультрафиолетовых лучей, после которых возможна фотореактивация. Лишь после работ В.И. Корогодина появились публикации Н.В. Лучника (СССР), Т. Альпер (Англия), Р.Ф. Кимбола (США) и других авторов, показывающие реальность пострадиационного восстановления самых разных биологических объектов: клеток растений, бактерий, инфузорий, клеток млекопитающих в культуре и др. В 1972 г. за доказательство реальности пострадиационного восстановления клеток В.И. Корогодина был выдан диплом на открытие (№ 115) с приоритетом от марта 1957 г.

Вскоре В.И. Корогодина вместе с Э.М. Карабаевым установил, что пострадиационное восстановление происходит только при оптимальной для жизнедеятельности клеток температуре и при осуществлении дыхания или брожения: химические реактивы, подавляющие энергетический обмен клеток, подавляют и пострадиационное восстановление. А вместе с китайской студенткой Лю Айшень им было показано, что восстановление не наблюдается у гаплоидных дрожжевых клеток.

В 1960 г. В.И. Корогодина пригласили работать в биологический отдел Института атомной энергии им. И.В. Курчатова. Пробеседовав с заведующим этим отделом четыре часа, В.И. Корогодина подал заявление об увольнении – и остался без работы. Однако через несколько дней ему позвонил проф. Н.П. Дубинин и предложил вместо себя заведовать лабораторией биофизики в Институте фитопатологии МСХ СССР в поселке Голицыно под Москвой. Там В.И. Корогодина проработал около двух лет, продолжая изучать закономерности пострадиационного восстановления дрожжевых клеток разной пloidности после действия ионизирующих излучений и ультрафиолетовых лучей. Было установлено, что темновое восстановление (без действия видимого света) происходит после обоих видов излучений, но наблюдается только у диплоидных и полиплоидных (но не гаплоидных) клеток. Мало того, совместно с В. Билуши им было показано, что дрожжевые клетки могут восстанавливаться как после облучения гамма-лучами, так и после облучения альфа-частицами, хотя интенсивность восстановления в этих случаях несколько различается. Позже эти данные были воспроизведены американскими авторами – Р. Хейнсом и др. Тогда же В.И. Корогодина совместно с Е.Н. Кабаковым установил, что хотя после ионизирующих излучений возникают как обратимые, так и необратимые первичные повреждения, после ультрафиолетового света обратимыми являются практически все элементарные лучевые повреждения, но в ходе самого восстановления (или фотореактивации) часть этих повреждений переходит в необратимое состояние.

Следует заметить, что представления о необратимости лучевых повреждений клеток хорошо согласовывались с «классической» точкой зрения, согласно которой элементарными летальными для клеток лучевыми повреждениями являются генные мутации. Вероятность возникновения летальных генных мутаций весьма мала, что еще в 1935 г. было показано

Н.В. Тимофеевым-Ресовским с соавторами. Было очень заманчиво обсудить опыты по восстановлению с самим Н.В. Тимофеевым-Ресовским.

Еще работая на кафедре биофизики МГУ, в 1956 г. В.И. Корогодин познакомился с Н.В. Тимофеевым-Ресовским, а в 1958 г., после защиты кандидатской диссертации, приехал в его лабораторию на озере Большое Миассово на Южном Урале и выступил там с докладом. Тотчас же по предложению Н.В. Тимофеева-Ресовского была организована группа проверки экспериментов по пострадиационному восстановлению дрожжей. Все результаты опытов полностью подтвердились. Сам же В.И. Корогодин решил связать свою дальнейшую работу с Н.В. Тимофеевым-Ресовским.

В конце 1961 г. В.И. Корогодин был приглашен заведовать лабораторией радиобиологии клеток и тканей в Институт медицинской радиологии АМН СССР, организованный академиком Г.А. Зедгенидзе в г. Обнинске, недалеко от Москвы, куда и переехал в начале 1962 г. Созданная им лаборатория просуществовала до 1972 г., входя в отдел радиобиологии и генетики, которым заведовал Н.В. Тимофеев-Ресовский. За эти годы совместно с Ю.Г. Капутьцевичем В.И. Корогодин закончил математический анализ процесса пострадиационного восстановления клеток и приступил к изучению факторов, обуславливающих существование разных форм инактивации, эффекта дорастания, эффекта восстановления и зависимость этих феноменов от плоидности клеток. В 1966 г. В.И. Корогодин защитил докторскую диссертацию, а в 1970 г. ему было присвоено звание профессора.

В конце 60-х годов В.И. Корогодин совместно с К.М. Близник и Ю.Г. Капутьцевичем обнаружил еще одно явление, четко связанное с плоидностью клеток, получившее впоследствии название каскадный мутагенез. Оказалось, что если посеять клетки из колоний, вырастающих из облученных диплоидных дрожжей, то вновь образующиеся колонии не только обнаруживают эффект дорастания, как и тотчас после облучения, но и формируют колонии разных размеров и формы. Если для посева брали мелкие колонии, вырастающие в предыдущем посеве, то феномен воспроизводился после десятков пассажей, на протяжении многих лет. Это наблюдалось только у диплоидных клеток, но не у гаплоидных, облученных в стационарной фазе роста.

Стало окончательно ясно, что форма кривой выживания (точнее, отсутствие плеча у кривой выживания гаплоидных клеток и его наличие у диплоидных и полиплоидных), разнообразие форм инактивации, наличие эффекта дорастания и каскадного мутагенеза, а также способность к пострадиационному восстановлению тесно связаны с фактором плоидности – все это наблюдается после облучения диплоидных и полиплоидных клеток и не наблюдается у гаплоидных. Возникло предположение, что с этим же связана более высокая радиорезистентность диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными, хотя количество ядерного материала, т.е. размеры мишени, у гаплоидных клеток в два раза меньше, чем у диплоидных, и согласно теории мишени первые должны быть более радиорезистентными, чем вторые. Но чтобы убедиться в этом окончательно, требовались специальные эксперименты.

Дело в том, что до тех пор все такие работы проводились на диплонтах – природных диплоидных дрожжах и искусственно полученных из них гапло-

идных. Возникло опасение, что именно искусственность таких гаплоидов и обуславливала все перечисленные выше их радиобиологические особенности. Требовалось провести такие же эксперименты на реципрокной системе дрожжей – на природных гаплоидных клетках и искусственно полученных из них диплоидных, т.е. на так называемых гаплонтах. Но чтобы провести эти работы, нужны были специалисты по генетике дрожжей, владеющие соответствующими методиками. Из литературы В.И. Корогодина выяснил, что два таких специалиста работают в Москве, в Институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Договорившись с директором этого института проф. С.И. Алиханьяном об организации лаборатории генетики и селекции дрожжей, В.И. Корогодина переходит на работу в этот институт и в 1972 г. переезжает в Москву. В 1974 г. он уже располагал тремя парами штаммов дрожжей разных видов: природными гаплоидами и искусственно полученными из них диплоидными штаммами.

Эксперименты показали, что такие штаммы ведут себя совершенно иначе, чем те, с которыми ранее работали во всем мире. А именно, природные гаплоидные дрожжи были примерно в два раза более радиорезистентными, чем искусственные диплоиды, хотя кривые выживания у природных гаплоидных клеток были экспоненциальные, как и у искусственных гаплоидов. Причем пострадиационного восстановления не наблюдалось ни у природных гаплоидов, ни у искусственных диплоидов. Три года работы с гаплоидными и диплоидными штаммами гаплонтов и диплоидов показали следующее.

Гаплонты не способны к пострадиационному восстановлению ни в гаплоидном, ни в диплоидном состоянии – по-видимому, у них отсутствует (или отсутствуют) какой-то (или какие-то) репарационные ферменты. Поэтому они и ведут себя так, как следует из теории мишени. У природных же диплоидов существует эффект восстановления, когда они находятся в диплоидном состоянии, и тогда они более радиорезистентны, чем гаплоидные клетки. Восстановление у дрожжей происходит по рекомбинационному типу, почему для его осуществления и необходим, минимум, двойной набор хромосом. Восстановление – единственная причина более высокой радиорезистентности диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными, и, можно думать, оно же является важнейшим фактором, обуславливающим высокую надежность генома таких клеток. Гибель облученных гаплоидных и диплоидных клеток происходит не за счет разных генетических повреждений, как считалось ранее, т.е. не за счет так называемых рецессивных и доминантных, летальных мутаций, а за счет повреждений одного типа – двойных разрывов ДНК, вызывающих различные нарушения хромосом. Такие хромосомные мутации являются причиной гибели облученных клеток любой плоидности. Только у гаплоидных клеток эти повреждения абсолютно летальны, и поэтому кривая выживания у них экспоненциальная, т.е. одноударная, а у диплоидных и полиплоидных клеток одно повреждение не является абсолютно летальным и вызывает гибель лишь с некоторой вероятностью, и для гибели таких клеток требуется несколько повреждений, или попаданий. Это обстоятельство обуславливает плечо у их кривых выживания, а также возможность их пострадиационного восстановления. Генные же летальные мутации возникают настолько редко, что практически не обуславливают никакого эффекта не только у диплоидных, но и у гаплоидных клеток. Так как для гибели облу-

ченной диплоидной клетки требуется несколько повреждений (попаданий), то отдельные повреждения вызывают у них лишь хромосомные aberrации, повышающие появление летальных секторов (тем самым обуславливая эффект дорастания), а также жизнеспособные хромосомные мутации, проявляющиеся в форме каскадного мутагенеза.

Таким образом, однотипные лучевые повреждения (двойные разрывы ДНК) и способность клеток к пострадиационному восстановлению обуславливают все особенности реакции клеток на облучение, о чем шла речь выше, а также связь этих особенностей с фактором ploидности. Можно было утверждать общебиологичность этих феноменов и их огромную роль в жизни живых организмов.

По мере изучения кривых выживания дрожжей разных штаммов, как диплоидов, так и гаплоидов, при действии на них излучений с разными физическими характеристиками все более складывалось впечатление, что эффект восстановления лежит в основе так называемой относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ). Создавалось впечатление, что в основе ОБЭ лежит зависимость от ЛПЭ необратимого компонента лучевого поражения клеток. Чтобы окончательно решить этот вопрос, требовались эксперименты на большом интервале ЛПЭ при использовании объектов, способных и неспособных к пострадиационному восстановлению. Технические возможности для проведения таких экспериментов имелись в нашей стране только в Дубне, в Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ). Весной 1977 г. В.И. Корогодина выступает на семинаре в ОИЯИ с предложением провести такие эксперименты с целью выяснить природу ОБЭ. Это предложение получило поддержку со стороны дирекции ОИЯИ, и в конце 1977 г. В.И. Корогодина переезжает на работу в г. Дубну. Здесь он организует сектор биологических исследований (впоследствии – отдел радиобиологии).

За решение проблемы ОБЭ взялся перешедший на работу в сектор Е.А. Красавин вместе с группой молодых сотрудников – выпускниками МИФИ К.Г. Амиртаевым, А.В. Глазуновым и П.Н. Лобачевским, а также молодой математик из Праги С. Козубек. Примерно через десять лет эта работа была завершена. Было действительно установлено, что решающая роль в разной биологической эффективности излучений с разными физическими характеристиками принадлежит свойству клеток спонтанно восстанавливаться от лучевых повреждений. В 1986 г. В.И. Корогодина передал сектор биологических исследований Е.А. Красавину, а сам полностью занялся научной работой.

Пока в секторе проводилась работа по проблеме ОБЭ, В.И. Корогодина занимался и другими задачами. Первая из них – изучение роли теории информации в биологических процессах. Вторая – изучение роли функционального состояния генов в их спонтанной мутабельности. Третья – роль глюкозной нагрузки на клетки злокачественных опухолей в их радиочувствительности. Коротко эти три цикла работ можно охарактеризовать следующим образом.

Анализ логического и математического аппаратов классической теории информации позволил выявить в ней ряд противоречий, в частности, подмену понятия информации представлениями о ее количественной мере. В работах В.И. Корогодина предлагается рассматривать информацию как «руководство

к действию», как необходимый компонент информационных систем, определяющий их свойство совершать то или иное целенаправленное действие. Анализируются разные свойства информации и динамика информационных систем. Показано, в частности, что все информационные системы обладают двумя общими свойствами – аутокатализом и гетерокатализом, не зависящими друг от друга. При этом аутокатализ определяет самовоспроизведение этих систем и кодирующей их информации, а гетерокатализ – изменения, вызываемые этими системами в окружающей среде. Изменчивость самой информации определяет возможность эволюции информационных систем.

Развитие жизни на Земле рассматривается как результат аутогенеза информации. Выделяются три вида информации: генетическая, поведенческая и логическая. Всем трем видам информации присущи одни и те же свойства, но разные специфические носители. Логическая информация, в отличие от двух первых, обуславливает техногенез – развитие технических систем связи и средств производства, присущих человеческим сообществам.

Изучение роли физиологического состояния генов в их спонтанной мутабельности было выполнено совместно с В.Л. Корогодиной. Главной трудностью здесь был выбор систем генов, мутации которых можно улавливать одним и тем же способом, но которые различаются в разных условиях их функциональным состоянием. Таковыми оказались гены, контролирующие синтез аденина. Исходными были штаммы, ауксотрофные по аденину и не способные расти на среде, не содержащей этот метаболит. Как известно, реверсии к прототрофности по аденину могут происходить двумя путями: путем образования обратных мутаций в гене, контролирующем его синтез, и путем прямых мутаций в генах-супрессорах. В специальных опытах было установлено, что в условиях, при которых активность гена *ADE2* подавлена, этот ген образует мутации с частотами, на два порядка меньшими, чем в условиях, когда он активно работает. В то же время гены-супрессоры, активность работы которых не зависит от наличия в среде аденина, в обоих случаях мутируют примерно с одинаковыми частотами.

Несколько позже подобные результаты были получены другими авторами на бактериях (прокариотах), и феномен получил название адаптивный мутагенез.

Третья проблема, разработка которой проводилась в основном совместно с Н.Л. Шмаковой, но осталась незавершенной, – это проблема действия глюкозной нагрузки на клетки злокачественных опухолей. Эта проблема возникла в связи со стремлением понять, почему добавление в среду глюкозы иногда повышает радиочувствительность опухолевых клеток. Эксперименты, проведенные на клетках асцитной карциномы Эрлиха, показали, что сама по себе глюкоза не является радиосенсибилизатором, а вызывает гибель клеток независимо от облучения, если глюкозной нагрузке сопутствует гипоксия (недостаток кислорода в среде). Это, таким образом, проявление давно известного эффекта Пастера: в условиях гипоксии дыхание клеток переключается на брожение, глюкоза активно сбраживается опухолевыми клетками, в них накапливается молочная кислота и они погибают от самозакисления. Такой же эффект можно получить, снижая рН среды, в которой находятся опухолевые клетки, разными другими способами. Это очень интересное явление, свойственное только клеткам злокачественных (но не доброкаче-

ственных!) опухолей, прекрасно воспроизводимое и *in vivo*, и *in vitro*, в том числе и на человеке, как было показано в Институте медицинской радиологии АМН СССР на неоперабельной опухоли языка. Однако дальнейшее развитие этих весьма перспективных для клиники работ было прекращено в связи с обнищанием ОИЯИ и других институтов бывшего СССР¹.

В заключение следует остановиться еще на одной задаче, разрабатываемой В.И. Корогодиным. Она относится к радиационной экологии, которой В.И. Корогодина начал интересоваться еще во время работы на кафедре биофизики биофака МГУ. Это расчет радиоемкости экосистем и повышение радиорезистентности живых организмов под влиянием предварительного слабого облучения – так называемая радиоадаптация.

Первая работа по радиоэкологии была выполнена В.И. Корогодиным (совместно с А.Л. Агре) еще в 1957 г. и опубликована в 1960 г. Она касается вопроса, какое количество радионуклидных загрязнений может быть сброшено в водоем без нарушения его работы как водоема-дезактиватора. Неожиданно для В.И. Корогодина эта работа пригодилась в 1988 г. в связи с загрязнением радионуклидами каскада днепровских водохранилищ после Чернобыльской катастрофы. Как было показано совместно с Ю.А. Кутлахмедовым и Г.Г. Поликарповым, количество радионуклидов, которое может вместить в себя данная экосистема без нарушения режима ее функционирования, и представляет собой меру радиоемкости этой экосистемы.

К вопросам радиоадаптации относится способность клеток осуществлять процесс пострадиационного восстановления во время продолжающегося облучения. Еще в начале 1960-х годов В.И. Корогодина направил своего сотрудника В.Г. Петина в Германию, где в лаборатории проф. Б.Н. Раевского он провел эксперименты по хроническому облучению покоящихся дрожжевых клеток при разных мощностях дозы и при разных температурах. Было установлено, что процессы восстановления происходят не только после прекращения облучения, но и во время лучевого воздействия, причем в обоих случаях закономерности восстановления идентичны. Эти результаты оказались важными в дальнейшем, когда проблема хронического облучения при низких мощностях доз стала особенно актуальной в связи с Чернобыльской катастрофой. В последние годы, основываясь, в частности, и на этих результатах, В.И. Корогодина вместе с В.Л. Корогодиной и Н.А. Зюзиковым стремился понять, чем обусловлено явление радиационной адаптации, когда малые мощности дозы при хроническом облучении повышают радиорезистентность клеток и организмов, что нередко сопровождается различными нарушениями иммунной системы. В основе этого феномена лежат, по-видимому, повреждения массовых структур клеток, что активирует репарационные системы, приводящие к восстановлению клеток от повреждений их уникальных (или генетических) структур.

Одним из наиболее важных открытий XX столетия было обнаружение, доказательство и изучение факта восстановления клеток от радиационных повреждений. Эти исследования заняли больше десяти лет, в них участвовали ученые разных стран. Открытие и основная часть исследований были сделаны в СССР.

Восстановление дрожжевых клеток от радиационных повреждений – первая исследовательская работа Владимира Ивановича Корогодина. Работая с 1953 г. лаборантом на организованной тогда Б.Н. Тарусовым кафедре биофизики МГУ, он обнаружил задержку роста колоний, вырастающих из облученных дрожжей¹ (1956), и три формы инактивации клеток², в том числе отдаленную, через несколько циклов деления, гибель некоторых из них (1957). До этого общепринятым было мнение, что клетки сразу погибают при радиационном повреждении. Молодой ученый заметил, что инактивация клеток связана с митозом, и разработал методику, позволяющую поддерживать митотический покой у клеток дрожжей. Его опыты показали, что клетки в митотическом покое способны восстанавливаться от радиационных повреждений (1957). По предложению Н.В. Тимофеева-Ресовского Корогодина повторил свои опыты в лаборатории Николая Владимировича на озере Большое Миассово (1958). В результате была принята гипотеза, согласно которой первичные радиобиологические повреждения могут иметь потенциальную форму и обратимый характер (1959). Одновременно и независимо Н.В. Лучником и Л.С. Царапкиным был обнаружен эффект восстановления хромосомных нарушений в клетках корешков гороха (1959). В то время многие ученые в нашей стране (в том числе Корогодина) и за рубежом были заняты изучением влияния на эффект восстановления клеточного метаболизма. М. Патрик и Р. Хейнс получили свидетельства об энзиматической природе восстановления (1964). В начале 60-х годов Корогодиным были исследованы чувствительность к облучению разных фаз клеточного цикла, зависимость эффекта облучения от дозы и предложена концепция потенциальных повреждений [1, 2].

Важным этапом исследования восстановления клеток от лучевых повреждений являлось определение роли пloidности в радиочувствительности клеток, чему Владимир Иванович со своими сотрудниками и коллегами посвятил большой цикл работ. Было установлено, что в основе лучевого поражения гаплоидных и диплоидных клеток лежат однотипные повреждения, и вероятность их формирования определяется работой репарационных си-

¹ В.И. Корогодина назвал этот феномен «эффектом дорастания».

² Формы инактивации клеток – формирование облученными клетками разных классов микроколоний с 5–40 и 2–4 клетками, а также одиночных клеток.

стем, которая наиболее эффективна в клетках с не менее чем двумя наборами хромосом.

Одной из очередных задач изучения восстановления клеток от радиационных повреждений было математическое описание эффекта. Владимир Иванович пригласил заняться моделированием эффектов восстановления Ю.Г. Капulyцевича, впоследствии ставшего «классиком количественной радиобиологии» [3]. Совместно со своими молодыми коллегами Ю.Г. Капulyцевичем, В.Г. Петиным, К.М. Близник и другими Владимир Иванович опубликовал цикл статей «Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток». Они показали, что классический принцип попадания, согласно которому радиобиологические реакции обусловлены однотипными повреждениями, приложим лишь для объяснения кривых выживания и эффекта дорастания, а для описания форм инактивации клеток необходимо предположить, что в клетках возникают повреждения разного рода. Ими было также показано, что критическое число повреждений, летальное для клетки, зависит от условий культивирования. Далее они проанализировали клетки, содержащиеся в колониях, выращиваемые из облученных клеток, и пришли к выводу, что потомки облученных клеток несут разное число повреждений, т.е. разные реакции клеток на облучение неоднозначно связаны с определенным числом повреждений соответствующих мишеней. Эти работы имели продолжение в цикле «Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов» («каскадный мутагенез»), в котором приняли участие те же авторы. Основным объектом в экспериментах Владимира Ивановича оставались дрожжи, хотя часто исследования были выполнены на клетках других организмов. Многие из этих работ были осуществлены совместно с Юлией Викторовной Корогодиной [4].

Необходимо отметить, что хотя В.И. Корогодина был участником жарких дискуссий между разработчиками принципа попадания и теории мишени и «структурно-метаболической гипотезы», однако неоднократно подчеркивал, что «оба этих направления – структурно-метаболическое и количественное – должны быть тесно связанными и взаимодополняющими» (1967).

Завершением исследований по классической радиобиологии В.И. Корогодина считал получение доказательства участия процессов восстановления в проявлении зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) от линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучений. Такие данные для эукариотов были впервые получены В.Г. Петиным [5]. Идея получила дальнейшую проработку под руководством В.И. Корогодина в Объединенном институте ядерных исследований, где в 1979 г. он организовал Сектор биологических исследований. Концепцию зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений он изложил, совместно с Е.А. Красавиным, в статье, опубликованной в 1982 г. [6]. В дальнейшем эту тему стали вести Е.А. Красавин [7] и молодые выпускники МИФИ К.Г. Амиртаев, А.А. Глазунов, П.Н. Лобачевский.

Исследования восстановления в 60-е г. прошлого столетия велись и в других лабораториях. Значительный вклад сделали ученые И.А. Захаров, В.П. Парибок [8], преемник Парибока В.Д. Жестянников [9], а также В.М. Михельсон, Н.В. Томилин [10], А.И. Газиев, В.М. Глазер. Исследования В.М. Михельсона, Н.В. Томилина, В.М. Глазера продолжаются до настоящего времени. В конце статьи, посвященной домолекулярным исследованиям

пострадиационного восстановления, Корогодин написал, что «исследования, результаты которых я описал, не могли бы быть выполнены без участия многих других авторов, ⟨...⟩ акад. Надсона и его школы, ⟨...⟩ Лакассаня и Хольвека ⟨...⟩, Альпер, Инге-Вечтомова, Латарже, Мортимера, Накаи, Сарачека, Тобайса, Захарова и их сотрудников, а также других исследователей, которые изучали генетику, радиобиологию и молекулярную биологию дрожжей, этих замечательных одноклеточных эукариот» [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966. 330 с.
2. *Корогодин В.И.* Восстановление клеток от повреждений, вызываемых ионизирующими излучениями: некоторые сравнительные аспекты // *Радиобиология*. 1967. Т. 7, № 5. С. 728–743.
3. *Капульцевич Ю.Г.* Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.
4. *Корогодин В.И., Корогодина Ю.В.* Восстановление клеток от повреждений. М.: Знание, 1976.
5. *Петин В.Г.* ОБЭ плотниоизирующих излучений и восстановление клеток // *Медицинская радиология*. 1977. Т. 22, № 10. С. 8–12.
6. *Корогодин В.И., Красавин Е.А.* Факторы, определяющие различия в биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками // *Радиобиология*. 1982. Т. 22, № 6. С. 727–738.
7. *Красавин Е.А.* Проблема ОБЭ и репарации ДНК. М.: Энергоатомиздат, 1989.
8. *Пострадиационная репарация* / Под ред. В.П. Парибока. М.: Атомиздат, 1960. 335 с.
9. *Жестянников В.Д.* Восстановление и радиорезистентность клетки. М.: Л.: Наука, 1968. 351 с.
10. *Томилин Н.В.* Генетическая стабильность клетки. М.; Л.: Наука, 1983. 156 с.
11. *Корогодин В.И.* Домолекулярный период исследований пострадиационного восстановления клеток // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1999. № 6. Т. 39. С. 597–604.

1.1. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ ЭФФЕКТА ВОССТАНОВЛЕНИЯ

ФОРМЫ ИНАКТИВАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИЕЙ

Ранее нами было показано, что степень торможения первого почкования дрожжевых клеток после облучения их ионизирующей радиацией связана с величиной дозы иными количественными соотношениями, нежели утрата такими клетками способности неограниченного размножения. Это обстоятельство позволило сделать вывод, согласно которому торможение первого почкования не является окончательным эффектом облучения, а представляет собой лишь одно из первых звеньев цепи процессов радиационного последствия, развивающихся в облученных клетках и приводящих к необратимой инактивации в более поздние сроки [1, 2]. Возник вопрос о выявлении сроков окончательной утраты клетками способности неограниченного размножения, или, другими словами, о динамике пострадиационных изменений таких клеток.

Хотя сам факт отдаленной инактивации облученных ионизирующей радиацией дрожжевых клеток описан многими авторами [3–7], количественная сторона этого явления до сих пор не подвергалась тщательному изучению. В частности, оставалось невыясненным, после какого количества циклов размножения наступает инактивация и может ли такая инактивация иметь обратимую форму, а также какими соотношениями связаны различные типы радиационного поражения дрожжевых клеток с величиной дозы. Эти вопросы имеют прямое отношение к выяснению механизма действия ионизирующих излучений, что побудило нас специально изучить их. Принципиальное значение имело также выяснение зависимости форм инактивации дрожжевых клеток от фактора пloidии, которому некоторые авторы [6, 8–11] приписывают определенную роль в механизме радиобиологического эффекта.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили диплоидные дрожжи *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В и естественные гаплоидные дрожжи *Zygosaccharomyces bailii*, полученные нами от проф. В.И. Кудрявцева, а также гаплоидный штамм XII расы пивных дрожжей, выведенный из диплоидного штамма и любезно предоставленный нам проф. К.В. Косиковым¹. 48-Часовая культура дрожжей на твердой среде (выращенная при 30 °С) суспендировалась в стерильной водопроводной воде и облучалась γ -лучами на установке ГУТ-Со-400. Концентрация клеток в суспензии составляла примерно 0,5 млн/мл, содержание почкующихся особей не превышало 0,1–0,2%, мощность дозы равнялась 1070 Р/мин, величина дозы варьировала от 7,5 до 885,5 кР.

Основные сведения о характере пострадиационного торможения почкования у облученных дрожжевых клеток были получены путем изуче-

¹ Автор пользуется случаем выразить глубокую признательность проф. В.И. Кудрявцеву и проф. К.В. Косикову за ценные консультации и помощь в работе.

ния препаратов фиксированных микроколоний, которые приготавливались следующим способом. Капля дрожжевой суспензии размазывалась шпателем по поверхности предметного стекла, покрытого тонким слоем питательного агара. Препараты инкубировались во влажной камере требуемое время при 30 °С, а затем обрабатывались парами формалина и высушивались при 45–50 °С. На хорошо приготовленных препаратах микроколонии прекрасно сохраняют свою форму, отдельные клетки четко видны. Такие препараты можно изучать в неокрашенном виде при увеличении в 100 или 200 раз.

На препаратах, зафиксированных после различных сроков инкубации, определялось относительное количество микроколоний, содержащих то или иное число клеток. В различных точках препарата просчитывалось 1000–1500 микроколоний. Почка принималась за отдельную клетку. Микроколонии, состоящие из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7–12, 13–24, 25–48, 49–99, 100–200 и более чем 200 клеток, относились к разным классам. Следовательно, последние шесть классов объединяли колонии, возникшие в результате трех и большего числа циклов размножения исходной клетки.

Облучению в наших опытах подвергался заведомо непочкующийся материал, при высеве на питательный субстрат клетки распределялись равномерно и поодиночке, а большое число просчитывавшихся колоний обеспечивало высокую достоверность результатов. Вариабельность данных, как правило, не превышала 3–5% в параллельных и 10% в повторных опытах. Полученные результаты позволили составить определенное представление о динамике роста микроколоний в контроле и после облучения разными дозами γ -лучей, а также обнаружить наличие различных форм инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Изучение количественных закономерностей пострадиационных изменений проводилось на *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В. Динамика роста микроколоний изображена на рис. 1. Необлученные дрожжевые клетки, высеванные на питательный агар, начинают образовывать почки при 30 °С примерно после 60–70 мин инкубации. В скором времени процесс почкования охватывает все клетки популяции, и к концу 4-го часа инкубации в культуре, как правило, не остается ни одной одноклеточной формы (рис. 1, 1). После завершения первого почкования клетки вступают во второй цикл размножения (рис. 1, 2). Двуклеточные формы сменяются четырехклеточными (реже – трехклеточными), «пары» превращаются в «цепочки», а затем в «веточки» клеток (рис. 1, 3). После следующих трех-четырёх циклов почкования «веточки» сменяются «дисками», типичными для нормально размножающихся на твердой питательной среде дрожжевых клеток чечевицеобразными формами микроколоний, состоящими из компактно расположенных мелких интенсивно вегетирующих особей (рис. 1, 2 и рис. 2, 1). Дальнейший рост микроколоний, вплоть до макроскопических размеров, осуществляется в этой форме «дисков».

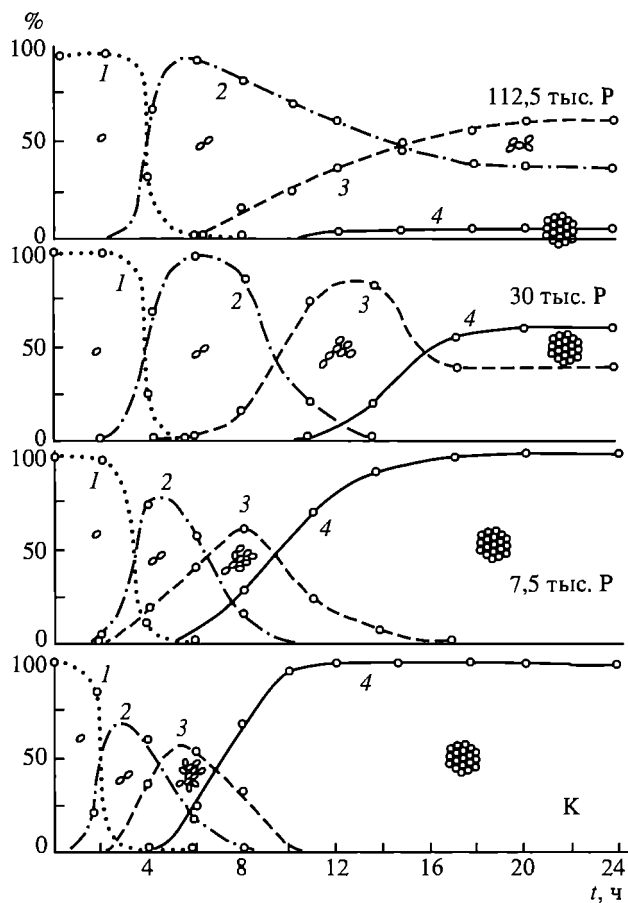


Рис. 1. Динамика смены форм микроколоний в течение 24 ч инкубации при 30 °С

Распределение различных форм микроколоний (в % от числа всех колоний) при разных дозах облучения; 1 – «единицы»; 2 – «пары»; 3 – «цепочки»; 4 – «диски», К – контроль

Облучение дрожжевых клеток существенно изменяет динамику их почкования. Прежде всего облученные клетки испытывают торможение первого почкования, носящее обратимый характер вплоть до доз в 350 кР. Как и в случае инкубации дрожжевых клеток в жидкой среде [2], задержку первого почкования испытывают все облученные клетки, высеянные на питательный агар, причем продолжительность этой задержки не превышает двух часов, а с увеличением дозы обнаруживается эффект насыщения.

После первого почкования размножение облученных дрожжевых клеток вновь тормозится. Продолжительность задержки второго почкования быстро возрастает с ростом дозы и значительно варьирует у разных клеток облученной популяции (см. рис. 1, 2). Обратимость этого эффекта облучения значительно ниже, нежели обратимость торможения первого почкования.

После осуществления второго почкования облученные дрожжевые клетки обычно почкуются два-пять раз в несколько замедленном темпе, а затем некоторые из них начинают размножаться с обычной скоростью, другие же

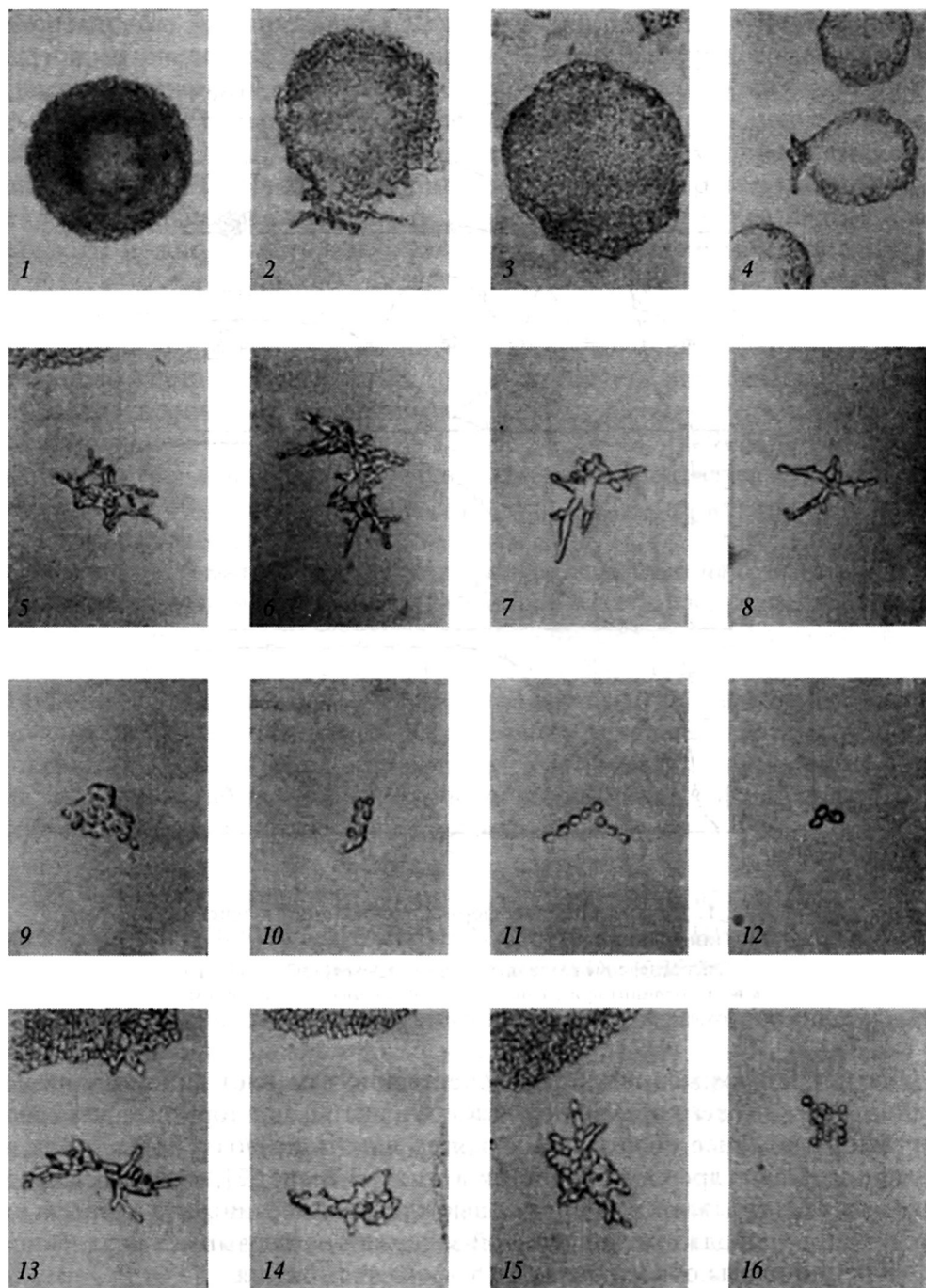


Рис. 2. 24-Часовые микроколонии дрожжей разной пloidии.

Диплоидные дрожжи, доза 30 кР: 1 – нормальная колония, «диск» (увеличение 10×7); 2 – форма восстановления (увеличение 20×7); формы отдаленной инактивации, «цепочки» 5 и 6 (увеличение 20×7), 7 и 8 (увеличение 40×7). Естественные гаплоидные дрожжи, доза 15 кР; 3 – нормальная микроколония (увеличение 20×7), 9–12 – формы отдаленной инактивации (увеличение 40×7). Искусственные гаплоидные дрожжи, доза 15 кР; 4 – форма восстановления (увеличение 10×7); 13–16 – формы отдаленной инактивации (увеличение 40×7)

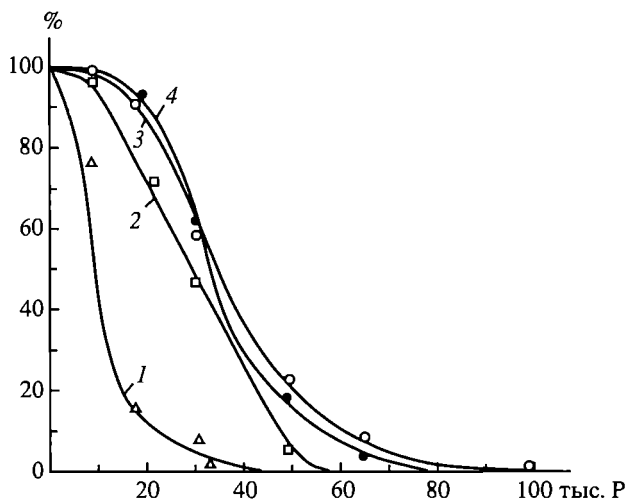


Рис. 3. Зависимость относительного числа «дисков» (в % от числа всех колоний) от дозы облучения после разных сроков инкубации.

1 – 12 ч; 2 – 18 ч; 3 – 24 ч. инкубации; 4 – кривая выживаемости, полученная стандартным методом подсчета макроколоний на чашках Петри

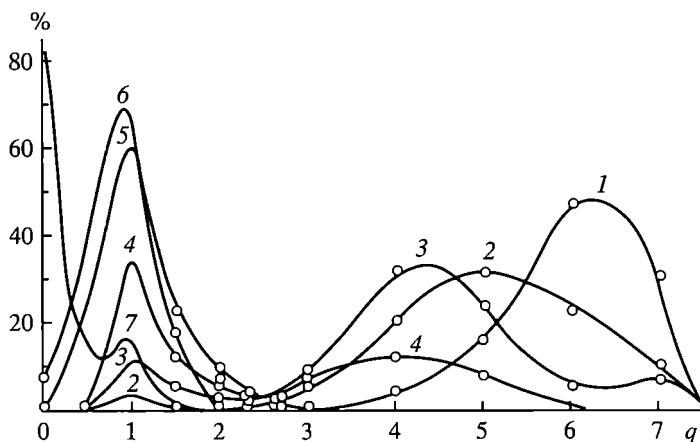


Рис. 4. Распределение инактивированных микроколоний (в % от общего количества погибших клеток) в зависимости от среднего числа циклов размножения (q) исходной клетки, при разных дозах облучения: 16 (1), 49 (2), 65 (3); 97 (4); 162 (5); 432 (6); 639 кР (7)

испытывают третье подавление размножения (см. рис. 1, 3). Относительное количество клеток, претерпевающих нарушение репродуктивной функции после четырех-семи циклов почкования, зависит от дозы, а само явление отдаленного торможения почкования почти или полностью необратимо.

Таким образом, облученные γ -лучами дрожжевые клетки при последующем выращивании их на твердой питательной среде испытывают три пе-

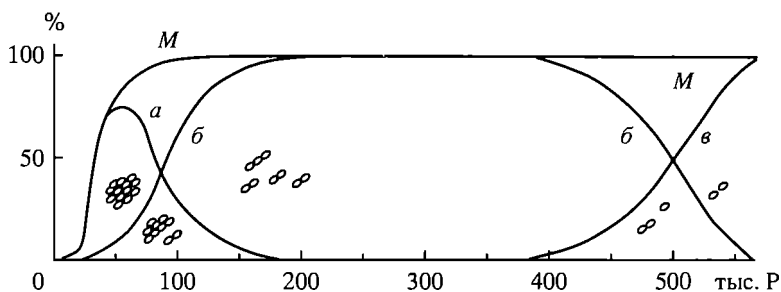


Рис. 5. Зависимость разных форм инактивации дрожжевых клеток от величины дозы.

М — суммарная кривая поражения; *а* — инактивация после четырех-семи циклов почкования; *б* — после одного почкования; *в* — инактивация без предварительного размножения

риода депрессии. Первый период выражается в задержке первого почкования, охватывает все клетки, продолжается не более двух часов и оказывается обратимым для всех индивидуумов при дозах облучения, не превышающих 350 кР. Второй период, также охватывающий все клетки, выражается в задержке второго почкования, продолжительность его увеличивается с ростом дозы, а количество способных к восстановлению клеток при этом быстро убывает. Третье подавление почкования наступает после завершения четырех-семи циклов размножения, затрагивает лишь часть клеток и обычно носит необратимый характер.

Изменение динамики почкования дрожжевых клеток после облучения их γ -лучами хорошо объясняет ранее описанное нами [1] явление замедленного формирования развивающихся из таких клеток макроколоний. Действительно, отличие облученных культур от контроля наиболее значительно при кратких сроках инкубации. С течением времени оно уменьшается и, достигнув определенного значения примерно после 20–24 ч выращивания при 30 °С, далее почти не изменяется (рис. 3). Из анализа рис. 3 следует, что микроколонии могут испытывать инактивацию лишь на стадиях развития, предшествующих образованию «дисков». Дiskoобразная же форма служит признаком здоровой, нормально развивающейся колонии. Процессы реактивации в облученных клетках практически полностью завершаются в течение 24 ч их инкубации при 30 °С, а микроколонии, не успевшие к этому времени превратиться в «диски», обречены на гибель.

Распределение прекративших развитие микроколоний по классам, содержащим колонии, образовавшиеся после различного числа циклов почкования, показано на рис. 4. Характер распределения форм инактивации при разных дозах облучения подтверждает высказанное выше положение о наличии трех разных типов гибели облученных дрожжевых клеток. После облучения невысокими дозами (порядка 10 тыс. Р) основная масса клеток утрачивает способность к почкованию лишь после четырех-семи циклов размножения. Такие формы отдаленной активации состоят из 16–150 клеток и представляют собой рыхлые микроколонии неправильных очертаний, слагающиеся из несколько гипертрофированных особей (см. рис. 2, 5–8). С ростом дозы максимум этой формы инактивации снижается и несколько сдвигается влево при одновре-

менном быстром возрастании доли микроколоний, инактивированных на двухклеточной стадии развития. Дальнейшее увеличение дозы радиации приводит к необратимой инаktivации клеток без предварительного размножения.

На рис. 5 показан характер зависимости каждой из трех форм инаktivации от дозы. Из рисунка видно, что кривая поражения дрожжевых клеток ионизирующей радиацией, получаемая стандартным методом подсчета макроколоний на чашках Петри, представляет собой сумму трех кривых, каждая из которых описывает зависимость от дозы той или иной формы инаktivации. Для каждой из этих кривых характерно наличие определенных пороговых доз.

ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА ПЛОИДИИ В ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

В радиобиологической литературе существует представление, согласно которому способность к реактивации и явление отдаленной гибели тесно связаны с пloidией и присущи лишь диплоидным и полипloidным дрожжевым клеткам [8–10, 12]. Что же касается дрожжевых клеток гапloidных штаммов, то последние, согласно этому представлению, погибают после облучения ионизирующими излучениями либо без предшествующего деления, либо в форме двухклеточной микроколонии, а явления восстановления у них вообще не наблюдается. Основанием для такого воззрения послужили, во-первых, результаты микроскопического изучения микроколоний, образующихся в течение 20-часовой инкубации при 25 °С из облученных рентгеновыми лучами клеток диплоидного и выведенного из него гапloidного штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [8]. Во-вторых, было показано, что в то время как неравномерность размеров макроколоний, образующихся из облученных диплоидных дрожжей, значительно отличается от контроля, у гапloidных штаммов облучение не влияет на этот показатель повреждения [12]. Зависимость форм инаktivации от фактора пloidии обычно расценивается как одно из доказательств генетической природы летального радиобиологического эффекта [8–10].

С целью проверки изложенного выше представления о роли фактора пloidии в пострадиационных изменениях дрожжевых клеток мы провели изучение форм инаktivации естественной и искусственной (полученной из диплоидного штамма) гапloidных дрожжевых культур. Заранее предполагая, что количественные закономерности пострадиационных изменений гапloidных клеток (как то: кривая выживания, динамика почкования, соотношение различных форм инаktivации и т.п.) имеют иной характер, нежели таковые у диплоидов, мы, тем не менее, ограничили свою задачу изучением чисто качественной стороны вопроса, имеющей в данном случае принципиальное значение.

Изучение фиксированных препаратов, приготовленных из облученных разными дозами (от 7,5 до 60 кР) гапloidных дрожжевых клеток, показало прежде всего наличие многоклеточных форм инаktivации у обоих использованных нами гапloidных штаммов. Гапloidные дрожжевые клетки, облученные среднелетальными дозами γ -лучей, нередко погибали после трех, четырех, пяти и более циклов размножения, в форме многоклеточной микро-

колонии (см. рис. 2, 9–16), аналогично тому, что мы видели выше у диплоидных дрожжей (см. рис. 2, 5–8). Однако фигуры отдаленной инактивации клонов гаплоидных штаммов обычно состояли из меньшего количества особей, чем у диплоидных дрожжей.

Кроме фигур отдаленной инактивации, на препаратах, приготовленных из облученных гаплоидных дрожжевых клеток, внимание привлекает еще один тип микроколоний, а именно фигуры восстановления. Фигуры отдаленной реактивации легко можно отличить от нормальных форм микроколоний по характерным «цепочкам» или «веточкам» гипертрофированных при реактивации особей, расположенных у края дискообразной микроколонии, сформировавшейся из потомков этих клеток. У диплоидных дрожжей реактивация осуществляется главным образом после первого деления; депрессия, затрагивающая четвертый–седьмой циклы размножения, обычно бывает необратимой. Иногда у диплоидных клеток возможно восстановление нормальной репродуктивной функции и после довольно продолжительного депрессионного периода (см. рис. 2, 2), однако количество фигур отдаленного восстановления на препаратах, приготовленных из облученных диплоидных клеток, весьма невелико. У дрожжевых клеток гаплоидных штаммов, напротив, случаи восстановления нормальной репродуктивной способности после депрессии, затрагивающей три–четыре поколения облученной клетки (рис. 2, 4), встречаются значительно чаще.

Возникает вопрос: почему же инактивация гаплоидных дрожжевых клонов после нескольких циклов размножения не была обнаружена предыдущими исследователями? Причину этого, по-видимому, следует искать в особенностях применявшихся ими методик. Так, в опытах Гюнтера и Кона по изучению размеров макроколоний [12] отсутствие у гаплоидного штамма зависимости этого параметра от облучения можно объяснить кратковременностью пострадиационной депрессии, испытываемой неинактивированными гаплоидными клетками: как известно, задержка почкования у облученных гаплоидных дрожжей значительно менее продолжительна, нежели у диплоидных, несмотря на их большую радиочувствительность [7]. Что же касается наблюдений Латарже и Эфрусси [8], то они могли быть обусловлены либо физиологическими особенностями изучавшихся ими клеток (ведь они облучали растущую популяцию), либо применявшимися этими авторами дозами рентгеновых лучей. Действительно, как видно из рис. 5, при достаточно высоких дозах облучения даже диплоидные дрожжевые клетки гибнут без предварительного размножения или после одного почкования. Гаплоидные дрожжи более чувствительны к действию радиации, чем диплоидные [11], и картина инактивации тех и других после облучения одинаковыми дозами, конечно, должна носить различный характер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, после облучения ионизирующей радиацией поврежденными в той или иной степени оказываются все дрожжевые клетки. Это хорошо заметно даже при сравнительно невысоких дозах и выражается в задержке начала почкования у всех клеток облученной популяции. В дальнейшем лучевое поражение у облученных клеток развивается волнообраз-

но: периоды депрессии размножения сменяются периодами восстановления. После продолжительной инкубации (48–96 ч при 30 °С) обратимое нарушение темпа размножения облученных клеток приобретает макроскопически выраженный характер и проявляется в уменьшении размеров и увеличении степени дисперсии диаметров колоний [1]. Трём периодам депрессии соответствуют и три определенные формы гибели облученных клеток. Наблюдаются три пика инактивации, время наступления которых почти не зависит от величины дозы: изменение дозы влияет лишь на относительное количество клеток, инактивированных тем или иным образом.

Подобная же динамика радиационного поражения наблюдается у позвоночных [13, 14], насекомых [15], кишечнорастворимых [16], низших червей [17] и других объектов [18, 19], для которых характерна волнообразность развития лучевого поражения и более или менее строго фиксированное время максимумов гибели. У одноклеточных динамика радиационного последствия достаточно тщательно изучалась лишь на некоторых инфузориях [20], причем полученные в этих случаях данные хорошо согласуются с отмеченными выше закономерностями. Кроме того, в работах многих авторов содержится фактический материал, позволяющий предположить значительно более широкое распространение волнообразного характера лучевого последствия в мире одноклеточных организмов. Так, описана отдаленная во времени гибель облученных ионизирующей радиацией жгутиковых [21] и водорослей [22], инактивация кишечной палочки в форме многоклеточных микроколоний [23], эффект отдаленного последствия у азотобактера и клубеньковых бактерий [24]. Весьма важными с этой же точки зрения являются данные о периодическом изменении чувствительности к вредным воздействиям, наблюдающемся в пострадиационный период у парамеций [25].

Необходимо отметить, что волнообразность развития эффекта последствия имеет место не только при поражении клеток ионизирующей радиацией. Аналогичное явление наблюдалось и на парамециях, облученных ультрафиолетовыми лучами [26–28]. Отдаленное последствие может быть вызвано некоторыми химическими агентами. Например, при введении зараженному малярией животному препарата хлорида гифелы плазмодиев происходит лишь спустя значительный промежуток времени после попадания их в организм комара, на ранней стадии дробления зиготы, возникающей половым путем². Известны также эффекты длящегося развития поражения после кратковременной экспозиции инфузорий в растворе метиленовой сини [26] и после обработки клеток некоторыми другими веществами [29–32].

Характер динамики радиационного последствия у дрожжевых клеток и формы зависимости разных типов инактивации от величины дозы делают весьма затруднительным, если не невозможным, объяснение отдаленной гибели облученных одноклеточных организмов мутационными изменениями, как это предлагают, например, Атвуд и Стэплтон [33]. Как указывает Кимбол [20], теории наследственных изменений неизвестен тип мутаций, способных оказывать такое действие на скорость размножения одноклеточных, от которого вначале происходит частичное или полное восстановление, а затем

² Этими сведениями автор обязан проф. Ш.Д. Мошковскому, которому пользуется случаем выразить свою глубокую признательность.

наступает почти неизбежная гибель 4–10-го поколения клетки, претерпевшей эту мутацию. Веским доводом против гипотезы о генетической природе пострадиационной гибели одноклеточных организмов может служить также описанный выше факт наличия многоклеточных форм инактивации у искусственного и естественного штаммов гаплоидных дрожжей.

Логичнее предположить, что причиной отдаленной гибели облученных дрожжевых клеток являются какие-то процессы радиационного последствия, возникающие в этих клетках при поглощении определенного количества энергии излучения и обладающие различными кинетическими параметрами, что и обуславливает волнообразность развития поражения. Торможение клеточного деления, с этой точки зрения, может являться следствием достижения этими процессами определенных пороговых значений, а явление реактивации – следствием затухания таких процессов и восстановления вызванных ими изменений.

Какова же возможная природа процессов радиационного последствия? Ранее мы отмечали [34], что кинетические особенности развития лучевого поражения у одноклеточных не противоречат гипотезе цепного механизма биологического действия ионизирующих излучений, развиваемой Тарусовым [35]. Однако это обстоятельство, конечно, не исключает других объяснений, если таковые окажутся более приемлемыми. Динамика радиационного поражения у одноклеточных еще весьма слабо изучена, и строить более определенные предположения относительно механизма этого явления нам кажется пока преждевременным.

ВЫВОДЫ

1. Дрожжевые клетки, инкубируемые после облучения γ -лучами на твердой питательной среде при 30 °С, проходят три периода торможения почкования, различающиеся по форме зависимости от дозы, по степени обратимости и по характеру распределения внутри облученной популяции.

2. Облученные γ -лучами дрожжевые клетки обнаруживают три формы инактивации: без предшествующего почкования, после одного, редко двух почкований и после четырех–семи циклов размножения. Распределение форм инактивации внутри облученной популяции зависит от дозы.

3. Явления отдаленной инактивации (после нескольких циклов размножения) и восстановления не находятся в прямой зависимости от фактора плоидии и наблюдаются у клеток как диплоидных, так и гаплоидных штаммов дрожжей, по крайней мере, после облучения γ -лучами покоящихся, непочкующихся культур.

4. Высказывается предположение, что волнообразность развития лучевого поражения является характерной особенностью реакции на облучение ионизирующими излучениями не только для многоклеточных, но и для многих видов одноклеточных организмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И. // Биофизика. 1957. Т. 2. С. 178.
2. Корогодин В.И. // Биофизика. 1957. Т. 5. С. 576.
3. Надсон Г.А. // Вестн. рентгенол. и радиол. 1920. Т. 1. С. 45.

4. *Holweck F., Lacassagne A.* // *Compt. rend. Soc. Biol.* 1930. Vol. 103. P. 60.
5. *Wyckoff R. W.G., Luyet B. J.* // *Radiology.* 1931. Vol. 17. P. 171.
6. *Henshaw P.S., Turkowitz H.* // *Amer. J. Roentgenol.* 1940. Vol. 43. P. 93.
7. *Burns V.W.* // *Radiation Res.* 1956. Vol. 8. P. 394.
8. *Latarjet R., Ephrussi B.* // *Compt. rend. Acad. Sci.* 1949. Vol. 229. P. 306.
9. *Latarjet R.* // *Acta radiol.* 1954. Vol. 41. P. 84.
10. *Латарже Р.* // *Радиобиология.* М.: Изд-во иностр. лит., 1955. С. 275.
11. *Tobias C.A.* // *Acta radiol.* 1954. Vol. 41. P. 105.
12. *Gunter S.E., Kohn H.J.* // *J. Bacteriol.* 1956. Vol. 71. P. 124.
13. *Раевский Б.* // *Вопросы радиобиологии.* М.: Изд-во иностр. лит., 1956. С. 133.
14. *Лучник Н.В.* // *Биофизика.* 1957. Т. 2. С. 487.
15. *Сумаруков Г.В.* // *Биофизика.* 1958. Т. 2 (в печати).
16. *Поликартов Г.Г.* // *Биофизика,* 1957. Т. 2. С. 173.
17. *Шмидт Н.К.* // *Вопросы радиобиологии.* Л.: Медгиз, 1956. С. 132.
18. *Tansley K., Spear F. G., Clücksmann A.* // *Brit. J. Ophthalmol.* 1937. Vol. 21. P. 273.
19. *Back R.* // *Compt. rend. Soc. Biol.* 1939. Vol. 131. P. 1103.
20. *Bridgmen J., Kimball R. F.* // *J. Cell. Compt. Physiol.* 1954. Vol. 44. P. 431.
21. *Ralston H.J.* // *Amer. J. Cancer.* 1939. Vol. 37. P. 288.
22. *Bonham K., Palumbo R.F.* // *Growth.* 1951. Vol. 15. P. 155.
23. *Hautermans T.* // *Strahlentherapie.* 1954. Vol. 55. P. 130.
24. *Сокурова Е.Н.* // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1956. Т. 6. С. 35.
25. *Ковалева Н.Е.* Исследование действия рентгеновых лучей на *Paramecium caudatum*. Диссертация. М., 1947.
26. *Александров В.Я.* // *Тр. Ин-та цитол., гистол. и эмбриол. АН СССР.* 1948. Т. 3. С. 3.
27. *Ковалев И.Ф.* // *Уч. зап. Экспер. ин-та глазных болезней им. Филатова.* 1949. Т. 1. С. 385.
28. *Kimball R.F., Geckler R.P., Gouther N.* // *J. Cell. Compt. Physiol.* 1953. Vol. 40. P. 427.
29. *Schaxel I.* // *Zool. Jahrb. Abt. Anat.* 1914. Vol. 37. P. 193.
30. *Behrend K.* // *Arch. Protistenkunde.* 1916. Vol. 36. P. 185.
31. *Broch N., Druckrey H., Herken H.* // *Arch. exp. Pathol. Pharm.* 1939. Vol. 193. P. 711.
32. *Гаузе Г.Ф., Смагардова Н.П., Алпатов В.В.* // *Биол. журн.* 1938. Vol. 8. P. 763.
33. *Atwood K.C., Stapleton G.E.* // *Naturwissenschaften.* 1952. Vol. 39. P. 330.
34. *Корогодин В.И., Поликартов Г.Г.* // *Успехи соврем. биол.* 1957. Vol. 44. P. 93.
35. *Тарусов Б.Н.* // *Основы биологического действия радиоактивных излучений.* М.: Медгиз, 1954.

FORMS OF YEAST CELL INACTIVATION BY IONIZING IRRADIATION

V.I. Korogodin

Conclusions

1. Yeast cells that are incubated after irradiation (γ -rays) on a solid medium at 30 °C undergo three periods of cell budding inhibition differing in the form of their dependence on the irradiation dose, in the reversibility degree and in the character of distribution within the irradiated population.

2. Irradiated yeast cells reveal three forms of inactivation: without a preceding budding after one or rarely two buddings and after 4–7 cycles of reproduction. The distribution of the inactivation forms within the irradiated population depends on the dose.

3. The phenomena of distant inactivation (after several cycles of reproduction) and of the recovery are not in direct relation to the ploidy factor and were observed both in haploid in haploid and diploid yeast strains, at least after the irradiation by γ -rays of resting, not budding cultures.

4. An assumption is stated that the wave-like development of the radiation injury presents a characteristic feature of the response of numerous unicellular species to ionizing irradiation.

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОКОЯЩИХСЯ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Ранее было показано, что при облучении дрожжевых клеток частично-летальными дозами γ -лучей инактивация наступает лишь спустя некоторое время после воздействия радиации, после осуществления клетками определенного количества циклов размножения [1]. Возникают вопросы: какова связь между пострадиационными изменениями клеток и их размножением? Служит ли торможение клеточного деления пассивным показателем достижения процессами лучевого последействия определенных пороговых значений или же делению клеток принадлежит активная роль в самом развитии этих процессов? Некоторые данные, полученные нами в направлении решения этих вопросов, приводятся в настоящей статье.

1. ОКРАШИВАЕМОСТЬ НЕВИТАЛЬНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И СПОНТАННЫЙ ЛИЗИС

ВВЕДЕНИЕ

Гибель клетки можно констатировать по окрашиваемости ее невитальными красителями [2] или по распаду, лизису клеточного протопласта. При этом необходимо учитывать, что метод окраски позволяет обнаружить лишь те из погибших клеток, которые еще не успели подвергнуться лизису.

Насколько нам известно, ни изменение окрашиваемости, ни скорость спонтанного лизиса облученных одноклеточных до сих пор никем подробно не изучались. В литературе имеются лишь отрывочные указания на отсутствие отличия облученных частично-летальными дозами рентгеновых лучей дрожжевых клеток от контроля при окраске их вскоре после воздействия радиацией и на несколько более ускоренный по сравнению с нормой лизис в облученных бактериальных культурах [3].

МЕТОДИКА

В наших опытах состояние митотического покоя достигалось содержанием облученных и контрольных дрожжевых клеток в стерильной водопроводной воде или на непитательном агаре. В качестве источника излучения использовали установку ГУТ-Со-400, мощность дозы составляла 1020 рад/мин, продолжительность облучения варьировалась. Объектом исследования, как и в предыдущих опытах [1], служили *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В. Облучению подвергалась суспензия неделящихся клеток (возраст культуры 48 ч при 30 °С, косой суслоагар) густотой около $6 \cdot 10^5$ клеток/мл.

Испытав несколько красителей (метиленовый синий, нейтральный красный, генцианвиолетт и др.), мы в качестве показателя жизнеспособности клеток избрали эритрозин, рекомендованный проф. Я.П. Худяковым. Водный 0,1%-ный раствор эритрозина быстро окрашивает мертвые клетки в яркий пурпурный цвет. Контрольные и облученные дрожжи инкубировались

требуемое время в непитательной среде при 30 °С, а затем их прокрашивали указанным красителем в течение 30 мин. Относительное содержание окрашивающихся форм определяли путем просчета в образцах 1000 клеток.

Параллельно с изучением окрашиваемости определяли скорость спонтанного лизиса. Клетки, облученные разными дозами, и контрольные высеивали на предметное стекло, покрытое непитательным агаром (2% агара на водопроводной воде), и инкубировали во влажной камере при 30 °С. Тотчас после облучения и затем каждые 24–48 ч в одних и тех же точках препарата подсчитывали количество нормальных форм дрожжевых клеток. На каждом препарате под наблюдением находилось от 1200 до 1700 клеток. Просчет производили под микроскопом, при увеличении 20 × 10. Живые клетки при таком увеличении имеют вид выпуклых блестящих пузырьков. Отмирающие клетки мутнеют, приобретают плоскую форму, затем начинается распад клеточной оболочки и центральной части протопласта; на агаре вокруг такой клетки появляется специфическая «зона сияния», клетка окружается мелкими гранулами и, наконец, расплывается, исчезает.

Окрашиваемость и скорость спонтанного лизиса определяли после облучения разными дозами на протяжении 10-суточной инкубации. Опыты ставили в двух повторностях. Вариабельность результатов, как правило, не превышала 10–15%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано на рис. 1, в суспензиях, облученных дозами порядка 10–20 кР, содержание окрашивающихся форм в течение всего опыта оставалось несколько ниже, чем в контроле. При дозах порядка 100–300 кР эта величина, достигнув в течение 3–4 сут 6–8%, т.е. несколько превысив контроль, далее сохранялась на таком же уровне. После облучения дрожжевой суспензии дозой в 500 кР наблюдалась иная картина. Содержание окрашивающихся клеток быстро возрастало в первые часы после облучения и через 1 сут достигало 46–52%. Затем величина начинала падать, по-видимому, за счет лизиса отмирающих клеток и, снизившись к четырем суткам до 18–20%, сохранялась до конца опыта на этом уровне на фоне заметного уменьшения концентрации клеток в суспензии.

Полученные данные позволили предположить, что при относительно невысоких дозах облучения быстрота отмирания клеток в покоящейся культуре незначительно отличается от таковой контроля. При облучении же суспензии дозой порядка 100 кР часть клеток отмирает быстро, в течение суток, тогда как остальные особи облученной популяции по скорости спонтанного лизиса незначительно отличаются от клеток, облученных меньшими дозами.

Как мы уже отмечали, содержание в суспензии окрашивающихся форм равно разности относительного количества отмирающих и уже успевших лизироваться клеток. Поэтому приведенные выше данные скорее характеризуют физиологическое состояние оставшихся в живых членов популяции, нежели отражают скорость спонтанного лизиса всех клеток культуры. Прямые сведения о характере последнего процесса были получены в опытах с высеиванием облученных клеток на непитательный агар, результаты которых изо-

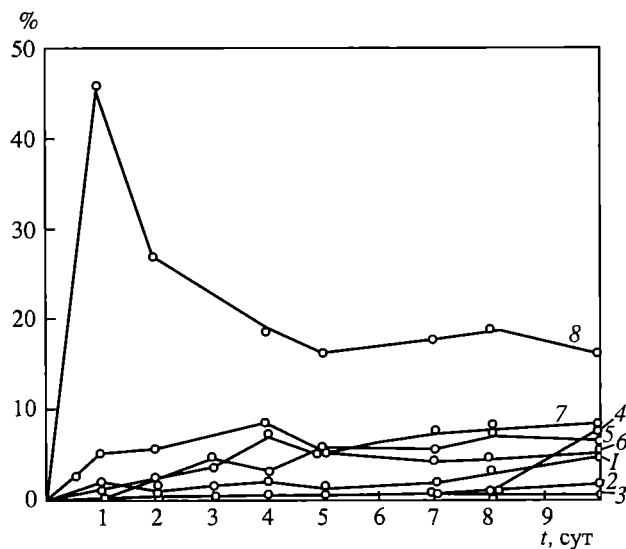


Рис. 1. Динамика содержания окрашивающихся форм облученных дрожжевых суспензиях.

1 – контроль; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 40; 5 – 80; 6 – 160; 7 – 280; 8 – 500 кР

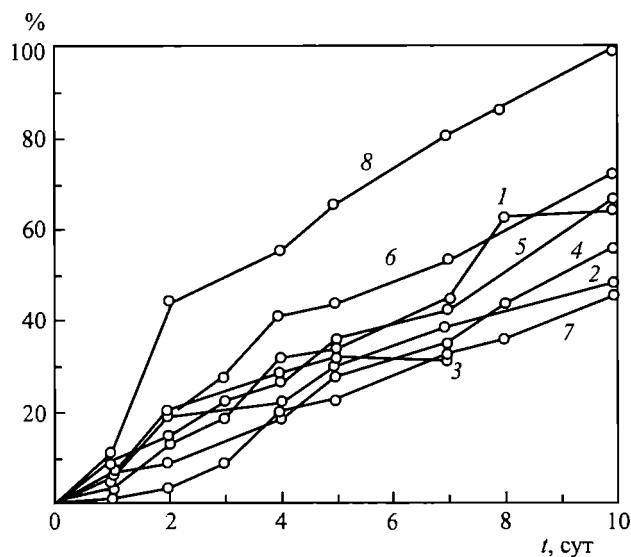


Рис. 2. Динамика спонтанного лизиса дрожжевых клеток, облученных разными дозами.

1 – контроль, 2 – 10, 3 – 20, 4 – 40, 5 – 80; 6 – 160, 7 – 280, 8 – 500 кР

бражены графически на рис. 2. Как показывают приводимые кривые, данные этих опытов полностью подтверждают представление о характере лизиса облученных клеток, сложившееся у нас в результате изучения окрашиваемости таких клеток эритрозином. Правда, при высеве клеток на агар процесс развивается несколько быстрее, быть может, вследствие лучшей аэрации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, облучение покоящихся дрожжевых клеток почти не влияет на скорость их спонтанного лизиса при последующей инкубации в непитательной среде, если величина дозы γ -лучей не превышает 300 кР. После облучения дрожжей дозой в 500 кР около половины популяции отмирает и лизируется в течение первых 24–48 ч, тогда как остальные ведут себя так же, как клетки, облученные меньшими дозами. Изучение облученных дрожжей по методике фиксированных микроколоний [1] показало, что количество клеток, отмирающих в течение первых суток после воздействия дозой в 500 кР, в пределах ошибки опыта равно количеству клеток, утрачивающих репродуктивную способность непосредственно во время облучения. Следовательно, клетки, неспособные после облучения делиться хотя бы один раз, вообще погибают «под лучом» или вскоре после облучения. Характерно, что быстрая гибель после облучения не только у микроорганизмов, но и у высших животных по данным Раевского наступает при дозах не ниже 100 кР. По мнению Раевского, гибель организмов при облучении столь высокими дозами обуславливается разрушением жизненно важных веществ биосубстрата, так называемой «молекулярной» смертью [5].

2. ДИНАМИКА ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

ВВЕДЕНИЕ

То обстоятельство, что дрожжевые клетки, помещенные после облучения их частично-летальными дозами в условия, препятствующие почкованию (в непитательную среду), по скорости отмирания не отличаются от контроля, позволило предположить, что для реализации последствий облучения нарушения, возникающие в биосубстрате клетки при действии лучистой энергии, должны быть включены в ее обмен веществ. Однако сами эти нарушения могут обладать способностью к спонтанным изменениям, усиливаясь или ослабляясь в тот период времени, когда клетки пребывают в состоянии митотического покоя. В этом случае продолжительность пребывания облученных клеток в таком состоянии должна влиять на картину поражения таких клеток, проявляющегося после перенесения их в условия, оптимальные для размножения и роста.

Изменения, возникающие в биосубстрате клеток при облучении и способные к реализации лишь через посредство обмена веществ, могут быть названы *первичными радиобиологическими нарушениями*. Описанная нами методика фиксированных микроколоний [1] наиболее пригодна для изучения таких нарушений при работе с неподвижными одноклеточными. Эта методика дает в руки экспериментатора два показателя пораженности популяции: процент инактивации (M) и среднее количество циклов размножения необратимо поврежденных клеток перед гибелью (Q). Если в течение периода пострадиационного покоя первичные радиобиологические нарушения усиливаются, то величина M будет возрастать, а величина Q уменьшаться; в противоположном случае возрастет Q , а уменьшится – значение M ;

выздоровление же части клеток облученной популяции, происходящее параллельно с усилением глубины поражения остальных клеток, должно приводить к снижению значений как M , так и Q .

МЕТОДИКА

Для изучения влияния продолжительности пребывания облученных дрожжевых клеток в состоянии митотического покоя на степень пораженности их γ -лучами радиоактивного кобальта бьюксы, содержащие контрольные и облученные суспензии, инкубировались в термостате при 30 °С в течение 7 сут. Через определенное время стерильно взятые пробы высевали на покрытые питательным агаром предметные стекла и изучали по методике фиксированных микроколоний [1]. В качестве контроля служили как свежеприготовленные суспензии, так и суспензии, выдержанные различное время перед облучением в непитательной среде. Опыты проводили в двух повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные представлены на рис. 3 и 4 и далее (вывод). Результаты исследования показали, что продолжительность предрадиационной инкубации дрожжевых клеток при 30 °С в непитательной среде не оказывает существенного влияния на их радиочувствительность, в то время как пострадиационная инкубация облученных клеток резко повышает их выживаемость (рис. 3).

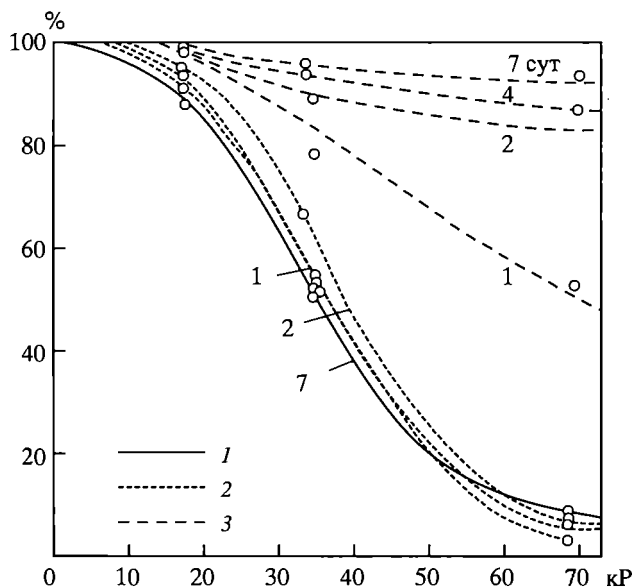
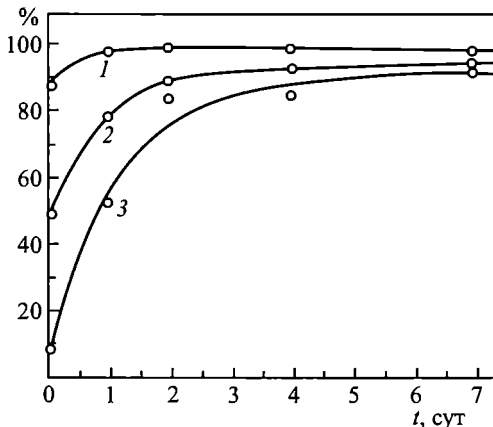


Рис. 3. Влияние предрадиационной и пострадиационной инкубации дрожжевых клеток в непитательной среде на форму кривых выживания.

1 – стандартная кривая выживания; 2 – инкубация перед облучением; 3 – инкубация после облучения; цифры на кривых – продолжительность инкубации (сут)

Рис. 4. Зависимость выживаемости облученных клеток от продолжительности пострadiационной инкубации в непитательной среде: 17 (1), 31 (2), 68 крaд (3)



Повышение относительной выживаемости облученных дрожжевых клеток вследствие пострadiационной инкубации их в непитательной среде не может быть результатом избирательного распада, лизиса, необратимо инактивированных особей облученной популяции, ибо скорость лизиса дрожжевых клеток, облученных дозами в диапазоне 10 Р–100 кР, существенно не отличается от контроля (см. выше), а количество клеток, лизирующихся в первые сутки инкубации, весьма невелико. Эффект уменьшения пораженности дрожжевых клеток со временем, наблюдающийся при инкубации их после облучения в непитательной среде, можно объяснить лишь спонтанным восстановлением нарушений, возникающих в биосубстрате таких клеток при облучении.

Влияние продолжительности пострadiационной инкубации дрожжевых клеток на количество циклов размножения перед необратимой инактивацией (доза облучения 68 кР):

Продолжительность инкубации, сут	0	1	2	4	7
Выживание, %	9 ± 4	52 ± 4	84 ± 3	85 ± 3	93 ± 2
Количество клеток в колонии, n	21 ± 20	73 ± 38	79 ± 36	82 ± 46	87 ± 39
$Q = \ln_2 n$	4,4	6,2	6,3	6,4	6,5

Данные вывода показывают, что одновременно с увеличением процента выживания возрастает количество циклов размножения, предшествующих необратимой инактивации. Таким образом, пострadiационное восстановление затрагивает все клетки облученной популяции: время, протекающее между прекращением облучения и высевом клеток на питательную среду, действует аналогично уменьшению дозы облучения.

Повышение процента выживания, происходящее с течением времени в облученных популяциях при выдерживании их после облучения в непитательной среде, графически изображено на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в дрожжевых клетках, содержащихся после облучения в непитательной среде, происходит частичное восстановление повреждения, несмотря на то, что средой таким клеткам служит вода, подвергавшаяся облучению. Следовательно, продолжительный контакт облученных дрожжевых клеток с облученной средой при применявшихся нами дозах не вызывал существенного снижения жизнеспособности таких клеток, во всяком случае влияния облученной среды не было заметно на фоне восстановления, выздоровления клеток от лучевой болезни.

Уменьшение эффекта облучения может быть связано как с разрушением или диффузией, вымыванием из клеток образовавшихся при облучении токсических продуктов, так и со спонтанным восстановлением физических нарушений биомолекул. Но какова бы ни была его природа, восстановление несомненно наблюдается в дрожжевых клетках, находящихся в состоянии митотического покоя. Можно предположить, что процессы восстановления осуществляются в клетках как в течение облучения, так и после его прекращения; инактивированными же оказываются лишь те клетки, у которых возникшие в пострадиационных реакциях изменения оказываются включенными в обмен веществ.

Вероятно, что зависимость эффективности облучения от продолжительности пребывания подвергнутых действию радиации клеток в состоянии подавленного метаболизма характерна для самых различных организмов. Такое предположение нам кажется вполне допустимым, несмотря на довольно ограниченное количество работ, посвященных изучению спонтанного восстановления [6]. Так, известно, что пребывание облученных рентгеновыми лучами тканей куриного зародыша в течение 5 ч при 0 °С полностью снимает эффект облучения [7]. Аналогичные результаты были недавно получены Поликарповым в опытах на гидрах¹. Более подробно этот вопрос изучался Праттом и сотр. на кишечной палочке [8]. Обмен веществ облученных бактерий тормозился понижением температуры до 4–6 °С, выживаемость определялась по стандартному методу ежедневно в течение шести суток. Приводимые этими авторами данные свидетельствуют, что зависимость степени восстановления от времени у *B. coli* имеет примерно такой же характер, что и у дрожжей в наших опытах. Аналогичность закономерностей спонтанного восстановления у столь далеких объектов, как перечисленные выше, вряд ли может являться простым совпадением.

Весьма вероятно, что описанное выше спонтанное восстановление облученных дрожжевых клеток, пребывающих в состоянии митотического покоя, по природе своей идентично с явлением, обуславливающим зависимость биологической эффективности ионизирующих излучений от мощности дозы. Последнее обстоятельство было впервые описано Кроутером [9] и подробно исследовано Ли [10]. Последний попытался дать этому явлению математическую интерпретацию, вводя в формулу Кроутера «фактор восстановления» β . Аналогичные расчеты приводит Ребоул [11], понимавший под β «вероятность неэффективности» данной дозы облучения. Однако до сих пор не удалось выяснить механизм процессов, определяющих роль мощности дозы в биологическом действии радиации. Если спонтанное восстановление покоящихся неразмножающихся клеток действительно связано с изменениями в первичных радиобиологических нарушениях, то, выключая временно тем или иным способом размножение облученной клетки, мы получим возможность непосредственно изучать свойства первичных радиобиологических нарушений. В этом случае одним из путей выяснения природы этих последних может служить изучение закономерностей восстановления облученных клеток и тканей, пребывающих в состоянии пониженного метаболизма, при различных физических и химических условиях среды (температура, кислород, давление, агрегатное состояние и пр.).

¹ Неопубликованные данные, личное сообщение автора.

ВЫВОДЫ

1. В работе изложены результаты влияния продолжительности пребывания облученных γ -лучами дрожжевых клеток в непитательной среде на скорость их спонтанного лизиса, окрашиваемость невитальными красителями и степень пораженности ионизирующей радиацией.

2. После облучения частично-летальными дозами быстрота отмирания дрожжевых клеток (в условиях митотического покоя) не отличалась существенно от контроля. После облучения дозами порядка 500 кР (абсолютно-летальные) наблюдались быстрое отмирание и распад части клеток облученной популяции, причем относительное количество таких клеток примерно равно относительному количеству клеток, испытывающих после облучения такими дозами инактивацию без предшествующего размножения [1]. Весьма вероятно, что без осуществления активного обмена веществ в облученных клетках развитие процессов радиационного последствия, приводящих к инактивации после нескольких циклов размножения, затруднительно или даже невозможно.

3. В дрожжевых клетках, пребывающих после облучения γ -лучами в условиях митотического покоя, наблюдается уменьшение последствий облучения (восстановление). Можно полагать, что изучение закономерностей восстановления клеток, находящихся после облучения в таком состоянии, будет служить одним из путей выяснения природы первичных радиобиологических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 2.
2. Имшенецкий А.А. // Микробиология. 1933. Т. 2.
3. Henslow P.S., Turkowitz H. // Amer. J. Roentgenol. 1940. Vol. 43. P. 93.
4. Сокурова Е.Н. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1956. Т. 6. С. 35.
5. Раевский Б. // Вопросы радиобиологии. М.: Изд-во иностр. лит. 1956. С. 133.
6. Latarjet R. // Acta Radial. 1954. Vol. 41. P. 84.
7. Strangenways T.S. P., Fell H.B. // Proc. Soc. B. 1927. Vol. 102. P. 9.
8. Pratt A.W., Moos W.S., Eden M.J. // Nat. Cancer Inst. 1955. Vol. 15. P. 1039.
9. Crowther J.A. // Proc. Roy. Soc. B. 1926. Vol. 100. P. 390.
10. Lea D.E. // Brit. J. Radiol. 1938. Vol. 11. P. 489.
11. Reboul J.A. // Amer. J. Cancer. 1939. Vol. 37. P. 273.

SOME REGULARITIES IN THE POST-IRRADIATION ALTERATIONS OF RESTING YEAST CELLS

V.I. Korogodin

CONCLUSIONS

1. The paper reports the results of the influence of the prolonged holding of γ -irradiated yeast cells in a non nutrient medium on their spontaneous lysis rate, staining ability by non vital dyes and the degree of radiation injury.

2. After irradiation with partly lethal doses, the death rate in yeast cells, remaining under conditions of mitosis inhibition, does not differ essentially from that in controls. After irradiation with a dose about $5 \cdot 10^5$ R (absolutely lethal) one can observe the rapid death and the destruction of a part of the population, the relative number of the destroyed cells

being equal to the relative number of cells inactivated, without a preceding reproduction after the irradiation with the same dose (*Korogodin V.I. // Biophysika. 1958. Vol. 3. P. 2*). It is, therefore, quite possible that the development of the post irradiation processes, causing the inactivation after several reproduction cycles, becomes difficult or impossible in the absence of an active metabolism in the yeast cells after their irradiation.

3. In yeast cells holding after irradiation with γ -rays under the conditions of mitotic inhibition, the decrease in the consequence of irradiation (recovery) is observed. It is possible to suggest that the study of the regularities of the recovery of cells, remaining after irradiation in this state, will become one of the ways of detecting the nature of the primary radiobiological damages.

К ВОПРОСУ ОБ ОБРАТИМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ У ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Облучение γ -лучами диплоидных дрожжевых клеток, находящихся в состоянии митотического покоя, вызывает гибель таких клеток «под лучом» или вскоре после облучения (I форма поражения), утрату облученными клетками репродуктивной способности после одного, редко двух почкований (II форма поражения) или после четырех циклов размножения (III форма поражения), а также снижает скорость формирования макроколоний неинaktivированными облученными клетками [Корогодин, 1957а, 1958а]. Если же облученные частично летальными дозами дрожжевые клетки перед высевом на питательный агар инкубировать в стерильной водопроводной воде, то степень пораженности популяции уменьшается, причем процент выживания монотонно возрастает с увеличением продолжительности такой пострадиационной инкубации [Корогодин, 1958б].

В связи с вышесказанным возникают два вопроса.

1. Действительно ли наблюдавшийся на облученных дрожжевых клетках феномен увеличения выживаемости вследствие пострадиационного митотического покоя является эффектом восстановления?

Дело в том, что в упомянутой выше работе (Корогодин, 1958б) выживаемость облученных дрожжевых клеток S определялась по методике микроколоний, т.е. через отношение:

$$S = \frac{s}{s+m} 100\%,$$

где s – количество просчитанных на препарате нормальных колоний (обозначим их индексом IV), а m – количество патологических форм (I+II+III). Отношение $s/(s+m)$ может возрастать как вследствие истинного восстановления (т.е. перехода клеток из класса m в класс s), так и за счет лизиса более пораженных клеток (уменьшение класса m), частичного размножения в непитательной среде неинaktivированных особей (возрастание класса s) или комбинации обеих последних возможностей. Отметим попутно, что именно последний вариант предложили Шерман и Чейз для объяснения описанного ими возрастания числа макроколоний на чашках Петри в слу-

чае выдерживания облученных дрожжей в непитательной среде [Sherman, Chase, 1949].

В предыдущей работе [Корогодин, 1958б] вывод о существовании эффекта восстановления был сделан на том основании, что облученные частично летальными дозами дрожжевые клетки при инкубации их на непитательном агаре (вода + 2% агара) не отличались по скорости спонтанного лизиса от контрольных и не обнаруживали индуцированного облучением почкования. Однако оставалось невыясненным, сохраняются ли эти закономерности при инкубации облученных клеток в жидкой непитательной среде? Изучению этого вопроса и посвящена первая часть исследования, результаты которого излагаются ниже.

2. Второй вопрос, приобретающий смысл лишь после окончательного доказательства существования эффекта восстановления, сводится к выяснению связи этого феномена с той или иной формой реакции дрожжевых клеток на облучение γ -лучами. Иными словами, требовалось изучить восстановимость II и III типов поражения и задержки скорости формирования макроколоний; I форма поражения, т.е. инактивация без предшествующего почкования, как было показано ранее [Корогодин, 1958б], является необратимой (по крайней мере, в условиях наших экспериментов).

Работа проводилась в летний период 1958 г. на биостанции Миассово. Основная часть математической обработки полученных данных была любезно выполнена Н.В. Лучником. Авторы пользуются случаем выразить свою искреннюю благодарность Н.В. Тимофееву-Ресовскому и Н.В. Лучнику за постоянное внимание к работе и помощь в обсуждении результатов, а также всему коллективу Лаборатории биофизики Института биологии Уральского филиала АН СССР за повседневное содействие в проведении исследования.

ОБЪЕКТ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили диплоидные дрожжи *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В. Облучению подвергалась водная суспензия клеток (концентрация 6–7 млн/мл) 72-часовой сусло-агаровой культуры, содержащая не более 0,1–0,3% почкующихся особей. В качестве источника γ -лучей использовался Co^{60} . Доза во всех опытах составляла 30 000 Р при мощности 670 Р/мин. При высеве на питательную среду сразу после облучения такая доза вызывает инактивацию $24,6 \pm 1,8\%$ клеток после одного-двух циклов размножения (II тип поражения) и $42,8 \pm 3,2\%$ клеток – на стадии многоклеточной микроколонии (III тип поражения); средняя выживаемость по микроколониям составляла $32,8 \pm 2,4\%$, а по макроколониям – $35,7 \pm 4,2\%$.

Облученные и контрольные суспензии инкубировались при 30 °С в стерильной озерной воде. Сразу после облучения и далее через определенные промежутки времени отбирались пробы, в которых определялась концентрация клеток (подсчетом в камере Горяева), процент почкования (микроскопически, путем учета 1500–2500 клеток) и степень пораженности популяции – по стандартной методике макроколоний (количество колоний на чашках Петри подсчитывалось после 48-, 72- и 96-часовых инкубаций при 30 °С) и по методике микроколоний, позволяющей определять соотношение разных форм поражения. Опыты проводились в трех-пяти повторностях.

Влияние пострадиационной инкубации на различные формы лучевого поражения дрожжей изучалось следующим образом. Облученные дрожжевые клетки после выдерживания их в течение различного времени в непитательной среде высевались на покрытые агаризированным сусликом (суслик 5° Ball.+2% агара) предметные стекла и инкубировались при 30 °С. Спустя каждые 3–4 ч термостатирования на протяжении 36-часовой инкубации препараты изучали под микроскопом. При этом контролировались одни и те же участки препарата, так что под наблюдением на каждом препарате находилось от 150 до 300 развивающихся микроколоний. Учет соотношения форм одних и тех же микроколоний в течение всей инкубации дает информацию о динамике развития колоний, формирующихся из клеток, пораженных излучением в разной степени, а также позволяет избежать ошибок за счет частичного лизиса рано инактивирующихся клеток, зарастания патологических колоний активно размножающимися соседями и слияния в одну колонию потомков нескольких рядом расположенных клеток. Параллельное определение выживаемости по макро- и микроколониам показало, что в течение 24-часового выращивания дрожжей на твердой питательной среде не все способные к длительному размножению клетки успевают формировать дискообразные микроколонии правильной формы, и позволило вносить соответствующие поправки в результаты подсчетов относительного содержания на препаратах клеток, инактивирующихся после нескольких циклов размножения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Лизис и почкование в непитательной среде. Результаты изучения лизиса и почкования необлученных и облученных дрожжевых клеток приведены в табл. 1. Ввиду хорошей воспроизводимости результатов, для составления таблицы использовались данные по отдельным опытам из каждой серии повторностей.

Приведенные в табл. 1 результаты определения концентрации дрожжевых клеток в суспензиях и относительного содержания почкующихся форм свидетельствуют о стабильности этих показателей, сохраняющихся в контрольной и облученной группах на одном и том же уровне в течение всей инкубации. Вариабельность их лежит в пределах ошибки опытов. Очевидно, что пребывание дрожжевых клеток в непитательной среде, независимо от их предварительного облучения, в условиях наших экспериментов не сопровождалось ни значительным их лизисом, ни существенным новообразованием или отделением почек.

Вывод этот хорошо подтверждается результатами изучения жизнеспособности контрольных и облученных дрожжей методами макро- и микроколоний. Действительно, относительное содержание жизнеспособных клеток в контроле сохранялось на одном и том же уровне в течение всего изучавшегося периода, в то время как содержание жизнеспособных клеток в облученных суспензиях за этот же срок заметно возрастало. Регистрация возрастания количества жизнеспособных клеток обоими методами дала хорошо совпадающие результаты, доказывая тем самым, что относительное повышение содержания нормальных форм микроколоний правильно отражает абсолютное

Концентрация, почкование и жизнеспособность облученных и необлученных дрожжевых клеток при инкубации их в течение 24 ч в непитательной среде

Продолжительность инкубации, ч	0	2	4	6	12	19	24	$M \pm \sigma$
Концентрация, в отн. ед.								
опыт	100	96	95	98	103	105	102	99,6±1,3
контроль	100	101	105	107	100	96	98	101,4±1,7
Почкование, %								
опыт	0,30	0,43	0,50	0,40	0,71	0,31	–	0,44±0,05
контроль	0,20	0,49	0,54	0,70	0,30	0,40	–	0,45±0,08
Выживаемость облученных клеток, %								
макроколонии	29,3	–	39,6	–	66,2	–	73,6	–
микроколонии	30,7	–	34,0	–	58,0	–	67,5	–
Содержание жизнеспособных клеток в контроле (среднее число на чашку Петри)	131±1,2	–	115±2,8	–	126±2,5	–	121±5,7	126±2,9

увеличение количества жизнеспособных клеток в облученной суспензии в течение пострадиационной инкубации их в непитательной среде.

Таким образом, при пострадиационной инкубации облученных дрожжей в непитательной среде не происходит ни избирательного лизиса необратимо поврежденных клеток, ни размножения клеток, сохранивших репродуктивную способность, а регистрируемый эффект увеличения относительного количества способных к длительному размножению клеток является результатом истинного восстановления их от лучевого поражения.

Динамика развития микроколоний. Рассмотрим теперь данные о влиянии пострадиационной инкубации дрожжевых клеток в непитательной среде на скорость формирования микроколоний и на соотношение разных форм поражения.

На рис. 1,а приведены кривые изменения соотношения разных форм микроколоний в зависимости от продолжительности роста их на твердой питательной среде при высеве сразу после облучения и через 24 ч. Кривые *I* – убывание с течением времени одиночных клеток, образующих почки и превращающихся в микроколонии из двух, а затем из трех и четырех клеток; кривые *II* – нарастание, а затем убывание микроколоний *II* формы; кривые *III* – аналогичные изменения содержания на препаратах микроколоний *III* формы; кривые *IV* – то же для нормальных дискообразных микроколоний. Как отмечалось выше, дрожжевые клетки, облученные дозой в 30 000 Р, испытывают инактивацию либо на стадии двух–четырёхклеточной микроколонии, либо на стадии «цепочки» или «веточки». Положение на оси ординат правых горизонтальных отрезков кривых *II*, *III* и *IV* описывает конечную картину относительного содержания на препаратах двух форм поражения и нормально жизнеспособных клеток. Из рис. 1 видно, что стабилизация относительного содержания на препаратах микроколоний *II* типа, в отличие от

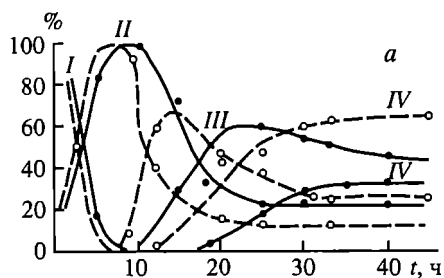


Рис. 1. Динамика формирования микроколоний облученными дрожжевыми клетками при высеве на питательную среду сразу после облучения (сплошные линии) и спустя 24 ч (пунктир). Экспериментальные данные (а) и различные способы их преобразования (б, в, з), объяснение в тексте. I, II, III и IV – разные формы микроколоний

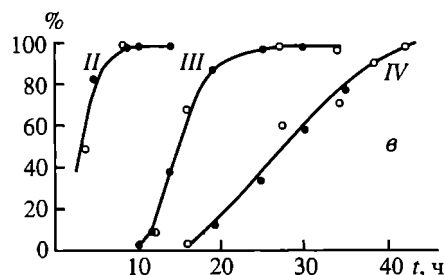
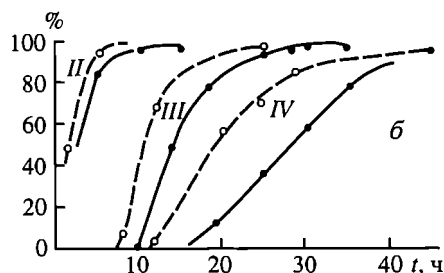
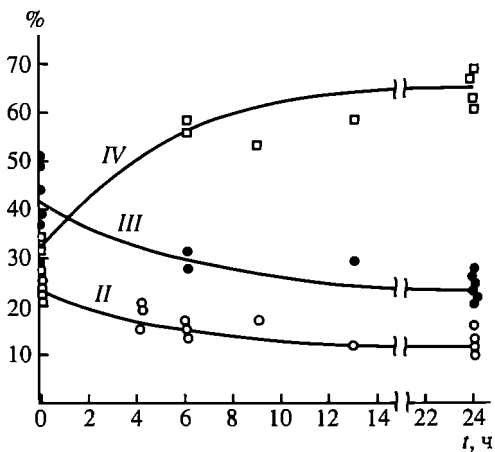
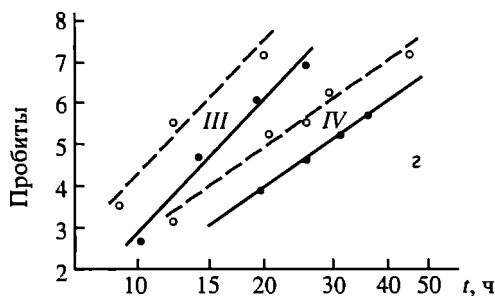


Рис. 2. Конечное содержание на препаратах разных форм микроколоний (II, III и IV) в зависимости от продолжительности пострадиационной инкубации в непитательной среде



таковых других типов микроколоний, наступает уже после 10–13 ч выращивания их при 30 °С.

При сравнении соответствующих кривых рис. 1 хорошо видно ускорение формирования микроколоний облученными клетками, выдержанными перед посевом в состоянии митотического покоя, по сравнению с клетками, высеянными сразу после облучения. Для анализа изменения скорости формирования микроколоний разных форм удобно произвести следующее преобразование кривых, изображенных на рис. 1,а. Так как эти кривые представляют собой равнодействующие из нарастания соответствующего типа микроколоний за счет перехода из предыдущего типа и убывания за счет перехода их в последующий тип, то для определения истинного изменения относительного

количества микроколоний каждого типа необходимо для каждой временной точки сложить процент колоний интересующего нас типа с процентом колоний последующих типов. При этом для II, III и IV типов колоний получается ряд S-образных кривых с разными асимптотами. Для сравнения форм этих кривых их можно привести к 100% (рис. 1,б) и преобразовать в прямые, применив преобразование логарифм времени – пробит эффекта.

На рис. 1,г представлены преобразованные таким образом кривые для перехода II типа микроколоний в III и III типа в IV для обоих вариантов опытов. Соответствующие трансформированные кривые идут параллельно, т.е. форма их одинакова, но скорость процессов различна. Эффективное время (время, в течение которого претерпело изменение 50% изучаемых объектов – ET50) для перехода II типа микроколоний в III при высеве сразу после облучения равно 15,7 ч, а при высеве через 24 ч – 11,7 ч. Для перехода III типа микроколоний в IV ET50 соответственно равно 28,0 и 20,3 час. Отношения этих чисел дают изменения скоростей перехода одних микроколоний в другие под влиянием пострадиационной инкубации, которое составляет в первом случае $15,7:11,7 = 1,34$, а во втором – $28,0:20,3 = 1,38$, т.е. чрезвычайно близкие величины.

Таким образом, пострадиационное пребывание дрожжевых клеток в непитательной среде способствует более быстрому (по сравнению с высевом сразу после облучения) формированию колоний III и IV типов. Ускорение это близко для обеих форм микроколоний и составляет в среднем 1,36. Для проверки этого вывода можно кривые обоих вариантов опытов, приведенные на рис. 1,б, изобразить совместно, растянув ось времени для второго варианта (24 ч пострадиационной инкубации в непитательной среде) в 1,36 раза, как это показано на рис. 1,в. Очень хорошее совпадение соответствующих кривых обоих вариантов опытов подтверждает сделанное выше заключение об одинаковом влиянии пострадиационной инкубации на скорость формирования микроколоний III и IV типов, а совпадение кривых для II типа микроколоний показывает, что точно такие же изменения претерпевает и скорость их формирования, т.е. быстрота образования почек высеянными на агар отдельными клетками.

На рис. 2 изображена зависимость относительного содержания разных форм микроколоний на препаратах, проинкубированных до окончательной стабилизации этих величин (30–36 ч), от продолжительности выдерживания облученных клеток в непитательной среде. Кривые построены на основании данных нескольких экспериментов. Для II типа микроколоний, содержание которых на препаратах значительно варьировало, достоверность эффекта восстановления подтверждена результатами регрессионного анализа ($P = 0,029$). Цифровой материал, приведенный в табл. 2, показывает, что наблюдавшееся в течение 24-часовой пострадиационной инкубации увеличение количества жизнеспособных клеток происходило за счет примерно одинакового уменьшения относительного числа клеток, погибающих как после одного-двух почкований, так и после нескольких циклов размножения.

Таким образом, пострадиационная инкубация облученных γ -лучами дрожжевых клеток в непитательной среде значительно уменьшает вызываемую облучением задержку первого почкования этих клеток и образования ими разных типов микроколоний при высеве на питательную среду. Одно-

Конечные соотношения разных типов микроколоний при высеве клеток на питательный агар сразу и через 24 ч после облучения (в %)

Типы микроколоний	Высев сразу после облучения	Высев через 24 ч после облучения	N_{24}/N_0
I	0	0	—
II	$24,6 \pm 1,8$	$12,0 \pm 1,8$	0,49
III	$42,8 \pm 3,2$	$23,0 \pm 2,8$	0,54
IV	$32,8 \pm 2,4$	$65,0 \pm 4,8$	1,98

временно наблюдается значительное снижение летального эффекта облучения за счет уменьшения количества клеток, инактивирующихся после одного или нескольких циклов размножения.

Скорость формирования макроколоний. Заключительная часть исследования посвящена изучению влияния пострадиационной инкубации дрожжевых клеток в непитательной среде на скорость формирования ими макроколоний, которая, как было показано ранее [Корогодин, 1957а], на диапазоне от 12 до 72 кР убывает пропорционально дозе облучения.

На рис. 3 изображена зависимость выживания (по макроколониям) облученных клеток от продолжительности пострадиационной инкубации их в непитательной среде. Кривая S_1 получена путем подсчета макроколоний после 48-часового роста их при 30 °С, а кривая S_2 — после 96-часового роста, т.е. после такого срока, в течение которого все жизнеспособные клетки успевают образовывать макроколонии. Отношение S_1/S_2 , т.е. относительная скорость формирования макроколоний облученными клетками, изображена в виде кривой E .

Из рис. 3 следует, что повышение выживаемости клеток вследствие пострадиационной инкубации их в непитательной среде сопровождается возрастанием скорости формирования ими макроколоний, причем обе величины на диапазоне от 4 до 24 ч инкубации в непитательной среде изменяются почти параллельно. Следовательно, эффект восстановления распространяется

как на летальное действие облучения, так и на индуцированное облучением торможение формирования макроколоний неинактивированными γ -лучами дрожжевыми клетками. На рис. 3 видно также, что в условиях наших опытов процессы восстановления почти полностью завершились в течение 24 ч инкубации облученных клеток в непитательной среде.

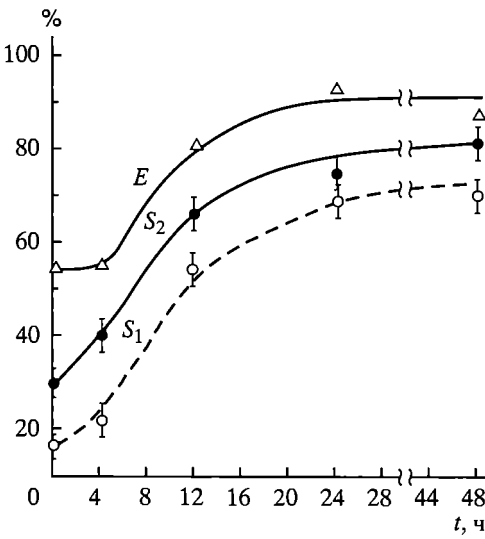


Рис. 3. Относительное содержание на чашках Петри макроколоний при подсчете после 48- (S_1) и 96-часовой (S_2) инкубации их при 30 °С и значения индекса $E = S_1/S_2$ в зависимости от продолжительности пострадиационного пребывания облученных клеток в непитательной среде

ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные выше данные окончательно подтверждают наличие эффекта восстановления у диплоидных дрожжевых клеток, выдерживаемых после облучения γ -лучами в состоянии митотического покоя. Было показано, что восстановление распространяется как на оба типа пострадиационной инактивации клеток, так и на индуцированную облучением задержку их размножения, затрагивающую первый и последующие циклы почкования.

Задержка первого почкования у облученных γ -лучами дрожжевых клеток является, по-видимому, следствием повреждения всей клетки в целом (и протоплазмы, и ядра), о чем свидетельствуют равномерность распределения этой задержки по клеткам облученной популяции [Корогодина, 1957б] и коррелирующие с этой задержкой изменения физико-химических свойств клеток, проявляющиеся при умеренных дозах облучения в усилении яркости люминесценции таких клеток после окрашивания их акридином оранжевым [Бируков и др., 1958].

Причиной пострадиационной гибели диплоидных дрожжей, как полагают многие авторы [Nybom, 1953; Zircle, Tobias, 1953; Tobias et al., 1958, и др.], служат, по-видимому, хромосомные аберрации.

Запаздывающее формирование облученными дрожжевыми клетками макроколоний, как позволяют предположить данные Тобиаса и др. [Tobias et al., 1958], является следствием двух причин, а именно: увеличения продолжительности нескольких первых циклов почкования у облученных клеток и частичного отмирания потомков их в четвертой-пятой генерациях. Частичная гибель потомков облученных диплоидных дрожжей, по-видимому, весьма неравномерно распределена по популяции способных формировать макроколонии особей (см., например, вариационные кривые размеров макроколоний в работе Корогодина [1957а]) и может обуславливаться запаздывающими патологическими изменениями ядерного аппарата таких клеток. Весьма вероятно, что двойственность причины задержки формирования макроколоний облученными дрожжами и выражается в различии форм кривых S_2 и E (см. рис. 3) на ранних сроках пострадиационной инкубации.

Таким образом, полная картина пострадиационных изменений митотической активности диплоидных дрожжевых клеток является следствием как кумулятивного, так и локализованного действий ионизирующих излучений на клеточные структуры.

Явление пострадиационного восстановления для «кумулятивного» эффекта облучения, а именно для торможения первого митоза у облученных рентгеновыми лучами яиц морского ежа, было описано Хеншоу и др. и проанализировано Ли [Lea, 1955]. Пострадиационное восстановление описано также для клеток культуры тканей куриных зародышей [Strangeways, Fell, 1927], механизм лучевого поражения которых, по-видимому, носит смешанный характер, и для бактерий *Escherichia coli* [Pratt et al., 1955, и др.], вопрос о механизме лучевого поражения которых до сих пор дискутируется [Шехтман и др., 1958], но анализа влияния митотического покоя на последствия кумулятивного и локального влияния облучения в этих работах не проводилось. Одновременно с нами и независимо от нас эффект восстановления, аналогичный описанному выше для диплоидных дрожжей, был обнаружен

Лучником и Царапкиным [1959] для хромосомных нарушений в клетках корешков гороха. Данные же о характере пострадиационного восстановления разных типов лучевого поражения у одного и того же объекта, насколько нам известно, получены впервые.

Реактивирующее влияние пострадиационного митотического покоя на рост тканей в культуре, на задержку дробления яиц морского ежа, на инактивацию кишечной палочки, на количество хромосомных перестроек в клетках корешков гороха и на различные типы пострадиационных изменений у диплоидных дрожжей указывает, по-видимому, на сходство первичных радиобиологических процессов, лежащих в основе отмеченных эффектов. Общим для упомянутых выше случаев реактивации является то, что показателем поражения служит нарушение митотической активности, для выяснения чего облученную клетку необходимо поместить в условия, пригодные для размножения. Осуществление митоза является событием, как бы «разрешающим» проявиться неявным первичным нарушениям в клетке. И чем позднее наступает это событие – митоз, тем менее губительными для клетки оказываются последствия облучения.

Приведенные выше данные еще раз подтверждают уже высказывавшиеся соображения о том, что первичные радиобиологические повреждения клеток являются в известной мере потенциальными, способными к спонтанному исчезновению, и приобретают необратимую или выраженную форму лишь спустя один или несколько митотических циклов [Корогодина, 1958б]. Весьма вероятно, что первичные радиобиологические нарушения слагаются из обратимой и необратимой компонент, соотношения которых зависят от линейной плотности ионизации и физико-химических условий во время облучения. Положения эти кажутся нам справедливыми по крайней мере для действия редко ионизирующих излучений на биологические эффекты, связанные с повреждением цитоплазмы и нарушениями хромосом.

Совершается ли переход потенциальных, обратимых радиобиологических нарушений в необратимые после облучения в течение одного митотического цикла, или может растягиваться на несколько следующих друг за другом циклов размножения клетки, пока еще не ясно. Однако можно полагать, что вероятность реализации первичных потенциальных радиобиологических нарушений падает с увеличением интервала времени между облучением и осуществлением митоза и зависит от физиологического состояния клеток и физико-химических условий среды (см., например, работу Корогодина, Тарусова и Тамбиева, 1959). Физиологическое состояние клетки может определяться условиями воспитания ее перед или после облучения, а также действием радиации на те или иные клеточные компоненты, повреждение которых само по себе еще не приводит клетку к гибели. Так, под влиянием облучения, как полагает Н.В. Лучник, в клетке может образовываться некоторое количество токсических продуктов, влияющих на митоз, или разрушаться, или замедляться синтез необходимых для нормального функционирования клетки веществ.

Относительно природы первичных (потенциальных) радиобиологических нарушений говорить пока еще трудно. В случае летального эффекта у диплоидных клеток это могут быть истинные разрывы хромосом, вероятность реституции которых пропорциональна продолжительности митоти-

ческого покоя, либо потенциальные (скрытые) повреждения хромосомного аппарата, реализация которых происходит во время митоза и зависит от кумулятивного эффекта облучения, либо, наконец, цепь физико-химических реакций, способных приводить к хромосомным поломкам в делящихся клетках, но затухающих в период митотического покоя. Не исключена возможность, что механизмы хромосомных aberrаций при действии ионизирующих излучений многообразны, и тогда столь же многообразны первичные процессы, лежащие в основе пострадиационного восстановления.

ВЫВОДЫ

1. В работе приводятся доказательства существования эффекта восстановления у облученных γ -лучами диплоидных дрожжей при пострадиационной инкубации их в непитательной среде.

2. Показано, что пострадиационный митотический покой сопровождается уменьшением биологических последствий облучения, связанных с кумулятивным (торможение первого митоза), локальным (два типа пострадиационной инактивации) и смешанным (задержка формирования макроколоний) действием их на клетки.

3. Для объяснения эффекта восстановления используется рабочая гипотеза, согласно которой первичные радиобиологические повреждения могут иметь потенциальную форму и обратимый характер, вероятность же превращения их в необратимые изменения находится в обратной зависимости от продолжительности пострадиационного митотического покоя и связана с физиологическим состоянием клетки и физико-химическими условиями среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бируков И.Н., Корогодина В.И., Поликарпов Г.Г. Новое в применении люминесцентной микроскопии для изучения биологического действия ионизирующих излучений // Журн. научн. и прикл. фотогр. и кинематогр., 1958. Т. 3, № 2. С. 128–130.
2. Корогодина В.И. 1957а. Некоторые закономерности роста макроколоний после облучения дрожжевых клеток γ -лучами радиокобальта // Биофизика. 1957а. Т. 2, № 2. С. 178–186.
3. Корогодина В.И. Некоторые закономерности торможения первого почкования дрожжевых клеток при действии γ -лучей радиокобальта // Биофизика. 1957б. Т. 2, № 5. С. 576–580.
4. Корогодина В.И. Формы инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией // Биофизика. 1958а. Т. 3, № 2. С. 206–214.
5. Корогодина В.И. Некоторые закономерности пострадиационных изменений покоящихся дрожжевых клеток // Биофизика. 1958б. Т. 3, № 6. С. 703–710.
6. Корогодина В.И., Тарусов Б.Н., Тамбиев А.Х. О зависимости реакций пострадиационного восстановления дрожжей от густоты клеточной суспензии, температуры и кислородного напряжения // Биофизика. 1959. Т. 4, № 2. С. 224–227.
7. Лучник Н.В., Царякин Л.С. Об обратимости цитогенетических лучевых повреждений // ДАН СССР. 1959. Т. 124, № 1. С. 213–216.
8. Шехтман Я.Л., Плохой В.И., Филиппова Г.В. Форма дозной кривой при облучении клеточной палочки рентгеновыми лучами и α -лучами полония // Биофизика. 1958. Т. 3, № 4. С. 479–486.
9. Lea D. E. Actions of radiations on living cells. Cambridge, 1955.
10. Nybom N. Some experiences from mutation experiments in *Chlamydomonas* // Hereditas. 1953. Vol. 39, N 1/2. P. 317–324.
11. Pratt W.A., Moos W.S., Eden M. Study of recovery of low temperature of X-irradiated *Escherichia coli* cells // 1955. J. Nat. Canc. Inst. Vol. 15, N 4. P. 1039–1047.

12. *Sherman F.G., Chase H.B.* Effects of ionising radiations on enzyme activitied of yeast cells. III. Influence of dilution on X-ray induced inhibition of anaerobic CO₂ production and colony formation // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1949. Vol. 34, N 2. P. 207–219.
13. *Strangeways T.S.P., Fell H.B.* A study the direct and indirect action of X-rays upon the tissue of the embryonic Fowl // *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1927. Vol. 102, N 713. P. 9–29.
14. *Tobias C.A., Mortimer R.K., Gunter R.L., Welch G.P.* The action of penetrating radiations on yeast cells // *Second United Nations Intern. Conf. Peaceful Uses Atom. Energy.* 1958.
15. *Zirle R.E., Tobias C.A.* Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves // *Arch. biochem. biophys.* 1953. Vol. 47, N 2. P. 282–306.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Ликвидация вредных последствий биологического действия ионизирующих излучений – важнейшая проблема современной радиобиологии. Выздоровление облученного многоклеточного организма может происходить как вследствие замещения клеток, погибших в результате облучения, неповрежденными элементами его органов и тканей, так и вследствие восстановления самих поврежденных клеток. Поэтому успехи в разработке методов борьбы с лучевыми поражениями зависят от степени нашей осведомленности о роли обоих этих процессов в патогенезе лучевой болезни и от умения воздействовать на каждый из них.

Роль размножения неповрежденных клеток в выздоровлении облученных животных хорошо известна. Явление это уже используется при лечении экспериментального лучевого поражения путем инъекции гомогенатов селезенки или костного мозга. Возможность же восстановления жизнеспособности клеток, поврежденных ионизирующими излучениями, до последнего времени подвергалась сомнению [1]. Однако некоторые указания на такую возможность появились в радиобиологической литературе еще около сорока лет тому назад. В частности, Г.А. Надсон в своем классическом труде, посвященном радиобиологии дрожжевых организмов, отмечает, что клетки, подвергшиеся воздействию препаратов радия, способны «выздоровливать» при переносе их на свежую питательную среду [2]. Это наблюдение имеет принципиальное значение: если судьба облученных клеток действительно зависит не только от полученной дозы, но и от условий их существования после облучения, то изучение этого феномена может дать радиобиологам мощное оружие борьбы с лучевым поражением путем воздействия на первичные процессы, разыгрывающиеся именно в клетках облученного организма. К сожалению, исследования Г.А. Надсона, носившие в основном качественный характер, не показали убедительно, было ли описанное им пострадиационное восстановление клеток правилом или только исключением.

Десять лет тому назад Шерман и Чейз описали возрастание выживаемости дрожжевых клеток, облученных рентгеновыми лучами, при высеве их на питательную среду через определенное время после воздействия. Однако эти авторы объяснили наблюдавшийся ими факт не восстановлением поврежденных излучениями клеток, а размножением сохранившейся жизнеспособности.

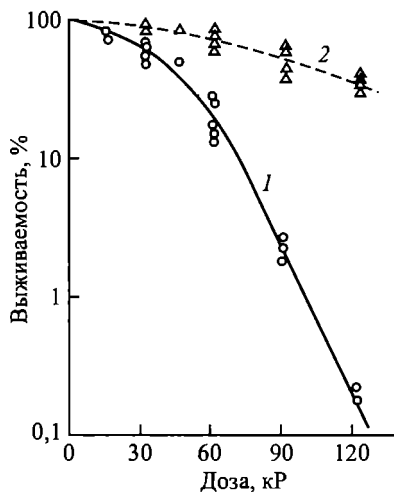
Кривые выживания дрожжевых клеток после облучения γ -лучами; высев на питательную среду непосредственно после облучения (1) и через 24–48 ч после облучения (2) (кривая восстановления)

способность части популяции за счет продуктов распада клеток, необратимо поврежденных радиацией [3].

Для того чтобы окончательно решить вопрос о способности клеток к пострадиационному восстановлению, требовалось экспериментально проверить справедливость гипотезы Шермана и Чейза. Не обнаружив соответствующих данных в литературе, один из авторов настоящего сообщения провел серию опытов по пострадиационному восстановлению на диплоидных дрожжевых организмах. В этих опытах удалось воспроизвести описанный Шерманом и Чейзом феномен возрастания выживаемости облученных дрожжей при сохранении их в течение суток и более в непитательной среде, а также показать отсутствие в таких условиях существенного лизиса и размножения облученных клеток [4]. Однако эти аргументы в пользу реальности эффекта восстановления относятся к области косвенных доказательств и поэтому не могут считаться достаточно убедительными.

Недавно нами было установлено, что резкое повышение выживаемости диплоидных дрожжевых клеток в период пострадиационного митотического покоя происходит даже после облучения их дозами в 120–150 крад, вызывающего инактивацию до 99,90–99,99% особей. Гибель клеток после облучения такими дозами наступает в основном после одного почкования, и на препаратах лишь изредка встречаются микроколонии, состоящие из четырех-пяти клеток. Однако 24–48-часовое пребывание облученных столь высокими дозами дрожжей в непитательной среде повышает их выживаемость в 200–1000 раз, причем инактивация не восстановившейся части популяции в этом случае наступает после нескольких циклов размножения. Кривая выживания (сплошная линия) и кривая восстановления (пунктирная) изучавшихся нами диплоидных дрожжей показаны на рисунке.

Эффект восстановления дрожжевых клеток, облученных дозами, вызывающими столь высокую летальность, позволил проверить реальность этого феномена прямым экспериментом. Объектом исследования, как и в предыдущих опытах, служили диплоидные дрожжи *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В. Дрожжевую суспензию, содержащую около 500 тыс. клеток на 1 мл, облучали γ -лучами радиоактивного кобальта в дозе 123 кР, вызывающей инактивацию 99,8% клеток. Непосредственно после облучения суспензию разбавляли стерильной водопроводной водой в 10 и 10 000 раз. Из первого разведения, содержащего около 50 тыс. клеток на 1 мл, производили высев на чашки Петри для определения выживания сразу после облучения; другое разведение, содержащее всего около 50 клеток на 1 мл, разливали по 1 мл в 30–40 стерильных пробирок. Половину таких порций высевали на питательную среду тотчас после их приготовления для определения частоты



**Доказательство реальности эффекта пострadiационного восстановления
диплоидных дрожжевых клеток (доза 123 крад)**

Группы	Опыт от 18.11–1959 г.		Опыт от 4.III–1959 г.		
	Число колоний	%	Число колоний	%	
Контроль, (развед. 1 : 10 000)	60,7 ± 1,3	100	44,6 ± 1,0	100	
Сроки высева	Сразу после облучения (развед. 1 : 10)	141,0 ± 20,6	0,23	81,0 ± 8,7	0,18
	Сразу после облучения, порции в 1 мл (развед. 1 : 10 000)	В трех чашках из 15 выросло по одной колонии	0,33	В двух чашках из 20 выросло по одной колонии (1 : 10)	0,10
	Через 48 час. после облучения, порции по 1 мл, (развед. 1 : 10 000)	Во всех 13 чашках выросли колонии 25,8 ± 7,1	42,5	Во всех 19 чашках выросли колонии 16,6 ± 3,5	37,2

попадания в эти порции клеток, способных к бесконечному размножению сразу после облучения. Вторую половину порций высевали на питательную среду через 48 ч после облучения для определения величины эффекта восстановления; последняя определялась также в неразделенной на порции суспензии, сохранявшейся в идентичных условиях (в термостате при 30 °С). Выживаемость определялась путем подсчета макроколоний на чашках Петри после четырехсуточной инкубации при 30 °С. Контролем служили необлученные дрожжи. Данные приведены в таблице.

Полученные результаты показывают следующее. После облучения дрожевой суспензии, содержащей около 500 тыс. клеток на 1 мл, дозой в 123 крад выживание близко к 0,2%. При разведении облученной суспензии в 10 000 раз и разделении ее на порции по 1 мл в каждую такую порцию попадало около 50 клеток. Так как 99,8% этих клеток сразу же после облучения не способно было образовывать макроколонии, то лишь в одной-двух порциях из десяти оказывалось по одной клетке, не утратившей вследствие облучения способности к размножению. Если бы эффект восстановления был артефактом, т.е. явлением, искусственно вызванным обработкой, а возрастание выживаемости при инкубации облученных дрожжей в непитательной среде происходило, как это предполагали Шерман и Чейз, за счет размножения неинактивированных особей, то мы зарегистрировали бы присутствие этого эффекта лишь в трех–семи порциях из изученных 32-х. В действительности же резкое повышение выживаемости (в 200 раз) было зарегистрировано во всех 32-х порциях облученной суспензии, из которых, как минимум, 25 не содержали ни одной клетки, способной к бесконечному размножению сразу после облучения. При этом величина восстановления в изолированных пробах оказалась такой же, как и в облученной суспензии, не разделенной на порции (ср. таблицу и рисунок).

Таким образом, пострadiационное восстановление диплоидных дрожжевых клеток, облученных высокими дозами γ -лучей, происходило с одинаковой интенсивностью во всех изученных нами пробах, независимо от того, содержали эти пробы клетки, не инактивированные вследствие облучения, или нет. Этот факт убедительно показывает, что возрастание выживаемости

облученных диплоидных дрожжей при пострадиационной инкубации их в непитательной среде есть истинный эффект восстановления и не связано с размножением отдельных сохранивших жизнеспособность клеток.

За последние годы в радиобиологической литературе накопилось значительное количество данных, показывающих, что пострадиационное восстановление не есть привилегия диплоидных дрожжей, а свойственно многим различным одноклеточным и клеткам многоклеточных организмов [5]. Это позволило В.И. Корогодину и Н.В. Лучнику предложить рабочую гипотезу, согласно которой первичные радиобиологические изменения в клетках могут носить потенциальный характер и обратимую форму, а степень их реализации зависит от условий существования клеток после облучения. Можно полагать, что изучение природы этих потенциальных повреждений и разработка приемов, направленных на ускорение их восстановления, сыграют существенную роль в борьбе с вредными биологическими последствиями действия ионизирующих излучений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Report of the United Nations Scientific conference on the effects of atomic radiation. N.Y.; 1958.
2. Надсон Г.А. // Вестник рентгенол. и радиол. 1920. Т. 1, № 1–2. С. 46.
3. Sherman F.G., Chase H.B. // J. Cell. Comp. Physiol. 1949. Vol. 33. P. 17.
4. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3, № 6. С. 703; Корогодин В.И., Малиновский О.В., Порядкова Н.А., Изможеров Н.А. // Цитология. 1959. Т. 1, № 3. С. 288.
5. Pratt A.W., Moos W.S., Eden M. // J. Nat. Cancer. Inst. 1955. Vol. 15. N 4. P. 1039. См. Граевский Э.Я., Зиновьева Е.Г. // Докл. АН СССР. 1958. Т. 121, № 5. С. 837; Лучник Н.В., Царанкин Н.В. // Там же. 1959. Т. 124, № 1. С. 213.

О СРОКАХ РЕАЛИЗАЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ У ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Еще в 1920 г. было показано, что жизнеспособность клеток, пораженных ионизирующими излучениями, зависит не только от величины полученной ими дозы, но и от условий пострадиационного воспитания [1]. Для изменения жизнеспособности облученных клеток нужно воздействовать на них соответствующими способами в течение того интервала времени, когда первичные последствия облучения еще не реализовались, не привели к необратимым изменениям, т.е. пока клетки еще сохраняют способность к пострадиационному восстановлению [2, 3].

При анализе результатов опытов по пострадиационной модификации различными химическими агентами выхода хромосомных aberrаций в клетках корешков гороха [4–6] было высказано предположение [7], что реализация потенциальных лучевых повреждений, ведущих к этим аномалиям, происходит, по-видимому, в процессе первого после облучения удвоения хромосомного аппарата клетки. Аналогичное обстоятельство установлено для вызываемых УФ премутагенных изменений, обуславливающих биохи-

мические мутации у бактерий [8]. На парамециях было показано [9], что реализация потенциальных повреждений, вызывающих у этих животных появление рецессивных летальных мутаций, приурочена к удвоению ДНК в их микронуклеусе. Интересно было выяснить, сколь общий характер имеют эти закономерности и, в частности, распространяются ли они на те потенциальные повреждения, которые, будучи реализованы, вызывают гибель самой облученной клетки или ее ближайшего потомства.

Объектом, удобным для экспериментального решения последнего вопроса, могут служить дрожжевые организмы. Косвенным показателем деления ядра у дрожжей является образование почки [10]. Методика изучения пострадиационного восстановления дрожжевых клеток разработана достаточно хорошо [11–13].

Пострадиационное восстановление дрожжей можно получить, выдерживая их после облучения при 30 °С в непитательной среде. Количественно эффект восстановления можно выразить в проценте облученных клеток, обнаруживающих этот феномен; для этого достаточно проинкубировать их в непитательной среде в течение времени, необходимого для полного проявления эффекта. Если дрожжевые клетки сразу после облучения поместить в условия, благоприятные для их почкования, а затем через различные интервалы времени переносить в непитательную среду и определять долю почкующихся особей и долю клеток, способных к восстановлению, то, сравнивая оба показателя, можно подойти к решению вопроса о сроках реализации у этого объекта потенциальных лучевых повреждений (по крайней мере, если эта реализация происходит в течение первого после облучения жизненного цикла клетки). Опыты, результаты которых излагаются ниже, были выполнены на кафедре биофизики биолого-почвенного факультета МГУ.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили диплоидные дрожжи *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В. Клетки выращивали двое-трое суток при 30 °С на агаризованном сусле, суспендировали в стерильной водопроводной воде до концентрации $10\text{--}100 \times 10^6$ клеток/мл, разливали по 1 мл в стеклянные бюксы и облучали требуемой дозой γ -лучей на установке ГУТ-Со-400 (мощность дозы около 1350 Р/мин). Облучаемая суспензия содержала лишь 0,1–0,03% почкующихся особей.

После лучевого воздействия суспензию переносили в 10 мл сусла (5° Балл.) и инкубировали при 30 °С в течение 5–8 ч. В каждом отдельном опыте применяли такую продолжительность инкубации, чтобы к ее окончанию у облученных клеток не происходило еще отделения сформировавшихся почек, т.е. чтобы концентрация клеток в суспензии, считая клетку с почкой за единицу, оставалась постоянной в течение всей инкубации.

Сразу после помещения дрожжей в сусло, а затем каждый час брали пробы, в которых определяли содержание почкующихся клеток. Затем клетки каждой пробы отделяли от сусла разбавлением 1 : 10 000 стерильной водой или центрифугированием и двукратной промывкой с последующим разведением осадка до нужной концентрации (оба способа дают идентичные результаты). Часть дрожжевой суспензии тотчас после завершения этой проце-

Влияние инкубации почкующихся дрожжей при 30 °С в стерильной воде в течение 24 ч на их концентрацию в суспензии и процент почкования

Доза, кР	Возраст культуры, часы	Концентрация клеток, млн/мл		Почкование, %	
		до инкубации	после инкубации	до инкубации	после инкубации
0	2	4,5	4,5	5,8	8,0
	3	4,9	5,3	49,0	51,0
	4	4,7	4,4	81,0	79,7
94,5	4	5,9	5,5	61,5	62,5
	5	6,6	6,3	95,3	95,0
243,0	1	5,3	5,8	0,1	4,5
	2,4	5,4	5,4	2,7	5,3
	5,7	5,4	5,3	91,1	88,1
	8	5,4	5,3	97,0	95,5

дуры высевали на агаризованное сусло в чашки Петри, а оставшуюся часть предварительно инкубировали при 30 °С в течение 24–48 ч. Выживаемость определяли по стандартной методике, сравнивая количество колоний, вырастающих в опытных и контрольных (необлученных) образцах в течение четырехсуточной инкубации при 30 °С. В некоторых опытах сразу после облучения изготовляли препараты микроколоний для определения по описанному ранее способу [13] соотношения разных форм инактивации.

Постановке основных опытов по изложенной выше схеме предшествовало выяснение вопроса, не происходит ли новообразования или отделения почек у почкующихся дрожжей при инкубации их в непитательной среде. Для этого после различных сроков «подкормки», как сразу после отделения клеток от сусла, так и после 24-часовой инкубации их в непитательной среде, в контрольных и облученных образцах определяли концентрацию клеток в суспензии (подсчетом в камере Горяева) и содержание почкующихся особей (микроскопированием). Полученные результаты, представленные в табл. 1, показали, что даже столь продолжительное пребывание почкующихся клеток в стерильной воде при физиологически оптимальной температуре практически не влияет ни на их концентрацию, ни на процент почкования. Следовательно, при этих условиях не происходит ни значительного отделения сформировавшихся почек, ни существенного образования. Вывод этот был подкреплен аналогичными опытами с необлученными клетками, концентрацию которых в суспензии определяли по методике макроколоний. Следовательно, данные, характеризующие выживаемость облученных дрожжей сразу после извлечения их из сусла и после инкубации их в непитательной среде, вполне сравнимы между собой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1 изображены кривые выживания дрожжевых клеток в зависимости от дозы облучения, полученные при высеве их на питательный агар как сразу после облучения (кривая 1), так и спустя 48 ч инкубации их в сте-

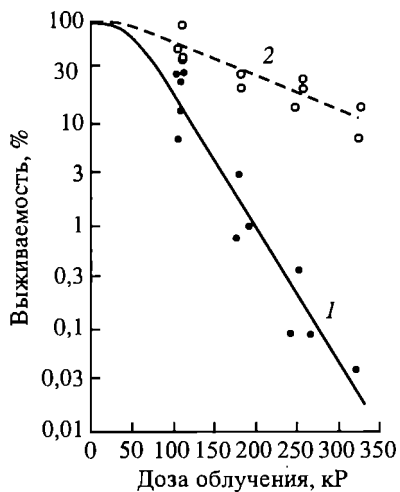


Рис. 1. Кривые выживания дрожжевых клеток в зависимости от дозы

1 — клетки высевали на питательный агар сразу после облучения; 2 — спустя 48 ч инкубации в непитательной среде

рильной воде (кривая 2). Значительный разброс экспериментальных данных, а также довольно высокое значение полулетальной дозы (58 кР по сравнению с 34 кР, найденными для этого же штамма ранее [13]) объясняются тем, что в этих опытах облучению подвергали густые клеточные взвеси на том интервале концентраций, где на радиочувствительность дрожжей сильное влияние оказывает содержание их в суспензии. Учитывая, что способность дрожжей к пострадиационному восстановлению определяется

лишь начальной выживаемостью, независимо от их концентрации при облучении [13], в дальнейшем изложении величину применявшихся доз будем иногда выражать не в килорентгенах, а в их биологической эффективности: например, $ЛД_{0,42}$ — доза, снижающая выживаемость облученной популяции до 0,42%.

В опытах основной серии были использованы дозы от 100 до 315 кР, обуславливающие выживаемость облученных клеток от 15 до 0,03%. В табл. 2 приведены данные, характеризующие типичное для применявшихся доз облучения содержание на препаратах микроколоний с различным числом клеток. Мы видим, что при всех использованных дозах облученные клетки перед инактивацией могут образовывать одну или несколько почек. При дозах порядка $ЛД_{15}$ около 20% клеток (от общего числа инактивированных) погибало после одного почкования и более 80% — после двух-шести циклов размножения; при дозах порядка $ЛД_1$ инактивацию после первого почкования испытывало около половины летально поврежденных особей, а при дозах порядка $ЛД_{0,1}$ – $ЛД_{0,01}$ — до 80% и более.

В табл. 3 и на рис. 2 приведены результаты нескольких опытов из основной серии: облученные клетки помещали в сусло, через различные интервалы времени t переносили в стерильную воду и определяли выживаемость как сразу после этого S_t , так и спустя 24 и 48 ч ($S_{t, 24}$ и $S_{t, 48}$)

Таблица 2

Относительное содержание (%) на 24-часовых препаратах микроколоний, состоящих из разного количества клеток

Доза, кР	Выживаемость, %	Количество клеток в микроколонии				
		1	2–3	4–11	12–40	более 40
100	15	0	14,5	7,9	42,6	35,0
185	1	0	51,0	26,0	20,9	2,1
256	0,1	0	84,0	14,5	1,5	<0,1
356	0,01	0	79,1	20,4	0,5	<0,1

Выживаемость дрожжевых клеток (%), определявшаяся сразу (S_t) и спустя 24 и 48 ч ($S_{t,24}$ и $S_{t,48}$) после взятия пробы

Доза, кР	Группа	Продолжительность инкубации в сусле, ч (t)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
170	S_t	2,9	3,0	3,0	2,9	2,3	2,2	2,3	2,5	3,6	
	$S_{t,24}$	28	32	35	28	21	13	10	8	–	
	$S_{t,48}$	26	31	30	23	32	20	15	11	–	
245	S_t	0,35	–	0,43	–	0,43	–	0,35	–	0,52	
	$S_{t,24}$	21	–	22	–	19	–	7,2	–	6,89	
	$S_{t,48}$	27	–	20	–	21	–	13	–	7,6	
238*	S_t	0,070	0,077	0,072	0,112	0,067	0,060	0,082	–	0,089	
	$S_{t,24}$	14	16	15	15	6,9	3,0	2,0	–	1,3	
	$S_{t,48}$	14	14	16	20	8,9	5,6	3,2	–	2,1	
315	S_t	0,033	0,030	0,027	0,034	0,033	0,033	0,034	0,028	0,033	
	$S_{t,24}$	7,5	7,3	8,5	12,2	6,3	1,3	0,55	0,36	0,72	
	$S_{t,48}$	14	18	20	13	12	4,1	2,1	0,68	0,76	

* В дозе 238 кР облучали менее густую суспензию, чем в других опытах этой группы.

Данные по зависимости S_t , $S_{t,24}$ и $S_{t,48}$ от величины t приведены в табл. 3. Мы видим, что при всех применявшихся дозах (от ЛД_{2,9} до ЛД_{0,03}) выживаемость S_t дрожжевых клеток, независимо от продолжительности предварительной инкубации их в сусле, как и следовало ожидать, остается практически на одном уровне. Выживаемость дрожжей, выдерживавшихся после извлечения из суслу в непитательной среде, заметно возрастает. Зависимость величины этой выживаемости от продолжительности инкубации дрожжей в сусле обсуждается ниже. Здесь же существенно отметить, что различия в значениях $S_{t,24}$ и $S_{t,48}$ весьма слабо зависят от времени t . Это означает, что скорость восстановления почти одинакова во всех пробах каждого опыта данной серии. Следовательно, различия уровней восстановления в разных пробах каждого опыта обуславливаются различиями содержания способных к восстановлению клеток. Мы видим далее, что различия между $S_{t,24}$ и $S_{t,48}$ не столь значительны, как между S_t и $S_{t,24}$. Это означает, что применявшиеся в опытах продолжительности инкубации клеток в голодной среде (24 и, тем более, 48 ч) вполне достаточны для практически полного выявления содержания в пробах клеток, способных к восстановлению.

Кривые зависимости выживаемостей, соответствующих максимальному восстановлению (обычно $S_{t,48}$, реже $S_{t,24}$), от продолжительности инкубации облученных клеток в сусле приведены на рис. 2. Соответствующие данные заимствованы из опытов по облучению дрожжевых суспензий разных концентраций в дозах 100, 170 и 315 кР. Здесь же изображена кривая почкования клеток, облученных указанными дозами. Мы видим, что на применявшемся диапазоне доз первое почкование облученных клеток описывается совпадающими кривыми, независимо от дозы облучения, чего и следовало ожидать согласно опубликованным ранее данным [15].

Как показано на рис. 2, выживаемость испытывших восстановление клеток, или, точнее, относительное содержание в пробах клеток, способных к

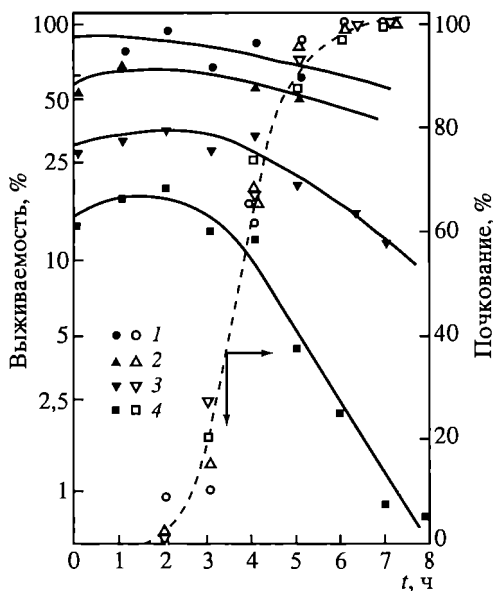


Рис. 2. Зависимость выживаемости после «полного» восстановления (сплошные линии, темные точки) и процента почкования (пунктирная линия, светлые точки) от продолжительности инкубации облученных дрожжей в сусле

1 – ЛД_{26,7}, 2 – ЛД_{6,92}, 3 – ЛД_{2,75}, 4 – ЛД_{0,032}

восстановлению, зависит от продолжительности инкубации облученных дрожжей в сусле. Содержание в пробах клеток, у которых еще не произошло реализации потенциальных повреждений, в первые часы инкубации почти не меняется (при ЛД₂₇) или даже несколько возрастает (при ЛД_{2,7} и ЛД_{0,03}), а затем более или менее быстро, в зависимости от дозы, убывает. Эта убыль становится заметной, когда количества почкующихся клеток

достигают 20–30%. К концу же 8-го часа инкубации, когда почти все облученные клетки образуют почки, содержание в пробах способных к восстановлению дрожжей снижается до минимальных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С увеличением содержания в облученных популяциях почкующихся клеток (вследствие инкубации их после облучения в сусле) наблюдается уменьшение содержания в них клеток, способных к восстановлению. Для объяснения этого обстоятельства можно предложить две гипотезы. Так, можно думать, что реализация вызванных облучением потенциальных повреждений происходит в дрожжевых клетках постепенно, по мере подготовки их к размножению (первая гипотеза). Можно предположить также, что реализация эта строго приурочена к определенному периоду жизненного цикла клетки, например, к образованию почки (вторая гипотеза). Если справедлива первая гипотеза, то с течением времени t среди клеток, еще не образовавших почку, должно наблюдаться постепенное снижение содержания способных к восстановлению особей. Если же справедлива вторая гипотеза, то относительное содержание способных к восстановлению клеток среди непочкующихся особей популяции не должно изменяться с течением времени t .

На применявшемся диапазоне доз, обуславливающих существенные различия в уровнях выживаемости, в соотношениях форм инактивации и в числе способных к восстановлению клеток (см. табл. 2 и 3), скорость первого почкования облученных дрожжей не зависит от величины дозы (см. рис. 2). Следовательно, сроки образования почек в облученных образцах одинаковы как для клеток, способных тотчас после облучения образовывать макроколонию, так и для клеток, обладающих обратимыми (потенциальными) и необратимыми летальными повреждениями. Следовательно, относительное содержание клеток этих трех групп среди дрожжей, успевших и не успевших

Символы и формулы, использованные при анализе экспериментальных данных

Символы и формулы	Смысловое значение символов
t	Продолжительность инкубации облученных клеток в сусле или время взятия пробы
$B_t (B_0 \approx 0)$	Содержание в пробах почкующихся клеток (в долях единицы)
$S_t (\approx S)$	Выживаемость, определявшаяся сразу после взятия пробы (в долях единицы)
S_t^*	Выживаемость, определявшаяся после «полного» восстановления (в долях единицы)
$A_t = 1 - B_t$	Содержание в пробах непочкующихся клеток
$M_t = 1 - S_t$	Содержание в пробах всех летально пораженных клеток (как способных, так и неспособных к восстановлению).
$R_t = S_t^* - S_t$	Содержание в пробах клеток, способных к восстановлению (т.е. клеток с потенциальными повреждениями)
$R_t^* = R_0 A_t$	Ожидаемое (теоретическое) содержание в пробах способных к восстановлению клеток, если реализация потенциальных повреждений строго приурочена к началу почкования
$Q_t = R_t - R_t^*$	Разница между истинным и теоретическим содержанием в пробах способных к восстановлению клеток
$M_0 A_t$	Содержание в пробах почкующихся летально пораженных клеток
$G_t = \frac{R_t}{M_0 A_t}$	Содержание в пробах способных к восстановлению клеток, выраженное по отношению ко всем летально пораженным непочкующимся особям
$G_t^* = \frac{Q_t}{M_0 B_t}$	Разница между реальным и теоретическим содержанием в пробах потенциально поврежденных клеток, выраженная по отношению ко всем летально поврежденным клеткам, образующим почки к моменту времени t

ко времени t образовать почки, должно быть одно и то же. Обстоятельство это существенно упрощает последующие рассуждения, снимая вопрос о том, клетки какой группы начинают почковаться раньше, а какой – позже.

Непосредственно в опытах мы определяли зависимость от времени t содержания в образцах почкующихся клеток (обозначим их B_t), клеток, способных к бесконечному размножению тотчас после взятия пробы (S_t), и клеток, способных образовывать макроколонии при высеве их на питательный агар после 24–48-часового восстановления (S_t^*). Однако, как показано в табл. 4, с помощью этих величин можно рассчитать теоретическое значение R_t^* способных восстанавливаться клеток, соответствующее предположению, что реализация потенциальных повреждений точно совпадает с началом почкования. Очевидно, что в случае справедливости первой гипотезы разность $R_t - R_t^* = Q_t$ ни при каких значениях t не может превышать 0.

Величины A_t , R_t , R_t^* и Q_t (смысловое значение этих, а также встречающихся ниже символов см. в табл. 4), рассчитанные по результатам опытов с облучением дрожжей высокими дозами, даны в табл. 5. Мы видим, что лишь в одном случае из 25 (для ЛД_{0,42} и $t = 2$ ч) $Q_t < 0$, во всех же остальных случаях

Зависимость A_t , R_t , R_t^* и Q_t (в %) от продолжительности инкубации облученных дрожжей в сусле

Доза, кР (выживаемость, %)	Группа	Время, ч A_t							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		100	98,2	75,1	35,0	8,8	2,0	0,5	0,3
170 (2,75±0,15)	R_t	29,0	32,0	25,1	29,7	17,8	12,7	8,5	—
	R_t^*	25,1	24,7	18,9	8,8	2,2	0,5	0,12	—
	Q_t	3,9	7,3	3,2	20,9	15,6	12,2	8,38	—
245 (0,42±0,03)	R_t	—	21,6	—	20,6	—	12,6	—	7,1
	R_t^*	—	26,1	—	9,3	—	0,5	—	0,08
	Q_t	—	—4,5	—	11,3	—	12,1	—	7,02
238* (0,079±0,005)	R_t	15,9	15,9	19,9	8,8	5,5	3,1	—	2,0
	R_t^*	13,9	13,6	10,5	4,9	1,2	0,3	—	0,04
	Q_t	2,0	2,3	9,4	4,1	4,3	2,8	—	1,96
315 (0,032±0,001)	R_t	17,97	19,97	12,97	11,97	4,07	2,06	0,83	0,73
	R_t^*	13,97	13,70	10,50	4,98	1,23	0,28	0,07	0,04
	Q_t	4,00	6,27	2,47	6,99	2,84	1,78	0,67	0,69

*В дозе 238 кР облучали более разбавленную суспензию, нежели в других опытах этой группы.

$Q_t > 0$. Следовательно, при $t > 1$ ч действительное количество способных к восстановлению клеток, как правило, превышает их теоретическое значение. Следовательно, даже при столь высоких дозах облучения, как 170–415 кР, реализации потенциальных повреждений у дрожжевых клеток не происходит вплоть до начала почкования, т.е. первая гипотеза неверна.

О чем же свидетельствует отмеченный только что факт $Q_t > 0$? Означает ли это, что способность клеток к восстановлению возрастает по мере приближения их к почкованию? Если это так, то с течением времени должно происходить возрастание значения G_t , неспособное, однако, превысить 1.

Зависимость G_t от t , графически изображенная на рис. 3,а, показывает, что содержание в пробах способных восстанавливаться клеток, отнесенное ко всем летально пораженным непочкующимся особям, сначала медленно, а затем быстро нарастает. Медленное возрастание G_t заметно уже в первые часы инкубации, когда $A_t \approx 100$. Это можно объяснить только некоторым увеличением содержания в пробах способных к восстановлению особей, что происходит, по-видимому, под влиянием метаболических процессов, осуществляющихся в клетках при помещении их после облучения на питательную среду; подобное обстоятельство, но выраженное в более яркой форме, было описано несколько лет назад [16] для облученных УФ бактерий. Однако, начиная с $t = 3$ часа, независимо от дозы облучения, наблюдается быстрое возрастание G_t . Между 3 и 6 часами соответствующие кривые пересекают значение $G_t = 1$ и устремляются вверх. При $t = 7-8$ ч содержание в пробах способных восстанавливаться клеток во много раз превышает содержание летально поврежденных непочкующихся особей. Это означает, что к восстановлению способны не только непочкующиеся клетки, но также часть клеток, уже успевших образовать почки.

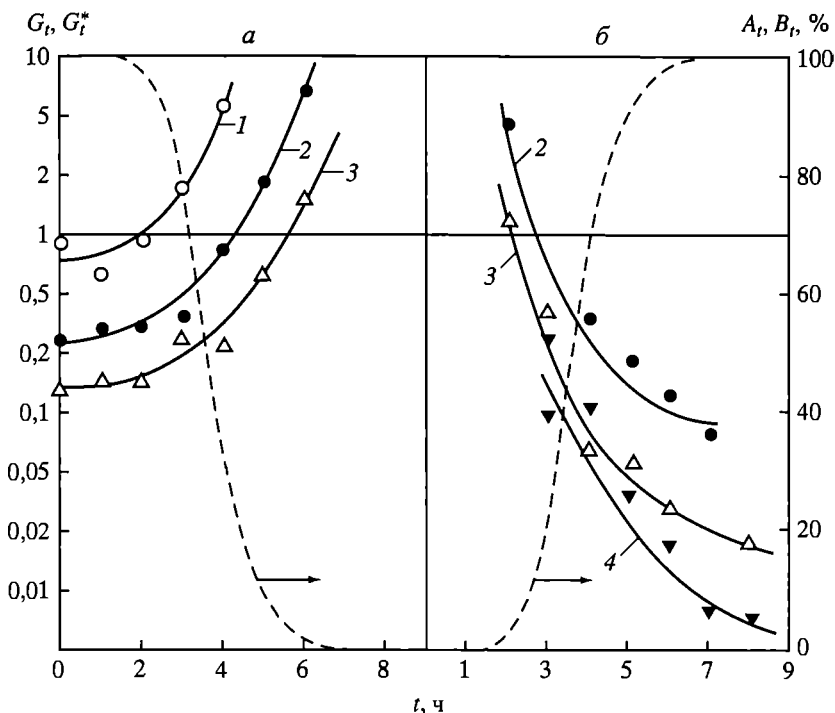


Рис. 3. Зависимость G_i (а) и G_i^* (б) от продолжительности инкубации облученных дрожжей в сусле.

1 – ЛД_{26,8}, 2 – ЛД_{2,75}, 3 – ЛД_{0,079}, 4 – ЛД_{0,032}; пунктирные линии – изменение содержания в суспензиях непочкующихся A_i (а) и почкующихся B_i (б) клеток

Таким образом, величина $Q_i > 0$ имеет двойственную природу и слагается как из числа непочкующихся клеток, дополнительно приобретших способность к восстановлению, так и из числа клеток, сохраняющих способность к восстановлению после образования почек. Удельный вес этих составляющих Q_i , однако, различен. Как следует из форм кривых рис. 3,а, первая составляющая, соответствующая медленному возрастанию этих кривых, даже к 6–8 часам вряд ли может обеспечить существенное увеличение Q_i . Следовательно, при $t \geq 3$ ч основное значение в формировании величины принадлежит второй компоненте – способным к восстановлению почкующимся клеткам.

Посмотрим, как будет с течением времени t изменяться относительное содержание таких клеток среди всех летально пораженных образовавших почки особей, т.е. какова будет форма зависимости G_i^* от t при $t \geq 3$ ч. Графически эта зависимость изображена на рис. 3,б. Мы видим, что G_i^* быстро уменьшается с течением времени t . Чем большее число летально пораженных клеток образует почки, тем меньшая доля их еще сохраняет способность к восстановлению. Если между 3 и 4 часами G_i и G_i^* для каждой дозы еще сравнимы между собой, то к 7–8 часам значение G_i^* уменьшается в 10–20 раз. Именно к этим срокам содержание в пробах почкующихся клеток приближается к 98–99% (см. рис. 2 и 3) и почти все почки достигают довольно крупных размеров.

Таким образом, утрата диплоидными дрожжевыми клетками способности к восстановлению, т.е. реализация у них потенциальных лучевых повреждений, приурочена не к началу почкования, а к более поздним его фазам. Показательно, что столь поздняя реализация потенциальных повреждений имеет место даже после столь высоких доз облучения, как $LD_{0,079}$ — $LD_{0,032}$, когда почти все облученные клетки погибают после первого-второго, редко третьего циклов почкования (см. табл. 2).

К какому же периоду в жизненном цикле дрожжевой клетки приурочена реализация потенциальных лучевых повреждений? Что означает тот факт, что реализация эта происходит несколько позднее, нежели начало почкования?

Опыты [17], выполненные на *Saccharomyces cerevisiae*, показали, во-первых, что у этого объекта почка и материнская клетка начинают независимо реагировать на облучение лишь по достижении первой около 1/3 размера породившей ее особи, а во-вторых, что вызываемая облучением задержка репликации хромосом может у дрожжей иметь большие сроки, нежели задержка первого почкования. Мы не знаем, с какой фазой почкования совпадает удвоение хромосомного аппарата у нашего штамма дрожжей и сколь сильно облучением можно затормозить этот процесс. Однако в качестве рабочей гипотезы можно предположить, что и у *Saccharomyces vini* штамм Мегри 139-В репликация хромосом после облучения происходит несколько позднее, нежели начинают образовываться почки, и что реализация потенциальных лучевых повреждений совершается у них именно во время удвоения хромосом.

Таким образом, мы приходим к выводу, что реализация потенциальных лучевых повреждений, обуславливающих гибель облученных клеток после одного или нескольких циклов размножения, происходит в тот же период жизненного цикла облученной особи, что и реализация потенциальных повреждений, вызывающих хромосомные aberrации в клетках растений [7] или рецессивные летальные мутации в микронуклеусах парамеций [9]. Весьма вероятно, что механизм такой реализации во всех трех случаях также идентичен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Надсон Г. А. // Вестн. рентгенол. радиол. 1920. Т. 1. С. 46.
2. Carlson J.G. // Radiation Biology / Ed. A. Hollaender. N.Y., 1954. Vol. 1. P. 763.
3. Hollaender A. // Advances in Radiobiology / Ed. G. C. de Hevesya. Edinburg; London. 1957. P. 123.
4. Лучник Н.В., Царапкин Л.С. // Цитология. 1959. Т. 1. С. 72.
5. Лучник Н.В., Царапкин Л.С. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 124. С. 213.
6. Царапкин Л.С. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 128. С. 190.
7. Лучник Н.В. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 129. С. 1168.
8. Doudney C O., Haas F.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1959. Vol. 45. P. 709.
9. Кимболл Р.Ф. // Восстановление клеток от повреждений. М.: Атомиздат, 1963. С. 247.
10. De Lamater R.D. // J. Bacteriol. 1950. Vol. 60. P. 321.
11. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 703.
12. Ремезова Т.С., Третьякова В.П. // Журн. общ. биол. 1961. Т. 22. С. 120.
13. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 206.
14. Алексеева С.И., Граевский Э.Я., Корогодин В.И. и др. // Радиобиология. 1961. Т. 2. С. 878.
15. Корогодин В.И. // Биофизика. 1957. Т. 2. С. 576.
16. Gillies N.E., Alper T. // Nature. 1959. Vol. 183. P. 237.
17. Burns V.W. // Radiation Res. 1956. Vol. 4. P. 394.



В.И. Корогодин в лаборатории кафедры биофизики МГУ. 1956
V.I. Korogodin in the laboratory of biophysics chair of the Moscow State University. 1956

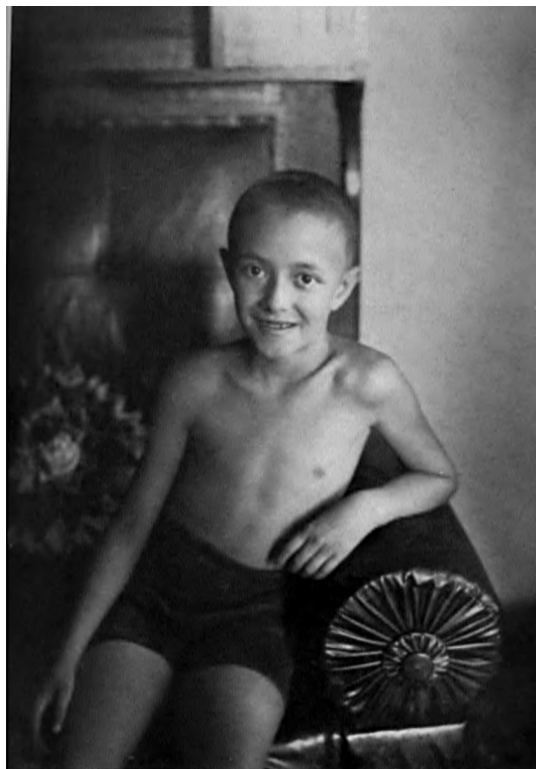


Семья отца – Ивана Павловича Корогодина (первый слева во втором ряду). 20-е гг. XX в., г. Затобольск, Казахстан
 Family of V.I. Korogodin's father (Ivan P. Korogodin – the first on the left in the second row). 1920th, t. Zatobolsk, Kazakhstan

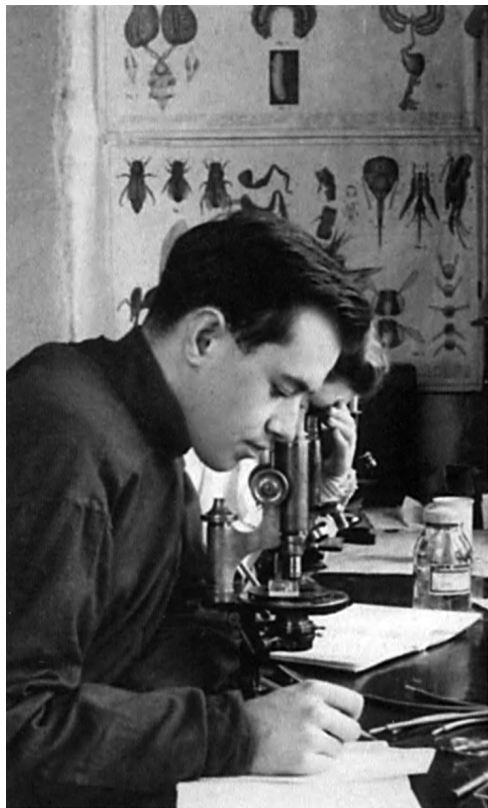


Семья матери – Евгении Антоновны Корогодиной (урожд. Писаревской); Антон Васильевич Писаревский с женой Надеждой Игнатьевной (урожд. Воейковой) (в центре), Евгения Антоновна Корогодина (четвертая слева в первом ряду), Иван Павлович Корогодина (четвертый слева во втором ряду). Начало 30-х гг. XX в., Павлоград
 Family of V.I. Korogodin's mother Eugenia A. Korogodina (née Pisarevskaya): Anton V. Pisarevskij with his wife Nadezhda I. (née Voejkova) (middle), Eugenia A. Korogodina (the fourth on the left in the front row), Ivan P. Korogodin (the fourth on the left in the second row). The beginning of 1930th, t. Pavlograd

Иван Павлович Корогодин с женой Евгенией Антоновной и маленьким Володей. 21 марта 1930 г. г. Сталино (Донецк)
Ivan P. Korogodin with his wife Eugenia A. Korogodina and little Vladimir. 21.03.1930, t. Stalino (Donezk)



В. Корогодин. 1936 г. Харьков
V. Korogodin. 1936, t. Kharkov



**В.И. Корогодин на Пушкинской биостанции МГУ. Останкино, 5 декабря 1949 г.
V.I. Korogodin at the Pushkin's biostation of the Moscow State University. 5.12.1949, Oostankino**

На пароходе «Печорский комсомолец» на реке Ижме. В.И. Корогодин и зоотехник Э.В. Шмит. 1953 г.

On shipboard «Pechora Komsomol» on Izhma river. V.I. Korogodin and zootechnician E.V. Shmit. 1953



Проф. Б.Н. Тарусов, основатель кафедры биофизики биолого-почвенного факультета МГУ
Professor B.N. Tarusov, the establisher of the biophysics chair of biology-soil sciences' department of the Moscow State University



В.И. Корогодин и Г.Г. Поликарпов.
Кафедра биофизики, 1955 г.
V.I. Korogodin and G.G. Polikarpov.
Biophysics' chair, 1955.





Н.В. Тимофеев-Ресовский
N.W. Timofeeff-Ressovsky

Приезд Н.В. Тимофеева-Ресовского на биофак МГУ. Слева направо: М.М. Асланян, Г.Г. Поликарпов, А.Н. Тюрюканов, Н.В. Тимофеев-Ресовский, В.И. Корогодин, В.М. Глазер. 1960 г.

Coming of N.W. Timofeeff-Ressovsky at the biology department of the Moscow State University. From left to right: M.M. Aslanyan, G.G. Polikarpov, A.N. Tyuryukanov, N.W. Timofeeff-Ressovsky, V.I. Korogodin, V.M. Glazer. 1960





На летней школе на берегу озера Большое Миассово. Слева направо: В.И. Корогодин, Л.С. Царапкин, Н.А. Порядкова, Н.В. Лучник, О.В. Малиновский. 1961 г.
at the summer school on the shore of the lake of Bolshoe Miassovo. From left to right: V.I. Korogodin, L.S. Zarapkin, N.A. Poryadkova, N.V. Luchnik, O.V. Malinovsky. 1961



Проводы на пенсию Н.В. Тимофеева-Ресовского в Институте медицинской радиологии РАМН. Слева направо: Н.В. Тимофеев-Ресовский, Е.К. Гинтер, В.И. Корогодин, В.И. Иванов. Обнинск, 1969
Seeing off on a pension of N.W. Timofeeff-Ressovsky in Institute of medical radiology of RAMS. From left to right: N.W. Timofeeff-Ressovsky, E.K. Ginter, V.I. Korogodin, V.I. Ivanov. Obninsk, 1969



В лаборатории В.И. Корогодина (Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов). Слева направо: И.И. Толсторуков, К.М. Ближник, Ю.Г. Капульцевич, Г.В. Савченко, С.В. Беневоленский, Т.И. Наумова. Середина 70-х гг. XX в. Москва

In V.I. Korogodin's laboratory (Institute of genetics and selection of industry microorganisms). From right to left: I.I. Tolstorukov, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich, G.V. Savchenko, S.V. Benevolensky, T.I. Naumova. The middle of 1970th. Moscow



Посещение лаборатории Р. Мортимера в Калифорнийском университете. Слева направо: Р. Мортимер, С.Г. Инге-Вечтомов, В.И. Корогодина, Дж. Бассел. Беркли, США. 1975 г.

Visit to the laboratory of R. Mortimer in Californian University. From left to right: R. Mortimer, S.G. Inge-Vechtomov, V.I. Korogodin, J. Bassel. Berkeley, USA, 1975

1.2. РОЛЬ ПЛОИДНОСТИ В ВОССТАНОВЛЕНИИ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВЕТОВОЙ И ТЕМНОВОЙ РЕАКТИВАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК РАЗНОЙ ПЛОИДНОСТИ, ПОРАЖЕННЫХ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Явление реактивации организмов после ультрафиолетового облучения известно уже давно. В 1949 г. была описана фотореактивация парамеций [Ковалев, 1949], гиф грибов [Kelner, 1949a], кишечной палочки [Kelner, 1949b; Novick, Szilard, 1949] и бактериофага [Dulbecco, 1949], а затем ряда других объектов, в том числе и дрожжевых клеток [Dulbecco, 1955]. Несколько лет назад появились сообщения о реактивации пораженных ультрафиолетовыми лучами инфузорий и бактерий под влиянием антибиотиков, задерживающих деление клеток [Kimball, Gaitner, Wilson, 1959; Gillis, 1959], а также диплоидных дрожжей, выдерживаемых в течение суток после облучения в непитательной среде [Ковязин, 1960]. В последние годы, после обнаружения «эффекта восстановления» клеток, пораженных ионизирующими излучениями, в опытах на дрожжевых организмах [Корогодин, 1958; Корогодин и Лю Айшень, 1959; Барсуков и др., 1961] и на клетках корешков пшеницы [Лучник и др., 1960] была показана четкая зависимость этого феномена от ploидности облучаемых объектов. Последнее обстоятельство побудило нас проверить, связана ли способность дрожжей к световой и темновой реактивации после ультрафиолетового облучения с количеством хромосомных наборов, содержащихся в их ядрах.

В опытах использовали генетически родственные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* шести ploидностей, от гаплоидов до гексаploидов: УО-2587 (1 *n*), Х-320 (2 *n*), Х-321 (3 *n*), Х-323 (4 *n*), Х-355 (5 *n*) и Х-362 (6 *n*). Указанные штаммы были любезно предоставлены нам профессором Р.К. Мортимером¹. Способ получения этих дрожжей, генетические особенности и кривые выживания их при действии рентгеновских лучей приведены в работе этого автора [Mortimer, 1958]. Кроме штаммов Р.К. Мортимера, в некоторых опытах мы использовали диплоидные дрожжи *Saccharomyces vini*, штамм Мегри 139-В, также довольно хорошо изученный в радиобиологическом отношении.

Перед постановкой каждого опыта дрожжи, независимо от штамма, выращивались 48 ч на агаризованном сусле (2% агара, 5° сусла) при 28 °С. Выросшую культуру суспендировали в стерильной водопроводной воде и, доведя концентрацию до 50–200 × 10⁴ клеток/мл, облучали небольшое количество такой суспензии ультрафиолетовыми лучами. Облучение проводили в стеклянном бюксе, покрытом снаружи черным лаком. Источником излучения служили две лампы БУВ-15, фильтром – стекло УФС-1, не пропускаю-

¹ Авторы пользуются случаем искренне поблагодарить профессора Р.К. Мортимера, предоставившего в их распоряжение, несмотря на связанное с этим беспокойство и затрату времени, уникальные штаммы дрожжей разной ploидности.

щее видимого света. Фотореактивацию обеспечивала лампа накаливания в 300 Вт, инфракрасная часть спектра которой поглощалась водным фильтром; реактивируемая суспензия помещалась на расстоянии 16 см от источника света, при мощности светового потока в 35 000 люкс/см². Темновая реактивация достигалась помещением облученной суспензии дрожжей на 24–48 ч в термостат. Температура при облучении дрожжей ультрафиолетом +18–20 °С, при световой и темновой реактивации 28–30 °С. Последний режим соблюдался и при инкубировании клеток, посеянных на покрытые питательным агаром предметные стекла, как непосредственно после облучения, так и спустя разные сроки пребывания в условиях реактивации.

Известно, что дрожжевые клетки, пораженные ионизирующим или ультрафиолетовым излучением и посеянные на питательную среду, погибают либо без предварительного размножения (I форма поражения), либо после образования одной-двух почек (II форма поражения), либо после нескольких циклов почкования (III форма поражения) (Ковязин, 1960). Клетки, не испытывавшие летальных изменений, постепенно восстанавливают нормальный темп деления и спустя 24 ч образуют чечевицеобразные колонии, состоящие из многих тысяч особей. Относительное содержание на препаратах колоний последнего типа, легко определяемое микроскопированием, служит показателем «выживаемости». Этой методикой «подсчета микроколоний», подробно изложенной ранее (Корогодин, 1958а), мы и пользовались для выявления эффективности ультрафиолетового облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривые выживания некоторых из штаммов дрожжей, использованных в работе, приведены на рис. 1, где величина выживаемости отложена в логарифмическом масштабе, а продолжительность экспозиции – в линейном. Для всех штаммов эти кривые имели один и тот же вид. Прямолинейная часть таких кривых, экстраполированная до пересечения с осью ординат, может быть описана уравнением:

$$\lg S = A + BD, \quad (1)$$

где $\lg S$ – логарифм выживаемости, D – доза (в мин), а A и B – коэффициенты (Sarachek, Lucke, 1953). Величина A характеризует степень изогнутости кривой выживания, а B – ее крутизну, отражающую радиочувствительность клеток. В табл. 1 приведены значения коэффициентов A и B для всех изученных нами штаммов дрожжей.

Большинство опытов по реактивации выполнены после облучения клеток дозами в 3–4 мин, обеспечивавшими начальную выживаемость в 1–10%. В тех случаях, когда реактивация имела место, возрастание выживаемости описывалось аналогичными по форме кривыми, примеры которых для штамма X-355 приведены на рис. 2, а, в.

Процесс реактивации можно изобразить и по-другому (Dulbecco, 1955), откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат – относительную эффективную дозу $D_t^* = D_t/D_0$, как показано на рис. 2, б, г. Такие кривые можно описать уравнением

$$D_t^* = D_t/D_0 = k + (1 - k)e^{-Bt}, \quad (2)$$

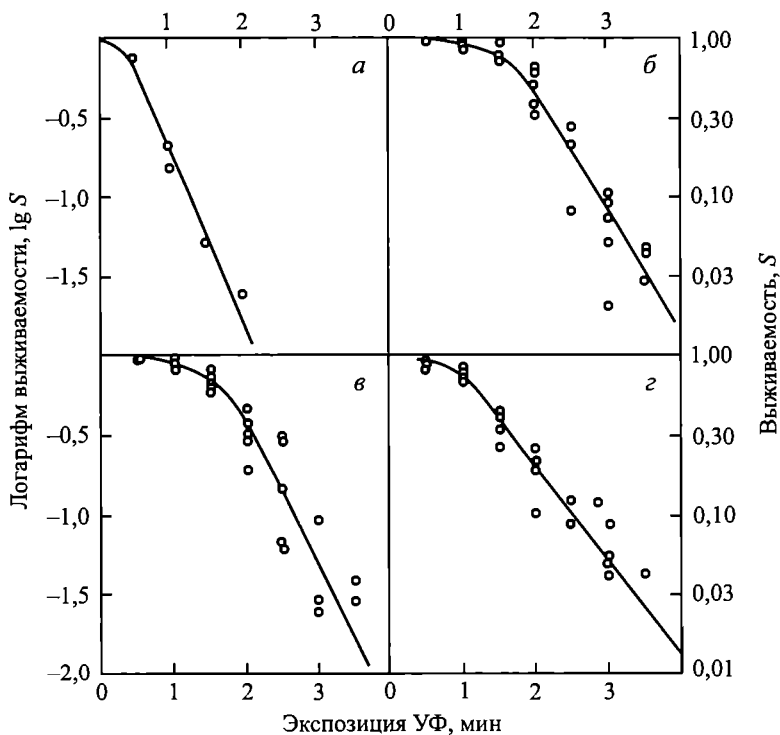


Рис. 1. Кривые выживания дрожжевых клеток, облученных ультрафиолетом.

a – штамм YO-2587, 1 *n*; *б* – штамм X-320, 2 *n*; *в* – штамм X-323, 4 *n*; *г* – штамм X-362, 6 *n*. Масштаб полулогарифмический

где D_0 – заданная доза, D_t – доза, обуславливающая такую же выживаемость, как и спустя t часов реактивации, k – необратимая компонента поражения, выраженная в долях заданной дозы, а β – скорость уменьшения обратимой компоненты поражения $(1 - k)$.

Таблица 1

Числовые значения коэффициентов уравнений (1) и (2), характеризующих радиочувствительность дрожжей и способность их к реактивации, а также данные об относительной интенсивности дыхания использованных в работе штаммов (интенсивность дыхания гаплоида YO-2587 принята за 1)

Индексы	Штаммы дрожжей разной ploidy							
	YO-2587 1 <i>n</i>	X-320 2 <i>n</i>	X-321 3 <i>n</i>	X-323 4 <i>n</i>	X-355 5 <i>n</i>	X-362 6 <i>n</i>	Мегри 139-B 2 <i>n</i>	
Радиочувствительность	<i>A</i>	0,49	1,32	0,97	1,32	0,79	0,54	1,16
Фотореактивация	<i>B</i>	1,15	0,80	0,63	0,88	0,72	0,61	0,89
	<i>k</i>	1	0,50	0,44	0,58	0,48	0,39	0,39
Темновая реактивация	β	0	1,43	1,03	1,34	1,65	1,62	1,71
	<i>k'</i>	1	0,53	0,59	0,65	0,56	0,43	0,54
Интенсивность дыхания	β'	0	0,120	0,144	0,115	0,115	0,086	0,117
		1,0	0,98	0,95	1,23	1,08	1,30	2,36

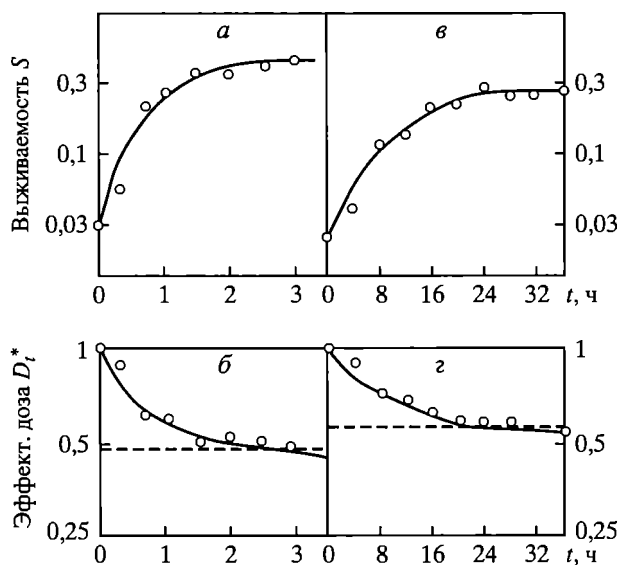


Рис. 2. Реактивация дрожжевых клеток штамма X-355, 5n при разных режимах.

Фотореактивация: а – зависимость выживаемости S от продолжительности экспозиции t видимым светом, б – зависимость эффективной дозы D_t^* от продолжительности экспозиции t , в и г – то же, что на а и б, только для темновой реактивации. Масштаб полулогарифмический

Значения коэффициентов k и β для световой и темновой реактивации изученных нами штаммов приведены в табл. 1. Мы видим, что все штаммы, кроме гаплоидного, способны претерпевать и световую, и темновую реактивацию. Как мы уже упоминали, облученные ультрафиолетом дрожжевые клетки могут погибать либо без предварительного размножения (I форма поражения), либо после нескольких циклов почкования. При дозах, применявшихся в опытах по реактивации, значительная доля клеток (до 50–70%) образовывала I форму поражения. По данным Ковязина (1960), эта форма поражения дрожжей необратима, по крайней мере, в случае темновой реактивации. В наших опытах при обоих режимах реактивации необратимо пораженными (в случае не гаплоидных дрожжей) оставалось 50–60% клеток. Это заставило нас специально изучить реактивабельность I формы поражения. Полученные данные, представленные в табл. 2, убедительно показывают, что во всех случаях, когда имеет место реактивация, особенно при фотореактивации, происходит резкое уменьшение в облученной популяции клеток, обнаруживающих I форму поражения.

Некоторые особенности реакции дрожжей на ультрафиолет напоминают их реакцию на ионизирующие излучения, другие же особенности специфичны, видимо, только для ультрафиолета. Так, кривые эффект–доза ультрафиолета для всех штаммов имеют сигмоидную форму ($A > 0$), тогда как выживаемость гаплоидных штаммов, пораженных ионизирующими излучениями, описывается экспоненциальными кривыми [Mortimer, 1958; Корогодина, Лю Ай-шень, 1959]. Чувствительность к ультрафиолету, как уже отмечалось в литературе [Sarachek, Lucke, 1953], уменьшается от гаплоидов к диплоидам и далее почти

Относительное содержание (%) на препаратах клеток, погибающих без предварительного размножения (I форма поражения). Доза 3,5 мин

Режим	Штамм и плоидность						
	УО-2587 1 n	Х-320 2 n	Х-321 3 n	Х-323 4 n	Х-355 5 n	Х-362 6 n	Мегри 139-В 2 n
Высев сразу после облучения	78	70	74	61	68	49	73
Высев спустя 3 ч фотореактивации	74	0,9	2,1	0,9	0,1	1,7	7,0
Высев спустя 2 ч темновой реактивации	67	25	25	25	26	14	27

не изменяется, тогда как в случае ионизирующих излучений диплоиды обладают минимальной радиочувствительностью, с дальнейшим же увеличением плоидности их радиорезистентность уменьшается и приближается к таковой гаплоидов [Mortimer, 1958]. После воздействия ультрафиолета, как и после ионизирующих излучений [Корогодин, Лю Ай-шень, 1959; Барсуков и др., 1961], мы не наблюдали реактивации гаплоидных клеток. Однако, хотя в случае ионизирующей радиации «реактивабильность» с увеличением плоидности от двух и далее возрастает [Барсуков и др., 1961; Лучник и др., 1960], в опытах с ультрафиолетом она остается примерно одинаковой (сравните значения k , β и k' , β' для клеток с двумя и более геномами, см. табл. 1). После ионизирующих излучений фотореактивация, как известно, почти или полностью отсутствует [Dulbesso, 1955], в случае же ультрафиолета при сильном освещении видимым светом реактивация происходит примерно в 10 раз быстрее, чем в темноте (сравните значения β и β' для каждого штамма, см. табл. 1). Наконец, в случае ионизирующих излучений скорость реактивации дрожжевых клеток коррелирует с интенсивностью дыхательных процессов [Ремезова, Третьякова, 1961; Карабаев, Корогодин, 1961]. Для проверки существования подобного обстоятельства после ультрафиолетового облучения мы измерили интенсивность дыхания изучаемых дрожжей. Дыхание необлученных клеток определяли на аппарате Варбурга при 28–29 °С, т.е. при температуре режимов реактивации. Полученные данные, нормированные к 10^{10} клеток за 1 ч и выраженные в относительных единицах (интенсивность дыхания гаплоидных дрожжей принята за 1), приведены в табл. 1. Мы видим, что на основании представленных в этой таблице данных вряд ли можно говорить о существовании четкой корреляции между интенсивностью дыхания и быстротой как световой, так и темновой реактивации дрожжевых клеток, пораженных ультрафиолетовым излучением.

ВЫВОДЫ

Приведены данные о чувствительности к ультрафиолету ряда дрожжевых клеток, различающихся плоидностью (от гаплоидов до гексаплоидов). Как световая, так и темновая реактивация наблюдается у всех штаммов, кроме гаплоидного. Под влиянием видимого света реактивация дрожжевых кле-

ток протекает значительно быстрее, чем в темноте, и затрагивает большее количество пораженных клеток. У «реактивабельных» дрожжей (а таковыми являются дрожжи с двумя и более геномами) интенсивность процессов реактивации практически не зависит от степени пloidности и не коррелирует с интенсивностью дыхания необлученных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков В.С., Малиновский О.В., Митюшова Н.М. // Докл. АН СССР. 1961 (в печати).
2. Карабаев Э.М., Корогодин В.И. Радиобиология. 1961. Т. 1, № 5. С. 653–658.
3. Ковалев И.Ф. // Уч. зап. Укр. эксперим. ин-та глазных болезней им. Филатова. 1949. Т. 1.
4. Ковязин Н.В. // Журн. общ. биол. 1960. Т. 21, № 5. С. 282–285.
5. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958а. Т. 3. № 2. С. 206–214; Биофизика. 1956. Т. 3, № 6. С. 703–710.
6. Корогодин В.И., Лю Ай-шень // Цитология. 1959. Т. 1, № 4. С. 397–404.
7. Лучник Н.В., Изможеров Н.А., Порядкова Н.А. и др. // Обратимость цитогенетических повреждений. М.: Изд-во АН СССР, 1960.
8. Ремезова Т.С., Третьякова В.П. // Журн. общ. биол. 1961. Т. 22, № 2. С. 120–127.
9. Dulbecco R. // Nature. 1949. Vol. 163. P. 949–950. Ibid. // Radiation Biology / Ed. A. Hollender. New York, 1955. Vol. 2. P. 455–486.
10. Gillis N.E., Alper T. // Nature. 1959. Vol. 183. P. 237–238.
11. Kelner A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1949a. Vol. 35, N 2. P. 73–79. J. Bacteriology. 1949. Vol. 58, N 4. P. 511–522.
12. Kimball R.F., Caitner S., Wilson S.M. // Radiation Res. 1959. Vol. 10, N 1. P. 390–497.
13. Mortimer R.K. // Radiat. Research. 1958. Vol. 9, N 3. P. 312–326.
14. Novick A., Szilard L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1949. Vol. 35, N 10. P. 591–600.
15. Sarachek A., Lucke W.H. // Arch. Biochem. Biophys. 1953. Vol. 44, N 2. P. 271–279.

THE COMPARATIVE STUDY OF LIGHT AND DARK REACTIVATION OF YEAST CELLS OF DIFFERENT PLOIDY, DAMAGED BY ULTRAVIOLET RADIATION

V.I. Korogodin, A.Y. Egorov, E.N. Kabakov, L.I. Markova

SUMMARY

The results on the ultraviolet sensitivity of some yeast cells which differ in ploidy (from haploid to hexaploid), are presented. Both the light and dark reactivations are observed in all strains except the haploid. Under the influence of visible light the reactivation of yeast cells proceeds more quickly than in the dark and affects large number of damaged cells. The intensity of the recovery processes of «reactiveable» yeasts i.e. yeast cells with two and more number of genomes practically independent on the ploidy degree and is not correlated with the intensity of breathing of the cells which were not irradiated.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК РАЗНОЙ ПЛОИДНОСТИ, ПОРАЖЕННЫХ АЛЬФА-ЧАСТИЦАМИ

Сравнительное изучение биологического действия ионизирующих излучений, создающих различную линейную плотность ионизации (ЛПИ), например, рентгеновых или γ -лучей и α -частиц и нейтронов, проводится в нескольких аспектах. Действительно, можно сравнивать кривые доза–эффект и определять относительную биологическую эффективность (ОБЭ) таких излучений; можно исследовать зависимость ОБЭ от физиологического состояния объектов; можно изучать модифицирующее влияние на биологическое действие этих излучений температуры, кислорода и различных химических агентов; можно, наконец, выяснять зависимости их эффективности от условий пострадиационного культивирования облученных объектов. Очевидно, что только накопление обширного фактического материала во всех четырех отмеченных аспектах позволит составить более или менее удовлетворительное представление о зависимости радиобиологических реакций от особенностей микрогеометрического распределения первичных физических актов взаимодействия ионизирующих излучений с биосубстратом.

Данные об ОБЭ редко- и густоионизирующих излучений весьма обширны; в общем случае (за исключением биологических макромолекул вирусов и фагов) α -частицы и нейтроны оказывают более сильное влияние на организмы, нежели рентгеновы и γ -лучи. Однако ОБЭ этих излучений зависит от физиологического состояния объектов и до сих пор не имеет никакого рационального объяснения [1]. Установлено, что поражающее действие α -частиц и нейтронов почти или вовсе не зависит от кислородного напряжения [2] и присутствия ряда химических соединений, эффективных в случаях рентгеновского или γ -облучения [3]. Недавно было показано, что эффективность α -облучения инфузорий можно заметно уменьшить, воздействуя на них в пострадиационный период некоторыми антибиотиками [4]. Аналогичный эффект восстановления после α -облучения был описан также для одного штамма диплоидных дрожжей [5]. В настоящей работе приводятся результаты изучения возможности восстановления жизнеспособности пораженных α -частицам дрожжевых клеток нескольких штаммов, содержащих разное количество хромосомных наборов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДИКА

В работе использованы 12 штаммов дрожжей разной ploidy, наименования которых, генетические характеристики и источники их получения приведены в табл. 1.

Дрожжи каждого штамма выращивали в течение 2–3 суток на косом сусло-агаре (5 Балл, сусла + 2% агар-агара) при 30°, затем суспендировали в стерильной водопроводной воде и моноклочечным слоем наносили на поверхность голодного агара, где и подвергали облучению α -частицами. Облученные клетки ресуспендировали в воде, доводили до концентрации около

Описание штаммов дрожжей, использовавшихся в работе

№	Вид	Штамм	Плоидность	От кого получен
1	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Лабораторный	I	В.И. Кудрявцев, СССР
2	<i>Saccharomyces vini</i>	Мегри 139-В	II	То же
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1270-12d	I	Б.С. Эфруси, Франция
4	То же	WY-110	II	То же
5	»	16 × 32	IV	»
6	»	YO-2587	I	Р.К. Мортимер, США
7	»	X-320	II	То же
8	»	X-324	II	»
9	»	X-321	III	»
10	»	X-322	III	»
11	»	X-323	IV	»
12	»	X-362	VI	»

10^6 клеток/мл и высевали на предметные стекла, покрытые агаризованным сушлом. Высев облученных клеток на питательную среду производили как сразу после облучения, так и спустя 24 и 48 ч. Предпосевную пострадиационную инкубацию в стерильной воде проводили при 30 °С. Выживаемость определяли по методике микроколоний [6] путем микроскопирования препаратов после 24-часовой инкубации их при 28–30 °С. «Выживающими» считали клетки, способные образовывать за указанный срок колонии, состоящие из 50 и более нормально почкующихся особей. Как показали предварительные опыты, относительное содержание на препаратах таких колоний довольно хорошо соответствует проценту выживаемости, определяемому по стандартной методике учета макроколоний на чашках Петри.

Источниками α -частиц служили препараты плутоний Pu^{239} , создававший на расстоянии 13 мм от поверхности мощность дозы около 50 рад/мин, и полоний Po^{210} , создававший на расстоянии 8 мм от поверхности мощность дозы около 10 200 рад/мин. В первом случае облучение продолжалось от 30 мин до нескольких часов и проводилось при 1–2 °С (для предотвращения восстановления во время облучения), во втором – в течение минут при комнатной температуре. Несколько опытов по облучению дрожжей *Zygosaccharomyces bailii* и *Saccharomyces vini* Мегри 139-В на том и другом источнике не выявили существенных различий в радиочувствительности клеток при обоих режимах облучения. Поэтому в дальнейшем мы будем указывать только величины доз, независимо от интервалов времени, в течение которых их давали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для всех использовавшихся штаммов дрожжей были определены кривые выживания. Несколько примеров таких кривых, изображенных в полулогарифмическом масштабе, приведено на рис. 1. Каждую кривую выживания можно описать двумя величинами: «экстраполяционным коэффициентом» n (формальная «ударность»), отражающим степень изогнутости кривой, и величиной LD_{10} , общепринятой мерой радиорезистентности облучаемых од-

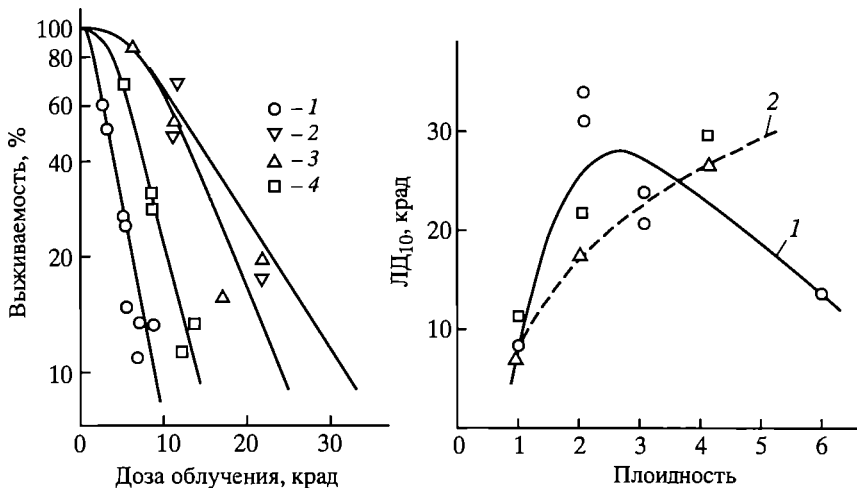


Рис. 1. Кривые выживания гаплоидных (1 – УО-2587), диплоидных (2 – Х-320), триплоидных (3 – Х-322) и гексаплоидных (4 – 362) дрожжей

Высев на питательную среду сразу после облучения α -частицами

Рис. 2. Зависимость радиорезистентности дрожжевых клеток (LD_{50}) от количества хромосомных наборов: 1 – для группы родственных штаммов дрожжей разной плоидности, полученных от Р.К. Мортимера; 2 – для дрожжей разных штаммов, полученных от Б.С. Эфруси

ноклеточных организмов. Соответствующие данные приведены в табл. 2, где различные штаммы дрожжей обозначены теми же номерами, что и в табл. 1.

На рис. 2 изображена зависимость LD_{50} от плоидности. Минимальной радиорезистентностью, как и следовало ожидать, отличаются гаплоидные штаммы. Для полиплоидного ряда дрожжей, полученных от Мортимера, радиорезистентность диплоидных штаммов максимальная, с дальнейшим же увеличением плоидности намечается ее снижение (рис. 2, 1). Для дрожжей гаплоидного, диплоидного и тетраплоидного штаммов, полученных от Эфруси, радиорезистентность с увеличением плоидности возрастает (рис. 2, 2).

Таблица 2

Радиобиологические характеристики использовавшихся в работе штаммов дрожжей

Номер штамма	α -облучение		Х- или γ -облучение		$LD_{x,\gamma} 10$ $LD_{\alpha} 10$	Номер штамма	α -облучение		Х- или γ -облучение		$LD_{x,\gamma} 10$ $LD_{\alpha} 10$
	n_{α}	$LD_{\alpha} 10$	$n_{x,\gamma}$	$LD_{x,\gamma} 10$			n_{α}	$LD_{\alpha} 10$	$n_{x,\gamma}$	$LD_{x,\gamma} 10$	
1	1	8	1	11,9* ¹	1,5	7	1,6	31	3,4	47,5* ³	1,5
2	2,8	22	6	58* ¹	2,6	8	1,8	34	–	–	–
3	1	11,2	1	20* ²	1,8	9	1,4	21	1,8	36* ³	1,7
4	1	18	2,5	37* ²	2,1	10	1,7	24	1,8	41* ³	1,7
5	1,4	27	2,5	58* ²	2,1	11	1,9	30	1,9	30* ³	1,0
6	1	8,5	1	8,1* ²	0,95	12	2	14	1,4	16,8* ³	1,2

*¹ Собственные данные.

*² Данные О.В. Малиновского (личное сообщение).

*³ Данные заимствованы из работы Мортимера [7].

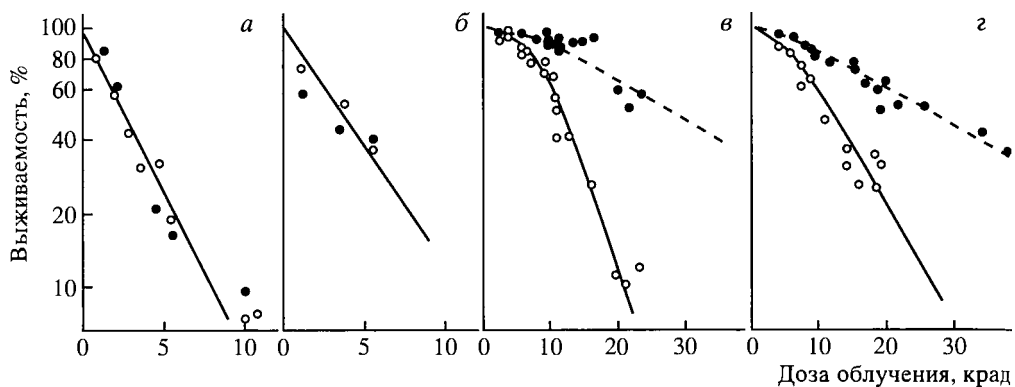


Рис. 3. Кривые выживания, определявшиеся путем высева дрожжевых клеток на питательный агар сразу после облучения (светлые кружки) и после 24-часовой инкубации облученных клеток в непитательной среде (темные кружки).

Приведены данные для гаплоидных штаммов (*a* – *Zygosaccharomyces Bailii*, *б* – 1270-12d), диплоидного (*в* – Мегри 139-B) и тетраплоидного (*з* – 16 × 32)

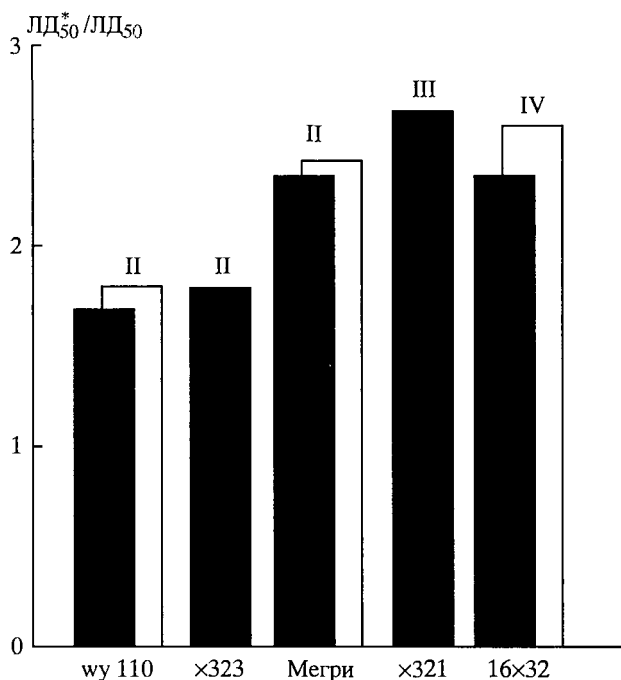


Рис. 4. Эффективность восстановления (LD_{50}^*/LD_{50}) дрожжевых клеток разных штаммов после облучения их α -частицами (темные столбики) и γ -лучами (светлые столбики), II-IV – плоидность

Результаты опытов по изучению пострадиационного восстановления дрожжей разных штаммов приведены на рис. 3 и 4 и в табл. 3. Нам не удалось обнаружить восстановления ни у одного из гаплоидных штаммов (соответствующие данные по двум из трех изучавшихся гаплоидных штаммов см. на рис. 3, *a*, *б*). У всех штаммов более высокой плоидности (кроме штаммов X-324 и X-362, которые в этом отношении не исследованы) зарегистриро-

Выживаемость (в %) дрожжевых клеток, определяющаяся сразу после облучения, а также спустя 24 и 48 ч

Штамм	Доза, крад	Продолжительность восстановления, часы		
		0	24	48
Мегри 139-В	9	69	91	97
	16,2	26	76	93
	21,6	9,5	40	51
S-321	5,8	60	87	91
	11,6	19,5	75	77
X-323	11,6	70	80	88

вано интенсивное восстановление после α -облучения при инкубации их в голодной среде. Как следует из табл. 3, резкое возрастание выживаемости наблюдается в основном в течение первых 24 ч такой инкубации. Примеры кривых выживания, полученных при высеве клеток на питательный агар сразу после облучения и спустя 24 ч, приведены на рис. 3, в, г.

ОБСУЖДЕНИЕ

Интересно сравнить реакции дрожжевых клеток разных штаммов на облучение рентгеновыми или γ -лучами и α -частицами.

Общеизвестно, что при α -облучении не наблюдается (или почти не наблюдается) кислородного эффекта; это было показано и для одного штамма дрожжей, использовавшегося в настоящей работе [5]. Это – одно существенное различие в действиях на дрожжи густо- и редкоионизирующих излучений. Второе различие состоит в увеличении эффективности α -облучения по сравнению с рентгеновыми или γ -лучами при одновременном уменьшении степени изогнутости кривой выживания. Это положение хорошо иллюстрирует табл. 2, где для 11 штаммов дрожжей приведены значения n_{α} , n_{γ} , $LD_{\alpha 10}$, $LD_{\gamma 10}$ и отношение $LD_{\gamma 10}/LD_{\alpha 10}$, примерно характеризующее ОБЭ α -частиц (соответствующий цифровой материал по рентгеновому и γ -облучению рассчитан по данным нескольких авторов, работавших с теми же штаммами дрожжей).

Как изменение степени изогнутости кривых выживания при облучении дрожжей густо- и редкоионизирующими излучениями, так и изменение их радиорезистентности различны для разных штаммов. Если ОБЭ α -лучей для штамма Мегри 139-В равна 2,6, для штаммов 1270 – 12d, WY-110, 16 × 32 близка к 2, а для штаммов X-321 и X-322 составляет 1,7, то для штаммов *Zygosaccharomyces bailii* X-320 и X-362 радиочувствительность изменяется незначительно, для штамма X-323 остается постоянной, а для штамма YO-2587 даже несколько снижается. Никакой четкой зависимости этих изменений от степени плоидности установить не удастся. Зависимость радиочувствительности от степени плоидности в пределах родственных штаммов дрожжей имеет при α -облучении примерно такой же характер, как и при рентгеновском или γ -облучениях (см. рис. 2, табл. 2). В пределах группы штаммов, полученных от Р.К. Мортимера, с увеличением плоидности от 2 и

более наблюдается снижение радиорезистентности, хотя и значительно менее четко выраженное, чем при рентгеновском облучении [7]. В пределах же группы штаммов, полученных от Б.С. Эфруси, как при действии α -частиц, так и при действии γ -лучей с увеличением плоидности от 1 до 4 радиорезистентность монотонно возрастает. Свидетельствует ли это о том, что закономерность, установленная Мортимером [7] для зависимости радиорезистентности дрожжей от их плоидности, носит лишь частный характер? Чтобы ответить на этот вопрос, наших данных, конечно, еще недостаточно.

Рассмотрим теперь особенности восстановления дрожжевых клеток после α -облучения. В тех случаях, когда восстановление имеет место (т.е. для клеток с двумя и более хромосомными наборами), вследствие восстановления происходит уменьшение изогнутости кривой выживания. Это хорошо заметно на рис. 3, в, г. Расчеты показали, что если сразу после облучения для штаммов Мегри 139-В, X-320 и 16×32 значения n равны 2,8, 1,5 и 1,4, то после 24-часового восстановления значения n равны, соответственно 1,2, 1,3 и 1,05. Подобное уменьшение степени изогнутости кривой выживания вследствие восстановления мы наблюдали и после γ -облучения на штамме Мегри 139-В. Следовательно, фактор уменьшения дозы в результате восстановления для каждого штамма дрожжей не является постоянной величиной, а несколько возрастает с увеличением дозы облучения. Будем условно выражать эффективность восстановления через отношение $R = LD_{50}^*/LD_{50}$, где числитель равен полулетальной дозе при определении выживаемости после 24 ч восстановления, а знаменатель – полулетальной дозе, определяемой сразу после облучения. Для гаплоидных клеток, где восстановления не происходит, $R = 1$, с увеличением же эффективности пострadiационной инкубации в голодной среде значение R должно возрастать.

Значения R_α для более подробно изученных в этом отношении трех диплоидных, одного триплоидного и одного тетраплоидного штаммов изображены в виде темных столбиков на рис. 4. Заметна определенная тенденция возрастания эффективности восстановления с увеличением степени плоидности. На этом же рисунке в виде светлых столбиков изображены значения R_γ для восстановления после γ -облучения штаммов Мегри 139-В (собственные данные), WY-110 и 16×32 (данные О.В. Малиновского, личное сообщение). Хорошо видно, что эффективность восстановления как после α -, так и после γ -облучения практически одинакова, независимо от использовавшихся в опытах штаммов.

Таким образом, из приведенных данных видно, что хотя α -лучи, как правило, более эффективны, чем рентгеновы лучи, в отношении поражающего действия на способность клеток дрожжей к размножению, однако при одинаковой степени поражения способность клеток к восстановлению оказывается одинаковой, независимо от того, каким видом излучения вызвано это поражение.

Это позволяет предположить, что биологические системы клеток, поражение которых вызывает инактивацию, и системы, определяющие способность пораженной клетки к восстановлению, не идентичны и, вероятно, пространственно разобщены. Весьма возможно, что первые из них связаны с ядерными структурами клеток, а вторые – с цитоплазматическими структурами, ответственными за осуществление метаболических процессов.

ВЫВОДЫ

Изучалось восстановление способности бесконечного размножения у клеток дрожжей разной ploидности, облученных α -частицами. «Эффект восстановления» обнаружен у всех штаммов, обладающих двумя и более хромосомными наборами. Показано, что хотя α -частицы, как правило, оказывают более сильное поражающее действие, нежели рентгеновы или γ -лучи, способность клеток к восстановлению при данной степени поражения не зависит от того, каким видом излучения это поражение вызвано.

Авторы выражают свою благодарность проф. Р.К. Мортимеру и проф. Б.С. Эфруси за любезно предоставленные штаммы дрожжей разной ploидности, О.В. Малиновскому – за разрешение воспользоваться его экспериментальными данными и Г.Б. Радзиевскому – за измерения дозы на препаратах полония [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Фриц-Ниггли Х. Радиобиология, ее основы и достижения: М.: Госатомиздат, 1961.
2. Щепотьева Е.С., Ардашников С.Н., Лурье Г.Б., Рахманова Т.В. Кислородный эффект при действии ионизирующих излучений. М.: Медгиз, 1959.
3. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. N.Y., 1958.
4. Kimball R.F., Gaitner N., Wilson S.M. // Radiation Res. 1959. Vol. 10. P. 490.
5. Билуши В., Корогодин В.И. // Докл. АН СССР. 1961. Т. 138. С. 1208.
6. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 206.
7. Mortimer R.K. // Radiation Res. 1958. Т. 9. С. 312.
8. Радзиевский Г.Б. Дозиметрия при внешнем α -облучении // Радиобиология. 1961. Т. 1. С. 141.

РОЛЬ ПЛОИДНОСТИ В РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК (эксперименты на дрожжевых организмах разных видов и генотипов)

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В основе представлений о роли ploидности в радиочувствительности клеток лежат опыты, выполненные на гаплоидных и диплоидных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Если облучать клетки этих дрожжей в стационарной стадии роста (когда большинство клеток находится в G_1 -фазе цикла), а затем высевать на твердую питательную среду, подсчитывать вырастающие колонии и строить кривые доза–эффект, можно обнаружить следующее. Во-первых, гаплоидные клетки имеют экспоненциальную кривую выживания, а диплоидные – сигмоидную, причем по радиочувствительности гаплоидные клетки существенно превосходят диплоидные [1–3]. Во-вторых, из облученных гаплоидных клеток колонии вырастают в то же время, что и из необлученных, и имеют такие же размеры, а формирование колоний из облученных диплоидных клеток растягивается на более длительные сроки («эффект до-растания») и такие колонии больше варьируют по размерам, чем в контроле

[3]. Чем же обусловлены эти различия в реакции на облучение гаплоидных и диплоидных дрожжей?

Одно время было распространено представление, согласно которому различия в радиочувствительности гаплоидных и диплоидных клеток обусловлены тем, что в лучевой инактивации гаплоидных клеток ведущая роль принадлежит рецессивным летальным мутациям, а диплоидных – доминантным. Это представление основывалось на результатах оценки вклада рецессивных и доминантных леталей в лучевую инактивацию дрожжевых клеток, выполненной Мортимером в конце 50-х годов [2]. Такая оценка была выполнена путем сопоставления кривой выживания облученных гаплоидных клеток *S. cerevisiae* с кривой выживания гибридов, полученных от скрещивания облученных гаплоидных клеток с необлученными, а также с кривой выживания диплоидных клеток. Согласно этой оценке, вклад рецессивных леталей в лучевую инактивацию гаплоидных клеток может достигать 95%, а доминантных – только 5%. Однако определение выхода рецессивных леталей у выживающих после облучения диплоидных клеток, выполненное методом тетрадного анализа Маньи [4] и Джеймсом [5], позволяет рассчитать, что за счет таких мутаций может погибнуть не более 30% облученных гаплоидных клеток. Примерно такой же результат (около 35%) дала оценка вклада рецессивных леталей в инактивацию гаплоидных клеток, выполненная недавно Хо и Мортимером в опытах по скрещиванию облученных и необлученных гаплоидных клеток *S. cerevisiae*, несущих мутацию *rad52* [6].

Мутация *rad52*, как принято считать, блокирует процессы пострадиационного восстановления. Эта мутация слабо повышает радиочувствительность гаплоидных дрожжей, находящихся в G_1 -фазе цикла, и очень сильно повышает радиочувствительность диплоидных дрожжей. Это позволяет интерпретировать данные работы [6] с позиций представлений, что ведущая роль в инактивации как гаплоидных, так и диплоидных клеток принадлежит однотипным повреждениям (например, хромосомным aberrациям, как предполагают эти авторы), а различия в радиочувствительности гаплоидных и диплоидных клеток «дикого типа» обусловлены главным образом процессами восстановления. Такая точка зрения, однако, требует еще одного допущения, а именно, что диплоидные клетки восстанавливаются от потенциальных лучевых повреждений значительно эффективнее, чем гаплоидные. Такое допущение хорошо согласуется с тем фактом, что при выдерживании в непитательной среде выживаемость облученных диплоидных клеток возрастает, а гаплоидных – не изменяется [3].

Представление о том, что в основе лучевой инактивации гаплоидных и диплоидных дрожжей лежат главным образом однотипные повреждения (а не рецессивные и доминантные летали в классическом смысле этих терминов), имеет и другое основание. В работах [7–9], выполненных на *S. ellipsoideus* и *S. cerevisiae* «дикого типа» (в отношении радиочувствительности), было показано, что вся совокупность различий в реакциях на облучение гаплоидных и диплоидных клеток, а именно различия в радиочувствительности, в форме кривых выживания, в соотношениях разных форм инактивации, в отсутствии (у гаплоидных клеток) и наличии (у диплоидных) летальных секторов и эффекта дорастания, а также связанного с ними массового выхода нестабильных клонов, – хорошо объясняется именно с этой точки зрения.

Различия между гаплоидными и диплоидными клетками с позиций этих представлений состоят в том, что, во-первых, вероятность b формирования каждого повреждения на единицу дозы облучения для гаплоидных клеток выше, чем для диплоидных, и, во-вторых, вероятность α -летального действия каждого сформировавшегося повреждения для гаплоидных клеток также выше, чем для диплоидных. Вероятность b формирования повреждения определяется размерами мишени, наличием радиопротекторов и эффективностью восстановления клеток от потенциальных повреждений. Вероятность α -летального действия повреждения зависит от плоидности клетки, ее генотипа и условий пострadiaционного культивирования. Для гаплоидных клеток $\alpha \geq 0,5$; каждая клетка, получившая даже одно повреждение, погибает после одного или нескольких циклов размножения; выживают только клетки, не получившие ни одного повреждения, и поэтому колонии, которые из них вырастают, не отличаются от контроля; кривые выживания имеют экспоненциальную форму, а эффект дорастания отсутствует. Для диплоидных клеток при оптимальных условиях культивирования $\alpha < 0,5$; чтобы клетка погибла, обычно требуется несколько повреждений; выживают не только клетки, не получившие ни одного повреждения (которые дают начало колониям, не отличающимся от контроля), но и клетки, получившие малое число повреждений (эти клетки дают начало колониям, вырастающим в более поздние сроки, чем в контроле); кривая выживания имеет сигмоидную форму, а эффект дорастания хорошо выражен. Такими свойствами могут обладать повреждения типа утраты фрагментов или целых хромосом, что абсолютно летально для гаплоидных клеток, но необязательно вызывает гибель диплоидных клеток. Изложенные здесь представления получили название «вероятностной модели» [10].

Традиционно зависимость выживаемости клеток S от дозы облучения D описывается уравнением

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n, \quad (1)$$

где D_0 – «среднелетальная доза», а n – экстраполяционное число кривой выживания. С позиций же вероятностной модели зависимость S от D описывается уравнением

$$S = \sum_{i=0}^k e^{-bD} \cdot \frac{(bD)^i}{i!} \left\{ 1 - \left[\frac{1 - (1 - \alpha)^i}{(1 - \alpha)^i} \right]^2 \right\}, \quad (2)$$

где k – максимальное целое число, при котором $(1 - \alpha)^k \geq 0,5$. Параметры α и b имеют тот смысл, о котором говорилось выше; чем меньше α по сравнению с $0,5$, тем больше экстраполяционное число n кривой выживания и ярче выражен эффект дорастания; чем меньше b , тем меньше наклон экспоненциального участка кривой выживания, причем численно $b = D_0^{-1}$ для облучавшихся клеток, не получивших ни одного повреждения и, следовательно, формирующих колонии одновременно с контролем. При $0,5 > \alpha > 0,3$ кривая выживания по форме близка к экспоненте, но эффект дорастания должен быть хорошо выражен; в таких случаях оценивать величину α следует не по величине «плеча» кривой выживания, а по величине эффекта дорастания.

Все сказанное выше определило первую задачу настоящей работы: выяснить, как влияет плоидность и генотип дрожжей *S. cerevisiae* на вероят-

ность формирования повреждений b и вероятность летального действия таких повреждений α при облучения клеток γ -лучами и α -частицами. Вторая же задача была обусловлена следующими соображениями. Как известно, *S. cerevisiae* относятся к диплонтам, т.е. вегетативная фаза их развития в природных условиях представлена преимущественно диплоидными клетками, а гаплоидные штаммы можно длительное время поддерживать лишь в лаборатории. Поэтому представляло интерес выяснить, как влияет плоидность на радиобиологические характеристики гаплоидных и диплоидных клеток дрожжей-гаплонтов, у которых в природных условиях вегетативная фаза развития представлена гаплоидными клетками. В качестве таких дрожжей в работе использовали *Pichia pinus*¹ и *P. guilliermondii*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Перечень штаммов дрожжей, использованных в работе, приведен в таблице. Гаплоидные и диплоидные штаммы *S. cerevisiae* «дикого типа» и несущие мутацию *rad51* (которая, как принято считать, блокирует восстановление), были получены нами от доктора Саеки (Япония); их характеристики приведены в работе [11]. Гаплоидный штамм *P. pinus* получен от доктора Л. Вюнше (ГДР). Установлено, что этот штамм является гомоталличным [12]. Диплоидная культура *P. pinus* выделена нами из исходного гаплоидного штамма после его самодиплоидизации и, следовательно, является гомозиготной по всем генам, кроме локуса типа спаривания. Гетероталлические гаплоидные штаммы *P. guilliermondii* двух типов спаривания были получены от доктора С. Куртцмана (США). Диплоидная культура этих дрожжей была передана нам Г.И. Наумовым, который получил ее путем скрещивания гаплоидных штаммов по методике, описанной в работах [13, 14], с последующим выделением зиготы с помощью микроманипулятора. У дрожжей *S. cerevisiae* «дикого типа», а также у дрожжей *P. pinus* и *P. guilliermondii* В.С. Орлова определила содержание ДНК, пользуясь методикой [15].

Дрожжи *S. cerevisiae* культивировали на агаризованном сусле, а *P. pinus* и *P. guilliermondii* – на среде YEPD при 28 °С. 5-Суточные культуры дрожжей (стационарная фаза роста) суспендировали в воде и облучали γ -лучами ¹³⁷Cs (установка «Колос», мощность дозы 0,9 крад/мин) или ⁶⁰Co (установка «Gamacell-220», мощность дозы 1,2 крад/мин), или α -частицами (препарат ²³⁹Pt, мощность дозы 1,7 крад/мин). Методика облучения дрожжей α -частицами описана в работе [16].

Выживаемость облученных клеток определяли подсчетом макроколоний, вырастающих на твердой среде, или по методике микроколоний [3]; результаты двух методов совпадали. В тех случаях, когда кривые выживания были близки к экспоненциальным, определяли эффект дорастания. Для этого макроколонии, вырастающие из облученных клеток, учитывали дважды – через двое суток, т.е. в то время, когда вырастают все колонии в контроле, и через 7–10 сут, в течение которых успевают сформироваться колонии из всех клеток, не погибших вследствие облучения.

¹ *Pichia methanolica*. Реидентифицирован (Толсторуков И.И. // Генетика. 1994. Т. 30, № 5. С. 635–640).

Радиобиологические характеристики дрожжей разных видов, плоидности и генотипов

Штамм	Содержание ДНК $\times 10^{-14}$ г/кл	Плоидность	Генотип	Радиочувствительность				$R = b^{-1}C$		
				γ-лучи		α-частицы		γ-лучи	α-частицы	
				b, град ⁻¹	α	b, град ⁻¹	α			
<i>S. cerevisiae</i>										
S288c	6,2	1n	α	0,15	0,5-0,6	0,23	0,7-0,8	1,53	41,3	27,0
XS774-4d	6,2	1n	α <i>rad51-1</i>	0,22	0,5	0,32	0,7	1,45	28,0	19,4
XS800	13,2	2n	α/a	0,10	0,1	0,46	0,15	4,60	132	29,0
XS805	13,2	2n	$\frac{\alpha \text{ rad51-1}}{a+}$	0,11	0,15	0,51	0,20	4,63	120	26,0
XS806	13,2	2n	$\frac{\alpha \text{ rad51-1}}{\alpha \text{ rad51-1}}$	0,38	0,20	0,53	0,4	1,40	35,0	25,0
<i>Pichia guilliermondii</i>										
NRRLY-2075	1,4	1n	<i>mat</i> ⁺	0,057	0,5	0,14	0,7	2,45	24,6	10,0
NRRLY-2076	1,4	1n	<i>mat</i> ⁻	0,057	0,5	0,16	0,7-0,8	2,78	24,6	8,7
2075 × 2076	2,3	2n	<i>mat</i> ^{+/mat}	0,104	0,43	0,25	0,8	2,40	22,0	9,2
<i>P. pinus</i>										
MH4	2,4	1n	-	0,16	0,6-0,7	0,20	0,7	1,30	15,0	12,0
MH4-Д	4,9	2n	-	0,32	0,43	0,27	0,8	0,84	15,3	18,0

Примечание: b – вероятность формирования повреждения на единицу дозы облучения, α – вероятность проявления повреждения повреждения, R – относительная радиорезистентность, град; C – содержание ДНК $\times 10^{-14}$ г/кл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕЙ-ДИПЛОНТОВ

Результаты опытов по определению зависимости выживаемости клеток разных штаммов *S. cerevisiae* от дозы облучения γ -лучами или α -частицами изображены на рис. 1 (темные точки). Значения параметров b и α , рассчитанные по этим данным, приведены в таблице (способ расчета параметров b и α описан ранее [8]). Подставляя эти значения b и α в уравнение (2), мы рассчитали кривые выживания (рис. 1, сплошные линии), а также кривые доза-эффект для выхода клеток, не поврежденных облучением и, следовательно, образующих колонии одновременно с контролем (рис. 1, штриховые линии). Видно, что рассчитанные по уравнению (2) кривые выживания хорошо согласуются с экспериментальными данными. Кривые выхода неповрежденных клеток в случае гаплоидных дрожжей совпадают с кривыми выживания. В случае разных диплоидных штаммов «дикого типа» хорошее соответствие теоретических и экспериментальных значений для выхода неповрежденных клеток было показано ранее [17], и в этой работе специально не изучалось. В случае же диплоидных дрожжей, гомозиготных по мутации *rad51*, как показано на рис. 1, экспериментально установленный выход неповрежденных клеток (светлые точки) тоже хорошо описывается рассчитан-

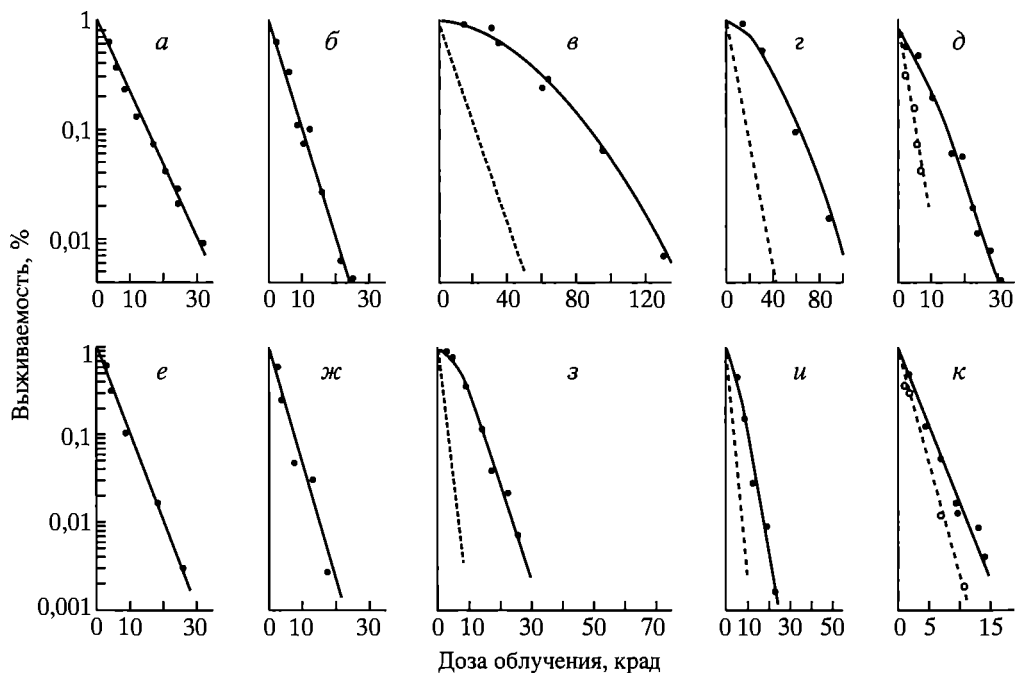


Рис. 1. Кривые выживания *S. cerevisiae* при облучении γ -лучами (а-д) и α -частицами (е-к)

а, е – гаплоид «дикого типа», штамм S288с; б, ж – гаплоид *rad51*, штамм XS744-4д; в, д – диплоид «дикого типа», штамм XS800, з, и – диплоид, гетерозиготный по мутации *rad51*, штамм XS805; д, к – диплоид, гомозиготный по мутации *rad51*, штамм XS806. Сплошные линии, темные точки – выживаемость; штриховые линии, светлые точки – выход колоний, вырастающих одновременно с контролем

ной кривой¹. Это означает, что параметры b и α достаточно полно описывают радиобиологические особенности клеток разных штаммов *S. cerevisiae*.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что в случае γ -облучения вероятность α летального действия сформировавшихся лучевых повреждений для обоих гаплоидных штаммов равна 0,5, а для всех трех диплоидных штаммов значительно меньше и равна 0,10–0,20. Это означает, что вероятность α летального действия повреждений относительно слабо зависит от того, несет клетка мутацию *rad51* или нет, а определяется главным образом числом хромосомных наборов (по крайней мере, для диплоидных клеток, гетерозиготных по локусам типа спаривания). Следовательно, различия в радиочувствительности дрожжей *S. cerevisiae*, обуславливаемые мутацией *rad51*, связаны главным образом с величиной вероятности b формирования повреждений; мы уже отмечали, что параметр b определяется как вероятностью возникновения первичного потенциального повреждения (что зависит от размеров мишени и степени ее защищенности), так и эффективностью процессов пострадиационного восстановления.

Параметр b в случае γ -облучения максимален для диплоидных клеток, гомозиготных по мутации *rad51*, и равен 0,38; следовательно, в расчете на один набор хромосом он равен 0,19. Последняя величина близка к вероятности формирования повреждения у гаплоидных клеток, несущих мутацию *rad51*, для которых $b = 0,22$. Можно думать, следовательно, что $b \simeq 0,20$ характерно для формирования повреждений в расчете на один набор хромосом у клеток *S. cerevisiae* при блокировке процессов восстановления вне зависимости от плоидности клеток. Одинаковая вероятность возникновения летальных повреждений (при пересчете на один набор хромосом) у гаплоидных и диплоидных дрожжей *S. cerevisiae*, дефектных по системам восстановления, хорошо согласуется с нашим допущением об однотипности таких повреждений у дрожжей разной плоидности и о малой роли рецессивных леталей в лучевой инактивации гаплоидных клеток; приведенная выше оценка вклада рецессивных леталей в лучевую инактивацию гаплоидных дрожжей, равная примерно 30%, по-видимому, завышена.

Для гаплоидных клеток «дикого типа» $b = 0,15$. Для диплоидных клеток «дикого типа» $b = 0,10$, а при пересчете на один набор хромосом – 0,05. Располагая этими значениями параметра b , можно рассчитать влияние восстановления на формирование повреждений у гаплоидных и диплоидных клеток «дикого типа». Мы помним, что для клеток, несущих мутацию *rad51*, в расчете на один набор хромосом $b \simeq 0,20$. Следовательно, у гаплоидных клеток «дикого типа» процессы восстановления уменьшают эффективность облучения примерно в 1,3 раза ($0,20 : 0,15 = 1,33$), а у диплоидных клеток примерно в 4 раза ($0,19 : 0,05 = 3,8$). Таким образом, у диплоидных клеток «дикого типа» процессы восстановления идут в 3 раза более эффективно, чем у гаплоидных. Это хорошо соответствует высказанному выше предпо-

¹Интересной особенностью диплоидных клеток, гомозиготных по мутации *rad51*, является их гетерогенность по радиочувствительности. Около 30% таких клеток формируют колонии в контроле позже, чем остальные 70%, и, по-видимому, обладают очень высокой чувствительностью к облучению, что и обуславливает хорошо видный на рисунке перегиб кривой выживания.

ложению, что для эффективной работы репарационных систем требуется наличие двойного набора хромосом.

Необходимость диплоидного состояния для успешного восстановления от лучевых повреждений дрожжевых клеток, облученных в G_1 -фазе цикла, может означать, что в процессах восстановления у дрожжей большая роль принадлежит взаимодействию гомологичных хромосом, например, их конъюгации. Возможность конъюгации гомологичных хромосом у диплоидных дрожжей во время вегетативного размножения следует из твердо установленного факта наличия у них митотического кроссинговера. Можно думать, следовательно, что процессы восстановления у дрожжей связаны с механизмами, участвующими в осуществлении митотической рекомбинации хромосом. Это хорошо согласуется с тем фактом, что осуществление синтеза ДНК у облученных диплоидных клеток не препятствует последующему их восстановлению при выдерживании в непитательной среде [3].

Диплоидные клетки, гетерозиготные по мутации *rad51*, менее устойчивы к γ -облучению, чем диплоидные клетки «дикого типа». Для них $b = 0,11$, а в пересчете на один набор хромосом – $0,055$. Мутация *rad51*, следовательно, частично проявляется и в гетерозиготном состоянии, несколько уменьшая эффективность работы репарационных систем.

В случае α -облучения клеток *S. cerevisiae* мутация *rad51* не влияет на вероятность α летального действия повреждений у гаплоидных клеток, но увеличивает значение этого параметра у диплоидных клеток по сравнению с диплоидными клетками «дикого типа». Как и в случае γ -облучения, для диплоидных клеток α меньше, чем для гаплоидных. В то же время величина параметра α при облучении клеток α -частицами больше, чем при γ -облучении; повреждения, возникающие в генетическом аппарате дрожжей при попадании α -частицы, более губительны, чем повреждения, вызываемые γ -лучами. Что же касается параметра b (вероятности формирования повреждений), то его величина при пересчете на один набор хромосом мало зависит как от плоидности, так и от наличия мутации *rad51*, составляя $0,25 \pm 0,03$. Это означает, что процессы восстановления, связанные с наличием двух наборов хромосом и блокируемые мутацией *rad51*, мало влияют на вероятность возникновения в клетках повреждений, вызываемых α -частицами, и в этом случае различия в радиочувствительности клеток обуславливаются в основном величиной вероятности проявления повреждений α , которая у диплоидных клеток существенно меньше, чем у гаплоидных.

Чтобы сравнить относительную биологическую эффективность (ОБЭ) α -частиц и γ -облучения в отношении вероятности формирования летальных повреждений при облучении дрожжевых клеток разной плоидности и генотипов, удобно использовать отношение вероятностей b формирования повреждений при этих видах излучения: $ОБЭ = b_\alpha : b_\gamma$. При таком выражении ОБЭ мы избавляемся от неопределенности, связанной с различиями в формах кривых выживания, обусловленных различиями вероятности α летального действия повреждений, вызываемых разными типами излучений.

Как показано в таблице, ОБЭ сильно зависит от плоидности и генотипа клеток. Так, для гаплоидных клеток «дикого типа» и несущих мутацию *rad51*, а также для диплоидных клеток, гомозиготных по мутации *rad51*, $ОБЭ = 1,4-1,5$; для диплоидных клеток «дикого типа» и гетерозиготных по

мутации *rad51* ОБЭ = 4,6, т.е. в 3 раза больше. Если принять, что у клеток, несущих мутацию *rad51*, восстановление подавлено, а у других тем ярче выражено, чем меньше значение вероятности формирования повреждений *b*, то мы приходим к выводу, что ОБЭ в большой мере определяется эффективностью процессов восстановления, причем главным образом от тех повреждений, которые вызываются γ -лучами.

Этот вывод выглядит несколько парадоксально: ведь при выдерживании в непитательной среде диплоидные дрожжи, пораженные α -частицами, восстанавливаются от потенциальных летальных повреждений столь же успешно, как и после γ -облучения [3]. По-видимому, процессы восстановления могут разыгрываться на разных этапах формирования потенциальных повреждений. В определении ОБЭ, по-видимому, решающая роль принадлежит начальным этапам восстановления, разыгрывающимся на ранних стадиях формирования потенциальных повреждений, более «чувствительных» к природе первичных лучевых повреждений и протекающих с большей скоростью, нежели те, которые удастся зарегистрировать при выдерживании облученных клеток в непитательной среде.

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДРОЖЖЕЙ-ГАПЛОНТОВ

Рассмотрим влияние пloidности на радиобиологические характеристики гаплоидных и диплоидных клеток дрожжей-гаплонтов *P. pinus* и *P. guilliermondii*. На рис. 2 и 3 ясно видно отличие радиобиологических ха-

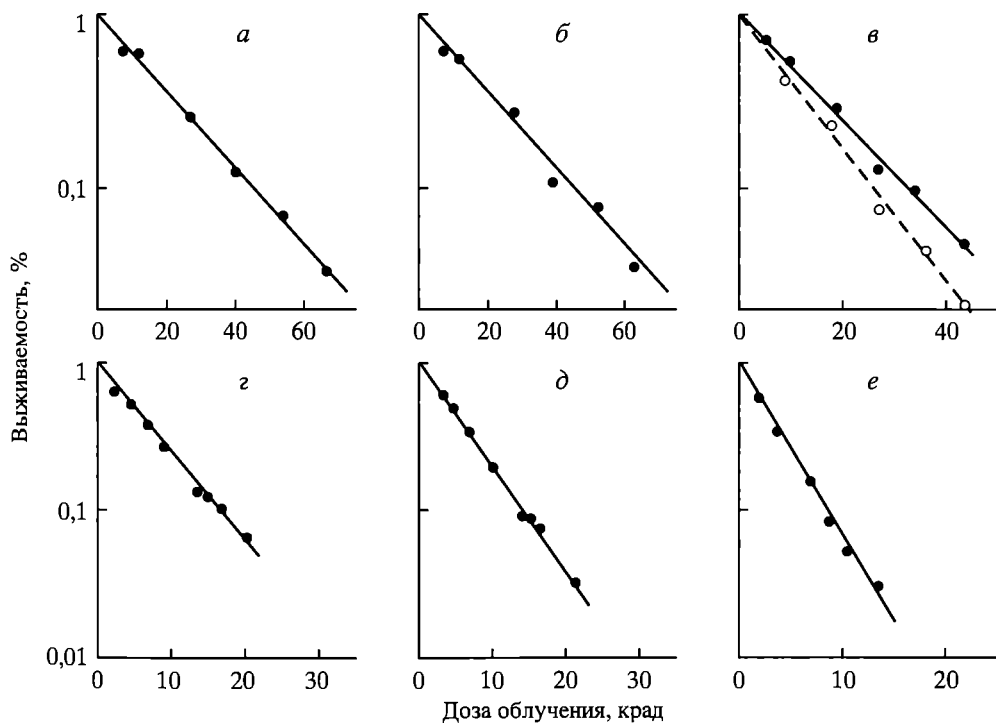


Рис. 2. Кривые выживания *Pichia guilliermondii* при облучении γ -лучами (а-в) и α -частицами (з-е)

а, з – гаплоид, штамм NRRLY-2075; б, д – гаплоид, штамм NRRLY-2076; в, е – диплоид, штамм 2075 × 2076. Обозначения те же, что и на рис. 1

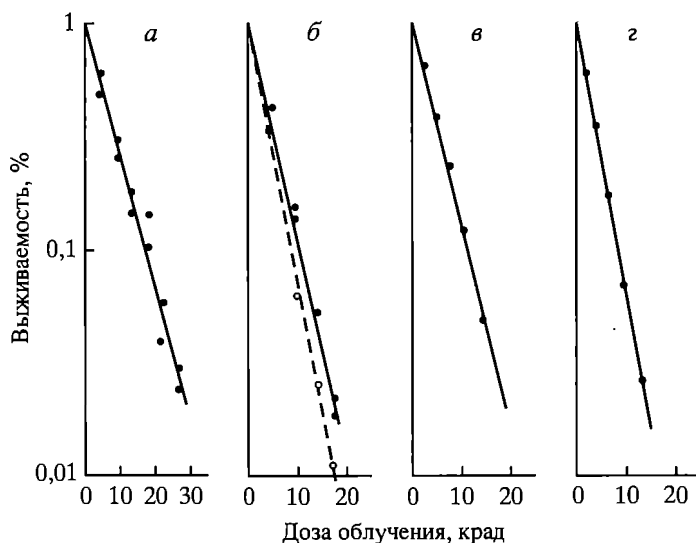


Рис. 3. Кривые выживания *Pichia pinus* при облучении γ -лучами (а, б) и α -частицами (в, г) а, в – гаплоид, штамм МН 4; б, г – диплоид, штамм МН 4-Д. Обозначения те же, что и на рис. 1

рактеристик дрожжей-гаплонтов от радиобиологических характеристик *S. cerevisiae* «дикого типа»: независимо от пloidности кривые выживания близки по форме к экспоненте, а диплоидные клетки более радиочувствительны, чем гаплоидные. Специальные опыты показали, что эффект дорастания присущ лишь диплоидным клеткам *P. pinus* и *P. guilliermondii*, облученным γ -лучами. В этих случаях только учет эффекта дорастания позволил правильно рассчитать величину параметра α . Значения параметров b и α для всех штаммов дрожжей-гаплонтов приведены в таблице. Кривые выживания и кривые, описывающие выход неповрежденных клеток, рассчитанные по формуле (2), как и в случае *S. cerevisiae*, хорошо согласуются с результатами экспериментов.

В случае γ -облучения вероятность летального действия лучевых повреждений α для гаплоидных клеток *P. pinus* и *P. guilliermondii* больше или равна 0,5, и кривые выживания имеют экспоненциальную форму. Для диплоидных клеток обоих природных гаплонтов $\alpha < 0,5$, чему соответствуют сигмоидные формы кривых выживания и наличие хоть и небольшого (по сравнению с *S. cerevisiae*), но четко выраженного эффекта дорастания. В этом отношении связь реакций на облучение с пloidностью клеток у гаплонтов качественно такая же, как и у диплontов *S. cerevisiae*. Значения же вероятностей формирования повреждений b у диплоидных клеток дрожжей-гаплонтов обоих видов в 2 раза больше, чем у гаплоидных клеток; в пересчете на один набор хромосом величина b не зависит от пloidности и для *P. pinus* равна 0,14, а для *P. guilliermondii* близка к 0,05. Диплоидные клетки дрожжей-гаплонтов, следовательно, в 2 раза чувствительнее к γ -облучению, чем гаплоидные, и это обусловлено только размерами «мишени». В этом отношении дрожжи-гаплонты «дикого типа» (а не специально полученные из них радиочувствительные мутанты!) ведут себя так же, как дрожжи-диплontы *S. cerevisiae* с мутацией *rad51*, блокирующей процессы восстановления.

Независимость вероятности формирования повреждений b от плоидности клеток у дрожжей-гаплонтов, по нашему мнению, представляет большой интерес. Во-первых, это еще раз подкрепляет сделанный выше вывод, что рецессивные летали играют очень малую роль в лучевой инактивации даже гаплоидных дрожжевых клеток. Во-вторых, это позволяет предположить, что у дрожжей-гаплонтов в отличие от дрожжей-диплоидов «дикого типа» слабо выражены или отсутствуют системы, обеспечивающие осуществление процессов восстановления.

В случае облучения α -частицами у дрожжей-гаплонтов вероятность летального действия повреждений α больше, чем в случае γ -облучения, и превосходит 0,5 не только для гаплоидных, но и для диплоидных клеток. Кривые выживания и гаплоидных, и диплоидных клеток этих дрожжей при α -облучении имеют экспоненциальную форму, а эффект дорастания отсутствует. Гаплоидные клетки дрожжей-гаплонтов обоих видов устойчивее к облучению α -частицами, чем диплоидные, хотя различия здесь менее ярко выражены, чем при γ -облучении, особенно в случае *P. pinus*. Значения же ОБЭ для гаплонтов обоих видов существенно различаются: у *P. pinus* для гаплоидных и диплоидных клеток ОБЭ равна соответственно 1,30 и 0,84, а у *P. guilliermondii* независимо от плоидности ОБЭ = 2,5.

Слабая зависимость величины ОБЭ от плоидности у дрожжей-гаплонтов согласуется с предположением, что у них отсутствуют или слабо выражены процессы восстановления, обуславливающие большую радиорезистентность диплоидных клеток *S. cerevisiae* «дикого типа» по сравнению с гаплоидными. Варьирование же значения ОБЭ у предположительно дефектных по системам восстановления клеток от 0,8 до 2,8 (см. таблицу) может означать, что величина ОБЭ обуславливается не только эффективностью процессов восстановления, но и другими факторами. Одним из таких факторов могут служить эндогенные радиозащитные соединения (радиопротекторы). Возможная роль эндогенных радиопротекторов в определении чувствительности дрожжей к ионизирующим излучениям иллюстрируется хотя бы данными работы [18], в которой показано, что у дрожжей *S. ellipsoideus* почкующиеся клетки, отличающиеся от непочкующихся большей радиорезистентностью, содержат в то же время и большее количество сульфгидрильных соединений. Различия в содержании эндогенных радиопротекторов должны сильнее сказываться на чувствительности клеток к γ -лучам, чем к α -частицам, и тем самым могут приводить к изменениям ОБЭ. Содержание эндогенных радиопротекторов, конечно, находится под генетическим контролем, но не обязательно связано с плоидностью; здесь вполне допустима ситуация, когда ОБЭ имеет довольно большую величину и не зависит от плоидности, как это наблюдается у *P. guilliermondii*.

ОБЭ ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ РАЗНЫХ ШТАММОВ

Сопоставим теперь устойчивость к γ -лучам и α -частицам всех десяти изученных в этой работе штаммов дрожжей. В качестве показателя относительной радиорезистентности дрожжей используем величину $R = b^{-1}C$, где b – вероятность формирования повреждения на единицу дозы облучения, а C – относительное содержание ДНК в клетке. Как показано в таблице, в

одном хромосомном наборе дрожжей *S. cerevisiae*, *P. pinus* и *P. guilliermondii* содержится примерно $6,47 \times 10^{-14}$, $2,43 \times 10^{-14}$ и $1,23 \times 10^{-14}$ г ДНК. Приняв содержание ДНК в одном наборе хромосом *S. cerevisiae* за 1, нетрудно рассчитать значения R для изученных нами штаммов дрожжей. Размерность параметра R выражается в крад, а по величине R равен дозе облучения, обуславливающей формирование в среднем одного повреждения на единицу объема (или массы) генетического аппарата клетки.

Значения параметра R для всех штаммов дрожжей приведены в таблице. Как и следовало ожидать (см. выше), относительная резистентность дрожжей *S. cerevisiae* к γ -лучам сильно варьирует (минимальна у гаплоидных клеток *rad51* и максимальна у диплоидных клеток «дикого типа»), но примерно одинакова в случае облучения α -частицами. Относительная резистентность дрожжей *P. guilliermondii* не зависит от пloidности, в случае γ -облучения близка к относительной резистентности гаплоидных дрожжей *S. cerevisiae*, несущих мутацию *rad51*, а в случае облучения α -частицами – примерно в 3 раза меньше, чем у дрожжей *S. cerevisiae*. Относительная же резистентность дрожжей *P. pinus* (также не зависящая от пloidности) в случае γ -облучения примерно в 2 раза меньше, чем у *P. guilliermondii* и в 3 раза меньше, чем у гаплоидных и дефектных по репарации диплоидных дрожжей *S. cerevisiae*, а в случае облучения α -частицами – примерно такая же, как у *P. guilliermondii*.

Столь сложную зависимость относительной радиорезистентности дрожжей разных видов и генотипов от линейной потери энергии излучений невозможно полностью объяснить с позиций развитых выше представлений. Число хромосомных наборов, процессы репарации, размеры мишеней (содержание ДНК) и, возможно, наличие эндогенных радиопротекторов и радиосенсибилизаторов здесь, конечно, играют важную роль, но, по-видимому, имеются дополнительные факторы, природа которых пока еще не установлена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теперь нам остается обсудить последний вопрос. С чем может быть связано то обстоятельство, что у диплоидных клеток дрожжей-гаплонтов, судя по приведенным выше данным, процессы восстановления слабо выражены или вовсе отсутствуют?

Как уже отмечалось [3], вполне допустима точка зрения, что способность клеток восстанавливаться от лучевых повреждений отражает их способность восстанавливаться от повреждений генетического аппарата, возникающих спонтанно или под влиянием различных повреждающих воздействий; это, конечно, может обеспечивать определенное селективное преимущество клеткам, у которых эффективно функционируют репарационные системы.

На примере дрожжей-диплонтов «дикого типа» мы видели, что у гаплоидных клеток процессы восстановления играют небольшую роль в обеспечении радиорезистентности. Чтобы ярко проявилось селективное преимущество клеток, обладающих хорошо развитыми репарационными системами, перед клетками, лишенными их, требуется наличие двух наборов хромосом. Это и наблюдается у дрожжей-диплонтов, у которых вегетативная фаза развития в природных условиях представлена диплоидными клетками. Когда же репарационные процессы подавлены или слабо выражены, как, напри-

мер, у дрожжей *S. cerevisiae*, несущих мутацию *rad51*, а также у дрожжей-гаплонтов *P. pinus* и *P. guilliermondii*, гаплоидные клетки оказываются даже более устойчивыми к повреждениям генетического аппарата, чем диплоидные. В таких случаях селективное преимущество могут иметь гаплоидные клетки. Может быть, именно поэтому у *P. pinus* и *P. guilliermondii* вегетативная фаза в природных условиях представлена гаплоидными клетками, а не диплоидными, как у *S. cerevisiae*. Это в свою очередь позволяет предположить, что предпосылкой перехода в процессе эволюции от гаплоидной вегетативной фазы к диплоидной могло послужить развитие систем, обеспечивающих более эффективное восстановление диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными от повреждений генетического аппарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Latarjet R., Ephrussi B. // *Comp. Rend. Acad. Sci.* 1949. Vol. 224. P. 306–310.
2. Mortimer R.K. // *Radiation Res.* 1958. Vol. 9, N 3. P. 312–325.
3. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
4. Magni G.E. // *Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.* 1956. Vol. 26. P. 273–284.
5. James A.P., Werner M.M. // *Mutation Res.* 1966. Vol. 3. P. 477–485.
6. Ho K.S. Y., Mortimer R.K. // *Mutation Res.* 1973. Vol. 20, N 1. P. 45–51.
7. Капульцевич Ю.Г. // *Радиобиология.* 1972. Т. 12, N 1. С. 3–18.
8. Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г. // *Радиобиология.* 1972. Там же. № 6. С. 864–872.
9. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. // *Радиобиология.* 1977. Т. 17, № 4. С. 492–499.
10. Kapultsevich Yu.G., Petin V.G. // *Studia biophysica.* 1977. Vol. 62, N 2. P. 151–165.
11. Natta-Inaba H., Saeki T. // *J. Radiation Res.* 1973. Vol. 16, N 1. P. 37–41.
12. Толсторуков И.И., Дутова Т.А., Беневоленский С.В., Соом Я.О. // *Генетика.* 1977. Т. 13, № 2. С. 322–327.
13. Щёлокова И.П., Жарова В.П., Квасников Е.И. // *Микробиол. журн.* 1974. Т. 36, № 3. С. 275–282.
14. Сибирный А.А., Шавловский Г.М., Киановская Б.В., Наумов Г.И. // *Генетика.* 1977. Т. 13, № 2. С. 314–321.
15. Сокурова Е.Н. // *Биохимия.* 1967. Т. 32, № 6. С. 1134–1143.
16. Билуши В., Корогодин В.И. // *Докл. АН СССР.* 1961. Т. 138, № 5. С. 1208–1211.
17. Капульцевич Ю.Г. // Количественный анализ реакций клеток на облучение. Дис. ... докт. биол. наук. Обнинск, 1973.
18. Корогодина Ю.В., Некрасова И.В., Петин В.Г., Граевский Э.Я. // *Радиобиология.* 1975. Т. 15, № 2. С. 228–232.

THE ROLE OF PLOIDY IN RADIOSENSITIVITY OF CELLS

(Experiments with yeasts of different strains and genotypes)

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich, V.G. Petin,
G.V. Savchenko., I.I. Tolstorukov

Sensitivity of experimentally obtained diploid cells of naturally occurring haplonts *Pichia pinus* and *Pichia guilliermondii* to γ -rays and α -particles has been shown to be twice as high as that of haploid cells and, therefore, independent of the ploidy, as calculated per one set of chromosomes. In this respect, the haplonts under study are similar to diplonts *Saccharomyces cerevisiae*, carrying *rad51* mutation, and drastically different from *Saccharomyces cerevisiae* of «wild type» whose haploid cells are much more radiosensitive than diploids. It has also been

found that relative biological effectiveness (RBE) of α -particles for yeasts of the strains under study decreases with increasing radiosensitivity, varying from 4.6 to 1.0. It is concluded that: (1) similar lesions lay the basis of radiation damage to both haploid and diploid yeast cells; the probability of formation of these lesions is conditioned by the dimensions of the «target» (DNA content) and the effectiveness of the repair systems, (2) the presence in the cell of at least two sets of chromosomes is necessary for effective work of the repair systems, (3) a higher radioresistance of diploid cells as compared to haploids in diplonts is mainly due to the effective work of the repair systems, (4) a higher radiosensitivity of diploid cells as compared to haploids in haplonts is perhaps due to a deficiency of these yeasts in repair systems, (5) an important role is ascribed to repair processes in the estimation of the RBE of radiations possessing different linear energy transfer.

1.3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПОСТРАДАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОК

Основой количественной радиобиологии служит принцип попаданий [1, 2]. До последнего времени принцип попаданий имел применение только для анализа кривых доза–эффект, в форме теории мишени, наиболее полно разработанной Ли [3]. Однако основные положения этого принципа могут быть использованы и для анализа пострадиационного восстановления клеток. Теоретическому обоснованию такой возможности посвящена настоящая работа.

Способность клеток восстанавливаться от различных эффектов облучения сейчас широко известна (см., например, [4]). Неоднократно описывалось и пострадиационное восстановление дрожжевых клеток, пораженных γ -лучами или α -частицами [5–8]. Было показано, в частности, что для дрожжевых организмов характерно «постепенное» восстановление от губительных последствий облучения [9]. Весьма вероятно, что подобный тип восстановления свойствен и другим биологическим объектам. Однако ввиду того, что на бактериях, инфузориях, клетках растений и животных этот вопрос изучен недостаточно полно, в дальнейшем изложении нам придется апеллировать только к результатам, полученным при работе с дрожжами.

ОСНОВНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ

При восстановлении клеток от лучевого поражения элементарные вредные для клетки последствия облучения исчезают из нее не все сразу, одновременно, а постепенно, в какой-то последовательности [9]. В аспекте настоящей работы безразлично, что представляют собой эти элементарные последствия облучения, а также, какова биохимическая природа эффекта восстановления. Для разработки моделей пострадиационного восстановления существенно лишь, что «постепенное освобождение» клеток от элементарных последствий облучения может совершаться по разным статистическим закономерностям. Различия эти должны сказаться как на изменении характера распределения числа элементарных повреждений по различным клеткам облученной и испытывающей восстановление популяции, так и на кинетике процесса восстановления.

Известно, что среди клеток, облученных данной дозой, всегда присутствуют как выживающие особи, так и особи, в разной степени пораженные ионизирующими излучениями – разные «формы инактивации». Дрожжевым клеткам, например, свойственны три формы инактивации: гибель после трех–шести циклов деления (1-я форма, M_1), после одного–двух почкований (2-я форма, M_2) и без предварительного размножения (форма M_3) [10]. Оче-

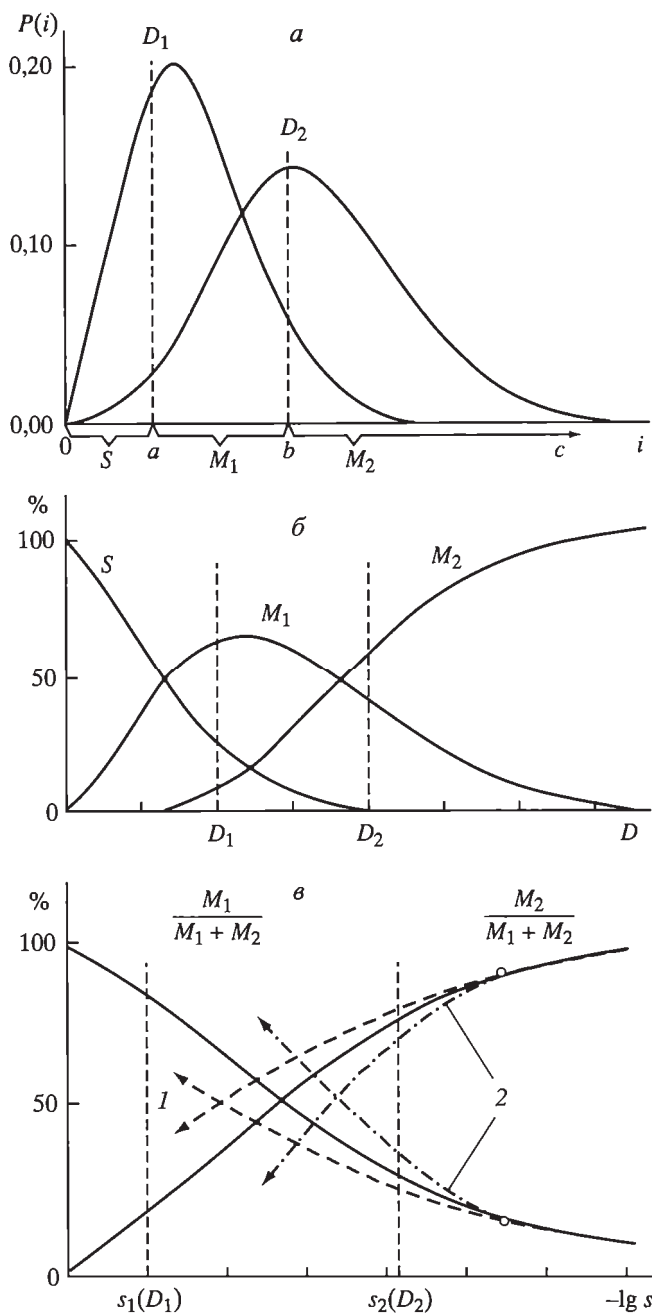


Рис. 1. Зависимость соотношения форм инактивации от дозы и выживаемость

a – условные кривые распределения числа повреждений по клеткам облученной популяции, $D_1 < D_2$; *б* – зависимость от дозы облучения D относительного содержания в облученной популяции выживающих клеток и двух форм инактивации M_1 и M_2 ; *в* – зависимость $M_1/(M_1 + M_2)$ и $M_2/(M_1 + M_2)$ от $S(D_0)$ (сплошные линии) и $S(t)$ (пунктирные линии)

видно, что относительное содержание в облученной популяции как выживающих клеток S , так и разных форм инактивации определяется характером распределения по клеткам отдельных элементарных радиобиологических повреждений. Таким образом, зависимость соотношения форм инактивации от дозы облучения D или выживаемости S (последнее особенно важно) должна однозначно отражать структуру распределения элементарных повреждений по отдельным облученным клеткам.

Поясним это положение.

Можно допустить, что при облучении в клетках возникают различного рода элементарные повреждения, обусловленные поражением различных (по эффективному сечению и критическому числу попаданий) чувствительных объемов, или мишеней. Мы не знаем, какое количество каких именно повреждений обуславливает ту или иную форму инактивации и какое максимальное число повреждений может быть для клетки нелетальным. Очевидно, однако, что выживающим клеткам S и клеткам, погибающим после различного числа циклов размножения (M_1 , M_2 и т. д.), должны соответствовать некоторые определенные количества элементарных повреждений.

Допустим, что группе S клеток соответствует число элементарных повреждений от 0 до a , группе M_1 – от $a + 1$ до b , группе M_2 – от $b + 1$ до c и т.д. На рис. 1, *а* даны две произвольные кривые распределения числа повреждений по клеткам облученной популяции, соответствующие двум условным дозам, D_1 и $D_2 > D_1$. Зависимость от D объемов классов, содержащих от 0 до a (класс S), от $a + 1$ до b (класс M_1) и от $b + 1$ до c (класс M_2) повреждений, схематически изображена на рис. 1, *б*. Очевидно, что любая деформация кривых распределения (рис. 1, *а*), скажется на формах кривых $S(D)$, $M_1(D)$ и $M_2(D)$ (рис. 1, *б*), а также на формах кривых, описывающих зависимости $M_1/(M_1 + M_2)$ и $M_2/(M_1 + M_2)$ от S , как это показано на рис. 1, *в*. Мы видим, что в последнем случае кривые, отражающие структуру распределений числа элементарных повреждений по облученным клеткам, связывают эти распределения не с дозой, обуславливающей среднее число повреждений, а с объемом класса, содержащего не летально пораженные клетки.

Рассуждения, развитые в предыдущем абзаце, сохраняют свою справедливость и в том случае, если разные формы инактивации обуславливаются не только числом повреждений, но и типом пораженных мишеней. И в этом случае, строя зависимость $M_1/(M_1 + M_2)$ и $M_2/(M_1 + M_2)$ от S , мы получим графическое отображение структуры распределения числа элементарных повреждений при различной степени пораженности популяции.

Для облегчения дальнейшего изложения сформулируем сказанное выше в математической форме.

Пусть в клетке имеется m формальных мишеней, причем степень пораженности клетки определяется числом пораженных мишеней n . Если вероятность поражения одной мишени есть F , то вероятность обнаружить клетку с n пораженными мишенями будет:

$$\Phi_n = \frac{m!}{n!(m-n)!} F^n (1-F)^{m-n}, \quad (1)$$

Если для поражения одной мишени необходимо не менее k попаданий, то

$$F = \sum_{i=k}^{\infty} P_i, \quad (2)$$

где P_i есть вероятность осуществления i попаданий в пределах одной мишени. В случае облучения клеток излучениями с низкой линейной потерей энергии (ЛПЭ) величины P_i распределены по закону Пуассона:

$$P_i = \frac{e^{-a} a^i}{i!}, \quad (3)$$

где a есть среднее число попаданий в мишень объема v при дозе D , т.е. $a = vD$. Функция $\Phi_n(D)$ (1), следовательно, и определяет характер распределения числа пораженных мишеней по клеткам, т.е. в конечном счете – характер зависимости относительного содержания разных форм инактивации от величины выживаемости S .

Зависимость соотношения форм инактивации от S можно построить как для уменьшения S вследствие накопления дозы, так и для возрастания S в ходе восстановления. Можно полагать, что максимальное нелетальное число повреждений одинаково как непосредственно после облучения, так и после восстановления любой степени. Поэтому, строя зависимости $M_1/(M_1 + M_2)$ и $M_2/(M_1 + M_2)$ от S , мы получаем возможность сравнивать структуры распределения числа повреждений по клеткам тотчас после облучения и после того или иного времени восстановления t . Вместе с тем строя зависимость S от времени восстановления t , можно судить о динамике накопления в популяции доли клеток, содержащих элементарные повреждения, число которых не превышает определенную (хотя и не известную нам) величину.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ

Рассмотрим несколько наиболее простых статистических (формальных) моделей пострadiационного восстановления.

Представим себе, что элементарными единицами восстановления могут служить либо последствия отдельных попаданий (см. далее разд. А), либо отдельные пораженные мишени (разд. Б). Очевидно, что в первом случае осуществление одного элементарного события восстановления отнюдь не однозначно элиминации одной пораженной мишени, как это имеет место во втором случае. Кроме того, в обоих случаях вероятность осуществления одного элементарного акта восстановления может по-разному зависеть от числа элементарных реparableных единиц в данной пораженной единице (т.е. от числа попаданий в одну мишень или от числа пораженных мишеней в клетке).

А. ЭЛЕМЕНТАРНЫМИ ЕДИНИЦАМИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СЛУЖАТ ПОСЛЕДСТВИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПОПАДАНИЙ

В данном случае последствия отдельных попаданий будем называть элементарными повреждениями или просто повреждениями. Обозначим через q вероятность элиминации в единицу времени одного элементарного повреждения из одной мишени. Тогда, с течением времени t восстановления клеток, облученных дозой D_0 , вероятность F наличия в клетке одной пораженной мишени будет постепенно убывать. Характер зависимости F от времени t будет определяться характером зависимости q от числа повреждений в мишени i . Очевидно, однако, что зависимость q от i нисколько не отразится на форме распределения числа пораженных мишеней по отдельным клеткам облученной популяции, которое описывается уравнением (1). В этом случае, следовательно, соотношение между разными формами инактивации и выживаемостью S , изменяющейся в процессе восстановления, будет точно таким же, как и при изменении S вследствие облучения клеток разными дозами. Процесс восстановления будет тождествен уменьшению сорбированной клетками дозы облучения, т.е. будет представлять собою уменьшение эффективной дозы.

Мы пришли, таким образом, к строгому определению понятия «эффективная доза». Пусть клетки были облучены дозой D_0 , снизившей их выживаемость до величины S_0 . Пусть, далее, в результате процесса восстанов-

ления, продолжавшегося t часов, их выживаемость повысилась до S . Если соотношение форм инактивации при S_t оказывается таким же, как и сразу после облучения клеток некоторой дозой D_0' , обуславливающей выживаемость $S_0' = S_t$, то можно говорить, что эффективность дозы D_0 , сорбированной клетками в момент облучения, уменьшилась в процессе восстановления до значения $D_t = D_0'$.

Нетрудно видеть, что содержание, которое мы вкладываем в понятие «эффективная доза», почти тождественно содержанию понятия «кумулятивная доза», предложенного Ли [3] для описания восстановления клеток от лучевых повреждений, вызывающих обратимую задержку деления.

Если восстановление совершается по типу уменьшения эффективной дозы, то процесс восстановления можно выражать в терминах зависимости от времени t абсолютной (D_t) или относительной ($D_t^* = D_t/D_0$) эффективной дозы, а мерой скорости восстановления может служить степень уменьшения эффективной дозы за единицу времени.

Таким образом, если элементарной единицей восстановления служат последствия отдельных попаданий, то восстановление осуществляется по типу уменьшения эффективной дозы. В ходе такого восстановления вероятность $F(t)$ «сохранения» в клетках пораженных мишеней можно представить в виде:

$$F(t) = \sum_{i=k}^{\infty} P_i(t) = \sum_{i=k}^{\infty} \frac{e^{-a_t} a_t^i}{i!} = \sum_{i=k}^{\infty} \frac{e^{-vD_t} (vD_t)^i}{i!}, \quad (4)$$

Однако начальное пуассоновское распределение P_i повреждений по отдельным мишеням должно по-разному деформироваться в процессе восстановления при различной зависимости вероятности элиминации одного повреждения в единицу времени q от числа повреждений i в одной мишени. В связи с этим, очевидно, будет меняться и зависимость скорости элиминации отдельных повреждений (или скорости уменьшения эффективной дозы D_t) от времени восстановления t .

Допуская, что в простейшем случае связь скорости восстановления со временем t определяется только статистическими закономерностями, рассмотрим три крайних формы такой зависимости:

- 1) $q = \text{const}$, т.е. не зависит от величины i ;
- 2) q пропорционально $1/i$,
- 3) q пропорционально i .

Расчеты, основанные на теории вероятностей, показали следующее.

1. Если $q = \text{const} = \beta$, то независимо от степени восстановления сохраняется пуассоновское распределение повреждений по мишеням P_i . Процесс восстановления влияет в этом случае только на среднее число повреждений $a_t = vD_t$ (см. рис. 2, $a-v$), и совершается по закону

$$da_t/dt = -\beta a_t, \quad (5)$$

откуда следует

$$D_t^* = D_t/D_0 = e^{-\beta t}. \quad (6)$$

Таким образом, в случае $q = \text{const} = \beta$, $\ln D_t^* = -\beta t$ линейно зависит от времени t . Наклон прямой, описывающей эту зависимость, не связан с вели-

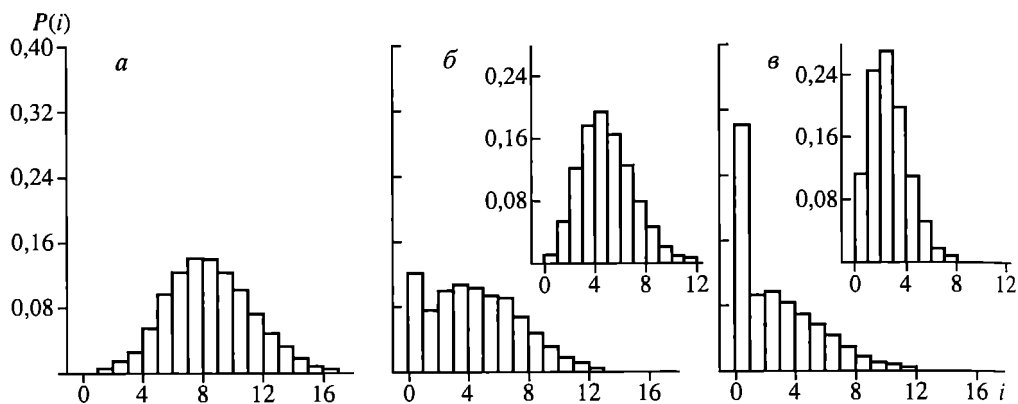


Рис. 2. Кривые пуассонова распределения числа попаданий i по мишеням для различных значений среднего распределения, на врезках – деформированные кривые
Среднее число попаданий равно 8 ($\beta t = 0$, рис. *а*), 4,2 ($\beta t = 4$, рис. *б*) и 2,2 ($\beta t = 6$, рис. *в*)

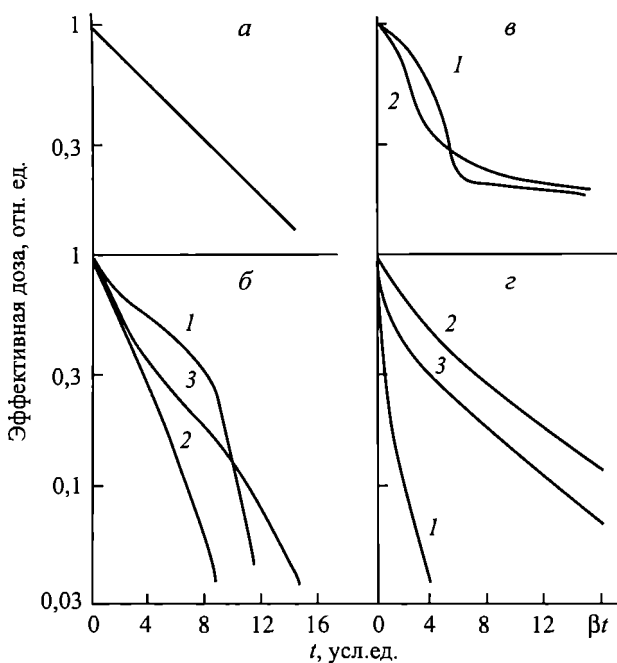


Рис. 3. Кривые уменьшения эффективной дозы в ходе восстановления, совершающегося согласно разным статистическим моделям ($D_i^* = D_i/D_0$)

Полулогарифмический масштаб; графики *а*, *б*, *в* и *г* соответствуют моделям 1, 2, 3 и 4, описанным в таблице

чиной заданной дозы D_0 и критическим числом попаданий k , необходимых для инактивации одной мишени. Величину β , пропорциональную скорости изменения эффективной дозы во времени, можно называть «постоянной восстановления». Форма кривой восстановления, соответствующая рассмотренному случаю, показана на рис. 3, *а*.

2. В случае $q = \beta/i$ исходное распределение числа повреждений по мишеням будет деформироваться в процессе восстановления так, как это показано

на рис. 2, б, в (врезки). Находя для каждого $F(t)$ соответствующие значения a_i , можно построить кривые зависимости D_i^* от времени восстановления t . На рис. 3, б приведены кривые $D_i^*(t)$ для критического числа попаданий $k = 6$ при такой начальной дозе, что $vD_0 = 8$ (кривая 1), а также для $k = 1$ при $vD_0 = 8$ (кривая 2) и $vD_0' = 15$ (кривая 3). Как и следовало ожидать, скорость восстановления в этом случае возрастает со временем t (кривые имеют выпуклую форму) и зависят от величин k (кривые 1 и 2) и D_0 (кривые 2 и 3), уменьшаясь, особенно в ранние сроки, с увеличением последней.

3. Случай $q = \beta i$ означает, что вероятность элиминации отдельных повреждений тем выше, чем больше их содержится в мишени. В этом случае начальное распределение P_i должно в ходе восстановления деформироваться в сторону уменьшения относительных объемов классов с высокими значениями i . Это будет вызывать уменьшение скорости изменения D_i^* с течением времени восстановления, как показано на рис. 3, в. С увеличением k такие кривые должны приобретать все более выпуклую форму на ранних сроках процесса (кривые 1 и 2 для $k = 6$ и 1 при $vD_0 = 12$), возрастание же D_0 должно приводить к увеличению начального наклона кривых.

Итак, мы рассмотрели три частных случая того типа восстановления, когда элементарными единицами процесса служат последствия отдельных попаданий в мишени. При построении соответствующих моделей мы основывались на предположении, что эффективные сечения содержащихся в клетках мишеней одинаковы, что для поражения каждой мишени требуется одно и то же число попаданий и что степень пораженности клеток зависит только от числа пораженных мишеней.

Априори, однако, можно допустить и другие ситуации. В частности, предположить, что в клетке имеется несколько групп мишеней, различающихся по v и k , и что определенная форма инактивации клетки связана с поражением определенного числа мишеней той или иной группы. Это будет означать, что каждой l -й форме поражения клеток будет соответствовать свое F_l . При облучении и при «независимом» восстановлении (т.е. когда $q = \text{const}$) F_l будет представлять собой сумму членов распределения Пуассона. Следовательно, закономерности восстановления в этом случае не будут отличаться от таковых, описанных выше для случая $q = \text{const} = \beta$, и будут описываться зависимостью (6). Если же у клеток с разнокачественными мишенями величина q зависит от числа i , то следует ожидать различий в соотношениях между формами инактивации при одинаковых значениях S , полученных путем облучения некоторой дозой D_1 или путем восстановления после $D_2 > D_1$. Степень этого различия, так же как и направление деформации кривых соотношения форм инактивации, должны варьировать в зависимости от вариаций v и k мишеней разных групп, а также от величины D_0 . К подобным типам восстановления понятие «эффективная доза», конечно, неприменимо. Для графического описания такого восстановления можно, однако, пользоваться «условной эффективной дозой» D' , обуславливающей тотчас после облучения такое же S' , как и после t часов восстановления.

Б. ЭЛЕМЕНТАРНЫМИ ЕДИНИЦАМИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СЛУЖАТ ОТДЕЛЬНЫЕ ПОРАЖЕННЫЕ МИШЕНИ

Для простоты допустим, что вероятность элиминации из клетки отдельных пораженных мишеней не зависит от их особенностей, но может изменяться с их числом j , т.е. могут наблюдаться такие же соотношения q и j , как и рассмотренные выше ($q = \text{const} = \beta$, $q = \beta/j$ и $q = \beta i$).

1. Если $q = \text{const} = \beta$, то распределение числа поврежденных мишеней по клеткам будет оставаться биномиальным как сразу после облучения разными дозами, так и в ходе восстановления. Иными словами, вероятность Φ_n обнаружить клетку с n поврежденными мишенями будет по-прежнему описываться уравнением (1), процесс же восстановления будет сказываться лишь на уменьшении вероятности наличия в клетке пораженной мишени. К этому случаю, следовательно, также приложимо понятие «уменьшение эффективной дозы». Однако, в отличие от аналогичного случая рассмотренного выше типа восстановления «А», при равновероятной элиминации отдельных пораженных мишеней форма кривой восстановления будет зависеть от критического числа попаданий K в мишень, D_0 и продолжительности восстановления t (рис. 3, з).

Действительно, в рассматриваемом типе восстановления зависимость $F(t)$ от D_i описывается уравнением (4). Кривые, задаваемые этим уравнением, хорошо известны и приводятся в различных руководствах по радиобиологии (см., например [2]). Пользуясь такими кривыми, можно найти зависимость D_i от F . Полагая, далее, что для числа повреждений FN_0 , где N_0 – общее число мишеней на клетку,

$$\frac{d(FN_0)}{dt} = -\beta FN_0, \quad (7)$$

мы получаем

$$F(t) = F_0 e^{-\beta t}. \quad (8)$$

Если, далее, по одной оси откладывать $-\ln F$, а по другой D_i , можно построить зависимость $D_i(t)$. Три примера таких кривых приведены на рис. 3, з. Мы видим, что по форме эти кривые существенно отличаются от экспоненциальных, но столь же существенно отличаются и от кривых восстановления других типов, приведенных на рис. 3, б, в. Увеличение критического числа попаданий в мишень K приводит к уменьшению скорости восстановления (кривые 1 и 2, для которых $K = 1$ и 5, а $vD_0 = 5$), с уменьшением же D_0 скорость восстановления возрастает, особенно на ранних сроках его осуществления (кривые 2 и 3, для которых $vD_0 = 5$ и 10, а $K = 5$).

Интересно, что величина D_0 влияет в этом случае не только на скорость восстановления, но и на степень изогнутости кривой $\ln D_i(t)$. Так, в случае одноударных «мишеней» ($K = 1$), если D_0 достаточно мала, так что $vD_0 \ll 1$, то $D_i(t) \sim F(t) \sim F_0 e^{-\beta t}$, т.е. зависимость D_i от t почти не отличается от экспоненциальной.

2. Если вероятность элиминации поврежденной мишени из клетки зависит от содержания в клетке таких мишеней, то биномиальное распреде-

**Радиобиологические характеристики клеток,
соответствующие различным статистическим моделям
пострадиационного восстановления**

Радиобиологические характеристики		Модели восстановления	
Соотношение форм инаktivации	Форма зависимости D_0 от t и D_0 (в полулогарифмическом масштабе)	Элементарные единицы восстановления	Форма зависимости q от $i(t)$
<p>I. Как при облучении (восстановление можно выражать в терминах эффективной дозы)</p>	<p>Форма зависимости D_0 от t и D_0 (в полулогарифмическом масштабе)</p> <p>1. $D_0(t) = D_0 e^{-\beta t}$. Восстановление описывается прямой, наклон которой не зависит от D_0 и t</p> <p>2. Кривые восстановления выпуклые, скорость восстановления увеличивается с ростом t и уменьшается с ростом D_0</p> <p>3. Кривые восстановления с перегибом; при высоких t вогнутые. Скорость восстановления при высоких t уменьшается, а с ростом D_0 (при низких t) возрастает</p> <p>4. Кривые восстановления вогнутые монотонные; с ростом D_0 скорость восстановления убывает (при невысоких t)</p>	<p>Элементарные повреждения (последствия отдельных попаданий); формы инаktivации зависят: либо а) от числа пораженных мишеней, либо б) от их числа и типа</p> <p>То же, но только для случая а)</p> <p>То же, но только для случая а)</p>	<p>$q = \text{const} = \beta$ («Независимое восстановление» типа «А»).</p> <p>$q = \beta/i$</p> <p>$q = \beta/i$</p> <p>$q = \text{const} = \beta$ («Независимое восстановление» типа «Б»).</p>

Таблица (окончание)

Радиобиологические характеристики		Модели восстановления	
Соотношение форм инактивации	Форма зависимости D_0 от t и D_0 (в полулогарифмическом масштабе)	Элементарные единицы восстановления	Форма зависимости q от $i(j)$
II. Соотношение форм инактивации деформировано			
1) Тип деформации неопределенный	5. Скорость восстановления (в условной эффективной дозе) возрастает с t и уменьшается с ростом D_0	Элементарные повреждения; формы инактивации зависят от типа пораженных мишеней	$q = \beta/i$
	6. Скорость восстановления (в условной эффективной дозе) уменьшается при высоких t , а с ростом D_0 при низких t возрастает	То же	$q = \beta i$
2) Кривые соотношения форм инактивации деформированы в сторону увеличения содержания форм с большей пораженностью	7. Скорость изменения условной эффективной дозы возрастает с t и уменьшается с ростом D_0	Пораженные мишени, независимо от связи форм инактивации с их числом или типом	$q = \beta/j$
3) Кривые соотношения форм инактивации деформированы в сторону увеличения содержания форм с меньшей пораженностью	8. Скорость изменения условной эффективной дозы уменьшается с ростом t и возрастает (при малых t) с ростом D_0	То же	$q = \beta j$

ление числа поврежденных мишеней по клеткам, описываемое уравнением (1), будет деформироваться в ходе восстановления таким же образом, как в аналогичных случаях деформируется пуассоновое распределение (см. рис. 2). Иными словами, в случае $q = \beta/j$ в ходе восстановления относительное содержание классов с более высокими значениями j будет все более превышать таковое тотчас после облучения клеток соответствующими «условными эффективными дозами», а в случае $q = \beta/j$ будет наблюдаться противоположная картина. Это обстоятельство сразу же отразится на кривых зависимости форм инактивации от величины S_j . Уменьшение q с ростом j будет приводить к относительному увеличению содержания в популяции восстанавливающихся клеток особей с более глубоким повреждением (см. рис. 1, в, кривые 1), а увеличение q с ростом j – к относительному увеличению содержания форм с менее глубоким повреждением (рис. 1, в, кривые 2). Степень подобной деформации должна зависеть от многих причин, в частности, от величины D_0 . Очевидно, что к обоим этим случаям восстановления понятие эффективной дозы неприменимо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было рассмотрено несколько различных статистических моделей пострadiационного восстановления клеток, в основу построения которых положен принцип попаданий. Мы видели, что различные типы восстановления требуют различного изменения соотношения форм инактивации клеток и различных зависимостей эффективной дозы (или условной эффективной дозы D') от времени t . Характер этих показателей рассмотренных моделей восстановления приведен в таблице.

Наиболее четкие различия имеют место внутри той группы моделей, которые позволяют описывать восстановление в терминах эффективной дозы. Поэтому первым этапом выбора статистической модели, приемлемой для описания конкретных экспериментальных данных, должен быть анализ изменения соотношения форм инактивации облученных клеток в ходе процесса восстановления. Только такой анализ позволит решить вопрос о применимости к тому или иному конкретному случаю понятия «уменьшение эффективной дозы».

Процессу восстановления, проходящему по типу уменьшения эффективной дозы, может соответствовать несколько различных статистических моделей (а именно модели 1, 2, 3 и 4 таблицы). Для того чтобы сделать выбор между этими моделями, необходимо проанализировать характер зависимости D_t от t при различных значениях D_0 , т.е. проанализировать форму кривых восстановления при различных исходных дозах облучения.

При использовании развитых выше соображений для анализа экспериментальных данных необходимо помнить, что при построении статистических моделей восстановления учитывалась только обратимая компонента лучевого поражения клеток. Существование необратимых первичных последствий облучения [11] не может не сказаться на форме экспериментальных кривых восстановления; последние будут представлять собой «чистые» кривые восстановления плюс необратимые компоненты лучевого поражения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Biophysik I. Das Treffer-prinzip in der Biologie.* Leipzig; S. Hirzel, 1947.
2. *Циммер К.Г.* Проблемы количественной радиобиологии. М.: Атомиздат, 1962.
3. *Ли Д.Э.* Действие радиации на живые клетки. М.: Атомиздат, 1963.
4. Восстановление клеток от повреждений. М.: Атомиздат, 1963.
5. *Корогодин В.И.* // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 703.
6. *Корогодин В.И., Малиновский О.В., Порядкова Н.А., Изможерев Н.А.* // Цитология. 1959. Т. 1. С. 306.
7. *Корогодин В.И., Малютина Т.С.* // Природа. 1959. № 10. С. 82.
8. *Корогодин В.И., Билуши В., Маркова Л.И., Шехтман Я.Л.* // Радиобиология. 1963. Т. 3. С. 39.
9. *Бувевич Ю.А., Карабаев Э.М., Корогодин В.И.* // Радиобиология. 1963. Т. 3. С. 197.
10. *Корогодин В.И.* // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 206.
11. *Корогодин В.И., Кабакова Н.М., Пересторонина Н.Н.* и др. // Радиобиология. 1964. Т. 4. С. 289.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОК

Могут ли клетки восстанавливаться от повреждений ионизирующими излучениями?

Положительный ответ на этот вопрос намечался уже в работах первых радиобиологов. Давно было показано, что выживаемость облученных клеток зависит от таких условий пострадиационной инкубации, как температура, состав питательной среды или срок посева на среду. Однако если результаты подобных опытов можно объяснять восстановлением, сами по себе эти опыты еще не доказывали его существования. Всегда оставалось сомнение, не является ли наблюдаемое повышение выживаемости следствием того, что в соответствующих условиях не проявляются необратимые последствия облучения или происходит размножение неповрежденных клеток перед высевом на питательную среду. Вот почему даже после выхода в свет работы Latarjet (1952), в которой обсуждались возможные механизмы восстановления, сама реальность этого феномена ставилась под сомнение, и только в конце 50-х годов существование пострадиационного восстановления было однозначно доказано в опытах Kimball (1956) и сотрудников, Alper и Gillies, В.И. Корогодина, Н.В. Лучника и Л.С. Царапкина и других исследователей. С тех пор изучением эффекта восстановления занялись многие научные коллективы (см. труды соответствующих симпозиумов).

Эффект пострадиационного восстановления клеток можно изучать двояко, акцентируя внимание либо на кинетических его закономерностях, либо на лежащих в его основе биохимических процессах.

Плодотворность исследования биохимической природы восстановления зависит от выбора единиц для количественного учета этого процесса, что в свою очередь требует формулировки рабочей гипотезы о природе эффекта восстановления или, точнее, разработки статистической модели, адекватно отражающей указанный эффект. Именно поэтому в первую очередь мы при-

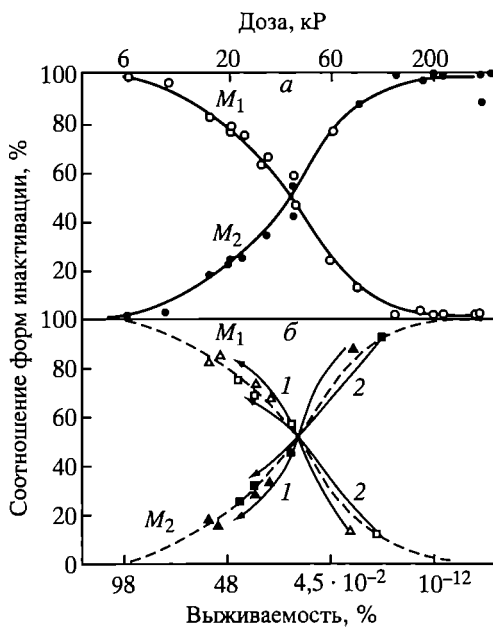
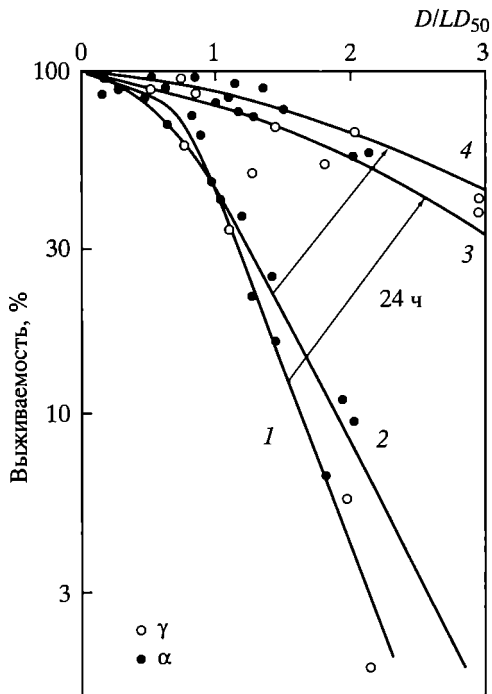
Рис. 1. Кривые выживания *Sacch. vini*, «Мегри 139-В» при высеве на питательный агар сразу после облучения (1, 2) и через 24 ч (3, 4); водную суспензию клеток подвергали действию γ -излучения (1, 3) или α -частиц (2, 4)

ступили к изучению кинетических закономерностей пострадиационного восстановления клеток.

Основным объектом нам служили дрожжи *Sacch. vini*, Мегри 139-В; выращенная на сусло-агаре двух-трехсуточная культура таких дрожжей содержит 99,2–99,8% «покоящихся» клеток. Если водную суспензию таких клеток подвергнуть γ -облучению или воздействию α -частиц, сразу же посеять на питательную среду и проинкубировать при 30 °С, можно определить зависимость их выживаемости от дозы облучения (кривые 1 и 2, рис. 1). Если облученные клетки посеять на питательную среду не сразу, а предварительно выдержать 24 ч при 30 °С в воде, в которой их облучали, их выживаемость существенно повысится (кривые 3 и 4, рис. 1).

Можно доказать, что этот эффект не связан с размножением клеток в облученной воде. Приготовим суспензию, содержащую по 100 клеток в 1 мл, и облучим в дозе 100 кР. Разделим эту суспензию на 40 порций по 1 мл каждая. Двадцать порций сразу же высеем на сусло-агар в чашки Петри (по 1 порции на чашку), поставим инкубировать при 30 °С. Через 4 сут лишь в трех-четырех чашках из 20 вырастет по одной колонии. Значит, после облучения в дозе 100 кР жизнеспособными оказались лишь две клетки из 1000, и лишь в четырех порциях из 20 содержалось по одной клетке, способной к бесконечному размножению. Оставшиеся 20 порций высеем на чашки Петри спустя 48 ч. Теперь в каждой чашке вырастет примерно по 40 колоний. Значит, за 48 ч выживаемость облученных клеток повысилась от 0,2 до 40% независимо от того, находились ли первично жизнеспособ-

Рис. 2. Зависимость соотношения форм инактивации M_1 и M_2 от выживаемости при разных дозах облучения (а) и в ходе восстановления (б); D_0 – 67 (1), 98 кР (2)



ные клетки в отдельных порциях или нет. Вспомним, что в обоих случаях, при высеве клеток на сусло-агар сразу же или спустя 48 ч после облучения, условия пострадиационного выращивания их были идентичны. Значит, повышение выживаемости облученных дрожжей вследствие выдерживания в водопроводной воде есть результат их восстановления.

Здесь эффект восстановления представлен как бы в «чистом виде», вне зависимости от условий выращивания клеток на питательной среде. Именно поэтому рассмотренную модель восстановления мы и использовали для изучения кинетических закономерностей этого процесса. Высевая облученные клетки на питательную среду спустя разные интервалы времени, можно получить кривую $S(t)$ зависимости выживаемости S от продолжительности восстановления t .

Выживаемость облученных клеток, испытанных или не испытанных восстановление, можно определять двояко, пользуясь классической методикой макроколоний или методикой микроколоний, предложенной Holveck и Lacassagne [1930] и усовершенствованной нами. При использовании обеих методик значения выживаемости получаются идентичными. Однако, пользуясь методикой микроколоний, помимо величины выживаемости можно определить и характер распределения степени пораженности по нежизнеспособным клеткам популяции. Дрожжевые клетки, пораженные ионизирующими излучениями в широком диапазоне доз, погибают после четырех-шести или одного-двух циклов почкования (1-я и 2-я формы инактивации, или M_1 и M_2). Относительное содержание M_1 и M_2 зависит от дозы облучения и выживаемости (рис. 2, а). Используя кривые выживания $S(D)$ и кривые восстановления $S(t)$ после разных доз облучения, а также зная зависимость соотношения форм инактивации от дозы облучения и продолжительности восстановления, можно попытаться решить вопрос о кинетических закономерностях этого феномена.

Можно полагать, что форма инактивации дрожжевой клетки зависит от числа попаданий или от числа и типа пораженных мишеней (Ю.Г. Капульцевич, В.И. Корогодина). В обоих случаях кривые зависимости относительного содержания M_1 и M_2 от дозы облучения D или выживаемости S (см. рис. 2, а) будут однозначно отражать распределение некоторого среднего числа элементарных повреждений (например, пораженных мишеней) по различным клеткам популяции, облученной в той или иной дозе.

Можно представить себе, что элементарными единицами восстановления служат или последствия отдельных элементарных попаданий, или отдельные пораженные мишени. Можно представить также, что в каждом из этих двух случаев вероятность β -восстановления клетки от одного элементарного повреждения или не зависит от числа i таких повреждений в клетке ($\beta = \lambda = \text{const}$), или увеличивается с их числом ($\beta \rightarrow \lambda i$), или, наконец, убывает ($\beta \rightarrow \lambda/i$). Таковы шесть простейших возможных альтернативных моделей процесса восстановления.

На основании теории вероятности можно рассчитать (Ю.Г. Капульцевич, В.И. Корогодина), что во всех трех случаях восстановления, совершающегося путем элиминации из клеток последствий отдельных попаданий, а также в случае «независимого» восстановления ($\beta = \text{const}$), если элиминируются пораженные мишени, характер распределения элементарных повреждений по

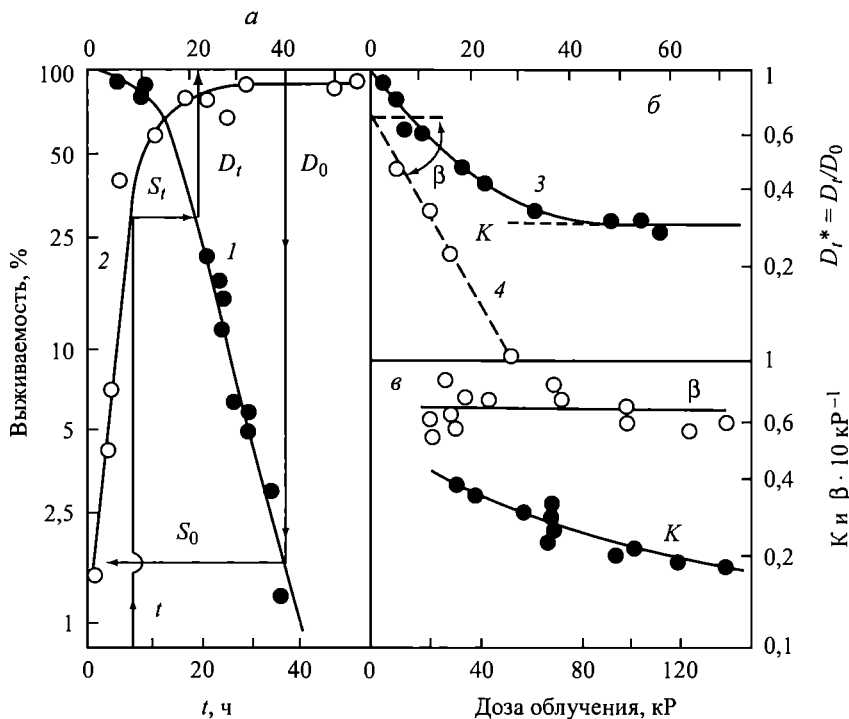


Рис. 3. Динамика пострadiационного восстановления дрожжевых клеток. Масштаб полулогарифмический

a – кривая выживания (1) и кривая восстановления (2). Стрелками показан способ расчета эффективной дозы D_i ; *b* – кривая восстановления, выраженная в относительных эффективных дозах $D_i^* = D_i/D_0$ (3); пунктирная линия (4) описывает уменьшение во времени обратимой компоненты лучевого поражения $D_i^*(1-K)$; *v* – зависимость от дозы облучения постоянной восстановления (β) и необратимой компоненты (K)

отдельным особям облученной популяции будет изменяться в ходе восстановления так, как если бы происходило уменьшение исходной дозы облучения. Иными словами, если в ходе восстановления относительное содержание разных форм инактивации среди всех пораженных клеток будет связано с выживаемостью такой же зависимостью, какая обнаруживается тотчас после облучения клеток в соответственно меньших дозах, можно утверждать, что процесс восстановления адекватно отражается какой-либо одной из этих четырех статистических моделей.

Данные, полученные в нашей лаборатории, показали, что в действительности дело обстоит именно так (рис. 2, б). Следовательно, в нашем случае процесс восстановления адекватен уменьшению эффективности заданной дозы и может быть описан зависимостью от времени восстановления t эффективной дозы, выраженной в абсолютных (D_i) или относительных $D_i^* = D_i/D_0$ единицах. Способ расчета D_i показан графически на рис. 3, *a*, где приведена стандартная кривая выживания $S(D)$ (кривая 1) и кривая восстановления $S(t)$ (кривая 2).

На основании теории вероятности можно рассчитать, что различным статистическим моделям, адекватным процессу восстановления, совершающегося путем уменьшения эффективной дозы, соответствуют разные формы

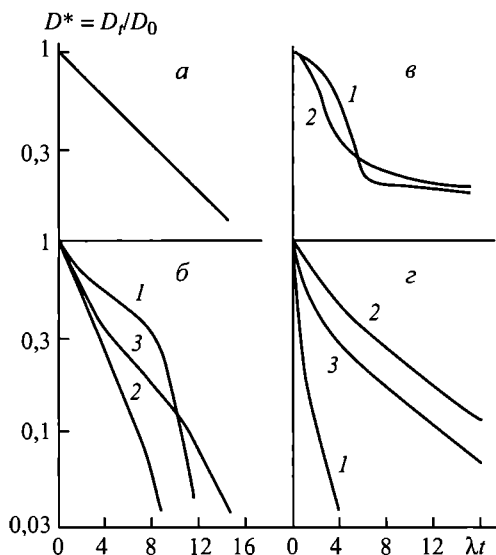


Рис. 4. Теоретические кривые восстановления клеток от обратимой компоненты лучевого поражения, выраженного в относительной эффективной дозе $D^* = D_i/D_0$; различные статистические модели; масштаб полулогарифмический (расчет кривых выполнил Ю.Г. Капальцевич)

а – единицами восстановления служат последствия отдельных попаданий; $\beta = \text{const}$. Наклон кривых не зависит от t , D_0 и критического числа попаданий в мишень m ; *б* – то же, но $\beta = \lambda i$; $1 - D_0 = 8/v$ (v – эффективный объем), $m = 6$; $2 - D_0 = 8/v$, $m = 1$; $3 - D_0 = 15/v$, $m = 1$; *в* – то же, но $\beta = \lambda i$; $1 - D_0 = 12/v$, $m = 6$; $2 - D_0 = 12/v$, $m = 1$; *г* – единицами восстановления служат пораженные мишени, $\beta = \text{const}$. Наклон кривых зависит от t , D_0 и критического числа M попаданий в мишень; $1 - D_0 = 5/v$, $M = 1$; $2 - D_0 = 5/v$, $M = 5$; $3 - D_0 = 10/v$, $M = 5$

зависимости D_i^* от t и D_0 . Как показано на рис. 4, кривые, описывающие зависимость D_i^* от t , для всех четырех моделей имеют совершенно различные формы. Для того чтобы выяснить, какая из этих моделей наиболее адекватно отражает реальный процесс восстановления, необходимо сравнить экспериментальные кривые восстановления, выраженного в терминах эффективной дозы, с теоретическими кривыми, изображенными на рис. 4.

Экспериментально полученная зависимость $D_i(t)$ для $D_0 = 40$ кР показана на рис. 3, б (кривая 3). Такую же форму имеют кривые $D_i(t)$ на всем изученном нами диапазоне доз – от 10 до 170 кР. Форма этих кривых существенно

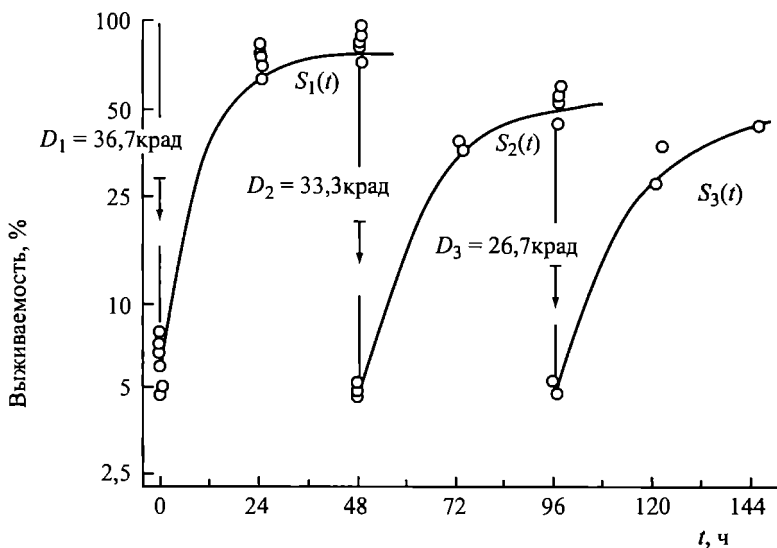


Рис. 5. Динамика восстановления дрожжевых клеток после трехкратного рентгеновского облучения. Интервалы между облучениями 48 ч, инкубация в водопроводной воде при 30 °С. $S_1(t)$, $S_2(t)$ и $S_3(t)$ – кривые восстановления после D_1 , D_2 и D_3

отличается от форм кривых всех четырех моделей, приведенных на рис. 4. Отличие это связано с тем, что экспериментальные кривые $D_i^*(t)$ стремятся не к 0, а к некоторым асимптотам – необратимым компонентам K .

Таким образом, пострадиационное восстановление клеток никогда не бывает полным. Можно предположить, что неспособность клеток к полному восстановлению связана или с исчерпанием в ходе восстановления метаболических ресурсов, контролирующих этот процесс, или с возникновением в ходе самого облучения некоторого числа необратимых элементарных повреждений. Чтобы проверить, какое из этих двух простейших предположений наиболее правдоподобно, сотрудником нашей лаборатории С.Я. Холевой были выполнены следующие эксперименты. Одни и те же дрожжевые клетки 3 раза подвергали рентгеновскому облучению, выдерживая их между облучениями в режиме восстановления. Перерывы между облучениями продолжались по 48 ч – время, вполне достаточное, чтобы кривая восстановления «вышла на плато». Если бы это плато свидетельствовало об исчерпании соответствующих метаболических ресурсов, то клетки, испытавшие полное возможное восстановление после 1-го облучения, вряд ли были бы способны восстанавливаться после 2-го и тем более 3-го лучевого удара. Однако, как показано на рис. 5, дрожжевые клетки прекрасно восстанавливаются и после 1-го, и после 2-го и даже после 3-го облучения. Эффективность восстановления во всех трех случаях практически одинакова. Эти результаты проще всего объяснить тем, что некоторые элементарные повреждения, возникающие в клетках при облучении, необратимы.

Если это предположение верно, то для дальнейшего анализа экспериментальных кривых восстановления $D_i^*(t)$ из них следует вычесть необратимую компоненту K , выраженную в долях заданной дозы. Величина $D_i^*(t) - K$, как показано на рис. 3, б (кривая 4), убывает во времени по экспоненциальному закону. Опыты, проведенные с дрожжевыми клетками, облученными в разных дозах, а также с клетками, облучавшимися повторно после предварительного восстановления, показали, что наклон кривых $D_i^*(t) - K$ (величина β) практически не зависит от D_0 (рис. 3, в). Сравнивая эти результаты с теоретическими кривыми восстановления, приведенными на рис. 4, мы видим, что такая закономерность уменьшения во времени обратной компоненты лучевого поражения соответствует статистической модели «независимое элиминирование из облученных клеток последствий отдельных попаданий» (см. рис. 4, а). Следовательно, процесс восстановления дрожжевых клеток можно представить в виде уравнения

$$D_i = D_0[K + (1 - K)e^{-\beta t}],$$

где D_i – эффективная доза, D_0 – заданная доза, K – необратимая компонента лучевого поражения, t – время и β – «постоянная восстановления». Количественно постоянная восстановления β пропорциональна вероятности элиминации в единицу времени из клетки одного элементарного повреждения. Величина K , как показано на рис. 3, в, несколько убывает с ростом дозы – следовательно, закономерности накопления в клетках необратимых элементарных повреждений несколько отличаются от закономерностей накопления повреждений обратимых.

Величина β в ходе восстановления остается постоянной и на большом интервале доз не зависит от D_0 ; этот факт свидетельствует о том, что в основе реального процесса восстановления лежат простые статистические закономерности. Следовательно, процесс восстановления контролируется какими-то структурными единицами клеток, представленными в избыточном числе и слабо повреждаемыми облучением. Об этом же свидетельствует и одинаковая способность клеток к восстановлению после повреждения γ -излучениями и α -частицами (см. рис. 1) и после нескольких последовательных облучений (см. рис. 5). Вывод этот кажется особенно правдоподобным, если учесть, что способность клеток к восстановлению связана с интенсивностью их энергетического обмена и, в частности, с наличием цитохромных систем. Весьма вероятно, что в основе пострадиационного восстановления клеток лежат какие-то ферментативные процессы.

Таким образом, изучение кинетических закономерностей пострадиационного восстановления клеток привело нас к выводу, что элементарными единицами восстановления служат последствия отдельных попаданий. Назовем такие обратимые последствия попаданий «потенциальные повреждения».

Как долго, однако, потенциальные повреждения сохраняют свою обратимость? Когда и в связи с чем происходит переход их в необратимое состояние? На этот вопрос можно ответить, изучая закономерности восстановления клеток после предварительного «подрачивания» их в питательной среде или применяя другие схемы опытов. Данные, полученные на дрожжах, инфузориях и бактериях, очень убедительно показывают, что переход потенциальных повреждений в необратимое состояние, или их «реализация», строго приурочен к первой пострадиационной редупликации хромосомного аппарата клеток. Иными словами, пока в облученных клетках не произошло деление ядра, потенциальные повреждения полностью сохраняют свою обратимость¹. Поэтому величину t уравнения можно определить как интервал времени между моментами возникновения и реализации потенциальных повреждений.

Изложенные выше соображения позволяют нам наметить следующий подход к объяснению фактов модификации лучевого поражения клеток условиями пострадиационного культивирования. Такие условия могут действовать на облученную клетку по меньшей мере двояко – они могут влиять на продолжительность времени t (срок обратимости потенциальных повреждений) и на интенсивность восстановления β . Согласно уравнению, эффективность облучения клеток в данной дозе будет тем ниже, чем больше время t и выше постоянная восстановления β . Следовательно, в каждом конкретном радиобиологическом эксперименте величина конечного эффекта (например, выживаемости) есть следствие не только исходной пораженности клеток при облучении в данной дозе, но и последующего восстановления. Как было показано в одной из наших работ, именно это обстоятельство обуславливает зависимость выживаемости облученных клеток от температуры пострадиационного культивирования.

Как известно, до недавнего времени наиболее последовательной попыткой объяснить биологическое действие ионизирующих излучений служил «принцип попадания», сформулированный в классических работах Ли, Н.В. Тимофеева-Ресовского и К.Г. Циммера. Однако до сих пор этот принцип не пытались использовать для объяснения модификации эффективности облучения путем различных воздействий на клетки в пострадиационный период. Более того, именно существование такой модификации послужило Баку и Александру основным аргументом для отрицания приложимости теории мишени – частного случая принципа попаданий – к лучевому поражению живых клеток. Мы видели, однако, что как эффект восстановления, так и факты модифицирующего влияния пострадиационных условий можно объяснить именно с позиций принципа попаданий, дополнив его концепцией «потенциальных повреждений». Согласно этой концепции, последствия отдельных попаданий в эффективные объемы клеток могут приводить как к необратимым, так и к обратимым, или потенциальным, повреждениям. Судьба таких повреждений (а следовательно, и конечная эффективность облучения) зависит от сроков их реализации и интенсивности процессов восстановления, согласно приведенному выше уравнению. По нашим расчетам, у диплоидных дрожжей до 75–80% всех первичных повреждений имеет потенциальный характер.

Что, однако, представляет собой способность клеток восстанавливаться от потенциальных лучевых повреждений?

В настоящее время вряд ли кто-либо сомневается, что не только мутации, но и летальные последствия облучения связаны с повреждением генетического аппарата клеток. Известно даже, что в качественном отношении генетические эффекты облучения не отличаются от спонтанных генных и хромосомных мутаций. Не означает ли это, что в экспериментах по восстановлению мы выявляем активность тех биохимических систем, которые у необлученных клеток направлены на ликвидацию премутагенных изменений? Если это предположение подтвердится, можно будет считать, что изучение пострадиационного восстановления клеток позволило установить новую общебиологическую закономерность – существование в клетках биохимических систем, участвующих в регулировке или стабилизации скорости «спонтанного» мутационного процесса. Не исключено, что такая «антимутагенная» функция присуща какой-либо группе ферментов, давно известных и хорошо изученных в других отношениях.

ЛИТЕРАТУРА¹

1. *Карабаев Э.М., Корогодин В.И.* // Радиобиология. 1961. Т. 5. С. 653.
2. *Карабаев Э.М., Корогодин В.И.* // Журн. общ. биол. 1962. № 3. С. 150.
3. *Корогодин В.И.* // Биофизика. 1958. Т. 3, № 6. С. 703.
4. *Корогодин В.И., Малютина Т.С.* // Природа. 1959. № 10. С. 82.
5. *Корогодин В.И., Билуши В., Маркова Л.И.* и др. // Радиобиология. 1963. Вып. 1. С. 39.
6. *Корогодин В.И.* // Биофизика. 1958. Т. 3, № 2. С. 206.
7. *Корогодин В.И.* // Радиобиология. 1964. № 1. С. 83.
8. *Корогодин В.И., Карабаев Э.М.* // Радиобиология. 1962. № 6. С. 824.
9. *Лучник Н.В., Царякин Л.С.* // Докл. АН СССР. 1959. Т. 124. С. 213.

10. Лучник Н.В., Изможеров Н.А., Порядкова Н.А. и др. // Обратимость цитогенетических повреждений, вызванных радиацией. М., 1960.
11. Хадсон Г.А. // Вестн. рентгенол. 1920. № 1. С. 46.
12. Ремезова Т.С., Третьякова В.П. // Журн. общ. биол. 1961. № 2. С. 120.
13. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G. Biophysik. Leipzig: S. Hirzel Verlag, 1947.
14. Циммер К.Г. Проблемы количественной радиобиологии. / Пер. с англ. под ред. В.И. Корогодина. М.: Атомиздат, 1962.
15. Alper T., Gillies N.E. // J. Gen. Microbiol. 1958. Vol. 18. P. 461.
16. Бак З., Александер П. Основы радиобиологии. М.: Изд-во иностр. лит., 1963.
17. Holweck F., Lacassagne A. // C. R. Soc. Biol. 1930. Vol. 103. P. 60.
18. Kimball R.F., Gaither N., Wilson S.M. // Radiat. Res. 1956. Vol. 5. P. 485.
19. Latarjet R. // C. R. Acad. Sci. (Paris). 1943. Vol. 217. P. 186.
20. Latarjet R. // Acta radiol. (Stockh.). 1954. Vol. 41. P. 48.
21. Ли Д.Э. Действие радиации на живые клетки. М., 1963.
22. Pratt A.W., Moos W.S., Eden M. // J. Nat. Cancer Inst. 1955. Vol. 15. P. 1039.
23. Repair From Genetic Radiation Damage and Differential Radiosensitivity in Germ Cells / Ed. F.H. Sobels. N.Y., 1963.
24. Stapleton G.E., Billen D., Hollaender A. // J. Cell. Comp. Physiol. 1953. Vol. 41. P. 345.
25. Strangeways T.S., Fell H.B. // Proc. Roy. Soc. 1927. Vol. 102. P. 9.
26. Wainwright S.D., Nevill A. // J.(Bact.). 1956. Vol. 70. P. 547.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОК ОТ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ: НЕКОТОРЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ

ВВЕДЕНИЕ

У первых радиобиологов вряд ли возникал вопрос, могут ли клетки восстанавливаться от лучевых повреждений; способность клеток к пострадиационному восстановлению казалась очевидной [1, 2].

И, действительно, наблюдая облученные клетки под микроскопом, можно видеть как различные фазы усугубления «лучевой болезни» клеток, так и «выздоровление» клеток, вначале выглядевших пораженными. Инфузории, облученные высокими дозами рентгеновых лучей, теряют подвижность и прозрачность, округляются, а затем вновь начинают двигаться и приобретают обычную форму [3]. Дрожжевые грибки, прекратив после облучения размножаться, через некоторое время возобновляют почкование: поделившись один или несколько раз, некоторые облученные дрожжи погибают, другие, восстановив исходный темп размножения, образуют колонии, а третьи, сформировав после нескольких циклов почкования патологические микроколонию (цепочки или веточки гипертрофированных и обреченных на гибель клеток), порождают вдруг одну-две клетки обычного вида, способные к бесконечному размножению [1, 4]. Клетки корешков растений, делящиеся вскоре после облучения, образуют нередко патологические фигуры митоза – хромосомы интенсивнее, чем в норме, окрашиваются, набухают, слипаются в комок; позже делящиеся клетки выглядят более нормальными – они восстанавливаются от повреждений, вызывающих липкость хромосом [5].

Подобных примеров можно привести много. Но наиболее рельефно способность клеток к восстановлению выступает в тех опытах, в которых коли-

чественно учитывают какую-либо одну из реакций клеток на облучение и определяют зависимость величины этой реакции от тех факторов, которые, по мнению экспериментатора, так или иначе влияют на способность клеток к восстановлению. Ниже будет рассмотрено несколько групп таких реакций, или, точнее, несколько форм проявления пострадиационного восстановления клеток. Я ограничусь лишь теми радиобиологическими реакциями, которые вызываются ионизирующими излучениями – рентгеновыми или γ -лучами, а также α - и другими тяжелыми частицами. Сравнительное рассмотрение нескольких форм восстановления позволит обсудить вопрос, в какой мере они могут быть обусловлены общими или различными «механизмами», а также в какой мере правомочно называть «восстановлением» различные группы фактов, сюда относящихся.

Однако прежде чем приступить к обсуждению намеченных вопросов, следует сделать несколько замечаний. Дело в том, что, несмотря на очевидность существования эффекта восстановления для первых радиобиологов, в литературе длительное время бытовало представление о необратимости ряда и, по крайней мере, летальных последствий облучения. Положение это коренным образом изменилось к концу 50-х годов, когда в разных лабораториях и на разных объектах была показана реальность феномена восстановления [6–12]. Может быть, именно в связи с этим в настоящее время термин «восстановление» используют весьма широко, даже слишком широко. Все чаще публикуются работы, где эффект восстановления привлекают для объяснения таких радиобиологических явлений, где само наличие восстановления еще отнюдь не доказано и закономерности его не изучены (например, для объяснения действия радиозащитных веществ [13] или распределения хромосомных aberrаций по облученным клеткам [14]); использование же неизвестного для объяснения неизвестного может лишь затруднить, а не облегчить выяснение сути дела. С другой стороны, те случаи, где восстановление доказано (или считается, что доказано), некоторые авторы склонны привлекать в качестве аргументов против теории мишени или принципа попадания [15–17], хотя само по себе наличие эффекта восстановления ничего не говорит ни за, ни против приложимости классических представлений количественной радиобиологии к тем или иным реакциям клеток на облучение.

Наконец, несколько слов относительно определения термина «восстановление». Этот вопрос поднимался на нескольких симпозиумах и подробно обсуждался в одной из статей В.П. Парибока [18]. Однако до сих пор не существует удовлетворительного определения этого термина, и в этом нет ничего удивительного. Действительно, восстановлением можно называть ликвидацию (или обезвреживание) в клетках тех повреждений, которые в данных условиях эксперимента обуславливают проявление той или иной реакции на облучение, однако в подавляющем большинстве случаев природа таких повреждений нам неизвестна. В настоящее время, мне кажется, полезнее не столько дискутировать различные определения этого понятия, содержание которого, в общей форме, очевидно, сколько стремиться к корректному его использованию, т.е. строго обосновывать наличие эффекта восстановления в том или ином конкретном случае и изучать конкретные формы его проявления.

1. СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ПРОЯВЛЕНИЯ ПОСТРАДАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОК

1. ЗАДЕРЖКА ДЕЛЕНИЯ

Наиболее общей формой проявления пострадиационного восстановления клеток является, пожалуй, их восстановление от повреждений, задерживающих первое пострадиационное деление. Действительно, временная задержка деления, а следовательно, и восстановление от соответствующих повреждений, наблюдается почти на всех биологических объектах, облученных в соответствующих дозах, и изучена в количественном отношении весьма обстоятельно. Анализ именно этого феномена привел Д.Э. Ли [19] к концепции «кумулятивной дозы» и позволил ему предположить, что соответствующее восстановление связано либо с разрушением радиотоксинов, либо с синтезом поврежденных облучением компонентов клетки, количество которых пропорционально дозе облучения.

Я уже приводил некоторые аргументы в пользу того, что задержка деления может быть обусловлена повреждением *массовых* структурных компонентов клеток, а также литературные данные, позволяющие, в первом приближении, связывать их с клеточным ядром [20]. Высказывалось также предположение, что задержка деления у облученных клеток связана с обратимым подавлением синтеза белка [21]. Не исключено, что эти повреждения в какой-то мере сходны с теми, которые вызывают «липкость» хромосом. В отношении задержки деления разные объекты очень различаются по радиочувствительности, и, что весьма интересно, форма зависимости величины задержки от дозы различна для *родственных* объектов, имеющих один или же два и более хромосомных наборов [20].

Считают, что восстановление клеток от повреждений, задерживающих деление, – активный метаболический процесс [19], требующий белкового синтеза [22]. Такое восстановление происходит только при активном функционировании облученной клетки и мало связано с ее последующей судьбой: деление может одновременно возобновляться у клеток как обреченных на гибель, так и у выживающих [23].

2. ПОВРЕЖДЕНИЯ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ МУТАЦИИ

Здесь речь будет идти только о повреждениях, вызывающих «видимые» (жизнеспособные) или рецессивные летальные мутации.

Сейчас принято считать, что значительная доля предмутационных повреждений обратима и клетки могут восстанавливаться от них при соответствующих условиях. Большинство работ такого рода выполнено на бактериях и при этом – после УФ-облучения. Однако восстановление бактерий от повреждений, вызывающих обратные биохимические мутации, описано и после действия ионизирующих излучений; протекает оно весьма эффективно, на фоне подавленного хлорамфениколом белкового синтеза [24]. Метаболические аспекты такого восстановления широко обсуждаются в литературе, но еще далеки от ясности. Для дрожжей описано восстановление от УФ- и γ -повреждений, вызывающих мутации в нескольких локусах их хромосом [25]. В обоих случаях восстановление происходит на фоне митотического

покоя (при выдерживании дрожжей в непитательной среде), практически не зависит от дозы облучения, осуществляется весьма интенсивно и имеет практически одинаковую величину как у гаплоидных, так и у ди- и триплоидных клеток.

Восстановление клеток от повреждений, вызывающих рецессивные летали, подробно изучено Р.Ф. Кимболом [8, 26] на парамециях. Такое восстановление также не зависит, по-видимому, от осуществления синтеза белка, в сходной мере эффективно после УФ-, рентгеновского и α -облучений и происходит вплоть до редупликации ДНК (когда наступает, как считают, «фиксация» соответствующих повреждений), хотя интенсивность его как будто и различается в разных фазах клеточного цикла. Интересно, что реализация потенциальных повреждений, вызывающих гибель облученных дрожжей, происходит не во время S-фазы, а позже, при делении ядра [20]; к сожалению, трудно сказать, связаны ли различия сроков реализации (или фиксации) в обоих случаях с разной природой соответствующих повреждений или со спецификой объектов.

В литературе давно уже обсуждается вопрос, могут ли восстанавливаться от предмутационных повреждений (имеются в виду «точковые» мутации) половые клетки животных. Некоторые данные получены в этом направлении на мышах [27] и весьма большой материал накоплен на дрозофиле [28]. В последнем случае как будто установлено, что в некоторых стадиях гаметогенеза восстановление действительно может иметь место, но количественные закономерности его изучены еще недостаточно, чтобы проводить сопоставление с данными по другим формам реакций на облучение или полученными на других объектах. Создается впечатление, однако, что и в этом случае подавление синтеза белка (а следовательно, и задержка продвижения клетки по циклу) может способствовать восстановлению.

3. ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОК ОТ «ПОДПОРОГОВЫХ» ПОВРЕЖДЕНИЙ

«Подпороговыми» или «сублетальными» принято называть такие повреждения, которые сами по себе не вызывают еще регистрируемого эффекта, но как бы сенсibiliзируют клетки к последующему облучению. Именно с такими повреждениями связывают обычно изогнутость начального отрезка кривых выживания некоторых клеток, выражающуюся в том, что экстраполяционное число (мера такой изогнутости) подобных кривых превышает единицу ($n > 1$). Показателем восстановления клеток от сублетальных повреждений служит изменение формы кривой выживания части популяции, нелетально поврежденной первым облучением, при последующем облучении в серии доз спустя определенный отрезок времени. При этом происходит восстановление только значений экстраполяционного числа, примерно до исходного уровня; наклон экспоненциального отрезка кривой выживания, измеряемый величиной $D_{0,37}$ обычно не изменяется.

Таким образом, экспериментальный прием выявления восстановления клеток от подпороговых (сублетальных) повреждений – фракционированное облучение. Очевидно, что повышения выживаемости клеток, летально поврежденных первой дозой, при проведении такого рода экспериментов определить невозможно. Очевидно также, что восстановление от подпо-

роговых повреждений можно зарегистрировать только у клеток, имеющих S-образные кривые доза–эффект.

Восстановление клеток от сублетальных повреждений весьма подробно изучено М.М. Элкайндом с сотрудниками и другими авторами на клетках млекопитающих в культуре *in vitro* и *in vivo*; обзор последних работ в этой области опубликовал недавно В.П. Парибок [29]. На дрожжах разной плоидности весьма обстоятельно исследовали эту форму восстановления С. Бачетти и др. [30, 31]. Закономерности восстановления тех и других объектов от сублетальных повреждений оказались весьма сходными.

Во-первых, такого рода восстановление можно получить, по-видимому, лишь на клетках, находящихся между облучениями на питательных средах; по крайней мере у облученных дрожжей, инкубируемых в непитательной среде, восстановления от сублетальных повреждений не наблюдается [20].

Во-вторых, у несинхронизированных культур с течением времени между фракциями облучения повышение экстраполяционного числа *n* до исходного уровня сменяется его снижением и второй волной повышения. Ряд авторов (см. обзор [31]) связывают этот процесс с тем, что в облученной популяции изменяется соотношение клеток, находящихся в разных фазах жизненного цикла и обладающих разной радиочувствительностью. У синхронизированных культур или у культур, инкубируемых при пониженной температуре или в отсутствие кислорода, такого снижения величины экстраполяционного числа не происходит, и это может служить аргументом в пользу реальности данной формы восстановления. Правда, окончательное суждение на этот счет можно будет вынести лишь тогда, когда будет тщательно изучено изменение соотношения числа клеток, находящихся в разных фазах цикла, при таких схемах постановки опытов.

Если реальность восстановления клеток от сублетальных повреждений будет доказана, это будет означать, что нелетально поврежденные облучением клетки, продвигаясь после облучения по циклу к первому пострадиационному делению, могут почти нацело восстанавливаться от подобных повреждений. Что представляют собою эти сублетальные повреждения, неизвестно. Высказывалось мнение, что ими могут быть не прореагировавшие между собою локальные повреждения хромосом [32], но мнение это очень слабо аргументировано. Высказывалось мнение также, что ими могут служить внеядерные, цитоплазматические повреждения [30]. Сходство в поведении хромосомных aberrаций и выживаемости клеток при фракционированном облучении не может служить убедительным доводом ни в пользу первой, ни против второй точек зрения потому, что удельный вес разных типов хромосомных повреждений в летальном действии ионизирующих излучений на клетки до сих пор не ясен, так же как и «механизм» возникновения разных типов хромосомных нарушений.

4. ЛЕТАЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Уменьшение летальных последствий облучения клеток ионизирующими излучениями можно, вообще говоря, выявлять разными способами, однако отнюдь не всегда получаемые в таких опытах результаты поддаются однозначной трактовке и отражают истинный эффект восстановления.

Одной из первых экспериментальных демонстраций такого уменьшения летальных последствий облучения могут служить, по-видимому, опыты Дж.А. Кроузера [3] с *Colpidium colpoda*: при фракционировании облучения этих инфузорий значения изоэффективных доз существенно возрастали. Дж.А. Кроузер назвал этот феномен «восстановлением» и дал приближенную количественную его оценку. Однако эффектом облучения в этих опытах служила ранняя пострадиационная гибель клеток в течение первых двух часов, и есть основания полагать, что этот вид лучевой инактивации обусловлен главным образом действием продуктов радиолиза воды, выход которых может существенно зависеть от мощности и фракционирования дозы [20]. К сожалению, более корректных исследований восстановления клеток от летальных повреждений методом протрагированного или фракционированного облучения мне неизвестно. И вообще, в такого рода экспериментах нелегко решить, связано ли изменение биологической эффективности облучения с восстановлением клеток от летальных повреждений или же с влиянием режима облучения на процесс их формирования.

В качестве феномена восстановления жизнеспособности облученных клеток описывалась также, и неоднократно, зависимость их выживаемости от условий пострадиационного культивирования [33–35]. Облученные клетки выращивали на разных средах, при разных температурах и условиях аэрации. Большинство работ такого рода проводилось на *E. coli* штамм В, причем те условия культивирования, при которых выживаемость оказывалась минимальной, расценивались как «подавляющие восстановления», а те, при которых выживаемость повышалась, – как «способствующие восстановлению» [35, 36]. Выживаемость *E. coli* штамм В при разных условиях культивирования варьирует от минимальных значений, характерных для штамма B_{S-1} , до максимальных значений, характерных для штамма В/г; в связи с этим высказывалось мнение, что *E. coli* B_{S-1} неспособны к восстановлению ни при каких условиях культивирования, а *E. coli* В/г, напротив, восстанавливаются независимо от этих условий [36]. Таким образом, различия в радиочувствительности разных штаммов *E. coli* некоторые авторы склонны сводить к различной способности их к восстановлению. С другой стороны, на том основании, что радиочувствительность разных штаммов *E. coli* меньше варьирует при α -облучении, чем при рентгеновском, делается вывод, что лучевые повреждения, вызываемые у бактерий α -частицами, почти или все необратимы [37].

Эта весьма последовательно проводившаяся и не лишенная элегантности точка зрения страдает одним дефектом – сам факт зависимости выживаемости *E. coli* В при разных условиях пострадиационного культивирования от эффективности восстановления, к сожалению, до сих пор не доказан. Чрезвычайная вариабельность выживаемости этих бактерий при культивировании до и после облучения на разных средах (что хорошо знакомо каждому, работавшему с этим объектом) и зависимость этой вариабельности от дозы облучения, возраста и фазы роста культуры делает практически невозможным точно количественно оценивать эффект той или иной среды. Очень часто выживаемость облученных клеток на разных средах коррелирует с жизнеспособностью на этих же средах контрольных, необлученных клеток [38]. При инкубации *E. coli* В при пониженной температуре, например при 19 °С,

на РКА (рыбокостный агар), с последующим перенесением в 37 °С или 45 °С уменьшается выживаемость не только облученных, но и необлученных клеток; динамика этого процесса также может варьировать от опыта к опыту и зависит от дозы облучения [39]. По аналогии с дрожжевыми клетками [40] можно предположить, что зависимость выживаемости облученных *E. coli* В от условий культивирования обусловлена не столько восстановлением, сколько разным проявлением лучевых повреждений. Последние исследования Х.И. Адлера с сотрудниками [41, 42], как будто подтверждают это мнение: показано, что условия пострадиационного культивирования, включая добавление экстрактов из некоторых радиорезистентных штаммов бактерий, повышающие выживаемость облученных клеток более чувствительных и в то же время способных к образованию филаментов (нитевидных, не развивающихся в колонии форм) штаммов, *препятствуют* процессу филаментообразования или содействуют формированию из уже возникших филаментов нормальных колоний. Это позволяет предположить, что некоторые особи облученной популяции *E. coli* В (штамм, способный к образованию филаментов) погибают при любых условиях пострадиационного культивирования, другие же, «менее пораженные» особи, в одних условиях культивирования образуют филаменты и погибают, а в других условиях не образуют филаменты и не погибают; последнее явление, конечно, вряд ли может быть названо «восстановлением». Факт же сходной радиочувствительности разных штаммов *E. coli* при α -облучении не противоречит гипотезе о восстановлении, но и не может служить ее доказательством, тем более, что на дрожжах [20] и парамециях [26] показана обратимость последствий α -облучения, вызывающих гибель клеток или рецессивные летальные мутации.

Более убедительны в отношении демонстрации восстановления на бактериях, казалось бы, опыты с их пострадиационной обработкой хлорамфениколом [11]. Между прочим, недавно «хлорамфеникольное восстановление» получено на бактериях *E. coli* В, у которых тимин в ДНК замещен 5-бромурацилом [43], что, как считалось ранее, препятствует пострадиационному восстановлению бактерий, пораженных УФ-лучами [37]. Однако в таких опытах не контролировалось влияние хлорамфеникола на филаментообразование у облученных клеток, и поэтому феномен хлорамфеникольного восстановления нуждается в дополнительном экспериментальном анализе. Дело в том, что хлорамфеникол не оказывает реактивирующего действия на штаммы *E. coli*, лишённые свойства образовывать филаменты¹

К сожалению, до сих пор почти единственным объектом, на котором строго доказан, многократно воспроизведен и количественно проанализирован феномен восстановления клеток от летальных последствий облучения, являются дрожжевые организмы [20].

Наиболее простой и распространенный способ получения пострадиационного восстановления у дрожжей – выдерживание их в непитательной среде (водопроводная вода или буферный раствор) при оптимальной темпера-

¹ Когда эта работа уже находилась в печати, была опубликована статья Э.М. Виткин (*Witkin E.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1967 Vol. 57 P. 1275*), в которой автор отмечает, что «хлорамфеникольное» восстановление УФ-облученных *E. coli* В действительно связано с подавлением филаментообразования.

туре и хорошей аэрации [9, 44]. При этом выживаемость облученных клеток повышается до некоторой постоянной величины, а процесс восстановления поддается описанию в терминах эффективной дозы:

$$D_t = D_0[k + (1 - k)e^{-\beta t}],$$

где D_0 – заданная доза, D_t – эффективная доза спустя t часов восстановления, k – необратимый компонент лучевого поражения, β – «постоянная восстановления», отражающая его скорость [20]. Для изученных штаммов дрожжей значения k и β практически не зависят от дозы – эффективность восстановления не уменьшается с дозой облучения, что свидетельствует о высокой радиорезистентности репарационных систем этих клеток. Значения k и β различны для дрожжей разных штаммов. Величина k может составлять 0,1, а величина β – достигать $0,13 \text{ ч}^{-1}$, что означает практически полное восстановление таких клеток от обратимых последствий облучения в течение 24–48 ч инкубации их в голодной среде при $30 \text{ }^\circ\text{C}$. При таких параметрах восстановления выживаемость облученных клеток, равная, например, 0,1–0,2%, может повыситься в течение 1–2 суток до 40–60%. Весьма существенно, что степень обратимости лучевых повреждений у дрожжей практически не зависит от линейной потери энергии (ЛПЭ) используемых излучений; пострадиационное восстановление одинаково эффективно как после действия γ - и рентгеновых лучей, так и после облучения дрожжей α -частицами [20] и тяжелыми ионами, вплоть до углерода и неона [45]. Весьма существенно также для понимания природы этого феномена, что восстановление от летальных лучевых повреждений можно получить только у дрожжей, содержащих два и больше хромосомных наборов; у гаплоидных дрожжевых клеток разных штаммов и видов эффекта восстановления до сих пор никому получить не удалось [20, 45].

Помимо восстановления на непитательной среде, дрожжевые клетки могут восстанавливаться и в присутствии питательных веществ, например, при инкубации на агаризованном сусле [20]. При посеве облученных клеток на питательную среду восстановление у них идет, по-видимому, примерно с такой же скоростью, как и в воде, и продолжается вплоть до первого пострадиационного деления ядра. Если сроки такого деления у облученных дрожжей на разных средах различны, то и восстановление будет разным и, следовательно, разная регистрируемая в опытах выживаемость. Однако отнюдь не все условия пострадиационной инкубации, влияющие на скорость размножения дрожжей, вызывают изменение их выживаемости только благодаря эффекту восстановления. Так, если облученные дрожжи выращивать при разных температурах, то благодаря сходному влиянию температуры и на скорость размножения, и на скорость восстановления, вклад восстановления в регистрируемый эффект облучения при разных температурах будет одинаковым, а выживаемость – разной [40]. Последнее связано с тем, что облучение может вызывать в клетках повреждения, летальные при одних условиях культивирования, и нелетальные – при других, безотносительно к эффекту восстановления.

Восстановление жизнеспособности облученных клеток при выдерживании в непитательной среде было описано не только для дрожжей, но и для некоторых бактерий [46] и клеток млекопитающих штамма СОЦ в культуре

[47]. Однако восстановление у этих объектов не было достаточно корректно проанализировано в количественном отношении и не было воспроизведено другими авторами, поэтому судить о его закономерностях пока еще, к сожалению, невозможно.

5. СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Таким образом, клетки, пораженные ионизирующими излучениями, могут восстанавливаться от повреждений, вызывающих различные проявления лучевого поражения. Выше были рассмотрены четыре формы пострадиационного восстановления: восстановление от повреждений, вызывающих задержку первого деления, от повреждений, вызывающих точечные биохимические мутации или рецессивные летали, от так называемых сублетальных (или подпороговых) повреждений и от летальных последствий облучения. Существуют, конечно, и другие формы восстановления – от других лучевых повреждений. Облученные клетки могут восстанавливаться от повреждений, изменяющих их проницаемость, подвижность, скорость роста, синтеза ДНК и других биохимических и физиологических процессов; не исключено, что некоторые из этих форм восстановления тесно связаны между собой и с восстановлением способности к первому пострадиационному делению [20]. Клетки могут восстанавливаться от повреждений, вызывающих «липкость» хромосом [5, 19], а также от структурных хромосомных повреждений, приводящих к фрагментации и другим хромосомным нарушениям [10]. Однако даже из краткого обзора, сделанного выше, следует, что одни формы восстановления свойственны практически всем изученным в этом отношении объектам, другие же – лишь некоторым, и, что весьма затрудняет сопоставление их между собой, разные формы восстановления изучались, как правило, на разных объектах исследования.

В тех случаях, когда одна и та же форма восстановления была изучена на разных биологических объектах, ярко выступает сходство (или общность) проявления ее закономерностей. Это касается, в первую очередь, восстановления от повреждений, задерживающих первое пострадиационное деление, а также от сублетальных повреждений. Восстановление клеток от повреждений, вызывающих мутации или гибель, изучалось на весьма ограниченном числе объектов, и судить об общности соответствующих закономерностей еще рано. К сожалению, восстановление от генетических и летальных последствий облучения совершенно не изучено на клетках млекопитающих в культуре, и до сих пор нельзя решить, действительно ли оно им присуще. Большое же количество публикаций, посвященных «пострадиационному восстановлению» бактерий, я не считаю возможным использовать для соответствующих сопоставлений, ибо сам феномен восстановления в этих случаях еще не окончательно доказан и соответствующие факты подчас допускают другую интерпретацию.

Фактически единственным объектом, на котором удовлетворительно изучено восстановление от нескольких различных последствий облучения, являются дрожжевые клетки; это обусловлено, конечно, большим удобством дрожжей для подобных исследований. И, если ориентироваться на результаты соответствующих опытов, можно с большой уверенностью утверждать,

что разные формы восстановления у этого объекта слабо связаны между собой или даже обусловлены разными механизмами.

Действительно, для возобновления задержанного облучением почкования дрожжи должны находиться в питательной среде, и эта форма восстановления наблюдается как у гаплоидных, так и у ди(поли)плоидных клеток, хотя и происходит у них с разными скоростями [20]. Восстановление от некоторых мутагенных повреждений осуществляется, и весьма интенсивно, в непитательной среде, и выражено примерно одинаково у клеток с разным числом хромосомных наборов, в том числе и у гаплоидов [25]. Восстановление от сублетальных повреждений происходит только на питательных средах, и может быть зарегистрировано лишь у ди(поли)плоидных клеток, кинетические закономерности его резко отличаются от таковых для восстановления от летальных повреждений при инкубации в голодной среде [20, 31]. Восстановление от летальных повреждений присуще только клеткам с двумя и большим числом хромосомных наборов и в равной мере эффективно осуществляется как в непитательной, так и на питательных средах [20]. Наконец, при культивировании облученных дрожжей в разных условиях различия их выживаемости могут быть связаны с восстановлением и не связаны с ним; последний феномен очень интересен, но изучение его только началось [40].

Поэтому при обсуждении «общих закономерностей» восстановления клеток от лучевых повреждений нужно всегда учитывать два обстоятельства. Во-первых, что отнюдь не всякое изменение выживаемости облученных клеток, обнаруживаемое в опытах с варьированием условий пострадиационной инкубации (или культивирования), может быть связано с эффектом восстановления; в некоторых случаях видимость увеличения (или уменьшения) выживаемости может обуславливаться просто разной скоростью отмирания необлученных (контрольных) и облученных клеток при данных пострадиационных условиях. Во-вторых, что наличие у того или иного объекта одной из форм восстановления отнюдь не свидетельствует еще о наличии других форм; это особенно важно при сопоставлении результатов опытов, в которых феномен восстановления показан либо путем задержки размножения облученных клеток тем или иным способом, либо путем фракционированного или протрагированного облучения. Поэтому при обсуждении различных аспектов проблемы восстановления необходимо особое внимание уделять как строгости доказательств наличия этого феномена в каждом конкретном случае, так и корректному определению той формы восстановления, которую позволяет выявить и количественно оценить используемая схема эксперимента.

II. ОТНОСИТЕЛЬНО «МЕХАНИЗМОВ» ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

Ввиду того, что восстановление *жизнеспособности* облученных клеток находится сейчас в центре внимания радиобиологов, обсуждение возможных «механизмов» этого феномена довольно широко представлено в литературе. Обсуждение этого вопроса ведется обычно в двух аспектах: 1) что является *объектом* восстановления, т.е. каковы те элементарные послед-

ствия облучения, восстановление от которых повышает жизнеспособность клетки, и 2) какие биохимические (или другие) системы осуществляют сам процесс восстановления. По причинам, изложенным выше, я не буду здесь рассматривать представления, основанные на опытах с бактериями. Отмечу лишь, что высказывалось мнение [36], согласно которому у бактерий процесс восстановления от повреждений ионизирующими излучениями сводится к ликвидации разрывов в ДНК, и ведущая роль здесь может принадлежать ДНК-полимеразной системе; к сожалению, убедительных доказательств справедливости этого представления еще не получено.

Относительно возможной природы восстановления жизнеспособности пораженных ионизирующими излучениями дрожжей существуют следующие факты и точки зрения.

Количественный анализ пострадиационного восстановления дрожжевых клеток приводит к следующим представлениям [20]. Создается впечатление, что процесс восстановления представляет собой ликвидацию некоторых элементарных повреждений, каждое из которых обусловлено отдельным актом попадания (ионизацией или группой ионизаций); такие повреждения были названы (может быть, не совсем удачно) «потенциальными». Где локализованы, с какими структурами связаны эти повреждения, какова их химическая природа – неизвестно. Потенциальные повреждения переходят в необратимую форму или приводят к необратимым изменениям только во время деления ядра облученной клетки; осуществление синтеза ДНК (что предшествует делению) не имеет к этим событиям никакого отношения. Тот факт, что гаплоидные дрожжи не восстанавливаются, а диплоидные и полиплоидные восстанавливаются, еще не позволяет говорить ни о сходстве, ни о различии лучевых летальных повреждений у гаплоидных и ди(поли)плоидных дрожжей, ибо отсутствие восстановления у первых может быть обусловлено не только другой природой соответствующих повреждений, но и неспособностью их к осуществлению репарационного процесса.

Пострадиационное восстановление дрожжей можно интерпретировать как статистический процесс и охарактеризовать величиной β – вероятностью восстановления клетки (или популяции) в единицу времени от одного обратимого элементарного повреждения. Значение β примерно одинаково у клеток, восстанавливающихся в непитательной среде, в состоянии «митотического покоя», и у клеток, инкубируемых на питательных средах, и не зависит, следовательно, от осуществления синтеза белка и нуклеиновых кислот. Величина β практически не зависит от продолжительности восстановления и дозы облучения, следовательно, у дрожжей «репарационные системы» (если таковые существуют) имеются в избыточном количестве и крайне радиорезистентны. С изменением температуры скорость восстановления меняется примерно так же, как и скорость размножения клеток. При восстановлении в аэробных условиях величина β примерно пропорциональна «добавочному» (по сравнению с контролем) поглощению кислорода облученными дрожжами и у разных способных к восстановлению штаммов коррелируют с этой величиной. В отсутствие кислорода условием восстановления является наличие экзогенных сбраживаемых углеводов. Ресинтез АТФ для осуществления восстановления, по-видимому, не является обязательным [20, 48]. Судя по результатам исследований М.Н. Мейселя с сотрудниками [49], на эффек-

тивность восстановления у разных штаммов дрожжей может влиять наличие свободных аминокислот, избыток или недостаток некоторых витаминов и пр.; однако остается неизвестным, имеют ли эти факторы значение сами по себе или посредством влияния на систему, активность которой проявляется в добавочном поглощении облученными клетками кислорода. А.Ф. Мосин [50] развивает представление о ведущем значении в осуществлении восстановления углеводного обмена клеток, однако конкретизировать эти представления пока трудно.

О.В. Малиновский с сотрудниками [32] недавно высказали предположение, будто обратимые лучевые повреждения у дрожжей могут представлять собою разломы хромосом, восстановление сводится к воссоединению или реституции поломанных хромосом, а необратимые лучевые повреждения возникают в результате неправильного соединения поломанных хромосом и являются «двуразломными» (или «двухударными») хромосомными абберациями. Если бы эта точка зрения была доказана, то все сказанное выше относительно метаболических аспектов восстановления можно было бы расценивать как характеристику той ферментной системы клеток, которая участвует в воссоединении поломанных хромосом.

Однако точка зрения О.В. Малиновского с сотрудниками основывается на допущении, что основной летальный эффект у ди(поли)плоидных дрожжей обязан двуразломным хромосомным перестройкам, а допущение это вряд ли когда-либо удастся проверить в опытах на дрожжевых организмах. Что же касается других объектов, у которых можно регистрировать как различные хромосомные абберации, так и гибель (инактивацию), например, клеток млекопитающих в культуре, то существует весьма обоснованное сомнение относительно возможности сведения *всего* летального эффекта облучения не только к хромосомным абберациям какого-либо определенного класса, но и ко всем хромосомным нарушениям вместе взятым [51]. Относительно ди(поли)плоидных дрожжей также высказывались сомнения о связи летальных последствий получения *только* с генетическими нарушениями [30]. Наконец, если принять точку зрения О.В. Малиновского с сотрудниками, то с учетом упомянутых выше особенностей пострадиационного восстановления дрожжей и главным образом с учетом сохранения обратимости потенциальных повреждений вплоть до деления ядра, формирование у этого объекта хромосомных аббераций придется наделять такими особенностями, которые не согласуются ни с одной из существующих на этот счет гипотез [20]. Последнее обстоятельство, конечно, не может служить серьезным аргументом против того или иного теоретического построения; в данном же случае беда заключается в том, что изложенную точку зрения пока что невозможно проверить в эксперименте ни на дрожжах, у которых нельзя наблюдать в микроскоп хромосомные нарушения, ни на подходящих в этом отношении объектах, например клетках млекопитающих в культуре, для которых до сих пор не разработано надежных способов получения той формы пострадиационного восстановления, какая присуща дрожжевым организмам. Весьма интересные опыты О.В. Малиновского и сотрудников [32], показавших, что необратимый компонент лучевого поражения дрожжей уменьшается при фракционировании дозы облучения, приводимые ими в подтверждение своих представлений, допускают, к сожалению, несколько различных трактовок

и в настоящее время еще не могут быть признаны убедительным аргументом в этом отношении.

Существует еще одна точка зрения на возможные «механизмы» пострадиационного восстановления дрожжевых клеток; я имею в виду соображения, развитые главным образом в работах А.М. Кузина и его сотрудников [17, 52]. Согласно представлениям этих авторов, лучевая гибель дрожжей (как, впрочем, и других одноклеточных и многоклеточных организмов) в значительной мере обусловлена накоплением в них «радиотоксинов», в основном ортохинонов. Предполагается, что *o*-хиноны накапливаются в облученных клетках благодаря нарушению процессов окисления, например, вследствие повреждения митохондрий (в результате ионизации), и, достигая некоторого порогового значения, вызывают задержку деления, разрыв ядерных мембран и различные хромосомные аномалии. Пострадиационное восстановление клеток будто бы связано с освобождением их от *o*-хинонов – вследствие ли диффузии их из клеток наружу или детоксикации. Здесь, следовательно, в качестве «объектов» процесса восстановления выступают молекулы соответствующих радиотоксинов, и тогда метаболические характеристики этого процесса должны касаться тех биохимических систем клеток, которые разрушают или удаляют эти молекулы.

Что касается удельного веса *o*-хинонов (или других «радиотоксинов») в лучевом поражении клеток, то оценить его пока никому не удалось, мне же он представляется незначительным и играющим второстепенную роль, а сами «радиотоксины» представляются не столько причиной, сколько следствием развития лучевой патологии как на уровне клетки, так и на уровне целостного многоклеточного организма. Что же касается роли освобождения клеток от *o*-хинонов в осуществлении восстановления, то изложенные выше представления основываются на следующем и притом единственном экспериментальном факте: если облученные дрожжи выдерживать в воде, т.е. в режиме восстановления, то в воде этой происходит накопление *o*-хинонов [52]. Однако возникает вопрос, отражает ли это явление уменьшение содержания *o*-хинонов в самих клетках? К сожалению, изменение содержания *o*-хинонов в дрожжах, инкубируемых в режиме восстановления, авторы работы [52] не определяли. Однако в этой же работе (стр. 31) приведены следующие небезыңтересные данные, полученные в опытах с облученными проростками кукурузы: показано, что из облученных корешков растений, инкубируемых в воде, также происходит выход *o*-хинонов, однако «количество хинонов, образующихся в тканях растения при 10 кР за 24 ч, примерно в 300 раз больше хинонов, выделенных за 24 ч этим же растением!» Кинетика выделения хинонов из дрожжей и корешков примерно одинакова [53]; если такова же и кинетика их накопления в клетках, то вряд ли процесс восстановления можно как-то связывать с освобождением клеток от подобных «радиотоксинов». Наконец, если *o*-хинонам действительно принадлежит существенная роль в лучевом поражении клетки, а накопление их в клетках связано с осуществлением в них обменных процессов, то как согласовать эти представления с тем фактом, что в облученных дрожжах процесс восстановления идет не только в непитательной среде, но и при высеве их на питательную среду, а реализация потенциальных повреждений происходит *только* во время деления ядра и никак не раньше?

Структурно-метаболическая теория лучевого поражения [17] не дает ответа на этот вопрос.

К сожалению, экспериментальные данные, касающиеся роли в лучевом поражении и восстановлении дрожжей других «радиотоксинов», например, ненасыщенных жирных кислот [53], также не позволяют делать на этот счет никаких выводов, ибо ограничиваются, по существу, простой констатацией факта, что в облученных клетках эти соединения могут содержаться в более высоких количествах, чем в необлученных... Столь же мало обоснована, по крайней мере экспериментально, точка зрения Б.Н. Тарусова [16], связывающего восстановление жизнеспособности облученных дрожжей с подавлением развития химических цепных реакций лучевого последствия. Все эти и подобные им представления еще недостаточно разработаны и отличаются пока одной общей особенностью: следствия, вытекающие из них, плохо согласуются с уже известными фактами, с одной стороны, и нередко не допускают прямой экспериментальной проверки, с другой стороны.

Таким образом, хотя мы и неплохо знаем *феноменологию* пострадиационного восстановления дрожжей, о конкретных механизмах его осуществления пока можно строить только предположения. Разработка этой проблемы еще далеко не достигла той фазы, в которой находится изучение фотореактивации и темнового восстановления клеток, пораженных УФ-лучами [54]. Несомненно, однако, что в настоящее время любые теории или гипотезы биологического действия ионизирующих излучений должны включать в себя обсуждение этого феномена и любые попытки в этом направлении тем более желательны, что со временем они принесут свои плоды, хотя бы избавив других исследователей от поисков в тех направлениях, которые в этом отношении мало перспективны.

III. ЭФФЕКТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И «КРИТИКА» «ТЕОРИИ МИШЕНИ»

Я уже упоминал, что некоторые авторы [15–17], апеллируя к факту пострадиационного восстановления клеток, противопоставляют его теории мишени или, точнее, принципу попадания. Здесь явное недоразумение. Действительно, ни теория мишени, ни принцип попадания ничего не говорят ни о месте локализации событий попадания (ионизации), обуславливающих тот или иной конечный эффект облучения, ни о последующей судьбе изменившихся вследствие попаданий элементарных внутриклеточных структур. Изучение химических, биохимических и физиологических изменений, разрывающихся в облученных клетках, в том числе и метаболических аспектов восстановления, ни в какой мере нельзя противопоставлять количественному (формальному) анализу биологического действия на клетки ионизирующих излучений, базирующемуся на принципах попадания и мишени. Более того, оба эти направления – структурно-метаболическое и количественное – должны быть тесно связанными и взаимно дополняющими, лишь тогда им гарантирован успех.

Действительно, что можно возразить против того, что первичные акты взаимодействия ионизирующих излучений с биосубстратом клеток происходят *случайно*, что при действии даже весьма высоких доз ионизированной

(и возбужденной) оказывается лишь ничтожная часть элементарных внутриклеточных структур (макромолекул) и что повреждение *разных* компонентов клетки может приводить к *разным* последствиям, по-разному влияя на ее судьбу? А это и есть исходные посылки принципов попадания и мишени [19, 55]. С другой стороны, кто может возразить против того, что вслед за первичным повреждением элементарные структуры клетки претерпевают дальнейшие химические изменения, которые вызывают различные нарушения биохимических и, далее, физиологических процессов, приводящие, наконец, к выраженным (регистрируемым в эксперименте) последствиям облучения? А это и есть основное положение структурно-метаболической теории биологического действия ионизирующих излучений [17]. Таким образом, оба эти направления в теоретической и экспериментальной радиобиологии взаимно дополняют друг друга, и каждое из них должно учитывать данные и представления другого, а не противостоять ему.

Именно *должно учитывать...* Вообще, в радиобиологии клетки уже существует много твердо установленных фактов, всю совокупность которых необходимо иметь в виду при любой попытке объяснить механизм биологического действия излучений. Так, например, в радиобиологии твердо установлено, что для клеток, имеющих малое число хромосомных наборов, непосредственное облучение ядра значительно более губительно, чем облучение всей цитоплазмы [56]. Имеющиеся в литературе данные [57, 62] о влиянии «радиотоксинов», выделяемых из облученных растений, на ядерный аппарат клеток свидетельствуют о весьма низкой их цитогенетической эффективности. Каковы же основания для серьезного обсуждения такого, например, механизма летального действия ионизирующих излучений на клетки, как повреждение, в результате ионизации, митохондрий, и связанное с этим накопление в клетках «радиотоксинов» [17]? Это мне непонятно.

И еще один пример. Известно, что летальный и генетический эффекты облучения *статистически* связаны с дозой, т.е. что при каждой дозе данным образом реагирует лишь *определенный процент* клеток, повреждения же *массовых* структур клеток, обуславливающих, например, задержку деления, практически при любой дозе более или менее равномерно затрагивают все клетки облученной популяции. Повреждения массовых структур, конечно, приводят к разнообразным нарушениям (чаще всего преходящим) биохимии и физиологии клеток. При химическом и биохимическом изучении облученных клеток экспериментатор вынужденно оперирует *со всеми* такими клетками, т.е. и с теми, у которых имеются летальные повреждения, и с теми, у которых их нет, но все эти клетки имеют многочисленные и разнообразные повреждения различных внутриклеточных структур. Совершенно естественно, что при таком валовом анализе наиболее существенные химические и биохимические изменения (по сравнению с контролем) должны быть зарегистрированы именно в тех структурах, повреждения которых менее всего ответственны за летальные и генетические последствия облучения, а именно в массовых цитоплазматических структурах клеток; об этом свидетельствуют самые приближенные расчеты. Поэтому, апеллируя к результатам таких анализов, надо быть очень осторожным в выводах и всегда стремиться ясно представить себе, с первичным повреждением *каких* структур соответствующие химические (и биохимические) изменения могут быть связаны, *каково*

распределение таких повреждений по клеткам облученной популяции, как оно зависит от дозы и *какие* регистрируемые последствия облучения могут быть ими обусловлены. Только при таком подходе можно рассчитывать на постепенную конкретизацию химических и биохимических последствий событий попадания в разные элементарные структуры клеток, т.е. на истинный синтез количественного (формального) и структурно-метаболического направлений в радиобиологии.

Сказанное выше целиком приложимо и к проблеме пострадиационного восстановления. Решение этой проблемы означает выяснение природы тех элементарных структур клеток, повреждения которых ответственны за данный биологический эффект, а также выявление природы тех процессов, посредством которых клетка может восстановиться от некоторого числа этих повреждений. Очевидно, однако, что ответ на эти вопросы означает *полное* выяснение механизмов биологического действия ионизирующих излучений, а это вряд ли может быть достигнуто в ближайшее время, ибо должно опираться на очень хорошие знания динамической биохимии и физиологии клетки, а знания наши в этой области еще далеки от совершенства. С другой стороны, изучение биологического действия ионизирующих излучений и, в частности, эффекта восстановления обещает многое дать и для понимания нормально осуществляющихся в клетках процессов, а этот аспект радиобиологии и представляет собою, пожалуй, наибольший интерес.

IV. НЕКОТОРЫЕ ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Общебиологический аспект проблемы восстановления можно сформулировать следующим образом: какую роль репарационные процессы, проявляющиеся в восстановлении клеток от лучевых повреждений, могут играть в их нормальной жизнедеятельности? Вопрос этот уже затрагивался в литературе [20, 58], хотя для серьезного обсуждения его, надо прямо сказать, мы еще не располагаем почти никаким фактическим материалом.

Разработка этого направления, мне кажется, может идти двумя путями, тесно между собой связанными.

Первый путь. Сравнительное количественное изучение восстановления клеток от повреждений, вызываемых как ионизирующими излучениями, так и другими агентами: УФ- и видимым светом, ультразвуком, химическими соединениями, температурой, механическими воздействиями. Несмотря на то что восстановление клеток от повреждений, вызываемых УФ, разработано сейчас наиболее полно [54], очень интересные и обширные исследования проводятся по восстановлению клеток от термических повреждений [59] и появляются данные относительно восстановления клеток от повреждений, вызываемых некоторыми химическими агентами [60, 61], сравнительного анализа этого вопроса путем сопоставления закономерностей восстановления от повреждений, вызываемых разными факторами, но приводящих к одинаковым (или хотя бы сопоставимым) последствиям, да еще на одних и тех же объектах, до сих пор почти не предпринималось.

Второй путь. Изучение влияния избирательного подавления «репарационных систем» клеток на нормально протекающие в них процессы жизнедея-

тельности. В этом направлении еще не сделано, по существу, даже первых попыток, и это вполне понятно, ибо мы еще не располагаем никакими способами избирательно подавить даже те репарационные процессы, которые проявляются в пострадиационном восстановлении. Более того, возникает вопрос, в какой мере обосновано само употребление термина «репарационные системы»? Можно ли говорить о существовании в клетках специальных биохимических систем (фермента или ферментов), «работающих» только на ликвидацию лучевых, например, повреждений? Не исключено, что репарационные функции в клетках выполняют те же ферменты или системы ферментов, которые в обычных условиях осуществляют нормальные процессы биосинтеза и дифференцировки клеток и только в «аварийных ситуациях» мобилизуются на ликвидацию повреждений. Столь же допустимо, однако, что в клетках постоянно «работают» какие-то «системы-дворники», наподобие иммунологических систем многоклеточных организмов (или прототипы этих систем на клеточном уровне), постоянно «очищающие» клетки от поломанных или испорченных элементарных внутриклеточных структур или их «обломков», поломка и порча которых, постоянно осуществляющиеся, предопределены общими законами термодинамики и статистики мира макромолекул.

Как бы то ни было, а на вопросы эти со временем, конечно, будут получены ответы. Ведь общебиологические аспекты проблемы пострадиационного восстановления клеток – весьма перспективный и увлекательный объект для экспериментальной и теоретической разработки. Это – еще один узел, тесно связывающий радиобиологию с другими науками о жизни. И вряд ли можно сомневаться в том, что проблемы эти привлекут к себе внимание в недалеком будущем представителей самых различных отраслей этой интереснейшей области знаний.

Автор благодарит Ю.Г. Капутьцевича и М.Н. Мясника за обсуждение вопросов, рассмотренных в этой статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Надсон Г.А.* // Вестн. рентгенол. и радиол. 1920. Т. 1. С. 45.
2. *Ancel P., Vintemberger P.* // Compt. Rend. Soc. Biol. 1925. Т. 92. С. 517.
3. *Crowther J.A.* // Proc. Roy. Soc. B100. 1926. P. 930.
4. *Lacassagne A., Holweck F.* // Compt. Rend. Soc. Biol. 1930. Vol. 104. P. 1221.
5. *Левитский Г.А., Араптян А.Г.* // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. Л.: Изд-во ВИР, 1931. Т. 27. С. 265.
6. *Pratt A.W., Moos W.S., Eden M.* // J. Natl. Cancer Inst. 1955. Vol. 15. P. 1093.
7. *Wainwright S.D., Nevill A.* // J. Bacteriol. 1956. Vol. 70. P. 547.
8. *Kimball R.F.* // Suppl. Cytologia, Int. J. Cytology, 1957. P. 252.
9. *Корогодин В.И.* Динамические закономерности радиационного поражения одноклеточных организмов (исследования на *Saccharomyces vini*). Дис. ... канд. биол. наук. М., 1957.
10. *Лучник Н.В., Царапкин Л.С.* // Цитология. 1959. Т. 1. С. 71.
11. *Gillies N.E., Alper T.* // Nature. 1959. Vol. 183. P. 237.
12. *Elkind M.M., Sutton H.* // Nature. 1959. Vol. 184. P. 1293.
13. *Alexander P., Dean C.J., Lett J.T.* // Third Internat. Cong. of Radiation Res., Book of Abstracts, Cortina D'Ampezzo, June 26–July 2, 1966. P. 20.
14. *Дубинин Н.П., Дубинина Л.Г., Тарасов В.А.* // Генетика. 1965. Т. 5. С. 68.
15. *Бак З., Александр П.* Основы радиобиологии. М.: Изд-во иностр. лит., 1963.
16. *Тарусов Б.Н.* Первичные процессы лучевого поражения. М.: Госатомиздат, 1962.
17. *Кузин А.М.* // Радиотоксины, их природа и роль в биологическом действии радиации высокой энергии. М.: Атомиздат. 1966. С. 5.

18. *Парибок В.П.* // Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М.: Наука, 1966. С. 20.
19. *Ли Д.Е.* Действие радиации на живые клетки. М.: Госатомиздат, 1963.
20. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
21. *Rustad R.C.* // Radiat. Res. 1966. Vol. 29. P. 203.
22. *Discoff H.S.* // Radiobiology of the Intracellular Level. L., 1959. P. 82.
23. *Burns V.W.* // Radiat. Res. 1956. Vol. 4. P. 394.
24. *Kada T.* // Proc. of the Conf. on Mechanisms of the Dose Rate Effect of Radiation at the Genetic and Cellular Levels, Oiso, November 4–7, 1964; Suppl to the Japan, J. Genetics, 1965. Vol. 40. P. 242.
25. *Арман И.П.* Мутационный процесс у дрожжей разной ploидности. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1966.
26. *Кимбалл Р.Ф.* // Восстановление клеток от повреждений. М.: Госатомиздат, 1963. С. 247.
27. *Рассел В.Л.* // Там же. С. 276.
28. *Соубельс Ф.Х., Тейтс А.Д.* // Там же. С. 284.
29. *Парибок В.П.* // Цитология. 1967. Т. 9. С. 137.
30. *Vacchetti S., Elli R. et al.* // Internat. J. Rad. Biol. 1966. Vol. 10. P. 213.
31. *Vacchetti S., Cassandro M. et al.* // Radiat. Res. 1966. Vol. 29. P. 295.
32. *Барсуков В.С., Малиновский О.В., Митюшова Н.М.* // Генетика. 1966. Т. 4. С. 136.
33. *Холлендер А., Степльтон Дж.* // Ионизирующие излучения и клеточный метаболизм. М.: Изд-во иностр. лит., 1958. С. 154.
34. *Alper T., Gillies, N.E.* // J. Gen. Microbiol. 1958. Vol. 18. P. 461.
35. *Вальдитейн Э.А., Жестянников В.Д.* // Радиобиология. 1963. Т. 3. С. 809.
36. *Вальдитейн Э.А., Жестянников В.Д.* // Цитология. 1967. Т. 9. С. 3.
37. *Жестянников В.Д., Парибок В.П., Вальдитейн Э.А.* // Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М.: Наука, 1966. С. 31.
38. *Мясник М.Н., Корогодин В.И.* // Радиобиология. 1967. Т. 7, N 2. С. 247.
39. *Myasnik M.N., Korogodin V.I.* // Radiat. Res. (in press).
40. *Капulyцевич Ю.Г.* // Радиобиология. 1967. Т. 7. С. 367.
41. *Adler H.I., Hardigree A.A.* // J. Bacteriol. 1965. Vol. 90. P. 223.
42. *Adler H.I., Fisher W.D. et al.* // J. Bacteriol. 1966. Vol. 91. P. 737.
43. *Gillies N.E.* // J. Gen. Microbiol. 1966. Vol. 45. P. 97.
44. *Корогодин В.И.* // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 307.
45. *Lutan J.T.* Dark recovery of yeast following ionizing radiation, Ph. D. Thesis Univ. of California, 1964.
46. *Сафиязов Ж.* Радиочувствительность и послелучевая репарация некоторых видов бактерий. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1964.
47. *Пархоменко И.М.* // Радиобиология. 1963. Т. 3. С. 689.
48. *Мосин А.Ф.* // Радиобиология (Информ. бюл. АН СССР). 1965. Т. 7. С. 32.
49. *Мейсель М.Н., Ремезова Т.С. и др.* // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1964. Т. 6. С. 827.
50. *Мосин А.Ф.* // Радиобиология. 1967. Т. 7. С. 111.
51. *Bender M.A., Wolf S.* // Amer. Naturalist. 1961. Vol. 95. P. 39.
52. *Норбаев Н., Кузин А.М.* // Радиотоксины, их природа и роль в биологическом действии радиации высокой энергии. М.: Атомиздат, 1966. С. 28.
53. *Олтану В., Гончаренко Е.Н., Конопляников А.Г., Кудряшов Ю.Б.* // Там же. С. 135.
54. *Rupert C.S., Harm W.* // Advances in Radiation Biology. N.Y.: Acad. Press Inc., 1966. Vol. 2. P. 1.
55. *Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G.* // Biophysik. Bd. I. Das Terfferprinzip in der Biologie. Leipzig: S. Hirzel Verlag, 1947.
56. *Астауров Б.Л.* // Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений. М.: Изд-во АН СССР, 1963. С. 140.
57. *Кузин А.М., Крюкова Л.М.* // Докл. АН СССР. 1961. Т. 137. С. 970.
58. *Парибок В.П.* // Радиобиология (Информ. бюл. АН СССР). 1965. Т. 7. С. 38.
59. *Александров В.Я.* // Цитология. 1965. Т. 7. С. 447.
60. *Медведева Г.А., Мейсель М.Н., Ионычева Г.А.* // Докл. АН СССР. 1964. Т. 159. С. 656.
61. *Patrick M.H., Haynes R.H., Uretz R.B.* // Radiat. Res. 1964. Vol. 21. P. 144.
62. *Swaminathan M.S. et al.* // Radiat. Res. 1962. Vol. 16. P. 182.

**АНАЛИЗ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК.
СООБЩЕНИЕ 1. КРИВЫЕ ВЫЖИВАНИЯ
И ЭФФЕКТ ДОРАСТАНИЯ**

Классическое направление количественной радиобиологии, получившее название принципа попадания и мишени, основывалось на результатах анализа кривых доза – эффект для выхода разных типов мутаций и вполне удовлетворительно объясняло формы кривых выживания вирусов, бактерий, дрожжей и некоторых других клеток [1, 2]. Однако кривые выживания (описывающие зависимость от дозы облучения относительного числа клеток, способных к бесконечному размножению) являются, хотя и очень важной, но далеко не исчерпывающей радиобиологической характеристикой исследуемых объектов. Так, на дрожжевых организмах показано, что летально пораженные клетки могут погибать как без деления, так и после одного или нескольких делений [3–7]; клетки, способные к «бесконечному» размножению, могут выщеплять «летальные секторы» [6, 8]; колонии, формирующиеся из облученных клеток, достигают макроскопического размера позже, чем в контроле («эффект дорастания») [3, 6, 9–11], и могут различаться между собой по радиочувствительности составляющих их клеток [12]. При этом разные формы проявления радиационного поражения клеток можно модифицировать, выдерживая облученные клетки в голодной среде [6, 11, 13], изменяя температуру культивирования [6, 14, 15] или добавляя в питательную среду поваренную соль [16, 17].

Возникает вопрос: в какой мере классические представления могут быть использованы для объяснения такого многообразия реакций клеток на облучение?

Мы постараемся ответить на этот вопрос, анализируя результаты наших опытов на дрожжевых организмах. В этих опытах мы предприняли систематическое изучение количественных закономерностей проявления у дрожжей тех форм лучевого поражения, фрагментарное описание которых содержалось в цитированных выше работах. А именно, у дрожжей разных штаммов и плоидности, различающихся по форме кривых выживания, были изучены эффект дорастания и соотношение форм инактивации при разных условиях культивирования, а у одного из штаммов диплоидных дрожжей были исследованы радиочувствительность и чувствительность к температуре клеток, из которых состоят колонии, вырастающие из облученного материала. В этом сообщении приводятся результаты опытов по изучению эффекта дорастания.

В качестве исходной посылки для анализа этих экспериментальных данных мы принимаем положение, основанное на принципе попадания и мишени: будем считать, что различные реакции клеток на облучение обусловлены повреждениями, возникающими при осуществлении событий попадания в одну или несколько мишеней. Будем считать также, что форма кривой выживания определяется критическим числом однотипных повреждений, требую-

щихся для инактивации клетки. А именно, экспоненциальные кривые соответствуют случаю, когда для инактивации клетки необходимо и достаточно одного повреждения, а сигмоидные кривые, или кривые с плечом – тем случаем, когда для инактивации клетки необходимо более одного повреждения, причем чем больше критическое число таких повреждений, тем больший размер имеет плечо [1, 2].

Рассматривая ту или иную реакцию дрожжевых клеток на облучение, мы будем стремиться выяснить, можно ли объяснить ее особенности, оставаясь на сформулированной выше позиции, и если нет, то какие дополнения или изменения следует внести в исходную посылку, чтобы такое объяснение оказалось возможным. Мы считаем, что только идя таким путем, удастся определить границы компетентности классических представлений в радиобиологии клетки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

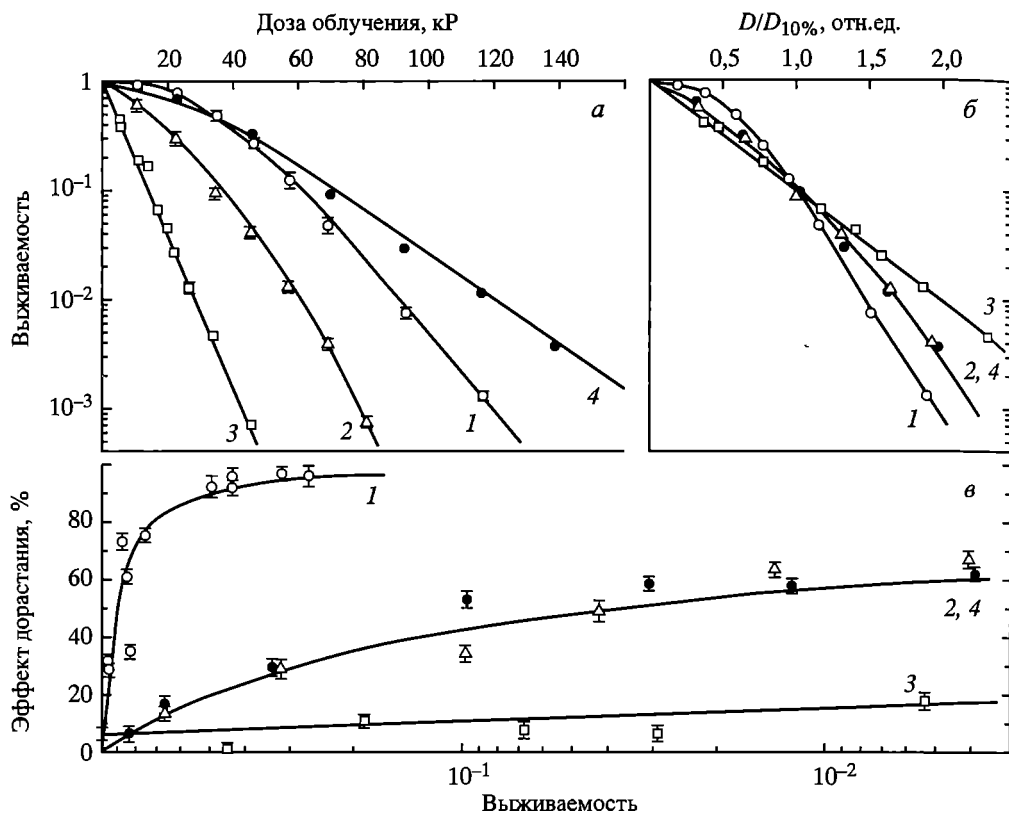
В опытах использовали *Saccharomyces cerevisiae*, штаммы УО 2022Д (диплоид) и 2ПГ-78 (гаплоид) и *Saccharomyces ellipsoideus* штаммы Мегри 139-В и 39-2 (диплоиды). Штамм УО 2022Д был выделен Сокуровой [7] из гаплоидного штамма УО 2022, полученного от Р.К. Мортимера; штамм 2ПГ-78 был получен от И.А. Захарова, а штамм Мегри – от В.И. Кудрявцева. Штамм 39-2 был выведен Ю.В. Корогодиной из клеток штамма Мегри 139-В после облучения; у дрожжей этого штамма отсутствует пострadiационное восстановление в воде (как у гаплоидов), а кривая выживания имеет сигмоидную форму (как у диплоидов).

Перед облучением дрожжи выращивали на питательном агаре (2% агара, 4° Балл неохмеленного пивного сусла) при 30 °С. Диплоидные дрожжи выращивали в течение 3–5 дней, а гаплоидные – 1–2 недели. Суспензии клеток в воде (около 10⁶ клеток/мл) облучали γ -квантами Со⁶⁰ на установке «Гаммацелл-220» (мощность дозы 39 Р/с). Облученные клетки высевали на агаризованное сусло (глубинный и поверхностный посевы) и выдерживали при 30 °С для определения выживаемости и эффекта дорастания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что разнообразие размеров макроколоний и эффект дорастания велики у диплоидных дрожжей и слабо выражены у гаплоидных [9, 10, 18]. Так, колонии, образуемые необлученными клетками диплоидных дрожжей штамма Мегри, дружно появляются на твердой среде через 24–28 ч роста при 30 °С, а после облучения вырастают в разные сроки в течение 24–120 ч. У гаплоидных же дрожжей штамма 2ПГ-78 макроколонии после облучения появляются одновременно с контролем, через 48 ч. С чем же связаны эти различия в реакциях на облучение диплоидных и гаплоидных клеток?

Напомним, что кривая выживания диплоидных дрожжей имеет сигмоидную форму, а выживаемость гаплоидных дрожжей уменьшается с ростом дозы экспоненциально. Основываясь на принципе попадания и мишени, можно предположить, что для инактивации диплоидных клеток необходимо много повреждений, а для инактивации гаплоидных клеток достаточно одно-



Кривые выживания (а, б) и эффект дорастания (в) у дрожжей разных штаммов

1 – *Saccharomyces ellipsoideus*, штамм Мегри 139-В, 2 – *Saccharomyces ellipsoideus*, штамм 39-2, 3 – *Saccharomyces cerevisiae*, 2ПГ-78, 4 – *Saccharomyces cerevisiae*, YO 2022Д

го повреждения. Если эффект дорастания обусловлен теми же повреждениями, которые определяют инактивацию, то диплоидные клетки, получившие меньше повреждений, чем критическое число, могут формировать колонию медленнее, чем в контроле. У гаплоидных же дрожжей после облучения выживают лишь клетки, не получившие ни одного повреждения, и они формируют колонии одновременно с контролем. Другое существенное отличие диплоидных клеток от гаплоидных состоит в том, что диплоидные дрожжи, как правило, способны восстанавливаться от лучевых повреждений, а гаплоидные нет [6]. Поэтому различия в проявлении эффекта дорастания у гаплоидных и диплоидных дрожжей могут быть связаны также с разной способностью этих клеток к пострадиационному восстановлению.

Чтобы сделать выбор между этими двумя возможностями, мы исследовали количественные закономерности эффекта дорастания у дрожжей разных штаммов. На рисунке представлены кривые выживания диплоидных дрожжей Мегри (а, кривая 1) и 39-2 (а, кривая 2), гаплоидных дрожжей 2ПГ-78 (а, кривая 3) и диплоидных дрожжей YO 2022Д (а, кривая 4). Напомним, что у дрожжей штамма 39-2 отсутствует пострадиационное восстановление, как и у гаплоидных дрожжей, хотя кривая выживания имеет сигмоидную, а не экспоненциальную форму. Таким образом, на рисунке представлены кривые

выживания дрожжей, способных восстанавливаться от лучевых повреждений и не обладающих такой способностью. Различия между этими кривыми хорошо видны на рисунке б, где выживаемость клеток представлена в зависимости от дозы облучения, поделенной на дозу, соответствующую 10% выживания. В таком изображении исчезают различия между кривыми, обусловленные разной радиорезистентностью клеток, и остаются лишь различия, связанные с формой этих кривых. Видно, что кривая выживания дрожжей штамма Мегри наиболее изогнута, а кривые двух других штаммов диплоидных дрожжей совпадают и занимают промежуточное положение между экспоненциальной кривой выживания гаплоидов и кривой выживания Мегри. На рисунке в представлена зависимость эффекта дорастания от выживаемости клеток. В качестве меры эффекта дорастания мы использовали отношение числа колоний, появившихся позже, чем в контроле, к общему числу колоний [10]. Макроколонии, образуемые необлученными клетками, появлялись у дрожжей штамма Мегри через 24 ч роста при 30 °С, а у клеток остальных штаммов – через 46–54 ч. Поскольку эффект дорастания измеряется долей тех клеток среди выживающих, которые формируют макроколонии позже, чем в контроле, то для сравнения разных штаммов целесообразно строить зависимость величины этого эффекта не от дозы облучения, а от выживаемости. Видно, что эффект дорастания особенно велик у диплоидных дрожжей Мегри, несколько меньше у двух других штаммов диплоидных дрожжей и практически отсутствует у гаплоидов.

Если эффект дорастания связан с репарационной способностью клеток, то он должен отсутствовать как у гаплоидных дрожжей, так и у диплоидных дрожжей 39-2. Однако из рисунка видно, что эффект дорастания у дрожжей 39-2 хотя и меньше, чем у Мегри, но значительно больше, чем у гаплоидов, и такой же, как у диплоидных дрожжей штамма УО 2022Д, которые хорошо восстанавливаются от лучевых повреждений [7]. Ранее было показано, что у штамма Мегри величина эффекта дорастания при одинаковых значениях выживаемости одинакова как сразу после облучения, так и после максимального восстановления в воде [11]. Это означает, что эффект дорастания не связан со способностью клеток восстанавливаться от лучевых повреждений.

Из экспериментальных данных, представленных на рисунке (б и в) видно, что чем больше форма кривой выживания отличается от экспоненты, тем сильнее выражен эффект дорастания. Это свидетельствует в пользу предположения, что эффект дорастания обусловлен теми же повреждениями, которые приводят к инактивации. Если число таких повреждений больше или равно критическому, клетка погибает, если же их меньше, клетка формирует макроколонию, но медленнее, чем в контроле. Очевидно, что чем больше повреждений необходимо для гибели клетки, т.е. чем больше «плечо» кривой выживания, тем больше клеток с повреждениями должно быть среди жизнеспособных особей при постоянном значении выживаемости, а следовательно, тем больше должен быть эффект дорастания. Это и наблюдается в эксперименте. В пользу предположения об идентичности повреждений, вызывающих инактивацию клеток и задержку роста колоний, свидетельствует также сходство (или идентичность) количественных закономерностей восстановления диплоидных дрожжей от таких повреждений при выдерживании в буфере или водопроводной воде [11, 13].

Все это позволяет представить себе следующую гипотетическую картину лучевого поражения клеток: клетки, не получившие во время облучения повреждений, образуют макроколонии в те же сроки и таких же размеров, как в контроле; клетки, получившие достаточно много повреждений, погибают; клетки, получившие меньше критического числа повреждений, формируют колонии медленнее, чем необлученные клетки. Эффект дорастания, следовательно, удастся непротворечно объяснить с позиций представлений, основанных на принципе попадания и мишени.

Почему же сублетально пораженные клетки формируют колонии медленнее, чем в контроле? Эффект дорастания вряд ли может быть целиком обусловлен задержками первых делений облученных клеток, распространяющимися на две-три клеточные генерации [6]; действительно, такие задержки, во-первых, присущи не только диплоидным, но и гаплоидным дрожжам, а во-вторых, их продолжительность измеряется часами, а запаздывание формирования макроколоний – сутками [6]. Как предполагают Тобайс и др. [8], значительный вклад в эффект дорастания может вносить появление у некоторых облученных клеток в процессе их размножения нежизнеспособных потомков. Ясно, что такая «частичная инактивация» [6] (или летальные секторы [19]), особенно если она распространяется на серию клеточных генераций, должна приводить к замедлению формирования колонии. В связи с этим весьма интересны наблюдения Хефнера [19], который показал, что у облученных ионизирующими излучениями гаплоидных дрожжей летальные секторы не встречаются. Наконец, определенную роль в эффекте дорастания должно играть формирование некоторыми облученными клетками медленно размножающихся клонов, что в некоторых случаях может быть связано с изменением их наследственности. Это предположение весьма правдоподобно в связи с хорошей корреляцией, наблюдающейся у дрожжей штамма Мегри между эффектом дорастания и выходом «сальтантов» [20]. Эффект дорастания, таким образом, может иметь комплексную природу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G.* // *Biophysik*. Bd 1. Das Trefferprinzip in der Biologie. Leipzig: Hirzel Verlag, 1947.
2. *Ли Д.Э.* Действие радиации на живую клетку. М.: Госатомиздат, 1963.
3. *Надсон Г.А.* Избранные труды. М.: Наука, 1967. Т. 2.
4. *Holweck F., Lacassagne A.* // *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1930. Vol. 103. P. 60.
5. *Корогодин В.И.* // *Биофизика*. 1958. Т. 3, N 2. С. 206.
6. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
7. *Сокурова Е.Н.* // *Радиобиология*. 1970. Т. 10, N 6. С. 720.
8. *Tobias C.A., Mortimer R.K., Gunter R.L., Welch G.P.* // 2-nd UN Geneva Conf., Section D-10. L.: Pergamon Press, 1958. P. 420.
9. *Gunter S.E., Kohn H.J.* // *J. Bacteriol.* 1956. Vol. 71. P. 124.
10. *Корогодин В.И.* // *Биофизика*. 1957. Т. 8, N 1. С. 178.
11. *Капулицевич Ю.Г.* // *Радиобиология*. 1967. Т. 7, N 6. С. 913.
12. *Тобиас К.* // *Радиобиология*. М.: Изд-во иностр. лит., 1955. С. 364.
13. *Корогодин В.И., Малиновский О.В., Порядкова Н.А., Изможерев Н.А.* // *Цитология*. 1959. Т. 1, N 3. С. 306.
14. *Корогодин В.И., Карабаев Э.М.* // *Радиобиология*. 1962. Т. 2, N 6. С. 824.
15. *Korogodin V.I., Kapultcevic Yu.G., Myasnik M.N.* et al. // *Adv. Biol. Med. Phys.* 1968. Vol. 12. P. 253.

16. Okazawa Y., Namaki M., Yamashita S., Matsuyama A. // Bull. Agric. Chem. Soc. Japan. 1960. Vol. 24, N 3. P. 235.
17. Кабакова Н.М., Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1969. Т. 9, N 6. С. 892.
18. Корогодин В.И., Лю Ай-шень // Цитология. 1959. Т. 1, N 4. С. 379.
19. Haefner K. // Radiation Res. 1967. Vol. 31. P. 400.
20. Близник К.М. // Studia Biophysica. 1971. Vol. 26. P. 183.

ANALYSIS OF RADIOBIOLOGICAL REACTIONS OF YEAST CELLS.

1. SURVIVAL CURVES AND DELAYED APPEARANCE OF MACROCOLONIES

Yu. G. Kapultsevich, V.I. Korogodin, V.G. Petin

The present work was undertaken to clear up the applicability of hit and target principle to the description of different manifestations of cell radiation damages. The quantitative analysis of the delayed appearance of macrocolonies was performed for haploid yeast cells, which showed the exponential survival curve and were not able to liquid holding recovery, and also for different strains of diploid yeast cells, which showed the sigmoidal survival curves. Some of these strains were able to postradiation recovery and one was not. It was shown that the effect of the delayed appearance of macrocolonies may be due to delayed formation of macrocolonies by irradiated cells accumulated subcritical number of hits.

АНАЛИЗ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК.

СООБЩЕНИЕ 2. ФОРМЫ ИНАКТИВАЦИИ И ПОСТРАДИАЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ

В предыдущем сообщении [1] было показано, что такие проявления реакций дрожжевых клеток на облучение, как форма кривых выживания и величина эффекта дорастания, можно удовлетворительно объяснить, основываясь на принципе попадания и мишени. Для этого достаточно допустить, что при облучении в разных клетках гомогенной популяции возникает разное количество однородных повреждений. Если число таких повреждений больше или равно критическому, клетка погибает. Если их число меньше критического, клетка выживает, но формирует колонию медленнее, чем в контроле. Если облученная клетка лишена повреждений, она формирует колонии в те же сроки и таких же размеров, как необлученная. Чем больше критическое число повреждений, тем больше плечо у кривой выживания и тем ярче выражен эффект дорастания. Именно такая картина наблюдается у разных штаммов диплоидных дрожжей. Если же критическое число повреждений равно 1, то все клетки, имеющие повреждения, погибают, а выживают только неповрежденные клетки. В этом случае кривая выживания имеет экспоненциальную форму, а эффект дорастания слабо выражен или отсутствует. Именно так реагируют на облучение дрожжи гаплоидных штаммов. В этом

сообщении мы попытаемся установить, в какой мере представления о связи разных форм проявления лучевого поражения клеток с разным числом однотипных повреждений приложимы к таким радиобиологическим феноменам, как инактивация облученных клеток после одного или нескольких делений и зависимость проявления лучевого поражения от условий пострадиационного культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Помимо штаммов *Saccharomyces cerevisiae* YO 2022Д (диплоид) и 2ПГ-78 (гаплоид), *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В и 39-2 (диплоиды), использовавшихся в предыдущем сообщении [1], в этой работе приводятся результаты опытов на гаплоидных штаммах *Saccharomyces cerevisiae*, 6А и 7Д, полученных от Накаи, а также *Zygosaccharomyces bailii* и *Schizosaccharomyces pombe*, полученных от Кудрявцева. Методика культивирования, облучения γ -лучами Co^{60} и учета макроколоний описана ранее [1]. Для учета разных форм инактивации [2] дрожжи высевали на поверхность агаризованного суслеа и изучали через определенный срок. При изучении модификации реакций клеток на облучение в питательную среду добавляли 8% хлористого натрия или изменяли температуру пострадиационного культивирования. Макроколонии подсчитывали через разные сроки инкубации, вплоть до полного проявления эффекта (5 сут роста на стандартной среде и 20–26 сут роста на среде с NaCl). Микроколонии просматривали через 1 сут роста на стандартной среде и через 5 сут роста на солевой среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, облученные клетки, не образующие макроколоний, погибают после разного числа делений [2]. Формы инактивации дрожжей можно сгруппировать следующим образом: микроколонии, содержащие от 5 до 40 клеток (класс M_1); микроколонии, содержащие от 2 до 4 клеток (класс M_2); одиночные клетки (класс M_3) [3]. Среди разных форм инактивации при малых дозах облучения у диплоидов обычно преобладает класс M_1 , который с ростом дозы сменяется классом M_2 , а у гаплоидных дрожжей форма M_2 часто является преобладающей даже при относительно небольших дозах [3, 4]. Форма инактивации M_3 , как правило, появляется лишь при очень высоких дозах, хотя встречаются и исключения (так, у *Schizosaccharomyces pombe* «единички» составляют заметную долю форм инактивации при относительно высокой выживаемости [4, 5]).

На рис. 1 и 2 приведены кривые выживания и кривые, описывающие зависимость от выживаемости относительного содержания класса M_2 для диплоидных (Мегри, 39-2 и YO 2022Д, кривые 1–3) и гаплоидных (2ПГ-78, 6А, 7Д и *Z. bailii*, кривые 4–7) дрожжей. (Зная выживаемость S и долю клеток класса M_2 , можно легко определить и долю клеток класса M_1 , так как $M_1 = 1 - S - M_2$.) Видно, что у разных штаммов дрожжей доля клеток класса M_2 при одинаковых значениях выживаемости различна: у диплоидных дрожжей Мегри, кривая выживания которых имеет максимальное «плечо», она минимальна, а у гаплоидных, имеющих экспоненциальные кривые

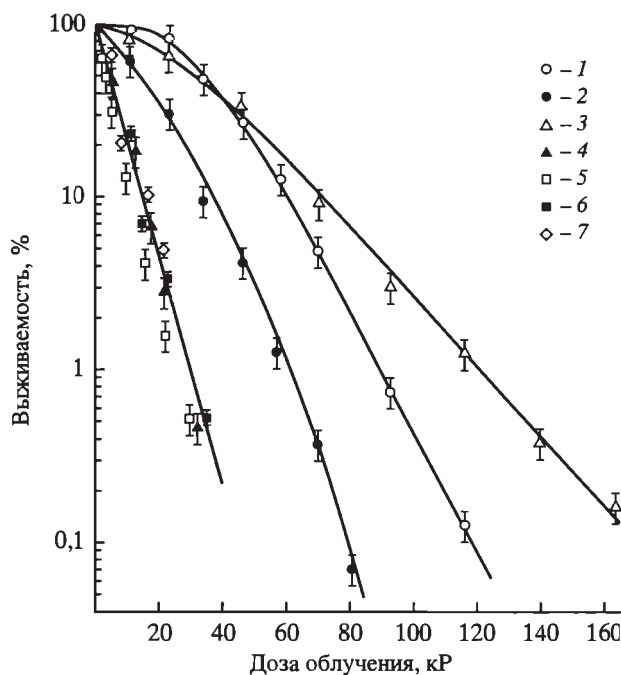


Рис. 1. Кривые выживания дрожжей разных штаммов при стандартных условиях пострadiационного культивирования

1 – *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В; 2 – *Saccharomyces ellipsoideus*, 39-2; 3 – *Saccharomyces cerevisiae*, YO 2022D; 4 – *Saccharomyces cerevisiae*, 2ПГ-78; 5 – *Zygosac-charomyces bailii*; 6 – *Saccharomyces cerevisiae*, 6А; 7 – *Saccharomyces cerevisiae*, 7D

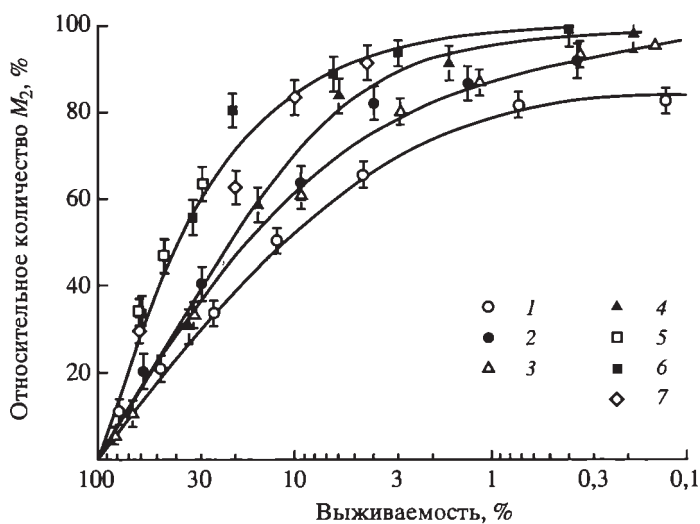


Рис. 2. Зависимость формы инактивации M_2 от выживаемости у дрожжей разных штаммов

Обозначения 1–7 см. на рис. 1

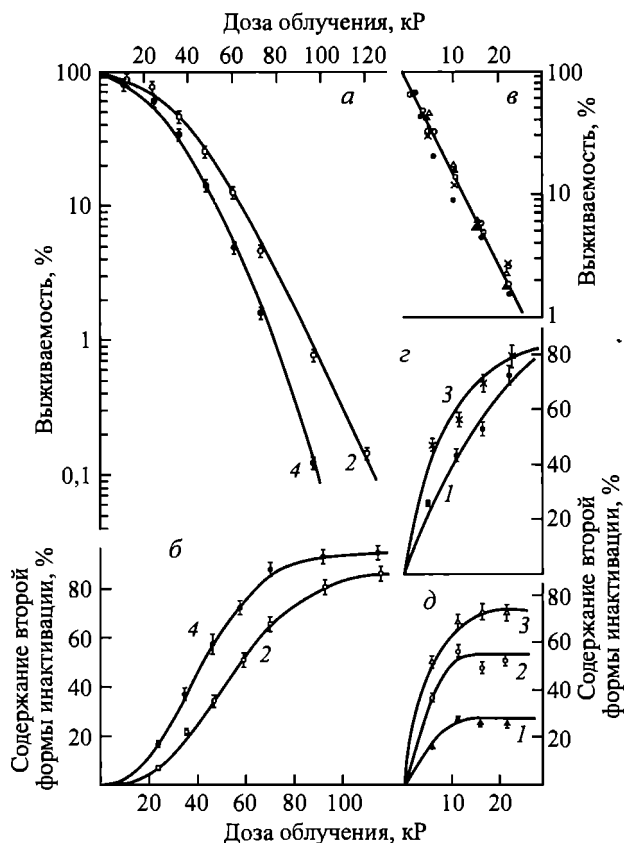


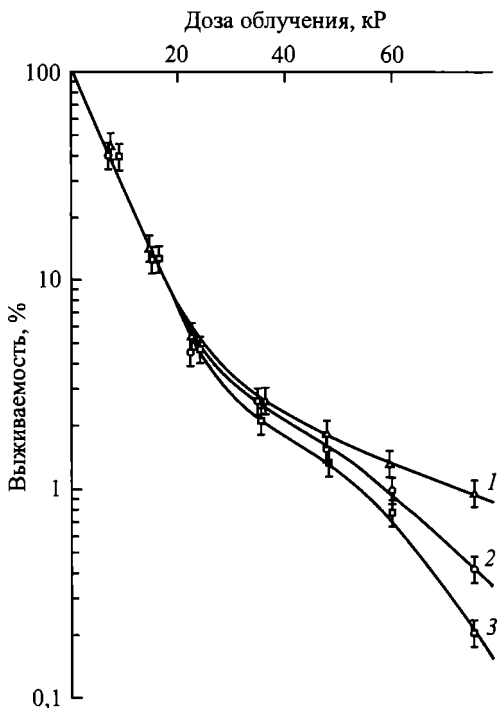
Рис. 3. Зависимость выживаемости (а, в) и формы инактивации M_2 (б, г, д) от дозы облучения у диплоидных дрожжей *Мегри* (а, б) и гаплоидных дрожжей *Z. bailii* (в, г, д) при разных температурах пострадиационного культивирования: 1 – 20, 2 – 30, 3 – 34, 4 – 37 °С

выживания, максимальна. Это позволяет предположить, что соотношение форм инактивации, как и эффект дорастания, связано с формой кривой выживания.

Соотношение форм инактивации у дрожжей, как и выживаемость, можно изменить, например, путем выдерживания облученных клеток в режиме восстановления [3]. Интересно, что количественные закономерности изменения выживаемости, эффекта дорастания и соотношения форм инактивации при восстановлении одинаковы [3, 6, 7]. Это позволяет предположить, что в основе всех трех форм реакций клеток на облучение лежат сходные по своей природе или одни и те же первичные повреждения.

Выживаемость облученных диплоидных дрожжей можно изменить вне связи с эффектом восстановления, например, уменьшая или увеличивая температуру культивирования по сравнению с 30 °С [8–10] или добавляя в питательную среду поваренную соль [11, 12]. Следует подчеркнуть, что такие изменения условий культивирования не влияют на выживаемость гаплоидов [8, 12]. Однако, как показано ниже, температура пострадиационной инкубации может существенно влиять на соотношение форм инактивации не толь-

Рис. 4. Кривые выживания гаплоидных дрожжей *Z. bailii*, полученные при разных температурах пострадиационного культивирования: 1 – 20, 2 – 30, 3 – 34 °С



ко у диплоидных, но и у гаплоидных дрожжей.

На рис. 3, а показаны кривые выживания диплоидных дрожжей Мегри при стандартной температуре 30 °С (кривая 2) и при 37 °С (кривая 4). Видно, что повышение температуры культивирования уменьшает выживаемость. На рис. 3, б для этого же штамма показано изменение с дозой облучения доли клеток класса M_2 при 30 °С (кривая 2) и 37 °С (кривая 4). Видно, что повышение температуры приводит к увеличению относительного содержания в популяции этой формы инактивации. На рис. 3, в приведена кривая выживания, а на рис. 3, г, д – кривые зависимости от дозы доли клеток класса M_2 для гаплоидных дрожжей *Zygosaccharomyces bailii* (7-дневная культура).

Данные независимых опытов обозначены разными символами. Кривые 1, 2 и 3, рис. 3, г, д и в описывают результаты опытов, проведенных при температуре 20, 30 и 34 °С. Видно, что у гаплоидных дрожжей соотношение форм инактивации меняется в зависимости от температуры и от опыта к опыту, а кривая выживания остается постоянной. Таким образом, изменение соотношения форм инактивации у диплоидных дрожжей сопровождается изменением выживаемости, а у гаплоидных – нет.

Связано ли это различие между диплоидными и гаплоидными дрожжами с формой кривой выживания? Напомним, что у кривых выживания гаплоидных дрожжей часто имеется резистентный «хвост» сигмоидной формы, обусловленный наличием в популяции почкующихся клеток; уровень выживаемости, с которого начинается «хвост», увеличивается с уменьшением возраста культуры [13–15]. Если для модификации выживаемости необходимо, чтобы кривая выживания имела сигмоидную форму, то можно ожидать, что у гаплоидных дрожжей выживаемость на уровне «хвоста» также будет зависеть от температуры культивирования. На рис. 4 представлены кривые выживания клеток трехсуточной культуры *Z. bailii*, которые выращивали после облучения при 20, 30 и 34 °С (кривые 1, 2 и 3 соответственно). Видно, что в области больших доз на уровне «хвоста» выживаемость этих клеток действительно зависит от температуры. Этот факт свидетельствует о связи температурной модификации выживаемости с формой кривой выживания.

Полученные результаты можно попытаться интерпретировать с помощью той же гипотезы, которую мы сформулировали при анализе эффекта дорастания [1]. Если для инактивации гаплоидной клетки достаточно одного повреж-

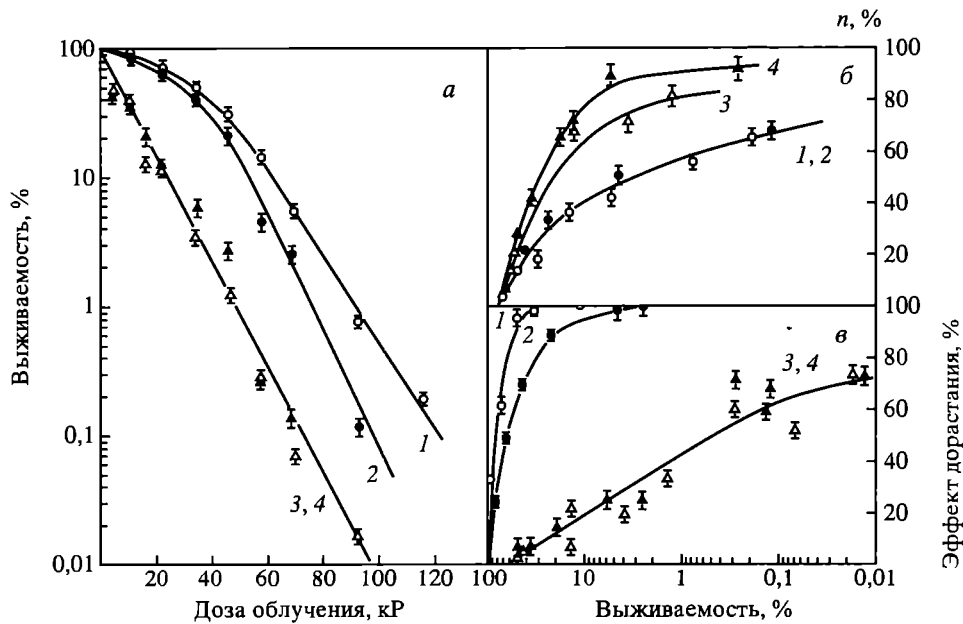


Рис. 5. Зависимость выживаемости, соотношения форм инактивации и эффекта дорастания от условий пострадиационного культивирования у диплоидных дрожжей Мегри:

а – кривые выживания; *б* – доля микроколоний, содержащих не более 4 клеток (*n*, %); *в* – эффект дорастания. Пострадиационная инкубация на стандартной питательной среде (1, 2) и на среде, содержащей 8% NaCl (3, 4), при $T = 30^\circ\text{C}$ (1, 3) и 37°C (2, 4)

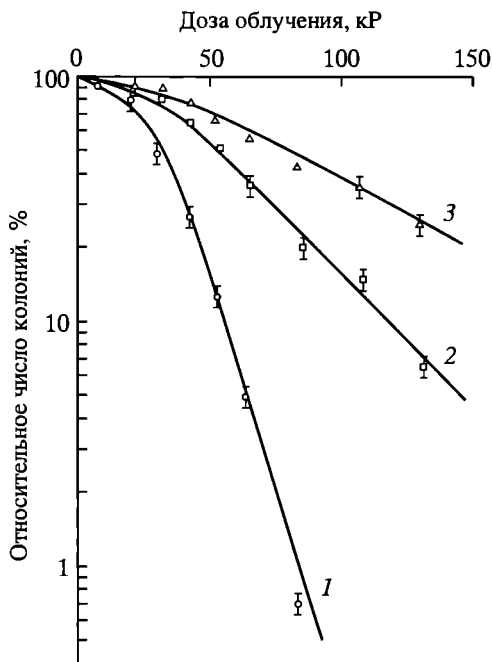
дения, а для инактивации диплоидной клетки необходимо несколько однотипных повреждений, то можно представить себе, что летально пораженные клетки образуют ту или иную форму инактивации также в зависимости от числа повреждений, и с ростом числа повреждений форма M_1 переходит в форму M_2 . Допустим теперь, что критическое число повреждений, необходимых для образования той или иной формы инактивации, так зависит от условий культивирования, что при их «ухудшении» эти числа уменьшаются. Вследствие этого при «ухудшении» условий культивирования у облученных диплоидных дрожжей должна уменьшаться выживаемость и увеличиваться относительное содержание формы инактивации M_2 , а у гаплоидных дрожжей может изменяться лишь соотношение форм инактивации, так как даже в оптимальных условиях гаплоидные клетки погибают уже при одном повреждении.

Из этой гипотезы можно вывести два следствия, которые допускают экспериментальную проверку.

Первое следствие и его проверка. Допустим, что критические числа повреждений, необходимых для образования форм инактивации, зависят от условий культивирования. Тогда, изменяя эти условия, можно модифицировать не только величину выживаемости, но и форму кривой выживания, величину эффекта дорастания и в некоторых случаях зависимость от выживаемости соотношения форм инактивации. В частности, «ухудшая» условия культивирования и тем самым уменьшая критическое число повреждений, можно сигмоидную кривую выживания превратить в экспоненциальную.

Мы попытались уменьшить величину «плеча» у кривой выживания диплоидных дрожжей Мегри, культивируя их после облучения в субоптималь-

Рис. 6. Кривые доза–эффект для колоний, содержащих разное число клеток (диплоидные дрожжи Мегри): макроколонии (1), относительное количество микроколоний, содержащих не менее пяти (2) и не менее трех (3) клеток



ных условиях. Для этого мы выращивали облученные клетки Мегри при разной температуре на среде, содержащей 8% NaCl (эта концентрация соли тормозит размножение необлученных клеток, но еще не влияет на их выживаемость [12]). На рис. 5, а кривые выживания 1 и 2 получены при выращивании облученных клеток на стандартной среде при 30 и 37 °С, а кривые 3 и 4 – при таких же температурах на среде, содержащей 8% NaCl. Видно, что поваренная соль не только уменьшает выживаемость облученных клеток, но и влияет на форму кривой выживания, превращая сигмоидную кривую в экспоненту. Кроме того, как и следовало ожидать, повышение температуры сверх оптимальной уменьшает выживаемость клеток

лишь на стандартной среде, где кривые выживания сигмоидны, и не влияет на выживаемость клеток на солевой среде, где кривая выживания экспоненциальна. Отметим, что в некоторых опытах, когда на солевой среде при 30 °С мы получали сигмоидную кривую выживания, повышение температуры до 37 °С уменьшало выживаемость клеток.

На рис. 5, б показано относительное количество микроколоний, содержащих не более четыре клеток, в зависимости от выживаемости на стандартной среде при 30 и 37 °С (кривые 1 и 2) и при таких же температурах на среде с солью (кривые 3 и 4). Видно, что количество таких микроколоний резко возрастает при выращивании диплоидных клеток на солевой среде и становится примерно таким же, как и у гаплоидных дрожжей на стандартной питательной среде (см. рис. 2). Отметим, что при добавлении соли в питательную среду изменяется и сам характер инактивации – на такой среде клетки штамма Мегри часто погибают, не совершив ни одного деления.

На рис. 5, в для этого же штамма дрожжей показана зависимость эффекта дорастания от выживаемости при разных условиях культивирования. На стандартной среде макроколонии появлялись через 24–28 ч в контроле и через 24–120 ч в опыте, а на солевой среде – через 7–10 сут в контроле и через 5–20 сут – в опыте. Из рисунка видно, что эффект дорастания максимален при стандартных условиях культивирования (кривая 1), несколько уменьшается при повышении температуры до 37 °С (кривая 2) и становится еще меньше при выращивании клеток на среде с NaCl. Наличие небольшого эффекта дорастания в последнем случае, несмотря на экспоненциальность кривой выживания диплоидов, может быть связано либо с тем, что такая кривая представляет собой суперпозицию нескольких кривых с малыми размерами плеча,

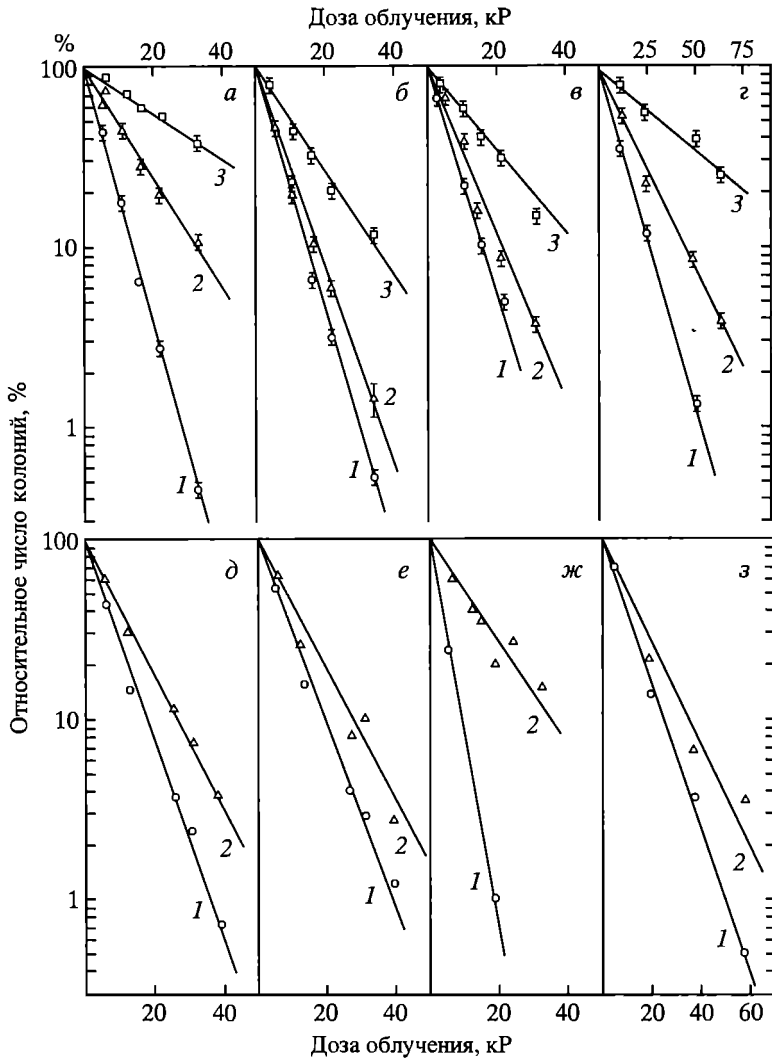


Рис. 7. Кривые доза-эффект для колоний, содержащих разное число клеток (гаплоидные дрожжи разных штаммов и видов): макроколонии (1), относительное количество микроколоний, содержащих не менее пяти (2) и не менее трех (3) клеток (для *S. pombe* не менее двух)

a – *Saccharomyces cerevisiae*, 2ПГ-78; *б* – *Saccharomyces cerevisiae*, 6А; *в* – *Saccharomyces cerevisiae*, 7D; *г* – *Schizosaccharomyces pombe*; *д* – *Saccharomyces cerevisiae*, YO 2022; *е* – *Saccharomyces cerevisiae*, YO 2587а; *ж* – *Saccharomyces cerevisiae*, 1305; *з* – *Pichia membrana taciensis*

либо с тем, что эффект дорастания обусловлен не только сублетальными повреждениями, но и в некоторой степени другими факторами, не учитываемыми нами. Однако, учитывая то, что эффект дорастания на солевой среде незначителен по сравнению с эффектом дорастания на стандартной среде, можно считать, что полученные результаты хорошо согласуются с нашей гипотезой.

Второе следствие и его проверка. Допустим, что разные формы инактивации обусловлены разным числом однотипных повреждений: чем больше

таких повреждений, тем меньше делений может совершить клетка. В таком случае кривая изменения с дозой относительного числа колоний, содержащих, например, не менее пяти клеток, должна быть более «многоударной», т.е. обладать большим «плечом», чем кривая выживания; еще большее «плечо» должно быть у дозовой кривой для колоний, содержащих не менее трех или двух клеток.

На рис. 6 представлены результаты опытов с диплоидными дрожжами Мегри [5]. Видно, что «плечо» кривых доза–эффект для колоний, содержащих не менее пяти и не менее трех клеток, не превышает «плечо» кривой выживания, что противоречит нашей гипотезе. Такие же результаты с этим штаммом дрожжей были получены Беневоленским и Мещеряковой [16], а с другими штаммами – Фриц-Ниггли и Блатманом [17].

Однако результаты таких опытов с клетками, имеющими сигмоидные кривые выживания, не всегда достаточно надежны, так как с помощью методики микроколоний трудно точно определить величину «плеча» у соответствующих кривых доза–эффект. Если же кривые выживания экспоненциальны, то для проверки нашей гипотезы достаточно убедиться в наличии или отсутствии «плеча» у кривых доза–эффект для колоний, содержащих заданное число клеток, для чего методика микроколоний вполне приемлема.

На рис. 7 представлены соответствующие данные, полученные нами ($a-z$) и Сокуровой [4] ($\partial-z$) на гаплоидных дрожжах разных штаммов и видов. Во всех случаях как кривые выживания, так и кривые доза–эффект для колоний, содержащих не менее пяти и не менее трех (для *Sch. pombe* не менее двух) клеток, имеют экспоненциальную форму, т.е. лишены плеча. Ранее такие же результаты были получены и для гаплоидных дрожжей *Z. bailii* [15], которые в этой работе использовались в опытах по температурной модификации.

Таким образом, результаты, полученные на разных штаммах гаплоидных и диплоидных дрожжей, противоречат предположению, что разные формы инактивации обусловлены разным числом однотипных повреждений. Следовательно, чтобы интерпретировать эти результаты с позиций принципа попаданий и мишени, приходится предположить, что инактивация клеток после разного числа делений должна быть связана с поражением нескольких качественно различных мишеней. А так как количество клеток в инактивированных колониях варьирует весьма широко, от единицы до нескольких десятков и даже до ста [2, 3], то приходится допустить существование в клетках большого числа таких мишеней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приступая к анализу различных проявлений лучевого поражения у дрожжевых организмов, мы исходили из простейшего предположения, основанного на принципе попадания и мишени, согласно которому разные радиобиологические реакции могут быть обусловлены разным числом однотипных повреждений, возникающих в результате осуществления событий попадания в одну или несколько идентичных мишеней. С позиций этой гипотезы нам удалось объяснить связь между формами кривых выживания дрожжей разных штаммов и особенностями проявления у них эффекта дорастания. Однако, чтобы, оставаясь в рамках классических представлений, объяснить

наличие у дрожжей разных форм инактивации и количественные закономерности модификации указанных радиобиологических реакций условиями пострадиационного культивирования, нам пришлось существенно усложнить исходную точку зрения. В новом виде наша гипотеза формулируется следующим образом. В результате облучения в клетке может возникнуть разное число качественно различных повреждений (поражения разных мишеней). Не поддающаяся простому учету комбинация таких повреждений, критическое число которых зависит от условий культивирования, может приводить клетку к инактивации после того или иного числа делений. Если имеющиеся в клетке повреждения при данных условиях нелетальны, то клетка формирует колонию, растущую медленнее, чем в контроле. Облученные клетки, не получившие ни одного повреждения, формируют колонии таких же размеров и в те же сроки, что и необлученные. Эта гипотеза позволяет дать удовлетворительное качественное объяснение той совокупности фактов, которыми мы располагали в этом и предшествующем [1] сообщениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 267.
2. Корогодин В.И. // Биофизика. 1968. Т. 3. С. 206.
3. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
4. Сокурова Е.Н. // Радиобиология. 1970. Т. 10. № 5. С. 720.
5. Капульцевич Ю.Г., Парфенов Е.Н. // Радиация и организм. Обнинск, 1970. С. 161.
6. Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 2. С. 258.
7. Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 6. С. 913.
8. Корогодин В.И., Карабаев Э.М. // Радиобиология. 1962. Т. 2, № 6. С. 824.
9. Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 2, С. 367.
10. Korogodin V.I., Kapultsevich Yu.G., Myasnik M.N. et al. // Adv. Biol. Med. Phys. 1968. Vol. 12. P. 253.
11. Okazawa Y., Namaki M., Yamashita S., Matsuyama A. // Bull. Agr. Chem. Soc. Japan. 1960. Vol. 24, N 3. С. 235.
12. Кабакова Н.М., Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1969. Т. 9, № 6. С. 892.
13. Beam C.A., Mortimer R.K., Wolfe R.G., Tobias C.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1954. Vol. 49. P. 110.
14. Wood T.H. // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1953. Vol. 84, N 2. С. 446.
15. Корогодин В.И., Лю Ай-шень // Цитология. 1959. Т. 1, N 4. С. 379.
16. Беневоленский В.Н., Мещерякова О.М. // Радиобиология. 1971. Т. 11, № 1. С. 80.
17. Fritz-Niggli H., Blattmann H. // Biophysik. 1969. Vol. 6. P. 46.

ANALYSIS OF RADIOBIOLOGICAL REACTIONS OF YEAST CELLS. 2. INACTIVATION FORMS AND POST-IRRADIATION MODIFICATION OF RADIATION DAMAGE

Yu.G. Kapultsevich, V.G. Petin, V.I. Korogodin, K.M. Bliznik

This work was undertaken to check the explanation of different inactivation forms and modification of radiobiological effects by postradiation cultivation conditions from the point of view of hit and target principle. Such explanation seems possible under assumption that different inactivation forms are due to the qualitatively different primary lesions and the critical number of lesions, which depend on the cultivation conditions decreasing with any deflection of these conditions from optimal one.

**АНАЛИЗ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК.
СООБЩЕНИЕ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОНИЙ,
ВЫРАСТАЮЩИХ ИЗ ОБЛУЧЕННЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК**

С позиций принципа попадания и мишени разную форму кривых выживания дрожжей разных штаммов и пloidности можно объяснить тем, что для их инактивации требуется разное критическое число однотипных повреждений. Анализируя связь величины эффекта дорастания с формой кривой выживания, мы показали, что эффект дорастания можно объяснить, допустив замедленное (по сравнению с контролем) формирование колоний из тех клеток, которые получили при облучении субкритическое число повреждений [1]. Далее, однако, оказалось, что эти представления нельзя согласовать с фактами, полученными при изучении форм инактивации дрожжевых клеток и зависимости их радиочувствительности от условий пострadiационного культивирования; для объяснения всей совокупности соответствующих фактов с позиций классических представлений нам пришлось предположить, что при облучении в клетках возникают повреждения разного рода (ответственные за разные формы инактивации), а критическое число их, летальное для клеток, зависит от условий культивирования [2]. Согласно этой гипотезе, критическое число повреждений тем меньше, чем больше условия культивирования клеток отличаются от оптимальных, а клетки, получившие при облучении субкритическое (для данных условий) число повреждений, передают эти повреждения своим потомкам, в результате чего из таких клеток колонии формируются медленнее, чем в контроле. Посмотрим теперь, в какой мере эти представления согласуются с экспериментальными данными, которыми мы располагаем относительно особенностей клеток, входящих в состав колоний, вырастающих из облученного материала, т.е. тех клеток, которые могут иметь субкритическое число повреждений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе были использованы диплоидные дрожжи *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В, основные радиобиологические характеристики которых уже описаны [1, 2]. Выращенные на сусло-агаре клетки этих дрожжей суспендировали в стерильной воде, облучали γ -лучами Co^{60} (установка «Гаммацелл-220», мощность дозы 2,3 крад/мин) и рассеивали в чашки Петри на поверхность твердой питательной среды с таким расчетом, чтобы в каждой чашке, независимо от дозы облучения, выросло примерно столько же колоний, как в контроле. Спустя тот или иной срок инкубации при 30 °С, измеряли диаметры этих колоний [13], а в других опытах изучали такие свойства клеток, входящих в состав колоний разных размеров, как радиочувствительность и способность к бесконечному размножению при разных температурах. Для некоторых наблюдений применяли методику микроколо-

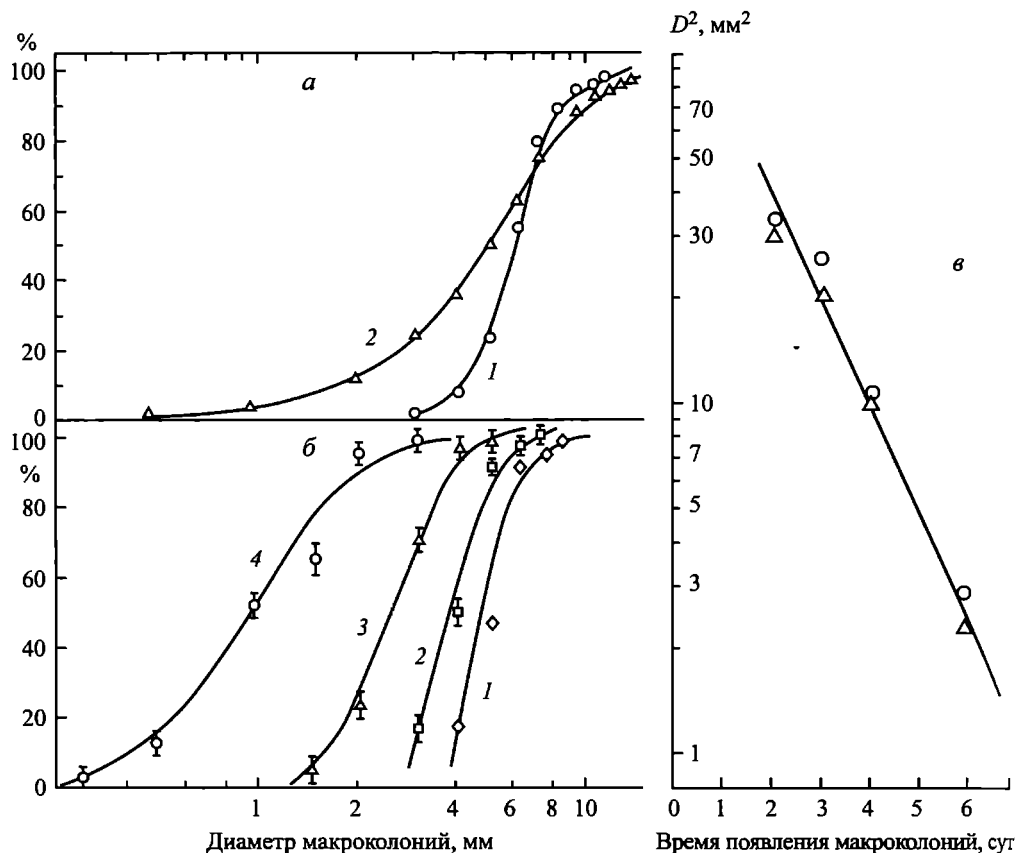


Рис. 1. Интегральное распределение по размерам всех макроколоний (а) и макроколоний, появляющихся в разные сроки (б), и среднее значение квадрата диаметра макроколоний D^2 в зависимости от срока появления (в)

По оси ординат – относительное количество макроколоний, диаметр которых не превышает заданную величину, % (а, б) и среднее значение квадрата диаметра макроколонии, mm^2 (в); а: 1 – контроль, 2 – облучение в дозе 70 кР; б: 1, 2, 3, 4 – макроколонии, появляющиеся на 2-, 3-и, 4-е и 5–7-е сут соответственно после облучения в дозе 70 кР; в – облучение в дозе 35 (кружки) и 70 кР (треугольники)

ний [4]. Эффективность роста определяли как отношение числа выросших колоний к числу клеток, высеваемых в чашки Петри, в процентах (клетки подсчитывали в камере Горяева).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены результаты измерения диаметров колоний, вырастающих в течение 14 (а) и 7 сут (б, в) из дрожжевых клеток, облученных в дозе 70 крад.

Интегральные распределения по диаметру колоний, выросших из необлученных и облученных клеток (рис. 1, а, кривые 1 и 2), подтверждают более ранние наблюдения [3], показавшие, что увеличение варьирования размеров колоний вследствие облучения происходит в основном за счет появления колоний более мелких, чем в контроле. Формы распределения по размерам колоний, появляющихся в чашках Петри на 2-, 3-, 4- и 5–7-е сут после об-

лучения в той же дозе (диаметры всех этих колоний измеряли на 7-е сут) (рис. 1, б, кривые 1–4), показывают, что чем позже такие колонии достигают макроскопических размеров, тем большее число их остается мелкими и при последующей инкубации. Увеличение продолжительности инкубации таких колоний на питательной среде сверх 7 сут лишь незначительно изменяет распределения, приведенные на рис. 1, б. На рис. 1, в изображены средние значения квадратов диаметров колоний в зависимости от сроков появления их в чашках Петри после облучения в дозах 35 и 70 крад (кружки и треугольники соответственно) (измерения диаметров проводили на 7-е сут инкубации; квадраты диаметров колоний взяты в качестве показателей, примерно пропорциональных числу содержащихся в колониях клеток [3]). Видно, что характер связи между скоростями роста колоний (сроками появления) и их размерами не зависит от дозы облучения исходных клеток.

Совокупность всех этих данных хорошо согласуется с предположением, что крупные колонии вырастают из тех облученных клеток, которые получили малое число повреждений или вовсе их не получили, а мелкие – из клеток, получивших много таких повреждений (но меньше критического числа), и что такие повреждения, передаваясь от материнских клеток к дочерним, сохраняются у потомков облученных клеток на протяжении многих генераций. Это допущение хорошо объясняет связь размеров колоний, вырастающих из облученных клеток, со скоростями их роста и независимость этой связи от дозы облучения. В пользу этого предположения свидетельствуют и ранние наблюдения [5], показавшие, что у гаплоидных дрожжей средние размеры макроколоний, образующихся из облученных клеток, такие же, как и в контроле. Действительно, если у гаплоидных дрожжей после облучения выживают лишь клетки, не получившие ни одного повреждения, то эти клетки должны формировать такие же макроколонии, как и необлученные клетки.

Если эта гипотеза справедлива, то можно ожидать, что радиочувствительность клеток, входящих в состав колоний, вырастающих из облученных диплоидных дрожжей, будет тем выше, чем мельче колония, а возрастание радиочувствительности будет происходить в основном за счет уменьшения размера плеча у кривых выживания. Естественно, что такие различия можно ожидать лишь для диплоидных клеток, имеющих сигмоидные кривые выживания; у гаплоидных дрожжей, имеющих экспоненциальную кривую выживания, клетки колоний, вырастающих из облученного материала, не должны содержать повреждений и, следовательно, не должны отличаться по радиочувствительности от контроля.

Тобайс [6] первый исследовал этот вопрос на гаплоидном и диплоидном штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Было показано, что у гаплоидов действительно нет различий в радиочувствительности необлученных клеток и клеток, выросших из облученного материала, а у диплоидов после облучения встречаются колонии, состоящие из клеток с повышенной радиочувствительностью. Эти результаты Тобайс объяснил наследованием (при вегетативном размножении) сублетальных повреждений, возникающих при облучении у диплоидных клеток. В своей работе, однако, он не приводит размеров тех колоний, клетки которых использовались в опытах. Поэтому мы повторили эти исследования на диплоидных дрожжах штамма Мегри,

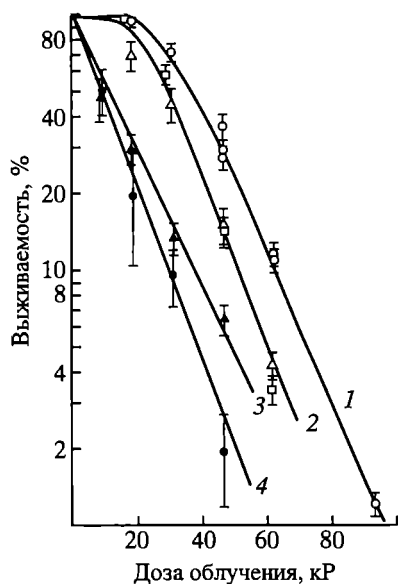


Рис. 2. Кривые выживания исходной культуры (1), клеток из крупных (2) и мелких (3, 4) макроколоний

выбирая для облучения крупные (диаметр более 5 мм) и мелкие (диаметр менее 1 мм) колонии, выросшие из клеток, получивших дозу в 70 крад.

Результаты наших опытов приведены на рис. 2. Кривая 1 представляет собой кривую выживания исходного материала, кривая 2 — кривую выживания клеток, взятых из трех крупных колоний (соответствующие данные обозначены разными значками), а кривые 3 и 4 — кривые выживания клеток из двух мелких колоний. Мы видим, что радиочувствительность клеток из крупных колоний несколько выше, чем у клеток исходной культуры, но кривая их выживания имеет сигмоидную форму. У клеток же из мелких колоний радиочувствительность гораздо выше, чем у исхо-

дной культуры, а кривые выживания экспоненциальны. Правда, для клеток из некоторых других мелких колоний мы получали и сигмоидные кривые выживания, однако размеры плеча таких кривых были намного меньше, чем размеры плеча кривых выживания клеток исходной культуры и клеток из крупных колоний. Полученные результаты хорошо согласуются с предположением [1], что крупные колонии вырастают после облучения из клеток, получивших мало повреждений, а мелкие — из клеток, получивших много повреждений. Можно полагать также, что в тех случаях, когда кривая выживания клеток из мелких колоний имеет экспоненциальную форму, все эти клетки содержат одинаковое количество повреждений, число которых лишь на единицу меньше критического. Итак, мы пришли к весьма нетривиальному заключению, которое допускает независимую экспериментальную проверку.

Действительно, если сформулированные выше представления правильны, то на основании опытов с пострадиационной модификацией выживаемости облученных дрожжей этого же штамма [2] можно ожидать значительных различий в эффективности роста при разных температурах инкубации для клеток, входящих в состав крупных колоний, и клеток, входящих в состав мелких колоний.

Поясним это заключение. Ранее мы пришли к выводу, что уменьшение плеча у кривой выживания диплоидных клеток при инкубации их после облучения в неоптимальных условиях может быть обусловлено тем, что в таких условиях для инактивации клетки требуется меньшее число повреждений, чем в оптимальных [2]. Если критическое число повреждений в оптимальных условиях равно, например, n , а клетка получила $n - 1$ повреждений, то она выживет и сформирует колонию, все клетки которой будут иметь по $n - 1$ повреждений — число, достаточное для их инактивации при неоптимальных условиях культивирования. Такие клетки, следовательно, при оптимальных условиях будут размножаться, а при неоптимальных — погибнут. Существенно подчеркнуть, что неоптимальные условия будут летальны для 100% таких

клеток – ведь они все, по определению, несут одинаковое число ($n - 1$) повреждений.

Изложим теперь результаты проверки этих положений. В качестве неоптимальных условий культивирования мы использовали температуру ниже или выше оптимальной, равной 30 °С. Основанием для этого нам служили наблюдения, показавшие, что выживаемость облученных дрожжей Мегри, культивируемых при 10, 20 и 37 °С, существенно ниже, чем при стандартной температуре в 30 °С [7, 8]. То обстоятельство, что выживаемость диплоидных дрожжей можно существенно уменьшить, изменив температуру инкубации на неоптимальную не только сразу после облучения, но даже спустя 30 ч, т. е. после осуществления ими примерно десяти циклов деления [8], свидетельствует в пользу предположения о наследовании потомками облученной клетки лучевых повреждений, влияющих на их жизнеспособность при разных температурах.

Изучение эффективности роста клеток, входящих в состав колоний, выросших из облученного материала, показало следующее. Для клеток исходной культуры эффективность роста при 10, 20, 30 и 37 °С практически не отличается от 100%. Для многих мелких колоний, выросших из облученных клеток, характерна пониженная эффективность роста даже при стандартных условиях культивирования, т.е. при 30 °С; так, для случайной выборки в 22 колонии эффективность роста равнялась в среднем 65%. Такое уменьшение эффективности роста при стандартной температуре культивирования может быть следствием накопления в колониях, выросших из облученных клеток, «летальных секторов» [1]. А так как количество таких погибших клеток в колониях может широко варьировать, то в интересующем нас аспекте более надежны данные не об абсолютной эффективности роста, а об относительной, определяемой как отношение эффективности роста при суб- или супероптимальной температуре к эффективности роста при оптимальной температуре в 30 °С. Данные такого рода следующие.

Для исходной культуры, как мы уже отмечали, эффективность роста при 10, 20, 30 и 37 °С равна 100% и относительная эффективность роста при 10 и 37 °С, следовательно, равна 1,00. Для клеток из крупных колоний, выросших из облученного материала, относительная эффективность роста при этих температурах равна 1,00–0,90. А для клеток из мелких колоний относительная эффективность роста при суб- и супероптимальных температурах равна в среднем 0,27–0,25, причем встречаются колонии с относительной эффективностью роста, равной 0,10 и даже 0,01.

О чем свидетельствуют эти результаты? Напомним, что на основании экспоненциальности кривых выживания клеток из некоторых мелких колоний, выросших из облученного материала при 30 °С, мы пришли к выводу, что все клетки, входящие в состав таких колоний, должны содержать число повреждений, близкое к критическому при 30 °С. Отсюда можно было ожидать, что эффективность роста таких клеток при 37 °С будет либо равна нулю (если количество содержащихся в них повреждений превышает число, критическое при 37 °С), либо будет равна эффективности роста при 30 °С (если их число меньше критического при 37 °С), т.е. относительная эффективность роста при 37 °С для одних колоний должна равняться нулю, а для других – единице (0,00 и 1,00 соответственно). В действительности же мы наблюдали весьма

широкое распределение относительной эффективности роста клеток из разных мелких колоний – от 1,00 до 0,10 и даже до 0,01, что прямо противоречит этому следствию из сформулированной ранее гипотезы [2].

Исходя из той же гипотезы, следует ожидать, что жизнеспособные клетки из мелких колоний, выросших при 37 °С, должны выживать и при 30 °С и, следовательно, относительная эффективность роста таких клеток для 37 °С также равна 1,00. По нашим данным, однако, относительная эффективность роста при 37 °С для клеток из таких колоний равна 0,41. Напомним, что для мелких колоний, выросших при 30 °С, эта величина равна 0,27. Значит, в мелких колониях, образовавшихся и при 30, и при 37 °С, наряду с инактивированными клетками (летальные секторы) содержатся клетки; жизнеспособные при 30 и нежизнеспособные при 37 °С, хотя во втором случае таких клеток относительно меньше. Это может означать, что мелкие колонии состоят из клеток, которые содержат не одинаковое, а разное число повреждений, причем колонии, развившиеся при 37 °С, содержат больше клеток с относительно малым числом повреждений, чем колонии, выросшие при 30 °С.

При изучении размножения клеток, взятых из мелких колоний, выяснилось, что в них наряду с клетками, погибающими без деления, и клетками, образующими макроколонию, имеются клетки, погибающие после одного, двух или нескольких циклов почкования. Колонии, вырастающие из жизнеспособных клеток, часто были разных размеров. Все это напоминало картину, наблюдающуюся после посева облученных клеток. Следовательно, мелкие колонии содержат клетки, различающиеся не только по радиочувствительности и по чувствительности к температуре, но и образующие разные формы инактивации. А ведь согласно нашей гипотезе, мелкие колонии должны состоять из клеток, содержащих субкритическое (т.е. нелетальное) число повреждений. Конечно, можно допустить, что в процессе формирования такой колонии повреждения из одних клеток могут элиминироваться, а в других – накапливаться, что и приводит к тому, что в одной и той же колонии содержатся клетки с разным числом повреждений. Однако это допущение, объясняющее накопление в колонии летальных секторов и зависимость эффективности роста от температуры, делает совершенно непонятным факт экспоненциальности кривых выживания для клеток из многих мелких колоний. Кроме того, из этого допущения следует, что некоторые клетки с большим числом повреждений благодаря их элиминации могут формировать колонии, тогда как другие клетки, несущие меньшее число повреждений, будут испытывать инактивацию. А это положение, как нетрудно видеть, противоречит всей системе представлений, объясняющей результаты экспериментов, описанных выше и в предыдущих сообщениях [1, 2]. Напомним, что согласно этим представлениям каждый радиобиологический эффект строго детерминированно определяется числом повреждений, полученных клеткой при облучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные данные, изложенные в этой работе и предыдущих сообщениях [1, 2], позволяют более всесторонне обсудить границы применения принципа попадания и мишени к трактовке лучевого поражения клеток, чем традиционный анализ одних только форм кривых выживания.

Количественный анализ зависимости от дозы облучения выживания и эффекта дорастания у дрожжей разных штаммов и плоидности позволил для объяснения наблюдаемых закономерностей принять простую гипотезу, согласно которой эти радиобиологические реакции обусловлены определенным числом однотипных повреждений, возникающих в клетке при облучении [1]. Анализ зависимости проявления радиобиологических реакций от условий пострадиационного культивирования привел к дополнению этой гипотезы положением о том, что критическое число повреждений, ответственных за тот или иной эффект, зависит от этих условий и, в частности, уменьшается при отклонении таких условий от оптимальных [2]. Далее, результаты определения зависимости соотношения форм инактивации от дозы облучения заставили усложнить эту гипотезу и предположить, что в клетке имеется много разных мишеней (структур), для поражения каждой из которых необходимо разное число повреждений, а каждый радиобиологический эффект обусловлен сложной комбинацией пораженных и непораженных мишеней [2]. Если эту гипотезу дополнить положением о том, что диплоидные клетки могут с одинаковой эффективностью восстанавливаться от повреждений разных типов [9–11], то мы получим систему представлений, удовлетворительно описывающую качественные особенности упомянутых выше реакций дрожжевых клеток на облучение.

Эта система представлений из-за своей сложности практически исключает возможность количественного анализа радиобиологических реакций и особенно их математического моделирования. Эти представления, однако, позволили сделать предсказания относительно некоторых важных свойств клеток, входящих в состав колоний, вырастающих из облученного материала: можно было предположить, что все клетки, входящие в состав той или иной выросшей колонии, содержат одинаковое количество повреждений (унаследованных от облученной клетки), число которых меньше критического. Экспериментальная проверка этого предположения (которой и посвящена данная работа) показала, что оно не согласуется с действительным положением вещей: колонии, вырастающие из облученного материала, содержали клетки, реакции которых на облучение и на температуру культивирования невозможно было объяснить в рамках развитых представлений. Следовательно, представления, согласно которым разные реакции клеток на облучение *однозначно* связаны с определенным числом повреждений соответствующих мишеней, не могут быть использованы для объяснения всей совокупности результатов радиобиологических экспериментов. Чтобы получить такое объяснение, придется, по-видимому, дополнить классический принцип попадания и мишени постулатом о вероятностной природе связи между осуществлением событий попадания и формированием той или иной реакции клетки на облучение.

Авторы благодарят И.Г. Дика за помощь в проведении некоторых экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 267.
2. Капутьцевич Ю.Г., Петин В.Г., Корогодин В.И., Близник К.М. // Там же. № 3. С. 408.

3. Корогодин В.И. // Биофизика. 1957. Т. 2, № 2. С. 178.
4. Корогодин В.И. // Биофизика. 1958. Т. 3, № 2. С. 206.
5. Корогодин В.И., Лю Ай-шень // Цитология. 1959. Т. 1, № 4. С. 379.
6. Тобиас К. // Радиобиология. М.: Изд-во иностр. лит., 1955. С. 364.
7. Корогодин В.И., Карабаев Э.М. // Радиобиология. 1962. Т. 2, № 6. С. 824.
8. Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 2. С. 367.
9. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
10. Корогодин В.И., Малиновский О.В., Порядкова Н.А., Изможерев Н.А. // Цитология. 1959. Т. 1, № 3. С. 306.
11. Капульцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 6. С. 913.

ANALYSIS OF RADIOBIOLOGICAL REACTIONS OF YEAST CELLS 3. CHARACTERISTICS OF MACROCOLONIES FORMED BY IRRADIATED YEAST CELLS

*Yu. G. Kapultsevich, K. M. Bliznik, V. I. Korogodin,
V. G. Petin, N. M. Kabakova*

Characteristics of macrocolonies formed by irradiated yeast cells were studied. The distribution of colony diameters was shown to be consistent with the supposition that large colonies are formed by cells with low number of damages while small colonies are formed by cells with high number of damages (but lower than the critical number). It was revealed that small colonies contain cells that could produce inactivation forms without irradiation. The radiosensitivity and sensitivity to cultivation temperature of these cells were essentially different. Decreased growth effectiveness of cells from small colonies implies that they contain a different number of damages even if they are from the same colony. It allows making a conclusion that representations according to different cell responses to irradiation are strictly determined by a certain number of hits to corresponding targets could not be useful for explanation of all results of radiobiological experiments.

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ВЕРОЯТНОСТНОЙ МОДЕЛИ РАДИАЦИОННОЙ ИНАКТИВАЦИИ КЛЕТОК ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ КРИВЫМ ВЫЖИВАНИЯ

Кривые выживания одноклеточных организмов и клеток высших растений и животных при действии ионизирующих излучений принято изображать в полулогарифмическом масштабе (рис. 1), что позволяет легко находить значения коэффициентов эмпирического уравнения

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n, \quad (1)$$

обычно используемого для описания таких кривых, где S – выживаемость; D – доза облучения; n и D_0 – коэффициенты, называемые экстраполяционным числом и среднелетальной дозой. Известны, однако, трудности интерпретации физического смысла коэффициентов n и D_0 [1]. Поэтому формулу (1) следует рассматривать только как математическое выражение, удобное для описания кривой выживания. Кроме того, использование уравнения (1) не позволяет в единых терминах описывать помимо кривых выживания такие важные показатели реакций клеток на облучение, как разнообразие форм

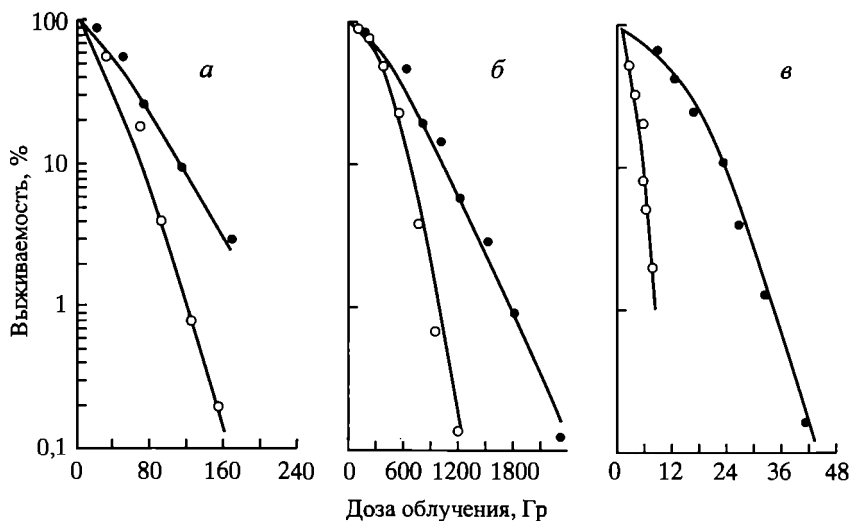


Рис. 1. Кривые выживания бактерий (а), дрожжей (б) и клеток млекопитающих в культуре (в)

Экспериментальные данные заимствованы из источников, приведенных в табл. 2; кривые построены согласно уравнению (2)

инактивации и наличие летальных секторов, проявляющихся макроскопически в виде эффекта дорастания [2].

Трудности эти в значительной мере преодолены в работе Капульцевича [3], предложившего вероятностную модель лучевой инактивации клеток. Согласно этой модели выживаемость облученных клеток

$$S = \sum_{i=0}^k e^{-bD} \frac{(bD)^i}{i!} \left\{ 1 - \left[\frac{1 - (1 - \alpha)^i}{(1 - \alpha)^i} \right]^2 \right\}, \quad (2)$$

где D – доза облучения; b – вероятность формирования одного элементарного повреждения на единицу дозы; α – вероятность «отказа» (т.е. неосуществления очередного деления облученной клетки или ее потомков) на одно элементарное повреждение; k – число повреждений на клетку, при котором $(1 - \alpha)^k > 0,5 \gg (1 - \alpha)^{k+1}$. Показатель степени «2» отражает тот факт, что репродуктивная гибель облученных клеток происходит, как правило, после осуществления хотя бы одного деления. Следствием вероятностной модели является, во-первых, наличие разных форм инактивации и летальных секторов, а во-вторых, строгая связь между соотношением форм инактивации и величиной эффекта дорастания, с одной стороны, и формой кривой выживания – с другой.

Очевидна большая информативная ценность интерпретации кривых выживания клеток в терминах вероятностной модели (2) по сравнению с классической интерпретацией (1): наряду с оценкой радиочувствительности клеток это позволяет оценивать разнообразие присущих им форм инактивации, выход летальных секторов и величину эффекта дорастания [3]. Однако нахождение значений параметров α и b вероятностной модели (2) по экспериментальным данным сопряжено с рядом трудностей. В случае дрожжевых клеток, для которых методически легко определять соотношение разных

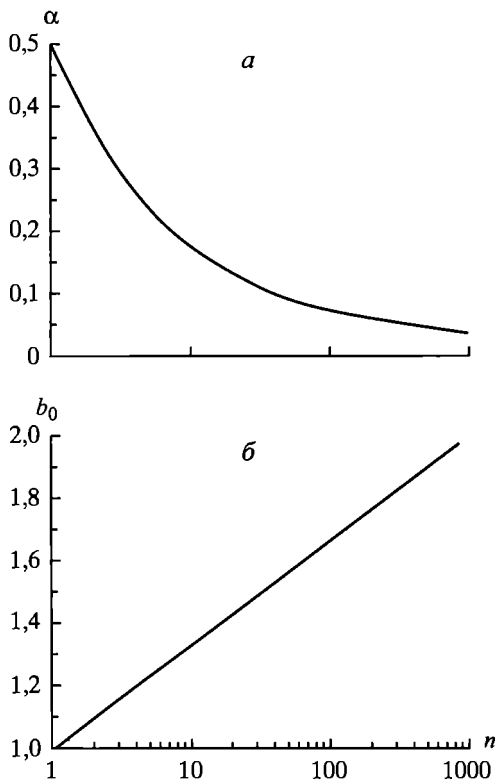


Рис. 2. Расчетные кривые изменения параметров α (а) и b_0 (б) в зависимости от значения n

форм инаktivации [2], эти трудности преодолеваются следующим образом: по соотношению форм инаktivации находят значение α , а затем, зная D_0 , рассчитывают величину b [3].

Однако для объектов, где учет разных форм инаktivации затруднен или невозможен (бактерии, клетки млекопитающих в культуре), этот метод непригоден. В случае экспоненциальных кривых выживания ($n = 1$) $b = D_0^{-1}$, а $\alpha \geq 0,5$. Следовательно, пользуясь только экспериментальными кривыми выживания, здесь можно достаточно точно определять значения b и граничные значения α .

В тех случаях, когда $n > 1$, трудности в оценке параметров α и b только по экспериментальным кривым выживания связаны со следующими обстоятельствами. Во-первых, для кривых выживания, описываемых

формулой (2), экстраполяционное число n не определено ($n \rightarrow \infty$ при $D \rightarrow \infty$); во-вторых, конечный наклон D_0^{-1} кривой выживания, описываемой этой формулой, становится равным b лишь при $D \rightarrow \infty$, т.е. может быть найден

Таблица 1

Значения $S_i(\alpha) = 1 - \left[\frac{1 - (1 - \alpha)^i}{(1 - \alpha)^i} \right]^2$ для некоторых величин параметра α

α	i						
	0	1	2	3	4	5	6
0,050	1	0,997	0,988	0,972	0,948	0,915	0,870
0,075	1	0,993	0,979	0,931	0,866	0,773	0,644
0,100	1	0,988	0,945	0,862	0,725	0,519	0,222
0,125	1	0,980	0,906	0,757	0,502	0,098	0
0,150	1	0,970	0,853	0,605	0,162	0	0
0,175	1	0,955	0,780	0,390	0	0	0
0,200	1	0,938	0,634	0,092	0	0	0
0,250	1	0,889	0,395	0	0	0	0
0,300	1	0,812	0	0	0	0	0
0,350	1	0,710	0	0	0	0	0
0,400	1	0,556	0	0	0	0	0
0,450	1	0,331	0	0	0	0	0
0,500	1	0	0	0	0	0	0

лишь при столь низких значениях выживаемости, которые невозможно определить в эксперименте. Эти затруднения, однако, можно преодолеть следующим образом.

Путем расчетов нами найдено, что между параметром α и экстраполяционным числом n имеется соотношение, которое описывается эмпирической формулой

$$\alpha = 0,4n^{-0,6} + 0,1n^{-0,15} \quad (3)$$

и графический вид которого приведен на рис. 2, а. Пользуясь этим рисунком или формулой (3), по известному значению n можно рассчитать значение α .

Для определения параметра b также можно воспользоваться эмпирической формулой

$$b = b_0(n)D_0^{-1}, \quad (4)$$

где $b_0(n)$ описывается уравнением

$$b_0 = 1 + 0,148 \ln n, \quad (5)$$

графический вид которого приведен на рис. 2, б.

Соотношения (3) и (5) являются приближенными и позволяют определять значения α и b с точностью, достаточной для удовлетворительного описания кривых выживания в диапазоне выживаемостей и экстраполяционных чисел, с которыми обычно имеют дело в эксперименте ($S \geq 10^{-4}$, $n = 1-1000$). Следует отметить, что основной вклад в погрешность вычисления α и b вносит ошибка в определении n и D_0 по экспериментальным данным.

Для облегчения построения кривых выживания в соответствии с (2) по найденным значениям α и b можно воспользоваться табл. 1, в которой при-

α	i						
	7	8	9	10	11	12	13
0,050	0,813	0,742	0,656	0,551	0,425	0,276	0,101
0,075	0,473	0,250	0	0	0	0	0
0,100	0	0	0	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0	0	0	0
0,150	0	0	0	0	0	0	0
0,175	0	0	0	0	0	0	0
0,200	0	0	0	0	0	0	0
0,250	0	0	0	0	0	0	0
0,300	0	0	0	0	0	0	0
0,350	0	0	0	0	0	0	0
0,400	0	0	0	0	0	0	0
0,450	0	0	0	0	0	0	0
0,500	0	0	0	0	0	0	0

Оценочные значения параметров α и b вероятностной модели для разных биологических объектов. Значения n и D_0 заимствованы из разных источников

Объект	Излучение	Эмпирический коэффициент		Параметр вероятностной модели		Литература
		n	D_0 , Гр	α	b , Гр ⁻¹	
Бактерии						
<i>E. coli</i> В	Рентгеновское	4,5	19,6	0,24	0,062	[4]
<i>E. coli</i> B _{S-1}	Гамма	3,0	34,7	0,29	0,034	[4]
Дрожжи						
<i>S. ellipsoideus</i> Мэгри 139-В	Гамма	35,0	122,1	0,11	0,0125	[3]
<i>S. cerevisiae</i> 28-73-1В	–	3,0	315,0	0,29	0,0037	Данные наст. работы
Клетки млекопитающих						
человек, HeLa	Рентгеновское	2,7	1,47	0,31	0,78	[1]
китайский хомьяк, V79	–	40,0	4,61	0,10	0,38	[5]

ведены рассчитанные нами значения

$$S_i(\alpha) = 1 - \left[\frac{1 - (1 - \alpha)^i}{(1 - \alpha)^i} \right]^2 \quad (6)$$

для α от 0,05 до 0,50, что соответствует значениям n примерно от 1000 до 1. В табл. 2 приведены полученные описанным способом оценочные значения α и b для нескольких биологических объектов. Кривые выживания, построенные по этим значениям α и b , изображены на рис. 1; видно хорошее соответствие этих кривых экспериментальным данным. В случае дрожжевых клеток значения α и b , полученные нашим методом, близки к тем, которые рассчитаны Капульцевичем [3] при использовании метода учета соотношения разных форм инактивации.

Можно надеяться, что предложенный метод оценки параметров α и b вероятностной модели, описывающей радиочувствительность клеток, окажется полезным для сопоставления по этим показателям реакций на облучение разных биологических объектов – от бактерий до клеток млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Alper T.* Cellular radiobiology. Cambridge; London etc. Cambridge University Press, 1979.
2. *Корогодин В.И.* Проблемы пострadiационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
3. *Капульцевич Ю.Г.* Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.
4. *Мясник М. Н.* Генетический контроль радиочувствительности бактерий. М.: Атомиздат, 1974.
5. Жизнеспособность клеток, облученных в малых дозах: теоретические и клинические аспекты // Тр. 6-й Гревской конф., Лондон, 1974. М.: Медицина, 1980.

THE ESTIMATION OF THE PROBABILITY MODEL PARAMETERS
FOR RADIATION INACTIVATION OF CELLS
USING THE EXPERIMENTAL SURVIVAL CURVES

K.G. Amirtaev, V.I. Korogodin, P.N. Lobachevsky

A simple method is proposed for estimation of α and b parameters of the probability model of radiation inactivation of cells with a reference to the experimental survival curves. The examples of such estimation for bacteria, yeast, and mammalian cells have been considered.

1.4 ЭФФЕКТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК

CELLULAR REPAIR PROCESSES: SURVIVAL OF IRRADIATED YEAST, BACTERIA AND PHAGES UNDER DIFFERENT POSTRADIATION CONDITIONS

INTRODUCTION

The ability of cells to recover from lesions is not in need of any proof. However, the term «recovery» is often used to describe quite different phenomena. Thus, by recovery are explained the reduction of dose effect at its fractionation, the increase of survival or decrease of mutation yields as a result of the retardation of multiplication in irradiated cells, and differences in the survival of bacteria incubated under various conditions after irradiation. Sometimes various radiosensitivity of some bacteria strains is connected with recovery. Finally, the increase of bacteriophage survival during the cultivation of certain strains on bacteria is referred to as «host cell recovery» (host cell reactivation, HCR) [1–4].

The list of phenomena interpreted as recovery can be considerably increased. Indeed, in recent years there has been a tendency to explain by recovery almost all cases in which any changes in irradiation procedure or postirradiation cell cultivation lead to the reduction of dose effect in comparison with some standard conditions, while the intensification of dose effect is explained by «inhibition of recovery». However, the above-mentioned examples are enough to formulate two questions: (1) Are all cases of changes of dose effect caused by various agents after irradiation connected with recovery? (2) Do various forms of recovery manifestation have common mechanisms?

It is evident that attempts to answer these questions can be based only on a thorough knowledge of at least one form of recovery. It is also necessary to have criteria allowing us to reveal and evaluate quantitatively the role of any form of recovery in the modification of dose effect under the influence of various agents. In this article some data obtained by us in this direction in experiments on yeast, bacteria, and phages are presented.

1. EXPERIMENTS WITH YEAST

A. SOME FEATURES OF THE RECOVERY OF IRRADIATED YEAST IN WATER

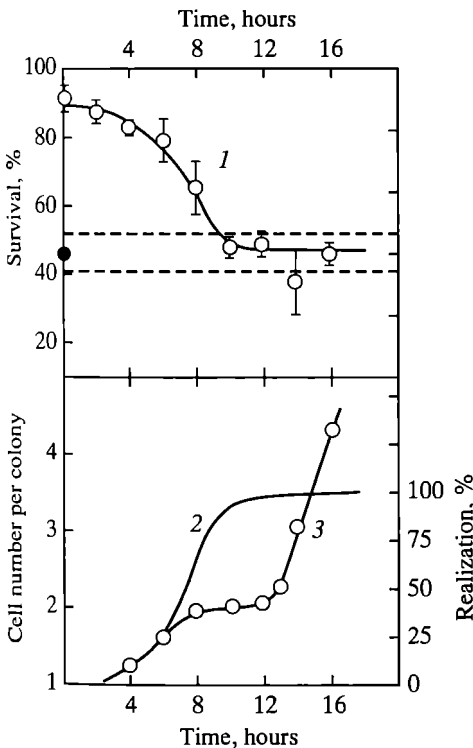
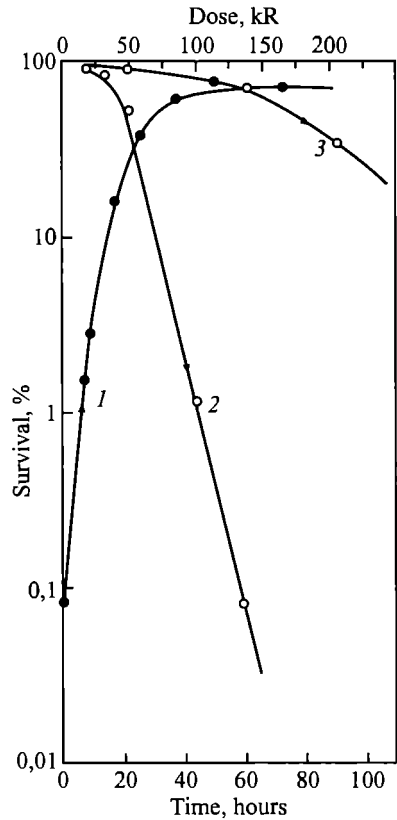
In our laboratory the most thoroughly investigated is the form of yeast recovery that manifests itself in the increase of survival if irradiated cells are preserved in buffer solution or tap water before the inoculation of culture medium [2]. Thus, if diploid yeast *Sacharomyces vini* Megri 139-B, is irradiated by γ -quanta with

Fig. 1. Yeast recovery in water

1 - Recovery curve; 2 - survival curve for cells sown on nutrient medium immediately after irradiation; 3 - the same, but after 3-days recovery in water

a dose of 125–130 kR and, immediately after that, inoculated on solid medium containing 4° Ball. of wort, the survival is 0.07–0.10%. If before inoculation this yeast is preserved in water at 30 °C its survival increases and after 48–72 hours reaches 60–70% (Fig. 1, curve 1). As shown by curves for yeast survival determined just after irradiation and after 48–72 hours of recovery in water (curves 2 and 3, respectively) the manifestation of such recovery does not depend on the dose and leads to the decrease of effectiveness by approximately four times [dose reduction factor (DRF) \approx 4].

The analysis of yeast recovery kinetics after various doses of irradiation, as well as the analysis of correlations of inactivation form, the dependence of recovery on temperature, preliminary «cultivation» of cells, and other factors allowed us to outline the following features of this process [2]:



(1) At yeast recovery in water there occurs an equiprobabilistic and independent elimination of discrete elementary lesions - aftereffects of separate hitting events. The recovery process is described by the equation

$$D_t = D_0 [k + (1 - k)e^{-\beta t}]$$

where D_0 is the irradiation dose, proportional to average number of hits per cell; D_t is the effective dose after t hours of recovery; β is the probability of elimination of one lesion per time unit (1 hour); and k is the «irreversible component» of radiation lesion.

(2) The presence of the coefficient k means that not all the lesions occurring in cells upon irradiation are reversible. Some of these lesions (equal to kD_0) are

Fig. 2. Realization of potential lesions in irradiated yeast cells on nutrient medium

1 - The loss of recoverability ($S_0 = 47\%$); 2 - realization of potential lesions; 3 - yeast multiplication

irreversible, and the cells can not recover from them even if they are incubated in water for a long time (Fig. 1, curve 1).

(3) Irradiated cells retain the ability to recover from reversible lesions only until nuclear division takes place. Only during nuclear division can reversible lesions produce irreversible lesions in cells – «realization of potential lesions» takes place. This is shown in Fig. 2 in which curve 1 describes the loss of ability to recover in irradiated yeast during its incubation on culture medium; curve 2 shows the realization of potential lesions; and curve 3 the dynamics of yeast multiplication [5]. It appears that the realization process begins together with the first budding and terminates before the second budding of irradiated cells.

One can assume that the recovery that takes place in irradiated yeast in water also occurs during its inoculation on culture medium immediately upon irradiation. Various conditions of cultivation can influence the effectiveness of such recovery in different ways and, consequently, the survival of irradiated cells. In this case, however, differences in survival of irradiated cells under various conditions of cultivation should disappear if cells are placed under corresponding conditions not immediately upon irradiation but (1) after preliminary «complete» recovery in water (when only irreversible lesions remain), or (2) after realization of potential lesions (when all reversible lesions became irreversible).

Let us now consider two examples of the effect of cultivation conditions on survival of irradiated yeast and try to decide in what way each of them is connected with the type of recovery that occurs in nonculture medium.

B. EFFECT OF VARIOUS GROWTH CONDITIONS ON THE SURVIVAL OF IRRADIATED YEAST

If yeast is cultivated just after γ -irradiation at 30 °C on media containing 4° Ball. of wort (medium A) or 1° Ball. of wort (medium B), its survival is higher on medium B than on medium A (Fig. 3, curves 1 and 2).

Let us assume that this effect of the medium is connected only with recovery, i.e., that on medium B recovery is more complete than on medium A. In this case it appears that if irradiated yeast is cultivated on media A or B after preliminary recovery in water its survival will be the same. Indeed, in this kind of experiment differences in survival of yeast cells on media A and B disappear (Fig. 3, curve 3). Curve 4 of Fig. 3 shows the survival of irradiated yeast on medium B after recovery that should be expected if the effect of medium were not connected with this process.

Let us now consider another experimental procedure. If yeast is irradiated by a dose of 110 kR its survival on medium A is 0.5%, and on medium B 4%. If yeast is inoculated immediately after irradiation on medium A and, at various intervals, transferred to medium B, or vice versa, changes of its survival will be described by curves 1 and 2 of Fig. 4. Here also, curves 3 and 4 show the dynamics of multiplication of irradiated yeast on media A and B. It is seen that on medium A yeast begins to bud and multiply more readily than on medium B. The effect of the transfer A → B disappears after 10–11 hours of incubation of cells on medium A just before the beginning of second budding, i.e., together with the termination of realization of potential lesions. The effect of the transfer B → A disappears after 17–18 hours just before the beginning of second budding on medium B. Thus, the

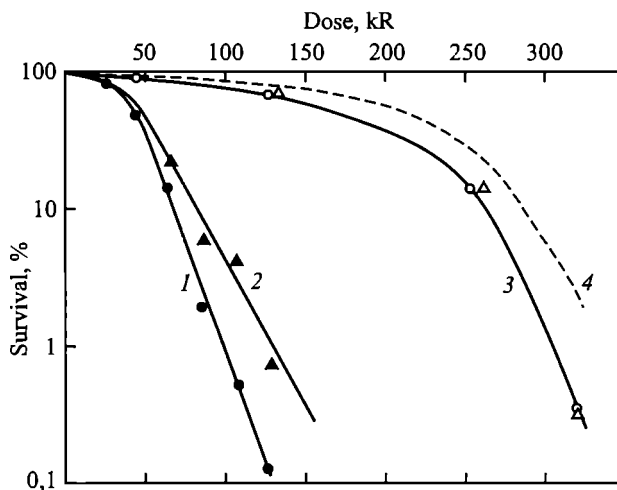


Fig. 3. Survival yeast cells on the media differing in wort content
 1 and 2 – Immediately following the irradiation; 3 – after 3 days recovery in water; 1 and 3 – 4° Ball. of wort; 2 and 3 – 1° Ball. of wort; 4 – a theoretical survival curve of «recovered» cells on 1° Ball. of wort medium, if the effect exerted by the medium is not due to recovery

results of the experiments correlate well with the assumption that differences in survival of irradiated yeast on media A and B are connected with recovery.

The fact that the realization of potential lesions on medium B occurs 5–6 hours later than on medium A means that the cells on medium B have 5–6 hours more at their disposal for recovery than on medium A. Curve 5 of Fig. 4 describes the kinetics of yeast recovery in water with the subsequent inoculation on medium A. It appears that 5–6 hours of such recovery is enough for yeast survival to reach the level which is observed on its inoculation on medium B immediately after irradiation. The effect of various concentrations of wort in medium on yeast survival can be explained in the following way: (1) irradiated yeast cultivated on culture media undergo a partial recovery from radiation lesions; (2) the recovery rate on culture media

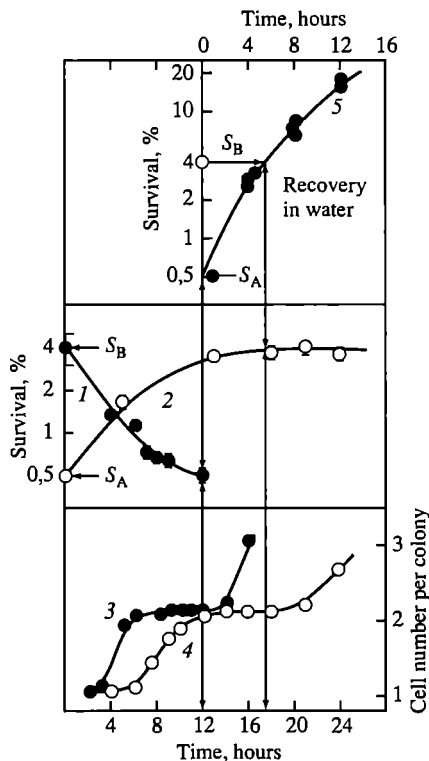


Fig. 4. The mechanism of wort content action on the survival of irradiated yeast cells; medium A, 4° Ball. of wort; medium B, 1° Ball. of wort

1 – Dependence of irradiated yeast survival on the time of transfer from the medium A to B; 2 – the same for reciprocal transfer; 3 – multiplication of irradiated yeast on the medium A; 4 – the same for medium B; 5 – recovery curve for yeast in water with subsequent transfer to medium A

is the same as in tap water and; (3) the period of realization of potential lesions depends on concentration of culture substrate in the medium.

Knowing the recovery rate of cells on culture medium and the period of realization of potential lesions after various radiation doses, one can calculate the «net» survival curve not modified by postirradiation recovery. Unfortunately, the exposition of results of such calculations is beyond the scope of this article. Now we are only interested in the fact that certain conditions of cultivation of irradiated cells exist under which the modification of the dose effect is connected with the same type of postirradiation recovery that takes place when cells are preserved in water.

C. EFFECT OF TEMPERATURE OF POSTIRRADIATION CULTIVATION ON THE SURVIVAL OF IRRADIATED YEAST

Not only the presence of wort in the medium but temperature of postirradiation cultivation as well affect the survival of irradiated yeast. If yeast is grown on a medium with 4° Ball. of wort at 30 °C immediately after irradiation, its survival will be higher than if it is grown at 10 °C (Fig. 5, curves 1 and 2).

If this effect of temperature is connected with recovery, one can expect that the cell cultivation at 30° and 10 °C after their preliminary «complete» recovery in water will not in any way affect their survival. In reality, however, it is different: survival of «recovered» cells at 30 °C (Fig. 5, curve 3) is higher than at 10°C (curve 4), and in the second case it is almost the same that could be expected if the temperature effect had no relation to recovery (curve 5).

The latter conclusion can be right only if the temperature change affects the time of realization of potential lesions (i.e., yeast multiplication rate) as well as recovery rate. Indeed, as shown in Fig. 6, yeast multiplication as well as its recovery in water at 10 °C is one seventh as fast as at 30 °C¹.

Table 1

The Amount of Growth of Unirradiated Yeast Cells at 30° and at 10 °C and of Cells from the Colonies Formed of Irradiated Material at 30 °C

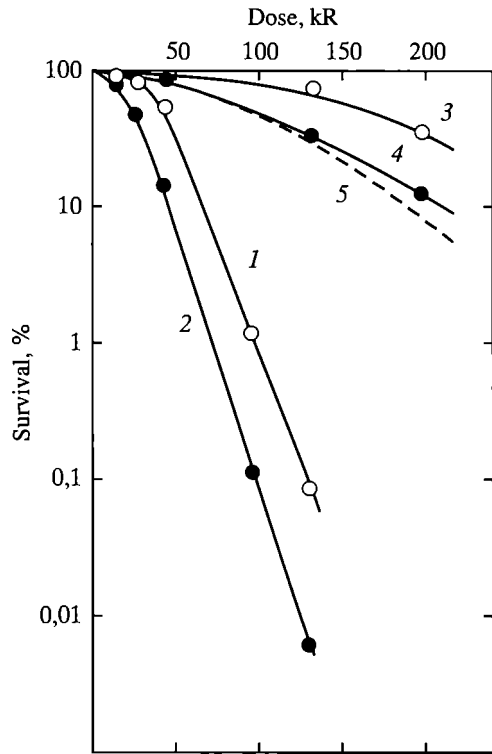
<i>t</i> (°C)	Unirradiated cells ^{a,b}	Cells from the colonies formed of irradiated material	
		Large colonies ^{a,c}	Small colonies ^{a,d}
30	$\frac{2767}{24} = 115$	$\frac{875}{5} = 175$	$\frac{749}{4} = 178$
10	$\frac{2159}{19} = 114$	$\frac{794}{5} = 159$	$\frac{341}{4} = 85$

^aNumerator: the number of colonies. Denominator: the number of plates. ^b P > 0.05. ^c 0.01 < P < 0.05. ^d P < 0.001.

¹ Data on temperature effect on yeast recovery in water are borrowed from the work of E.M. Karabayev and S.Ya. Kholeva [6] done in our laboratory.

Fig. 5. Survival curves of irradiated yeasts at different postradiation growth temperatures

1 and 2 – Immediately following the irradiation; 3 and 4 – after 3-days recovery in water; 1 and 3 – growth at 30 °C; 2 and 4 – growth at 10 °C; 5 – a theoretical survival curve of recovered cells at 10 °C, if the effect exerted by the temperature is not due to recovery



Let us see how the temperature changes in various periods of postirradiation incubation affect yeast survival. Figure 7 shows the results of such experiments following yeast irradiation with a dose of 65 kR. Curves of yeast multiplication at 10° and 30 °C are also presented. Time-effect curves for the change of incubation temperature differ considerably from similar curves for changes of culture medium (Fig. 4). First, short yeast incubation at 30° and 10 °C does not decrease, and even increases, the effect of temperature change. Second, and most important, the temperature change continues to affect yeast survival even after the termination of realization of potential lesions [the termination of realization (R) is shown by the arrows].

This effect of temperature on survival of irradiated yeast can be connected with the fact that even those radiation lesions that are not lethal to yeast at 30°C become lethal at 10°C. Consequently, one can expect that some colonies grown from irradiated yeast at 30°C contain cells unable to grow at 10°C. Experiments confirmed this assumption. Table 1 shows that the effectiveness of growth of non-irradiated cells at 30° and 10 °C is the same. The same is observed at 30° and 10 °C with cells taken from large colonies grown during 96 hours at 30 °C from

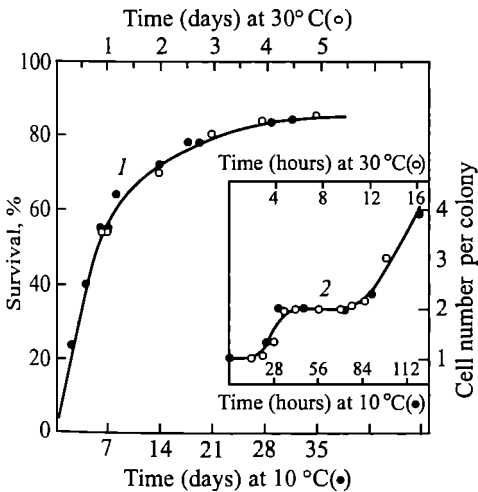


Fig. 6. Yeast recovery in water (curve 1) and growth on nutrient medium (curve 2) at different postirradiation temperatures. The upper scale, incubation time at 30 °C; the lower scale, incubation time at 10 °C

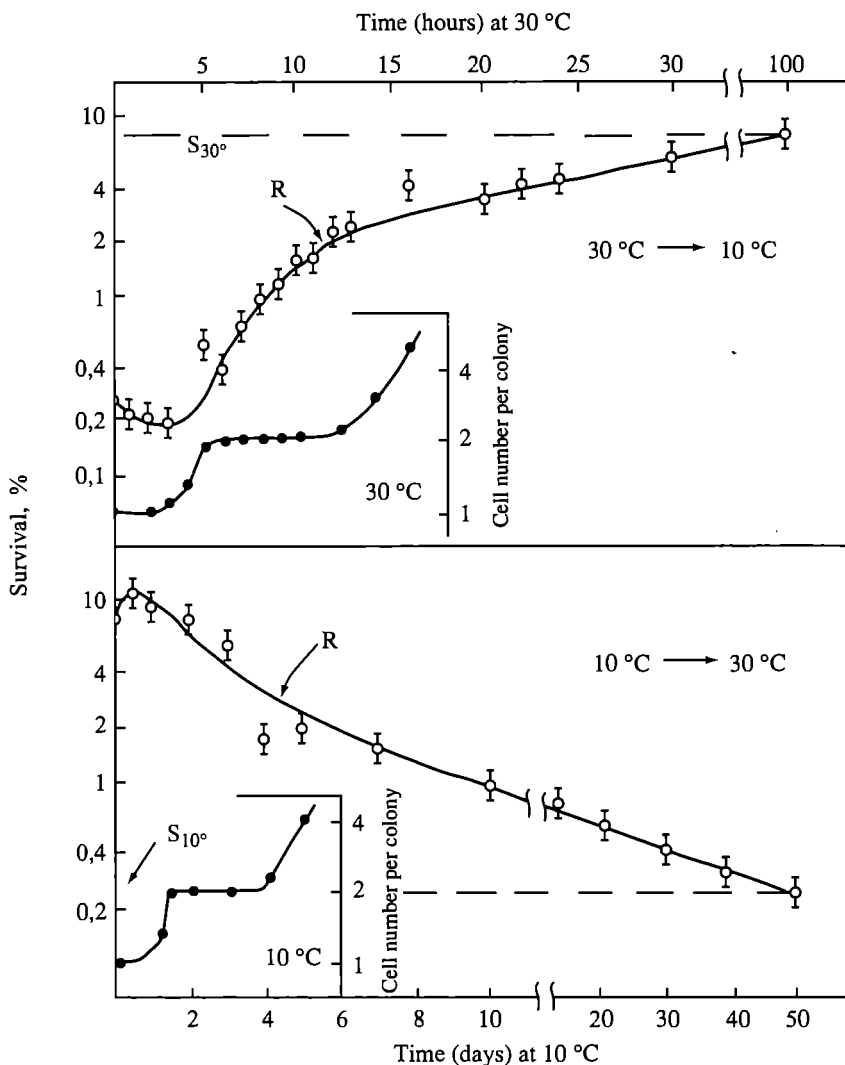


Fig. 7. Effect of time of postradiation temperature alteration on the survival of yeast
 Upper figure, transfer from 30 to 10°C; lower figure, from 10 to 30 °C. Closed circles, multiplication of irradiated yeast at 30 and 10 °C; R, term of realization of potential lesions

yeast irradiated with a dose of 130 kR. However, for cells taken from smaller colonies grown in the same Petri dishes the effectiveness of growth at 10°C is two times lower than at 30 °C.

We do not know the nature of radiation lesions causing additional destruction of yeast at 10 °C incubation. Probably there are «targets» in cells, the lesions of which are lethal only at this temperature, or that in this case radiation lesions disturbing the mechanism of cell adaptation appear. In this article we are only interested in the fact that there is a category of cultivation conditions under which changes of survival of irradiated cells are not connected with the effect of these conditions on realization of postradiation recovery.

D. RESULTS OF EXPERIMENTS WITH YEAST

Thus, the cultivation regime for irradiated cells can affect their survival at least in two ways: (1) by the modification of postirradiation recovery and (2) as a result of various degrees of lethal action of radiation lesions. In the latter case cultivation conditions become a selection factor as a result of which appear certain differences among cell progeny surviving under various conditions.

In experiments on yeast we could distinguish between these two categories of cultivation conditions since postirradiation recovery of these organisms in water, in which the recovery effect appears as if in a «pure form», was thoroughly investigated. However, this approach is not applicable to all objects of radiobiological investigations. If experiments with yeast have given answers to some questions posed at the beginning of this work, experiments with bacteria and phages have led us only to the formulation of new questions.

2. EXPERIMENTS WITH BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* B

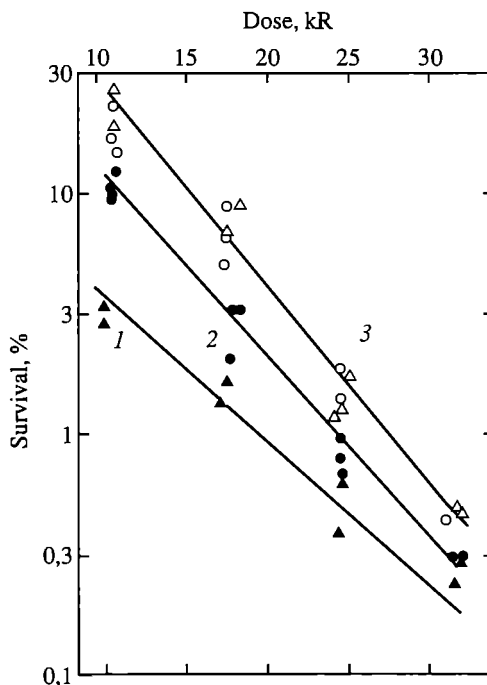
A. RELATIONSHIP BETWEEN SURVIVAL OF IRRADIATED BACTERIA CULTIVATED UNDER DIFFERENT GROWTH CONDITIONS AND THE EFFECT OF THESE CONDITIONS ON COLONY-FORMING ABILITY OF NONIRRADIATED CELLS

Different survival of irradiated bacteria under various conditions has been long ago known, and this phenomenon was usually termed recovery [3, 4]. This phenomenon can be obtained, for instance, by cultivating irradiated bacteria *E. coli* B on meat agar (MA) and on a minimum medium M-9. If, prior to irradiation, cells are grown on wortagar (WA) (Fig. 8, curves 1 and 3) the effect is more pronounced than if they are grown on fish-bone-agar (FBA) (curves 2 and 3). However, unlike yeast which forms its colonies from nonirradiated cells in a similar way on all tested media and at various temperatures, the formation of colonies (plate efficiency) from nonirradiated bacteria *E. coli* B depends considerably on cultivation conditions.

Let us consider the latter case in detail. If the same number of nonirradiated bacteria are cultivated on different media or at different temperatures different numbers of colonies will grow. The dependence of effectiveness of bacteria growth on cultivation conditions can vary from experiment to experiment but

Fig. 8. Survival of *E. coli* B under different growth conditions

1 and 3 - Preirradiation growth on WA; 2 and 3 - the same on FBA; 1 and 2 - postirradiation growth on MPA; 3 - the same on M-9



The Amount of Growth of *E. coli* B under Different Growth Conditions

Growth conditions ^a	Relative colony number (%)	Relative favorability of the medium (RFM)
MPA, 37 °C	100	1.00
MPA + 0.5% sodium chloride, 37 °C	60–70	0.6–0.7
MPA, 45 °C	109–129	1.1–1.3
MPA + 2% glucose, 37 °C	65–106	0.7–1.1
M-9 + 0.1% glucose, 37 °C	109–140	1.1–1.4
M-9 + 0.4% glucose, 37 °C	102–154	1.0–1.5
A+0.1% glucose, 37 °C	116–127	1.2–1.3
A+0.4% glucose, 37 °C	108–148	1.1–1.5

^aMedium A is a saline medium somewhat differing from M-9 in composition.

is, in general, quite clearly expressed. It appears that any bacteria population is rather heterogeneous in relation to viability on various media. If the number of colonies grown from the given amount of inoculated bacteria on meat-peptone-agar (MPA) at 37 °C is taken as standard, the relative favorableness of medium (RFM) can be expressed as the ratio of the number of colonies grown on this medium to the number of colonies grown under standard conditions. Apparently, RFM of MPA at 37 °C is 1.00. Table 2 shows that RFM can be more as well as less than 1.00. In the general case, RFM does not correlate with the rate of bacteria multiplication under various cultivation conditions. Let us see how survival of irradiated bacteria depends on RFM for nonirradiated cells. Figure 9 shows some data obtained by us on bacteria irradiated by γ -rays in doses of

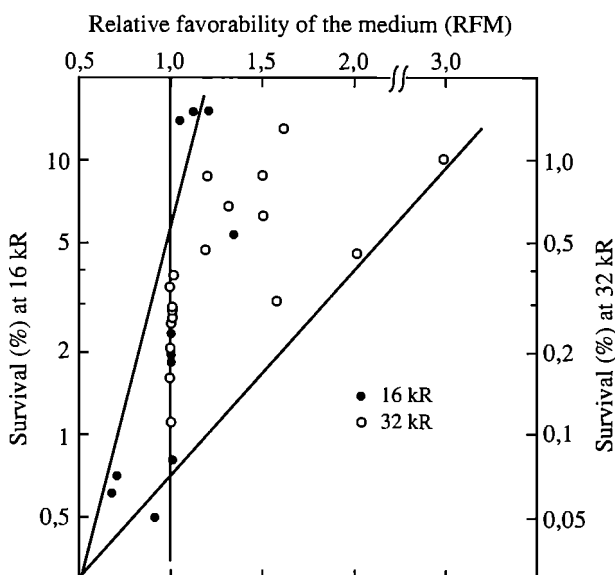


Fig. 9. Survival of irradiated *E. coli* B on media differing in favorability for nonirradiated cells

16 and 32 kR. It appears that survival of irradiated bacteria expressed as a percent of the controls is higher the greater the value of RFM. This phenomenon is very clearly expressed and is repeated from experiment to experiment: rank correlation coefficient for survival of irradiated cells and RFM $\rho^s = 0.97$. A similar phenomenon in the case of *E. coli* irradiation by UV-rays was reported earlier [4].

In some cases survival of irradiated cells on two media is the same despite the different effectiveness of growth observed in the controls. However, we never observed the survival of irradiated cells to be lower at RFM more than 1.00 than under standard conditions, or the reverse correlation – at RFM less comparing 1.00. Consequently, the manifestation of RFM for irradiated cells (RFM_{irr}) is either higher in comparison with the controls (RFM_C) or does not change

$$\text{RFM}_{irr} \geq \text{RFM}_C$$

B. DEPENDENCE ON THE SURVIVAL OF IRRADIATED CELLS ON RELATIVE FAVORABILITY OF MEDIUM

Despite good reproduction of the investigated phenomenon, Fig. 9 also shows that no clear quantitative relation between survival of irradiated bacteria and RFM is observed. According to our data the increase of medium effect following irradiation ($\text{RFM}_{irr}/\text{RFM}_C$ at $\text{RFM}_C > 1.00$ and $\text{RFM}_C/\text{RFM}_{irr}$ at $\text{RFM}_C < 1.00$) can be from 1 to 20. As shown in Table 3, this value depends on conditions of postirradiation bacteria cultivation, on conditions of cultivation before irradiation, on irradiation dose and, it appears, on a number of other factors.

It is quite probable that at 37 °C incubation there is a certain «top limit» of survival of irradiated cells, corresponding to their survival on M-9, which is difficult to surpass. If prior to irradiation bacteria are for a long time cultivated not on MPA or FBA but on MA, their survival on MPA will approach this limit and on M-9 will not change. The effectiveness of growth of nonirradiated and, especially, irradiated bacteria can be decreased in comparison with standard values on MPA at 37 °C by adding glucose or sodium chloride to MPA. It can be increased in comparison with M-9 if bacteria are grown on MPA at 45 °C. In all these cases, with an increase of irradiation dose differences between RFM_{irr} and RFM_C decrease and even disappear.

C. DISCUSSION OF RESULTS OF EXPERIMENTS WITH BACTERIA

We have already mentioned that dependence of survival of irradiated bacteria on cultivation conditions is assumed to be connected with recovery. However, the presence of close correlation between viability of irradiated bacteria and RFM_C allows us to give another explanation of the corresponding facts. Indeed, if RFM_C reflects the heterogeneity of nonirradiated bacteria in respect to cultivation conditions, irradiation can increase this heterogeneity which is reflected in the relationship $\text{RFM}_{irr} \geq \text{RFM}_C$. This can be connected with the fact that on irradiation bacteria can acquire lesions that are lethal only under certain cultivation condition [7]. In other words, a similar phenomenon can be observed here as in the case of the decrease of survival of irradiated yeast at 10°C incubation on culture medium as compared with 30°C.

Percent Survival and RFM for *E. coli* B after Different Doses of γ -Rays and under Different Pre- and Postirradiation Conditions

Preirradiation conditions	Dose, kr	Survival on different media		RFM _C	RFM _{irr}	K ^a	
		MPA, 37°C	M-9, 37°C				
MPA, 37 °C, 24 hours	32	0.20	0.06 ^b	0.65	0.17	3.8	
		–	1.5 ^c	1.15	8.6	7.5	
		–	4.0	1.25	25.0	20.0	
FBA, 37 °C, 24 hours	12	7.4	17.2	2.00	4.8	2.4	
		18	2.0	4.6	–	4.6	2.3
		24	0.6	0.6	–	2.0	1.0
WA, 37 °C, 24 hours	12	2.7	25.0	1.50	14.1	9.4	
		18	1.1	8.7	–	11.8	7.9
		24	0.6	1.2	–	3.0	2.0
FBA, 14 days storage at room temperature	18	3.5	8.5	1.20	2.9	2.4	
		24	1.1	1.8	–	2.0	1.7
		32	0.3	0.3	–	1.2	1.0
A series of MA passages at 37 °C	12	18.2	17.2	1.01	1.0	1.0	
		18	5.6	5.2	–	0.9	1.0
		24	1.3	1.2	–	0.9	1.0
Repeated experiments with MPA, 37 °C	18	3.7	4.6	1.00	1.24	1.2	
		2.9	6.8	1.32	3.0	2.3	
		4.5	5.3	1.90	2.2	1.2	
Repeated experiments with FBA, 37 °C	18	3.5	8.5	1.20	2.8	2.3	
		2.8	6.2	1.50	3.3	2.2	
		2.0	4.6	2.00	4.6	2.3	
Repeated experiments with WA, 37 °C	18	1.1	8.7	1.50	11.9	7.9	
		1.6	3.0	1.61	3.0	1.9	
		3.8	10.0	3.20	8.5	2.6	

^a K is obtained by division of the greater RFM value by the smaller one. ^b Postradiation growth on MPA+2% glucose, 37 °C. ^c Postradiation growth on MPA, 45 °C.

We are far from the notion that the data obtained by us subverts the hypothesis of recovery in relation to bacteria *E. coli* B. We would like only to point out that the existence of the relationship $RFM_{irr} \geq RFM_C$ allows us to suggest as an explanation of this phenomenon an alternative hypothesis of «selection» together with the hypothesis of «recovery». To our regret no experiments with bacteria were carried out that could help us choose between these two hypotheses for various cultivation conditions. However, if it turns out that dependence of survival of irradiated bacteria on such conditions is connected precisely with recovery, the data obtained by us will indicate that the mechanism of postirradiation recovery of bacteria differs considerably from that of yeast recovery.

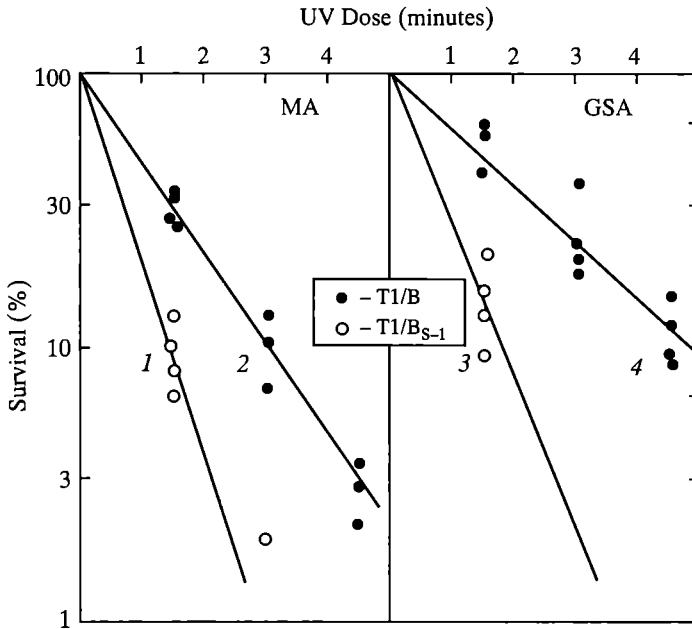


Fig. 10. Survival of UV-irradiated phages T1 under different postradiation conditions
 1 and 3 – Phages grown on *E. coli* B_{S-1}, 2 and 4 – the same on *E. coli* B; 1 and 2 – bacteria infected with irradiated phages grown on MA; 3 and 4 – the same on GSA

Indeed, if *E. coli* B can recover from radiation lesions, one can maintain that «repair systems» of these bacteria are rather labile, that the degree of development (or effectiveness of operation) of such systems depends on the dose value as well as on conditions of cell cultivation prior to or following irradiation. Besides, it will be possible to maintain that in bacteria the postirradiation recovery is more fully pronounced under those conditions that are more favorable for survival of non-irradiated cells as well. We think that further progress in the study of postirradiation recovery of bacteria will be closely connected with the clarification of the nature of this phenomenon.

3. EXPERIMENTS WITH BACTERIOPHAGE T1

A. RELATION BETWEEN RADIOSENSITIVITY OF UV-IRRADIATED PHAGE AND EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON HOST BACTERIA

Dependence of the manifestation of lethal consequences of irradiation on cultivation conditions is typical not only for yeast and bacteria but for phages as well. It is known that if UV-irradiated phages are grown on bacteria of two strains differing in sensitivity to this irradiation, survival of phages on bacteria of the UV-resistant strain will be higher. The resistance of bacteria to UV is usually connected with the presence of repair systems. The dependence of UV-sensitivity of phages on UV-sensitivity of host cells is explained by the ability of bacterial repair systems to recover phage DNA from UV lesions [3, 4].

The difference in survival curves of UV-irradiated phages T1 grown on *E. coli* of UV-resistant strain B and UV-sensitive strain B_{S-1} is shown in Fig. 10. This

Table 4

Interrelation between Survival of γ -Irradiated Phages T1, $\text{RFM}_{\text{phage}}$ and $\text{RFM}_{\text{bact}}^a$

Host cell	Medium	S(%)	$\text{RFM}_{\text{phage}}$	RFM_{bact}
<i>E. coli</i> B	MA	31.8±2.2	1.00	1.00
	GSA	64.0±6.2	1.65±0.21	1.25±0.05
<i>E. coli</i> B _{S-1}	MA	9.7±1.1	1.00	1.00
	GSA	12.8±4.6	1.76±0.21	1.39±0.19

^aConstant UV dose throughout.

difference, very pronounced during the cultivation of bacteria inoculated by irradiated phage on MA (curves 1 and 2), increases even more during the cultivation of such bacteria on glucose-salt-agar (GSA) (curves 3 and 4). It appears that the lethal effect of UV-irradiation on phages is less pronounced at host cell incubation on GSA than on MA, the medium effect being more pronounced for *E. coli* B than for *E. coli* B_{S-1}. Hence, the minimum medium GSA is more favorable for survival of UV-irradiated phages than the complete medium MA.

It is interesting to note that the effectiveness of growth of nonirradiated phages, or relative favorableness of medium ($\text{RFM}_{\text{phage}}$), also depends on cultivation conditions of host bacteria inoculated by them. In Table 4 are shown mean data of several experiments on survival of UV-irradiated phages during cultivation of bacteria inoculated by them on media MA and GSA as well as values of $\text{RFM}_{\text{phage}}$ and RFM_{bact} obtained in the same experiments. It appears that: (1) survival of UV irradiated phages increases with the increase of $\text{RFM}_{\text{phage}}$, and (2) that for phages the same medium is more favorable as for host cells.

To what degree, however, is $\text{RFM}_{\text{phage}}$ affected by the value of RFM_{bact} ? It was noted above that RFM for bacteria varies considerably from experiment to experiment and depends on conditions of preliminary cultivation. Paired experiments, in which RFM for phages and bacteria was determined on the same cultures of *E. coli* B and medium samples, have shown that with an increase of RFM_{bact} , as a rule, $\text{RFM}_{\text{phage}}$ increases (Fig. 11), and that there is a close relation between these values ($\rho^S = 0.76$). Maximum values of $\text{RFM}_{\text{phage}}$ and RFM_{bact} were obtained on M-9 after preliminary cultivation of bacteria on WA.

The nature of the effect of RFM_{bact} on $\text{RFM}_{\text{phage}}$ is not yet clear. Perhaps the destruction of some bacteria on inoculation of less favorable medium occurs so quickly that phages penetrating into them simply have no time for multiplication and viable progeny. However, keeping in mind the fact that survival of UV-irradiated bacteria is higher under such cultivation conditions where the effectiveness of growth of non-irradiated material is greater [4], we can maintain that cultivation conditions affect in a similar way survival of UV-irradiated and non-irradiated bacteria as well as survival of UV-irradiated and nonirradiated phages.

B. SOME RESULTS OBTAINED ON γ -DAMAGED PHAGE

Let us now see whether or not there is a dependence of phage viability on cultivation conditions of host cells after γ -irradiation. Results of several experiments shown in Table 5 indicate that at cultivation of bacteria inoculated by γ -irradiated phages on MA and M-9, i.e., on those media which affect considerably not only

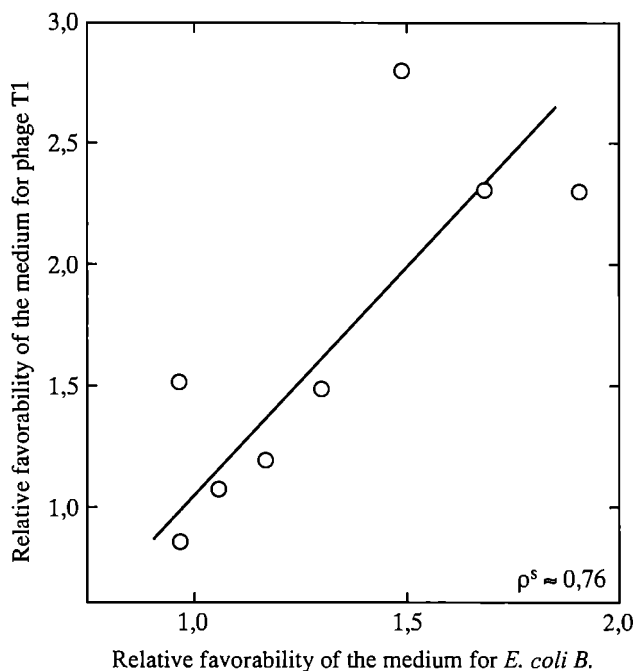


Fig. 11. Effect of nonirradiated host cell RFM on RFM of nonirradiated phages

RFM of bacteria and phages but also survival of γ -irradiated bacteria (see Fig. 8), marked differences in viability of γ -irradiated phages were not observed. We could not obtain a noticeable effect of medium (MA and M-9) even in those experiments in which γ -irradiated phages were grown on MA cultures of bacteria. In last experiments, RFM of phages and bacteria reaches maximum values (3.01 ± 0.10 and 1.40 ± 0.13 , respectively) as well as the effect of postirradiation cultivation on survival of γ -irradiated host cells (see Fig. 8).

C. RESULTS OF EXPERIMENTS WITH PHAGES

Thus, though the effectiveness of growth of phages is closely connected with the effectiveness of growth on corresponding media of host cells, relative radiosensitivity of phages on various media correlates with $\text{RFM}_{\text{phage}}$ and with relative

Table 5

Independence of γ -Irradiated Phages Percent Survival of the Postirradiation Growth Conditions

Dose, kR	T1 (<i>E. coli</i> B)		T1 (<i>E. coli</i> B _{S-1})	
	MPA ^a	M-9 ^b	MPA ^a	M-9 ^c
12	68.5±6.2	63.1±5.8	59.1±10.0	53.2±5.4
24	27.2±5.5	35.3±1.9	36 ±14.6	39.6±9.7
36	12.0±1.6	12.3±2.3	—	—

^aRFM_{phage} = 1.00. ^bRFM_{phage} = 2.01±0.33. ^cRFM_{phage} = 1.93±0.09.

radiosensitivity of bacteria only to the action of UV rays. After the action of ionizing radiation we could not detect the similar correlation.

If different viability on various media of irradiated bacteria, as well as the phenomenon host cell reactivation (HCR), is indeed connected with the «work» of bacteria reparation systems, it can indicate that prior lesions, causing the lethal effect in phages and bacteria, are the same as those affected by the action of UV rays and are different from those affected by the action of ionizing radiation. If the correlation of bacteria radiosensitivity and the RFM value is not connected with recovery there should be another explanation of the HCR phenomenon in phages. We think that one of the ways to solve this problem experimentally is further comparative investigation of viability of nonirradiated and irradiated phages cultivated under different conditions, and of viability of nonirradiated and irradiated host bacteria of various strains under the same conditions.

SUMMARY

It seems to us that the above-mentioned data indicate clearly enough the complexity and variety of manifestation of recovery effect as well as the fascination of this problem in a general biological sense. Though many articles and several special symposia have already been dedicated to the problem of postirradiation recovery, a thorough investigation of this problem has in fact only begun. We do not yet know how various forms of recovery are connected with each other and whether they are based on one and the same or on different mechanisms. We do not know why the recovery process is closely connected with the ploidy of yeast cells, why haploid yeast is incapable of recover while the corresponding homozygous ones successfully recover from UV, X-, γ -, α -, and other radiations. We do not know what biochemical processes guarantee recovery of various organisms from different kinds of lesions, if whether we can speak of special "recovery systems", or if recovery processes are due to the same enzymes that guarantee the synthesis of corresponding elementary intracellular structures in a normal cell ontogenesis. We do not know what the role of reparation processes is on the cell level in non-irradiated organisms. One can only make assumptions on all these points [1-4]. Now, however, more and more new investigators and scientific groups have become engaged in investigations of recovery, and it is hoped that time is near when all these questions will be answered.

REFERENCES

1. Symposium on recovery of cells from injury // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1961. Vol. 58, suppl. 1.
2. *Korogodin V.I.* Problems in postradiation recovery. Moscow: Atomisdat, 1966. In Russian.
3. *Waldstein E.A., Zhestjanikov V.D.* // Protection and recovery from radiation damage. Moscow: Nauka, 1966. In Russian.
4. *Rupert C.S., Harm W.* // *Adv. Radiat. Biol.*, 1966. Vol. 2, N 1.
5. *Kabakova N.M., Kabakov E.N.* // Protection and recovery from radiation damage". Moscow: Nauka, 1966. In Russian.
6. *Karabayev E.M., Kholeva S.Ya.* // *Ibid.*
7. *Alper T.* Cellular radiation biology. Baltimore (Md.): Williams and Wilkins, 1965.

RADIOSENSITIVITY OF HAPLONT YEAST CELLS IRRADIATED WITH SPARSELY AND DENSELY IONIZING RADIATIONS

1. INTRODUCTION

It is generally known that haploid cells of wild-type *Saccharomyces cerevisiae* are significantly more sensitive to ionizing radiation than diploid and other polyploid cells [1–3]. It is now explained by the ability of polyploid cells, in contrast to haploids, to repair double-strand breaks induced in DNA by ionizing radiation [4–7]. *Saccharomyces cerevisiae* cells are diplont: they exist as diploid cells in natural conditions. There are other yeast species which exist in natural conditions as haploids and their diploid cells have been constructed in laboratory conditions. In such a case, the doubling of cell genome was shown not to result in notable changes in radioresistance [8, 9]. The relation between radiosensitivities of haploid and diploid strains of haplont yeasts (*Pichia pinus*, *Pichia guilliermondii*) was almost the same as for some radiosensitive *rad* mutants in *Saccharomyces cerevisiae* [10–12] which were unable of diploid specific recovery. Thus, it appeared that unlike diplonts, natural haplonts might be defective in diploid specific recovery. It was shown [13] that the liquid-holding recovery (LHR) of yeast *Pichia pinus* was absent ($DMF = 1$) in haploid cells and was present in a minor extent in diploid cells ($DMF = 1.25-1.4$). It is noteworthy that typical values of the DMF for wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells were about 2.5–5.0 [3].

The relative biological effectiveness (RBE) of densely ionizing radiation was considerably higher for diploid (3.5–5.0) than for haploid (about 2.0) cells of *Saccharomyces cerevisiae* [2, 14–18]. These data can be considered as the first indication of the importance of postirradiation recovery in the RBE of high-linear energy transfer (high-LET) radiation. More cogent arguments supporting this view came from experiments with radiosensitive cells defective in recovery processes. The role of specific repair pathways in the determination of the RBE of densely ionizing radiation was demonstrated for bacterial [19–21], yeast [7, 8, 11, 22–26] and mammalian [27, 28] cells. Thus, the RBE of densely ionizing radiation is influenced by both the physical patterns of energy deposition and cell ability to recover from radiation damage. Experiments on the RBE of densely ionizing radiations for yeast cells were mainly carried out with *Saccharomyces cerevisiae*. Similar data for haplont yeast cells are practically unknown. Therefore, it is of interest from a fundamental point of view to study radiation response to low- and high-LET radiations of haplont yeast cells with a single and double set of chromosomes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. STRAINS

Different haploid and diploid strains of haplont yeast cells were used in this investigation. Haploid strains of *Yarrowia lipolytica* (formerly *Candida lipolytica* and then *Saccharomycopsis lipolytica*) of different mating type (CX-161-1B, CX-39-74B) and diploid strain (CX-229) obtained by mating of haploids

[29] were kindly provided by Dr. J. Basset (USA). Haploid strain of *Pichia pinus* (MH4) was obtained from Dr. L. Wünsche (Germany). This strain was established to be homothallic; diploid strain (MH-4D) has been constructed by autodiploidization [30]. Taxonomic reidentification of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* MH-4 was recently carried out by comparison of genome structure and hybridization of strain MH-4 with typical *Pichia methanolica* [31]. Based on the data obtained, the author concludes that strain MH-4 refers to *Pichia methanolica* species. Heterothallic haploid strains of *Pichia guilliermondii* of both mating types (NRRLY-2075, NRRLY-2076) were kindly supplied by Dr. C.P. Kurtzman (USA). Diploid strain (NRRLY 2075 × 2076) was constructed through mating of haploid cells [32].

2.2. MEDIUM AND GROWTH CONDITIONS

Pichia yeast cells of all strains were incubated at 30 °C and *Yarrowia lipolytica* at 24 °C. Before irradiation, the cells were grown for 3–5 days on solid medium (yeast extract, 1%; bacto-peptone, 2%; dextrose, 2%; agar, 2%). The duration of preirradiation cultivation of various strains was determined by the time needed to attain stationary growth phase when the number of small budding cells was less than 2%. The cells were then resuspended in sterile water and after appropriate dilution were irradiated with ionizing radiations.

2.3. IRRADIATION TREATMENTS

Cells from the same stock solution were irradiated with ^{137}Cs (7.8 Gy/min) or ^{60}Co (12 Gy/min) γ -rays and with ^{239}Pu α -particles (25 Gy/min). The LET of the particles reaching the cell monolayer was estimated to be about 120–130 keV/ μm . Just at this LET value, the maximum in RBE-LET relationship was observed for most eukaryotic and some prokaryotic unicellular organisms. The γ -ray dose-rate was measured with a Siemens ionization chamber. Cell suspensions (10^6 cells/ml) in sterile water were irradiated with γ -rays at room temperature in glass tubes. Preliminary experiments have shown that our irradiation conditions were identical to those with aeration.

The α -particle dose-rate was determined by measuring the intensity and energy of the particles with semi-conductor silicon surface barrier detector at a distance corresponding to the cells. The dose-rate was calculated according to the formula $dD/dt = 0.00016 LF$ (Gy/min), where L is the rate of energy loss in electron volts per micron and F is the flux of particles per square micron and per minute [33]. Dosimetric errors were found to be of 3–5% for sparsely and up to 10% for densely ionizing radiation. The small range of α -particles necessitated the use of a monolayer of yeast cells for α -irradiation: 0.02 ml of cell suspension (5×10^7 cells/ml) was placed on the surface of non-nutrient agar, and the water from this drop of cell suspension was evaporated. The source of α -particles was placed in a plexiglass box with fixed channels allowing the cells on the agar surface to be brought in close proximity (3–4 mm of air) of the source. After α -exposure, the cells were rinsed from the small piece of agar layer and plated on nutrient agar after appropriate dilution.

2.4. SCORING

The viability of irradiated cells was determined using two criteria: (a) the scoring of visible macrocolonies after 5–6 days of growth; (b) the microscopic observations of irradiated population after 24 h growth on the surface of nutrient agar. In the latter case, a cell was considered as survivor if it gave rise to a colony with 50 or more cells in 24 h [3]. It is worth noting that this is sufficient time to overcome the radiation-induced G2 block, and the results were identical when using true colony-forming ability after 5–6 days post-treatment incubation on complete medium containing agar plates. However, both scoring methods gave identical results for all yeast strains excepting *Yarrowia lipolytica*. Since *Yarrowia lipolytica* culture contained cells of different morphology having different radiosensitivities, we only used the microcolony counts for survival measurement of *Yarrowia lipolytica*, cells with unusual filamentous forms not being taken into account.

3. RESULTS

The typical survival curves of all strains studied exposed to both γ -rays and α -particles are presented in Figs. 1–3. Each data point represents an average survival for 3–6 Petri dishes, each containing from 50 to 200 colonies. Experimental points in all figures have errors of 2% or less, that is approximately the size of the point. Dose-effect curves have been drawn by visually fitting the experimental points. Each experiment was repeated a minimum of 3 times. All survival curves are exponential (excepting one haploid strain, Fig. 1B) and can be described by the mean lethal dose D_0 , which is the dose needed to reduce the survival S to $S \cdot e^{-1}$ or about 0.37 S . This parameter for all curves is listed in Table 1. The resistant tails in Fig. 1B for one of haploid strains of *Yarrowia lipolytica* yeast cells was

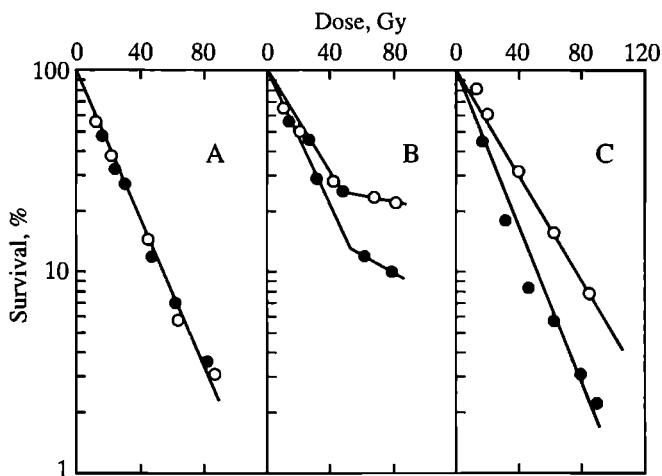


Fig. 1. The survival curves of haploid (CX-116-1B, A; CX-39-74B, B) and diploid (CX-229, C) yeast *Yarrowia lipolytica* exposed to γ -rays from ^{137}Cs (open circles) and α -particles from ^{239}Pu (closed circles)

The viability was determined by the scoring of microcolonies after 24 h growth

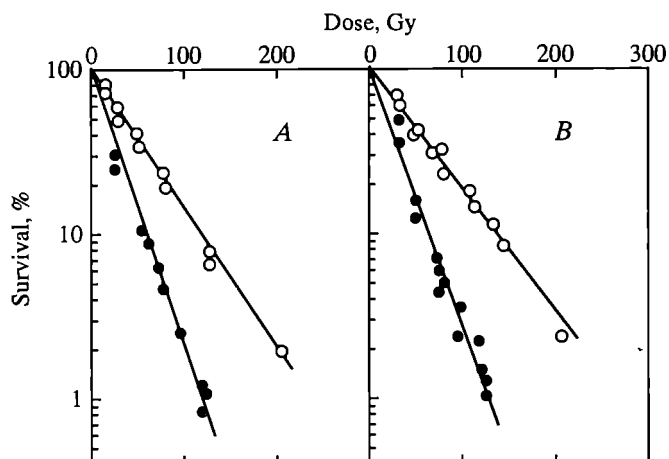


Fig. 2. The survival curves of haploid (MH-4, A) and diploid (MH-4D, B) yeast *Pichia pinus* exposed to γ -rays from ^{60}Co (open circles) and α -particles from ^{239}Pu (closed circles). The viability was determined by the scoring of visible macrocolonies after 5-6 days of growth

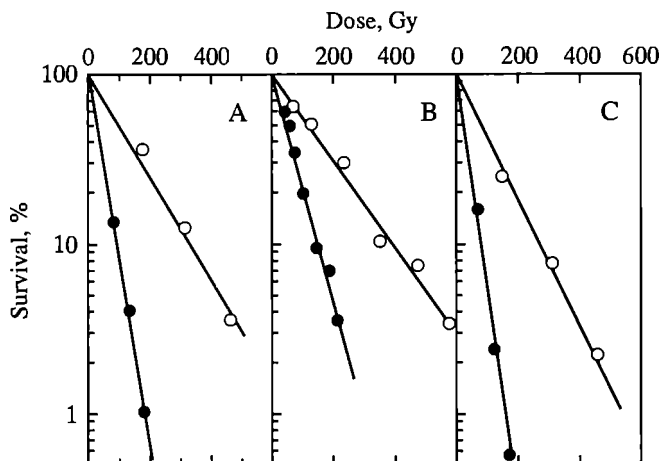


Fig. 3. The survival curves of haploid (NRRLY-2075, A; NR-RLY-2076, B) and diploid (NRRLY 2075 \times 2076, C) yeast *Pichia guilliermondii* exposed to γ -rays from ^{60}Co (open circles) and α -particles from ^{239}Pu (closed circles)

The viability was determined by the scoring of visible macrocolonies after 5-6 days of growth

not related with increased repair by recombination in cells in G_2 -phase because this repair should give rise to a shouldered survival curve in the corresponding heterozygous a/a diploid strain which was not registered in our case. Table 1 also summarizes the RBE values, which were calculated as the ratio of D_0 at low- and high-LET radiation: $\text{RBE} = D_0(\gamma) / D_0(\alpha)$. The errors involved in the corresponding D_0 and the RBE have been calculated from interexperimental variations and included in this table.

As illustrated by the data presented, the doubling of the chromosome set for haplont yeast *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pinus*, and *Pichia guilliermondii* does

Radiobiological parameters of yeasts of different species and ploidy

Strains (ploidy)	$D_0(\gamma)$ (Gy)	$D_0(\alpha)$ (Gy)	RBE	DNA content 10^{-14} g/cell
<i>Yarrowia lipolytica</i>				
CX-161-1B (haploid)	24.0±2.1	24.0±2.4	1.00±0.05	—
CX-39-74B (haploid)	31.1±3.5	26.8±3.0	1.16±0.06	—
CX-229 (diploid)	32.2±2.8	21.1±2.3	1.53±0.06	—
<i>Pichia pinus</i>				
MH-4 (haploid)	51.3±4.8	26.1±2.9	1.96±0.11	2.4±0.3
MH-4D (diploid)	58.1±6.1	27.7±3.1	2.10±0.10	4.9±0.5
<i>Pichia guilliermondii</i>				
NRRLY-2075 (haploid)	145.0±17.0	41.3±4.6	3.51±0.27	1.4±0.2
NRRLY-2076 (haploid)	167.0±15.0	60.8±7.1	2.75±0.25	1.4±0.2
2075 2076 (diploid)	115.2±11.0	36.5±4.0	3.16±0.32	2.3±0.3

not result in a great increase of cell radioresistance. The γ -ray sensitivity of diploid cells of these yeast species was nearly equal or even somewhat larger to that of their haploid cells, the last assertion being true for *Pichia guilliermondii*, for which $D_0(\gamma)$ of diploid survival curve is about of 0.8 of that for haploid cells. The main criterion to distinguish the diploid state from the haploid state was the possibility of diploid strains to undergo meiosis and sporulation on sporulation media and produce tetrads consisting of 4 viable ascospores. Moreover, *Pichia pinus* diploid was able to sporulate even on usual complete media YEPD after a great duration of cultivation (10–14 days), the colonies being rose colored in contrast to white colonies produced by haploid cells. The diploids used in these experiments were heterozygous for mating type. It was controlled by tetrad analysis and the ability to crossing of the corresponding spores. In addition, DNA content was estimated for *Pichia* yeasts (Table 1) by colorimetric diphenylamine and UV-spectrophotometric methods [8]. One can believe that repair processes of haplont yeast are manifested to a small extent if they are not absent. As a consequence, the effect of ploidy on survival of these yeast species was similar to that of *Saccharomyces cerevisiae* radiosensitive mutants in which defects of recombinational repair was due to *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutations responsible for the absence of the diploid specific recovery [8, 10, 34–36].

We have tested the LHR ability of *Pichia pinus* and *Pichia guilliermondii* yeast cells irradiated by ^{60}Co γ -rays. The results are presented in Table 2. It can be seen that both haploid and diploid cells were incapable of the LHR: their survival was not enhanced after delayed plating. The absence of the LHR in haplont yeasts may be considered as an additional argument in favor of the above-mentioned fact that the radioresistant tail of the dose-effect curve for one of the haploid *Yarrowia lipolytica* strains (Fig. 1B) was not related with the budding cell resistance which is known [10] to be connected with diploid-specific recovery.

As already mentioned, the repair capacity including diploid specific recovery is an important determinant for the RBE of high-LET ionizing radiation. From this, it can be expected that the difference in the RBE of α -particles for haploid and diploid yeast cells of the investigated species will vary to a smaller extent

Percent survival of *Pichia pinus* and *Pichia guilliermondii* yeast cells plated immediately after γ -irradiation (^{60}Co) and after 3 days non-nutrient agar-holding recovery

Dose (Gy)	Percent survival			
	Haploid cells		Diploid cells	
	Immediate plating	Delayed plating	Immediate plating	Delayed plating
<i>Pichia pinus</i>				
80	25.5	20.1	24.0	31.0
160	10.0	8.0	4.2	7.6
240	4.2	3.3	1.6	1.8
320	1.2	0.9	1.0	1.4
<i>Pichia guilliermondii</i>				
240	15.8	20.7	13.2	10.9
480	3.2	4.3	1.8	2.0
720	0.7	0.6	0.3	0.2
960	0.1	0.1	0.03	0.05

than for wild-type. Indeed, this was found. The doubling of cell genome was shown not to be accompanied by a big increase in the RBE of α -particles for all haplont yeast strains studied. For haploid and the corresponding diploid strains, the following RBE values were obtained: 1.00–1.16 and 1.53 for *Yarrowia lipolytica*; 1.96 and 2.10 for *Pichia pinus*; 2.75–3.51 and 3.16 for *Pichia guilliermondii* (Table 1). Comparing these data with previously published results [8, 11, 22, 26], one can conclude that for the first species the RBE values were almost identical to those for the most sensitive *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutants exposed at the exponential phase of growth. For the second species, the RBE values were close to those for haploid wild-type cells and for *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* exposed at the stationary phase of growth. The following conclusions concerning the RBE for *Pichia guilliermondii* may be deduced. The RBE for haploid and diploid yeast cells of this species are not very different from each other. Although these RBE values are significantly higher than those for radiosensitive *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutants, they still did not reach the RBE values typical for wild-type diploid yeast cells.

Fig. 4 shows the relation between the RBE and $D_0(\gamma)$ values for all yeast strains studied. An almost linear relationship is found between these parameters. The regression line is $\text{RBE} = 0.964 + 0.015 D_0$ and the correlation coefficient is 0.93. The data indicate that the RBE correlates well with haplont yeast cell radioresistance (D_0) and further provide good evidence for the role of both physical (LET) and biological (radioresistance, reparation) mechanisms in the determination of RBE for high-LET radiation.

4. DISCUSSION

In the present investigation, 5 haploid and 3 diploid yeast strains of various species were exposed to ionizing radiation with low- and high-LET. A common feature of the yeast species investigated was that, in contrast to *Saccharomyces cerevisiae*, they have a haploid stage as a normal vegetative state in natural con-

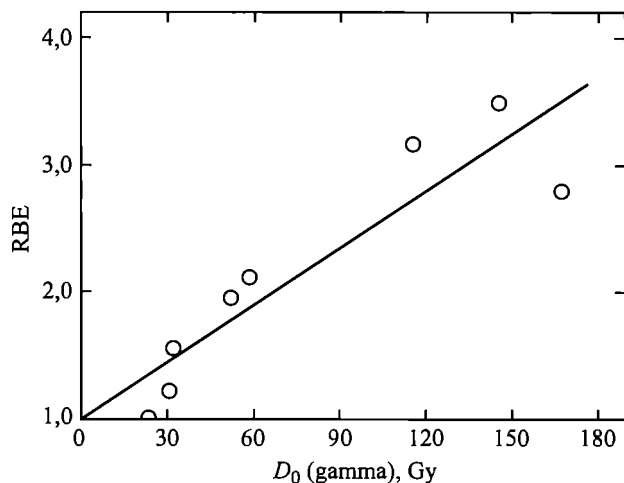


Fig. 4. The relation of $D_0(\gamma)$ values with RBE of α -particles for various yeast strains

ditions. The most basic conclusion justified by the above findings concerns the dependence of both radiosensitivity and RBE of high-LET radiation on ploidy. As was already mentioned, haploid cells of *Saccharomyces cerevisiae* are significantly more sensitive to ionizing radiation than diploid cells; diploid and higher ploidies are characterized by sigmoidal survival curves, while haploid cells are inactivated exponentially [2, 3]. This well-known standard experience in radiation biology, however, is not the only form of the influence of ploidy to the radiosensitivity of unicellular eukaryotes. The diploid-specific recovery (DSR), defined as the ratio of radiation doses for diploid and haploid cells producing, for example, 10% survival [10], was significantly smaller for various *rad* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* in comparison with that for their wild-type cells. Some of these mutations (*rad51*, *rad52*, *rad54*) reveal the DSR close to 0.7–2.0 [10–12, 37]. This means that, in some cases, radiosensitivity of haploid cells was almost identical to radiosensitivity of diploid ones. In addition, it was shown that there was no remarkable difference in sensitivity to both ionizing radiation and UV-light between haploid and diploid cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [38] and the yeast-like eukaryote *Ustilago maydis* [39]. Shahin et al. [38] have shown that haploid and diploid wild-type strains of *Schizosaccharomyces pombe* exhibited no liquid-holding effect after both γ - and UV-irradiation. As was shown in this paper, *Pichia pinus* and *Pichia guilliermondii* yeast cells were incapable of the LHR. It is not excluded that all these cells were defective in diploid-specific recovery including DNA double-strand break repair which was found to be responsible for the LHR in *Saccharomyces cerevisiae* [5, 7, 40].

As soon as the RBE of high-LET radiation correlates with cell radiosensitivity and its ability to repair radiation damage, one could expect that the doubling of the cell genome differently influences the RBE in various yeast species. For wild-type diploid yeast of *Saccharomyces cerevisiae*, capable of recovery the transition from the haploid to the diploid state is followed by the great increase

in both radioresistance and the RBE of densely ionizing particles [8, 11, 22, 23]. In these publications, it was also shown that radiosensitive *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* incapable of postirradiation recovery were more sensitive to radiation because of the lack of their capacity for repair of radiation damage and they also displayed lower values of the RBE. In addition, their haploid and diploid strains were almost equally sensitive to ionizing radiation.

Qualitatively similar results have been obtained in this paper for 3 species of haplont yeast cells: *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pinus*, *Pichia guilliermondii*. The radiosensitivity and the RBE of α -particles were almost identical for the haploid and diploid cells of all these species. For *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pinus* yeasts, the RBE values (1.0–2.1) were close to those typical for *rad50*, *rad51*, *rad52* and *rad54* mutants defective in repair systems. The relatively higher values of the RBE of α -particles for both haploid (2.75 and 3.51) and diploid (3.16) *Pichia guilliermondii* cells may suggest that repair processes do not play the main role in RBE determination for this species and the effectiveness of densely ionizing particles may be due to some other physical and/or biochemical factors. For example, wild-type haploid and diploid strains of *Schizosaccharomyces pombe* were incapable of LHR. However, inactivation curves of these strains show that these cells are radiation resistant and several radiation-sensitive mutants have been isolated in *Schizosaccharomyces pombe*, suggesting that the parental wild-type has some repair mechanisms for radiation-induced damage [38].

The experimental data presented here may be explained by the key role of repair for radioresistance of yeast cells of different ploidy. Apparently, haplont yeast cells are deficient in a repair system, the effects of which in diplont yeast cells are related to the presence of the double genome allowing recombination processes to occur. If radiation injuries in haploid and diploid cells involve radiation damage leading to chromosome aberrations it can be expected that such lesions may arise at a higher frequency in diploid than in haploid cells because of differences in target volume (number of chromosomes, DNA content, etc.). In such a case, diploid cells have to be more radiosensitive for cells incapable of recovery in comparison with haploid cells. If dark recovery is not completely inhibited, then an intermediate situation may apply and haploid and diploid cells may show very similar radiosensitivity. Then the RBE values are expected to be nearly identical for haploid and diploid yeast cells as observed in this study.

If the cell radioresistance to ionizing radiation may to some extent, serve as a measure of cell sensitivity to other environmental factor inflicted genetic damage, one may suppose that only the yeasts capable of diploid cell recovery will have a selective advantage. On the contrary, for yeasts defective in repair systems, haploid cells may possess a selective advantage. It is not excluded that owing to this fact, the vegetative phase in natural conditions is presented by diploid cells in *Saccharomyces cerevisiae* and by haploid cells in *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pinus* and *Pichia guilliermondii*. It follows that the development of repair systems, providing more full recovery of diploid cells from genetic damages in comparison with haploid cells, may have served as a prerequisite for the transition, during evolution processes, from haplont to diplont cells.

REFERENCES

1. *Mortimer R.K.* Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae* // *Radiat. Res.* 1958. Vol. 9. P. 312–326.
2. *Laskowski W.* Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. 1. Aufbau homozygoter Stämme und Dosiseffektkurven für ionisierende Strahlen. UV and organische Peroxyde // *Ztschr. Naturforsch. B.* 1960. Bd. 15. S. 495–506.
3. *Korogodin V.I.* Problems of postirradiation recovery. Moscow: Atomizdat, 1966.
4. *Resnick M.A., Martin P.* The repair of double-strand break in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control // *Mol. Gen. Genet.* 1976. Vol. 143. P. 119–129.
5. *Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V.* Repair of DNA double-strand breaks requires two homologous DNA duplexes // *Mol. Biol. Rep.* 1977. Vol. 3. P. 437–442.
6. *Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Grundler W.* et al. Radiation studies at the physical, molecular, cellular and macrocolony level // Sixth symp. on microdosimetry / Ed. J. Booz and H.J. Ebert. Harwood, 1978. P. 121–143.
7. *Frankenberg-Schwager M., Frankenberg D., Harbich R.* Repair of DNA double-strand breaks as a determinant of RBE of alpha-particles // *Brit. J. Cancer.* 1984. Vol. 49, suppl. 6. P. 169–173.
8. *Korogodin V.I., Blisnik K.M., Kapul'tsevich Yu.G.* et al. The role of ploidy in radiosensitivity of cells: (Experiments with yeast of different strain and genotypes) // *Radiobiologiya.* 1977. Vol. 17. P. 700–710.
9. *Korogodin V.I.* The study of post-irradiation recovery of yeast: the premolecular period // *Mutati. Res.* 1993. Vol. 89. P. 17–26.
10. *Saeki T., Machida I., Nakai S.* Genetic control of diploid recovery after gamma-irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Ibid.* 1980. Vol. 73. P. 251–265.
11. *Petin V.G., Kabakova N.M.* RBE of densely ionizing radiation for wild-type and radiosensitive mutants of yeast // *Ibid.* 1981. Vol. 82. P. 285–294.
12. *Petin V.G., Matrenina V.L.* Radioprotection action of chemical compounds on gamma-irradiated yeast cells of various genotypes // *Mol. Gen. Genet.* 1981. Vol. 183. P. 152–157.
13. *Glasunov A.V., Lobachevsky P.N.* Postradiation recovery of *Pichia pinus* yeast cells // *Radiobiologiya.* 1983. Vol. 23. P. 409–411.
14. *Sayeg J.A., Birge A.C., Beam C.A., Tobias C.A.* The effects of accelerated carbon nuclear and other radiations on the survival of haploid yeast. II. Biological experiments // *Radiat. Res.* 1959. Vol. 10. P. 449–461.
15. *Mortimer R., Brustad T., Cormack D.V.* Influence of linear energy transfer and oxygen tension on the effectiveness of ionizing radiations for induction of mutations and lethality in *Saccharomyces cerevisiae* // *Ibid.* 1965. Vol. 26. P. 465–482.
16. *Raju M.R., Gnanapurani M., Stackler B.* et al. Induction of heteroallelic reversions and lethality in *Saccaromyces cerevisiae* exposed to radiations of various LET (⁶⁰Co gamma-rays, heavy ions, and π^- mesons) in air and nitrogen atmospheres // *Ibid.* 1971. Vol. 47. P. 635–643.
17. *Bertsche U.* The response of diploid yeast to radiations at different LET // *Ibid.* 1978. Vol. 76. P. 349–367.
18. *Subrahmanyam P., Rao B.S., Reddy N.M.S.* et al. Modification of high LET radiation-induced damage and its repair in yeast by hypoxia // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1979. Vol. 36. P. 479–488.
19. *Haynes R.H.* The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena // *Radiat. Res.* 1966. Suppl. 6. P. 1–29.
20. *Alper T.* Cell death and its modification: The role of primary lesions in membranes and DNA // *Biophysical aspects of radiation quality.* Vienna: IAEA, 1971. P. 171–184.
21. *Krasavin E.A.* Problem of RBE and repair of DNA. Moscow: Energoatomizdat, 1989.
22. *Petin V.G.* RBE of densely ionising radiation and cell recovery // *Med. Radiol.* 1977. Vol. 22. P. 8–12.
23. *Petin V.G.* Effect of gamma and alpha irradiation on survival of wild-type and sensitive mutants of yeast // *Mutat. Res.* 1979. Vol. 60. P. 43–49.
24. *Hannan, M.A., Paul M., Phillips R.L.* Fast neutron RBE for lethality and genotoxicity in a wild-type and repair-deficient strain of yeast // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1986. Vol. 50. P. 811–824.
25. *Frankenberg D.* Repair of DNA double-strand breaks and its effect on RBE // *Adv. Space Res.* 1994. Vol. 14, N 10. P. 235–248.
26. *Petin D.V., Petin V.G.* Genetic control of RBE of alpha-particles for yeast cells irradiated in stationary and exponential phase of growth // *Mutat. Res.* 1995. Vol. 326. P. 211–218.

27. Tobias C.A., Blakely E.A., Chang E.P.Y. et al. Response of sensitive human ataxia and resistant T-1 cell lines to accelerated heavy ions // Brit. J. Cancer. 1984. Vol. 49, suppl. 6. P. 175–185.
28. Coquerelle T.M., Weibezahn K.F., Lücke-Huhle C. Rejoining of double strand breaks in normal human and ataxia-telangiectasia fibroblasts after exposure to ⁶⁰Co gamma-rays, ²⁴¹Am alpha-particle or bleomycin // Intern. J. Radiat. Biol. 1987. Vol. 51. P. 209–218.
29. Bassel J., Mortimer R. Genetic analysis of mating type and alkane utilization in *Saccharomycopsis lipolytica* // J. Bacteriol. 1979. Vol. 114. P. 894–896.
30. Tolstorukov I.I., Dutova T.A., Benevolensky S.V., Soom Ya.O. Hybridization and genetic analysis of methanol-utilizing yeast *Pichia pinus* // Genetica. 1977. Vol. 13. P. 322–329.
31. Tolstorukov I.I. Genome structure and reidentification of the taxonomic status of *Pichia pinus* MH4 lines // Ibid. 1994. Vol. 30. P. 635–640.
32. Sibirny A.A., Shavlovsky G.M., Kshanovskaya B.V., Naumov G.I. Hybridization and meiotic segregation in the paraffin-utilizing yeast *Pichia guilliermondii*, Wickerham // Ibid. 1977. Vol. 13. P. 314–321.
33. Barendsen G.W., Beusker T.L.J. Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. 1. Irradiation techniques and dosimetry // Radiat. Res. 1960. Vol. 13. P. 832–840.
34. Game J.C. Radiation sensitive mutants and repair in yeast // Yeast genetics: Fundamental and applied aspects / Ed. F.T. Spencer et al. B.: Springer, 1983. P. 109–137.
35. Friedberg E.C. Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Rev. 1988. Vol. 52. P. 70–102.
36. Friedberg E.C., Siede W., Cooper A.C. Cellular responses to DNA damage in yeast // The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* / Ed. J.R. Broach et al. Cold Spring Harbor (N.Y.), 1991. Vol. 1: Genome dynamics, protein synthesis and energetics. P. 147–192. (Cold Spring Harbor Lab. Monogr.; 21).
37. McKee R.M., Lawrence C.W. Genetic analysis of γ -ray mutagenesis in yeast. III. Double-mutant strains // Mutat. Res. 1980. Vol. 70. P. 37–48.
38. Shahin M.M., Gentner N.E., Nasim A. The effect of liquid holding in *Schizosaccharomyces pombe* strains after gamma and ultraviolet irradiation // Radiat. Res. 1973. Vol. 53. P. 216–225.
39. Lemont J.F. Induced mutagenesis in *Ustilago maydis*. 1. Isolation and characterization of a radiation-reversible allele of the structural gene for nitrate reductase // Mol. Gen. Genet. 1976. Vol. 145. P. 125–132.
40. Brunberg G., Resnick M.A., Williamson D.H. Cell-cycle-specific repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* // Radiat. Res. 1980. Vol. 82. P. 547–548.

1.5. ЗАВИСИМОСТЬ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОТ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧИ ЭНЕРГИИ ИЗЛУЧЕНИЙ

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Уже на ранних этапах развития радиобиологии было отмечено, что разные виды ионизирующих излучений при действии на живые клетки различаются по своей эффективности. Позднее выяснилось, что закономерности зависимости биологической эффективности излучений от величины их линейной передачи энергии, которую обозначают обычно ЛПЭ или L , сложны и неоднозначны.

Для оценки биологической эффективности излучений, различающихся между собой величиной L , обычно используют понятие относительной биологической эффективности (ОБЭ), которую определяют как отношение доз «стандартного» (обычно 200 кВ рентгеновы или γ -лучи) и исследуемого излучений при равных величинах эффектов. В экспериментах, где критерием оценки радиобиологического эффекта служит выживаемость клеток, часто используют отношение

$$\frac{D_a \text{ стандартного излучения}}{D_0 \text{ исследуемого излучения}} = \text{ОБЭ исследуемого излучения,}$$

где D_0 – «средняя доза», при которой в каждой клетке в среднем возникает по одному «инактивирующему повреждению». Выживаемость S клеток связана с дозой облучения D через параметр D_0 (в случае экспоненциальных кривых выживания, например, $S = \exp(-D \cdot D_0^{-1})$). Поэтому величина D_0 может служить мерой радиорезистентности клеток, а величина D_0^{-1} – мерой радиочувствительности клеток, или эффективности облучения. В дальнейшем изложении в качестве показателя радиочувствительности клеток мы будем использовать D_0^{-1} независимо от того, рассматривается эта величина сама по себе или при сопоставлении значений радиочувствительности разных клеток при действии какого-либо одного или разных видов излучений.

Так как значения ОБЭ определяются из отношения D_0 для стандартного и D_0 для исследуемого излучений, то термин «относительная биологическая эффективность» создает определенный настрой, при котором различия в чувствительности клеток к воздействию разных излучений связывают только со свойствами этих излучений. Вместе с тем, как это будет показано ниже, не менее важная роль здесь принадлежит и биологическим особенностям самих клеток.

Прежде чем приступить к рассмотрению закономерностей изменения радиочувствительности клеток при действии разных видов излучений, сделаем несколько замечаний, касающихся важной характеристики качества излучения – L , которая является энергией, переданной заряженной частицей веществу, отнесенной к единице пути. Следует различать L заряженной частицы и тормозную способность вещества, которая характеризует отнесенную к единице пути потерю энергии заряженной частицы в данном веществе плотностью ρ . Величина $L\rho^{-1}$ не зависит от плотности вещества. В случае, когда можно пренебречь потерей энергии на тормозное излучение, L равна тормозной способности [1]. При дальнейшем изложении под L будем понимать характеристику излучения, являющуюся усредненной макроскопической величиной.

ФОРМЫ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ L

Как известно, кривые, описывающие зависимость выживания клеток от дозы излучений, можно разделить на два класса: экспоненциальные и сигмоидные. При действии частиц с возрастающими значениями L часто наблюдается трансформация сигмоидных кривых в экспоненциальные, но превращение экспоненциальных в сигмоидные никогда не происходит.

Клетки с экспоненциальными кривыми выживания также можно подразделить на два класса по форме зависимости D_0^{-1} от L .

Первый класс характеризуется зависимостью, представленной на рис. 1,а. Для нее характерны максимальные значения D_0^{-1} , образующие плато при малых величинах L , и постепенное уменьшение D_0^{-1} при дальнейшем возрастании L (зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода). Такая зависимость типична для большинства прокариот – вирусов и многих видов бактерий [2–5]. Величины ОБЭ в этом случае не превышают 1, а нисходящей ветви кривой $D_0^{-1}(L)$ соответствует уменьшение их значений.

Второй класс клеток с экспоненциальными кривыми выживания характеризуется такой зависимостью $D_0^{-1}(L)$, которая описывается кривой с максимумом (зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода). В этом случае радиочувствительность клеток с увеличением L вначале мало изменяется, затем возрастает до некоторого максимума и лишь после этого, при дальнейшем увеличении L , уменьшается (рис. 1,б). Максимум радиочувствительности соответствует наибольшим значениям ОБЭ. Этот тип зависимости свойствен некоторым видам бактерий и гаплоидным дрожжам [2, 6, 7]. Для клеток с сигмоидными кривыми выживания (диплоидные дрожжи, клетки млекопитающих) всегда характерна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода [8–10]. Пример такой зависимости приведен на рис. 1,в.

Важным параметром, характеризующим особенности взаимодействия корпускулярных видов излучений с клетками, является величина поперечного сечения инактивации σ , которая связана с D_0^{-1} как:

$$\sigma = D_0^{-1} L \rho^{-1}. \quad (1)$$

Поскольку $D = FL\rho^{-1}$, где – флюенс частиц, то для экспоненциальных

Рис. 1. Зависимость радиочувствительности клеток D_0^{-1} от ЛПЭ для бактерий *E. coli* (а) [4], гаплоидных дрожжей (б) [7] и клеток китайского хомяка (в) [9]

кривых выживаемости

$$S = \exp(-D \cdot D_0^{-1}) = \exp(-FL\rho^{-1} D_0^{-1}) = \exp(-\sigma F). \quad (2)$$

Для клеток, которым свойственна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода, связь величины σ с L описывается кривой 1, представленной на рис. 2 (зависимость $\sigma(L)$ 1-го рода). На этой кривой можно отметить три характерных компонента: область линейного возрастания σ с увеличением L , область перегиба кривой и область плато, соответствующую постоянному значению σ при высоких величинах L . При сопоставлении кривых $D_0^{-1}(L)$ и видно, что участок линейного возрастания σ соответствует плато на кривой зависимости $D_0^{-1}(L)$, когда ОБЭ = 1, а область плато $\sigma(L)$ – нисходящей ветви кривой $D_0^{-1}(L)$, когда ОБЭ < 1.

Кривая 2 на рис. 2 описывает $\sigma(L)$ для клеток, которым свойственна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода. Кривая зависимости $\sigma(L)$ 2-го рода имеет следующие компоненты: область линейного возрастания σ с увеличением L , область степенного возрастания σ , область перегиба кривой и область плато, соответствующую постоянному значению σ . При сопоставлении кривых $D_0^{-1}(L)$ и $\sigma(L)$ 2-го рода видно, что область степенного возрастания σ соответствует области увеличения D_0^{-1} до максимальных значений, а область плато – уменьшению D_0^{-1} с ростом L . При одинаковых значениях энергии частиц на один нуклон в области плато $\sigma = \text{const}$ [3, 4, 7, 10].

Таким образом, клетки по их реакциям на воздействие излучений разного качества можно разделить на три класса – 1-й класс: $S(D)$ экспоненциальная, $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода; 2-й класс: $S(D)$ экспоненциальная, $D_0^{-1}(L)$ – 2-го рода; 3-й класс: $S(D)$ сигмоидная, $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода.

Формально зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода можно объяснить моделью «одна мишень – одно попадание», когда для инактивации клетки необходимо и достаточно возникновения одной первичной ионизации в пределах мишени или «чувствительного объема» [11–13]. В этом случае $S(D)$ имеет экспоненциальную форму, биологическая эффективность частиц в диапазоне малых L постоянна, а затем уменьшается.

Действительно, в предположении, что число первичных ионизаций при дозе D следует пуассоновскому распределению, пусть

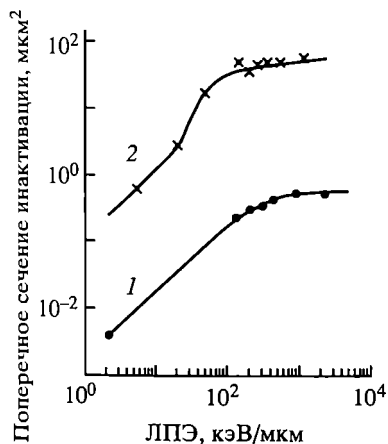
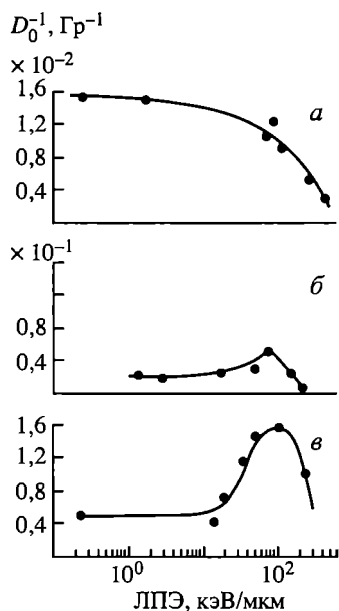


Рис. 2. Зависимость поперечного сечения инактивации для бактерий *E. coli* (1) [4] и клеток китайского хомяка (2) [10] от ЛПЭ



nl – среднее число первичных ионизаций в мишени, где l – толщина, n – среднее число первичных ионизаций на единицу длины, равное $L\omega^{-1}$ (ω – энергия, необходимая для образования одной пары ионов). Вероятность $P_{(x)}$, что число этих ионизаций равно x , определяется как

$$P_{(x)} = \exp(-nl) (nl)^x / x. \quad (3)$$

В случае, когда не происходит ни одной ионизации

$$P_{(0)} = \exp(-nl). \quad (4)$$

Вероятность p , что по крайней мере одна первичная ионизация имеет место, равна

$$p = 1 - \exp(-nl) = 1 - \exp(-L\omega^{-1}l). \quad (5)$$

Очевидно, что $\sigma = \sigma_0 p$, где σ_0 – геометрическое поперечное сечение мишени. Тогда

$$\sigma = \sigma_0 [1 - \exp(-L\omega^{-1}l)], \quad (6)$$

а выживаемость клеток при облучении потоком частиц F равна

$$\begin{aligned} S &= \exp(-F\sigma) = \exp\{-F\sigma_0[1 - \exp(-L\omega^{-1}l)]\} = \\ &= \exp\{-D\sigma_0[1 - \exp(-L\omega^{-1}l)]L^{-1}\}. \end{aligned} \quad (7)$$

Очевидно, что радиочувствительность клеток данного типа равна:

$$D_0^{-1} = \sigma_0 [1 - \exp(-L\omega^{-1}l)]L^{-1}. \quad (8)$$

Пусть L_t – область L , соответствующая перегибу кривой $D_0^{-1}(L)$. Из (8) следует, что при $L < L_t$, $D_0^{-1} = \text{const}$, а при $L > L_t$, величина D_0^{-1} уменьшается. Согласно (6) при увеличении L σ стремится к σ_0 . Это означает, что каждая частица с $L > L_t$, при прохождении через чувствительный объем клетки будет приводить к инактивации с вероятностью, равной 1; биологическая эффективность излучений с $L > L_t$ на единицу поглощенной дозы будет уменьшаться, а на одну частицу будет оставаться постоянной. Таким образом, зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода можно однозначно интерпретировать в терминах физических характеристик ионизирующих излучений.

Кривые $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода, как мы уже отмечали, свойственны клеткам и с экспоненциальными кривыми выживания (гаплоидные дрожжи), и с сигмоидными кривыми (диплоидные дрожжи, клетки млекопитающих). Такую форму зависимости радиочувствительности от L можно объяснять с разных позиций [13]. Можно предположить, что для инактивации таких клеток необходимо осуществление нескольких попаданий в одну мишень или не менее одного попадания в каждую из нескольких мишеней. Событиями попадания могут служить или одна ионизация, или группа из нескольких ионизаций. Очевидно, что такая ситуация не поддается однозначной интерпретации. Общим, однако, является то, что для инактивации объектов с $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода требуется значительно большее количество энергии, чем для объектов с $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода.

Из многочисленных моделей, предложенных в разное время для интерпретации зависимости $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода в терминах физики ионизирующих излучений и геометрии мишеней, наибольшего внимания, пожалуй, заслу-

живает модель К. Гюнтера и В. Шульца [14]. Однако недавно было установлено, что на форму кривых $D_0^{-1}(L)$ большое влияние оказывает свойство клеток восстанавливаться от лучевых повреждений. Познакомимся с этими данными более подробно.

РОЛЬ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАВИСИМОСТИ $D_0^{-1}(L)$

Известно несколько форм и механизмов восстановления клеток от лучевых повреждений, которые присущи как прокариотам, так и эукариотам. Считается, что в конечном итоге репарация – это восстановление нарушенной структуры ДНК. Во всех этих случаях благодаря деятельности репарационных ферментов происходит или исправление структурных нарушений в молекуле ДНК, вызванных облучением, или ликвидация дефектов в ДНК, синтезированной на поврежденной ДНК-матрице [15].

У прокариот, большинству из которых свойственна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода, весьма детально идентифицированы основные этапы репарации ДНК и ее молекулярные механизмы. К числу репарируемых клеткой повреждений относятся и одностранные разрывы (ОР) ДНК. В то же время двунитевые разрывы (ДР) ДНК обычно являются летальными событиями [16]. Однако следует различать два типа ДР, имеющих разное происхождение.

Известно, что при действии ионизирующих излучений образуются как прямые, так и косые ДР [17, 18]. Прямые ДР возникают в результате одновременного повреждения комплементарных участков обеих нитей ДНК. Косые ДР образуются в результате перекрытия двух близко расположенных друг от друга ОР в разных нитях ДНК вследствие ферментативной деградации поврежденных участков. В силу того, что ОР активно репарируются клеткой в процессе сверхбыстрой и быстрой репараций с участием ДНК-полимераз и ДНК-лигаз [15, 18], образование косых ДР и их репарация зависят от интенсивности деградации поврежденных участков и эффективности работы ресинтезирующих ферментов. Предварительные оценки показывают, что при действии γ -лучей косые ДР у *E. coli* составляют значительную часть от общего числа ДР [18]. Двунитевые разрывы такого происхождения весьма интенсивно репарируются клеткой, в отличие от прямых ДР, репарация которых требует участия рекомбинационных механизмов [15].

У *E. coli* с диким репарационным генотипом возникновение даже одного нерепарированного ДР (косого или прямого) является летальным событием. Величина дозы облучения, при которой образуется в среднем один такой ДР на геном, в этом случае точно соответствует значению D_0 , определяемому по выживаемости [16]. У радиочувствительных репарационных мутантов такого соответствия нет: в этом случае D_0 в несколько раз меньше дозы, при которой происходит образование в среднем одного ДР на геном. В то же время значения доз, при которых образуется в среднем один ДР у репарационных мутантов и у клеток с диким репарационным генотипом с ингибированной системой репарации, примерно одинаковы. Следовательно, для радиочувствительных мутантов летальными событиями служат не только ДР, но и другие повреждения ДНК. Все это позволяет сделать вывод, что в области плато кривой $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода, характерной для *E. coli* с диким ге-

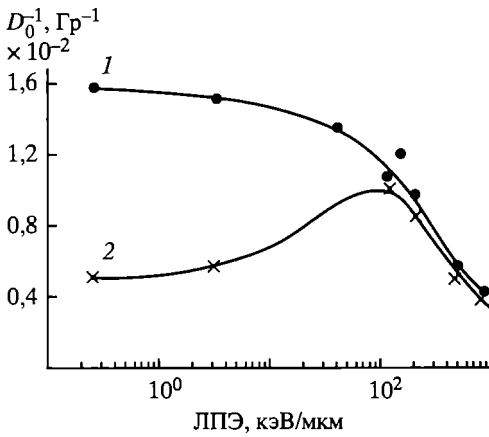


Рис. 3. Зависимость радиочувствительности клеток D_0^{-1} от ЛПЭ для бактерий *E. coli* при облучении в обычных условиях (1) и в присутствии β -меркаптоэтиламина (2) [4]

нотипом, летальному событию соответствует образование в ДНК одного ДР, а нисходящая ветвь этой кривой отражает возрастание числа ДР на D_0 на геном.

Когда более сбалансированная система репарации уменьшает вероятность образования ДР из перекрывающихся ОР, можно ожидать возрастания резистентности клеток

к воздействию излучений с малой ЛПЭ. Такая ситуация, по-видимому, наблюдается при модификации радиочувствительности клеток химическими радиопротекторами. Согласно [19] химические радиопротекторы, замедляя стадию экзонуклеазной расчистки брешей в нитях ДНК или скорость инцизии γ -сайтов, создают условия для лучшей балансировки между процессами деградации поврежденных участков ДНК и их ресинтезом, что приводит к снижению вероятности образования ферментативных ДР ДНК. Поскольку с увеличением ЛПЭ излучений вклад прямых ДР в суммарный выход ДР возрастает [14], эффективность радиопротекторов при увеличении L должна снижаться. Это хорошо согласуется с данными по облучению бактерий *E. coli* тяжелыми ионами в условиях защиты β -меркаптоэтиламиноом [4]. Наблюдающуюся при этом трансформацию кривой $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода в кривую 2-го рода (рис. 3) можно объяснить эффективной репарацией косых ДР при малых ЛПЭ и отсутствием репарации прямых ДР, вклад которых в повреждения ДНК с увеличением ЛПЭ возрастает. Можно думать, что у прокариот зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода отражает интенсивно идущие процессы репарации от повреждений ДНК, приводящих к возникновению косых ДР.

У эукариот (дрожжи, клетки млекопитающих), как и у прокариот, ДР в ДНК наиболее опасные последствия облучения. По мнению ряда авторов [20, 21], именно ДР являются причиной образования хромосомных aberrаций, которые и приводят такие клетки к гибели [22]. Радиорезистентность этих клеток, следовательно, также должна отражать их способность к репарации ДР ДНК.

Известно, что в расчете на один набор хромосом диплоидные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в 10–15 раз устойчивее гаплоидных.

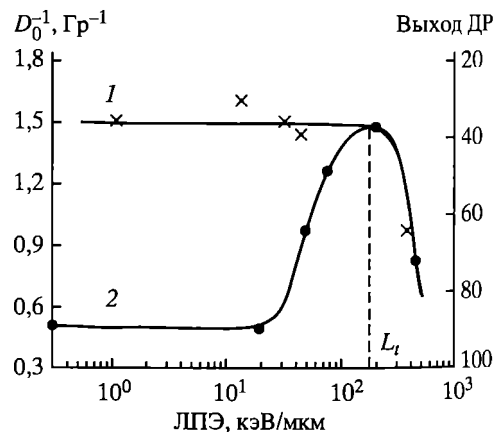


Рис. 4. Зависимость от ЛПЭ радиочувствительности D_0^{-1} (2) [9] и выхода первичных ДР ДНК на D_0 на геном, абс. ед. (1) [26] для клеток китайского хомяка V-79

Было установлено, что гаплоидные и диплоидные клетки погибают при облучении за счет однотипных лучевых повреждений – вероятнее всего, хромосомных летальных мутаций [23]. Различия в радиорезистентности гаплоидных и диплоидных дрожжей обусловлены, по-видимому, свойством диплоидных клеток восстанавливаться от ДР ДНК, которые не репарируются гаплоидными клетками [24].

Если у диплоидных дрожжей заблокировано свойство восстанавливаться от лучевых повреждений, они утрачивают способность репарировать ДР [24] и становятся примерно в 2 раза радиочувствительнее, чем гаплоидные [25]. Чувствительность таких клеток повышается в основном к воздействию γ -лучей, но мало изменяется при облучении α -частицами [25]: у клеток эукариот с нарушенной репарацией ДР зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода имеет тенденцию модифицироваться в сторону кривой $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода.

Такая модификация кривой $D_0^{-1}(L)$ при нарушении диплоидспецифической репарации дает основание полагать, что форма этой кривой в значительной мере обусловлена эффективностью репарации ДР при действии излучений с малыми L . Как следует из работы [26], в которой оценивался первичный выход G ДР в клетках китайского хомяка при облучении частицами с разной L , число ДР на D_0 на геном ($G \cdot D_0 \cdot \text{геном}$) в диапазоне L от 0,3 до 150 кэВ/мкм примерно постоянно и равно 38, а при дальнейшем возрастании L увеличивается (рис. 4, кривая 1). Область перегиба этой кривой соответствует максимальной радиочувствительности клеток (рис. 4, кривая 2) и выходу кривой зависимости $\sigma(L)$ на плато σ_0 . Это означает, что прохождение одной частицы с $L = L_i = 150\text{--}200$ кэВ/мкм через ядро такой клетки приводит к образованию около 38 ДР и вызывает ее инактивацию с вероятностью, равной 1.

Первичный выход ДР оценивался в этих экспериментах в условиях ингибированной системы репарации и нормировался на D_0 излучений с разными L , определяемую по кривой выживания. Доза, при которой происходит образование 38 ДР на геном, соответствует D_0 при действии частиц с $L = L_i$ (рис. 4). Это может означать, что при действии излучений с $L = L_i$ клетки млекопитающих не способны репарировать ДР, хотя при облучении частицами с низкой L они, как известно, интенсивно восстанавливаются от таких повреждений. Следовательно, при подавлении способности клеток к восстановлению выход ДР на D_0 на геном должен быть постоянным до значений $L = L_i$, а при дальнейшем увеличении L должен возрастать. Это и находит свое отражение на рис. 4, где показано, что для клеток млекопитающих зависимость $D_0^{-1}(L)$ описывается кривой 2-го рода, а зависимость ($G \cdot D_0 \cdot \text{геном}$) (L) кривой 1-го рода.

Разная репарируемость ДР, образующихся в клетках млекопитающих при действии излучений с малой L и плотноионизирующих частиц, может свидетельствовать об их качественных различиях. Известно, что выход ДР на единицу дозы облучения с увеличением L возрастает, увеличивается и доля прямых ДР [14]. В случае воздействия γ -лучей нельзя исключить возможности формирования ДР из ОР, которые, вероятно, легче репарируются клеткой. Имеются данные [27], что при возникновении ОР комплементарный участок противоположающей нити ДНК в клетках млекопитающих может подвергаться действию эндонуклеаз и также разрываться, образуя ДР; такие

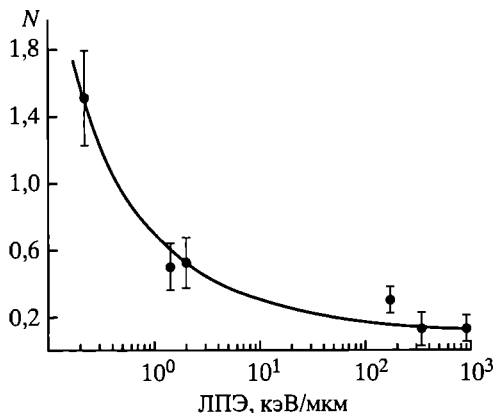


Рис. 5. Влияние ЛПЭ излучений на относительное содержание перестроек хромосом и фрагментов в лимфоцитах человека [33]

N – относительное число перестроек (дисцентрики + кольца) и фрагментов хромосом

ДР легче репарируются клеткой по сравнению с прямыми ДР, репарация которых осуществляется по рекомбинационному механизму.

Такая точка зрения согласуется с данными об эффективной химической защите клеток млекопитающих при действии γ -лучей [28] и отсут-

ствии таковой при облучении тяжелыми ионами [29]. Если допустить, что реализация защитного действия радиопротекторов у клеток млекопитающих осуществляется по таким же механизмам, что и у бактерий (путем уменьшения вероятности образования ДР из ОР вследствие подавления эндо- или экзонуклеазной активности), то зависимость эффективности химической защиты от L излучений и в этом случае может свидетельствовать о модификации радиопротекторами процессов образования ДР из ферментативных ОР.

Как мы уже отмечали, в литературе есть указания, что при действии тяжелых ионов на клетки эукариот репарация повреждений сильно ограничена или отсутствует. Так, в опытах с клетками млекопитающих при фракционировании дозы тяжелых ионов обнаружена полная аддитивность отдельных лучевых фракций [30]. Изучение репарации ОР и ДР ДНК у клеток млекопитающих, облученных γ -лучами и α -частицами, показало, что восстановление структуры ДНК от ДР во втором случае возможно лишь в ограниченном диапазоне доз [31]. Отмечалась также значительно меньшая репарируемость ОР и ДР ДНК в клетках млекопитающих, облученных π -мезонами, чем после действия рентгеновых лучей [32].

Снижение эффективности репарации ДР в случае воздействия плотноионизирующих частиц подтверждается и данными цитогенетического анализа клеток млекопитающих [33]. Летальное действие излучений на клетки млекопитающих обычно связывают с возникновением таких нарушений хромосом, как фрагменты и различного рода перестройки. Образование фрагментов обязано, по-видимому, неосуществлению восстановления ДНК от ДР. Тогда отношение выхода перестроек к выходу фрагментов может служить косвенным показателем эффективности репарации от ДР. Представленные таким образом данные работы [33] приведены на рис. 5. Можно видеть, что с увеличением L эффективность репарации в лимфоцитах человека уменьшается почти в 10 раз.

В настоящее время однозначно связать уменьшение эффективности репарации при возрастании L с каким-либо одним механизмом не представляется возможным. Однако ясно, что эффективность работы репарационных систем обусловлена как особенностями организации генетического аппарата клетки, так и степенью поврежденности структур-мишеней, которые подлежат восстановлению. При возрастании ЛПЭ излучений до значений, со-

ответствующих максимуму кривой $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода и больших, количество энергии в среднем на одно событие попадания увеличивается и повреждения становятся все менее обратимыми. Это обстоятельство, по-видимому, вносит существенный вклад в наличие максимума на кривой $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода.

ПОСТРАДИАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ КРИВОЙ $D_0^{-1}(L)$

Весьма информативными для решения вопроса о роли пострадиационного восстановления в биологической эффективности излучений с разной L могут быть эксперименты с такими объектами, у которых либо нарушены те или иные этапы репарации, либо репарация осуществляется более эффективно, чем у клеток с диким генотипом. Особый интерес в этом отношении представляет изучение трансформации кривых $D_0^{-1}(L)$ у радиочувствительных и радиорезистентных мутантов. Однако прежде чем рассмотреть возможные варианты такой трансформации, необходимо сделать несколько замечаний о специфике энерговыделения в треках тяжелых заряженных частиц при прохождении их через вещество.

Известно, что основным механизмом, посредством которого энергия нерелятивистской частицы передается облучаемому веществу, является возбуждение и ионизация атомов. Ионизация производится как самой частицей, так и δ -электронами, образующимися вдоль геометрической оси трека. Трек ионизирующей частицы принято считать состоящим из двух областей – сердцевины трека и области δ -электронов. Радиус r_{\max} трека не зависит от вида заряженной частицы, поскольку энергия δ -электронов, формирующих границу трека, от заряда частицы Z_0 не зависит. Величина r_{\max} определяется только скоростью частицы или ее энергией на один нуклон E [1, 34].

При определении зависимости D_0 от L разные значения L следует получать путем использования частиц, имеющих одинаковую E , но различающихся по Z_0 . Только в этом случае будет соблюдаться постоянство энергетического спектра δ -электронов, и при условии, что $r_{\max} < r_g$ (где r_g – радиус мишени), а $L > L_f$, σ будет равно σ_0 .

Точное определение микрораспределения энергии, передаваемой частицей, возможно с применением методов микродозиметрии [1, 14]. В ряде случаев для описания этого распределения можно использовать модель радиального распределения поглощенной энергии [35].

Пусть для инактивации клетки в мишени объема v должно произойти поглощение энергии $\epsilon = D_0 \rho v$, где ρ – плотность мишени. В треках частиц, имеющих одинаковые E , но различающихся по эффективному заряду Z , ϵ выделяется на тем больших расстояниях ($r_{\text{эф}}$) от геометрической оси трека, чем больше Z [34]. Если полагать, что у бактерий «дикого типа» (ωt), способных ликвидировать ОР ДНК, эффективность репарации не меняется на линейном участке кривой $\sigma(L)$, то определенное количество энергии, выделяемой частицами с такими значениями L , будет как бы «сниматься» репарационной системой. В этом случае для достижения $\epsilon = \epsilon_{\omega t}$ на расстоянии $r_{\text{эф}}$ требуется прохождение частицы с энергией E и $Z = Z_{\omega t}$. Тогда для мутантов (*rad*) с нарушенной системой репарации ОР $\epsilon = \epsilon_{\text{rad}}$ будет выделяться при

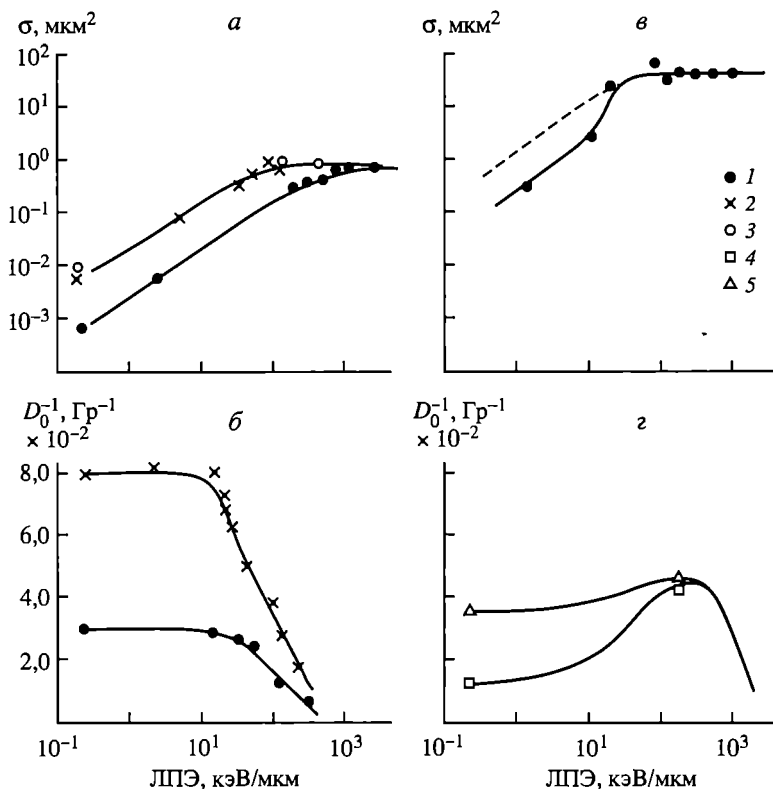


Рис. 6. Модификация зависимости поперечного сечения инактивации σ (а, в) и D_0^{-1} (б, г) про- и эукариотических клеток при нарушении репарации от ЛПЭ

а, б – для бактерий *E. coli* B/r [3] (1) и *B_{S-1}* [3] (2), [6] (3); в – для клеток китайского хомяка [10] (пунктиром показана ожидаемая зависимость σ от ЛПЭ для клеток при нарушении репарации ДР); г – радиочувствительность диплоидных дрожжей *S. cerevisiae* дикого типа (4) и мутанта *rad51* (5) при действии γ -лучей и α -частиц [25]

тех же $r_{эф}$ и E в случае прохождения частицы с $Z = Z_{rad} < Z_{\omega r}$ и соответственно меньшими L . Отсюда следует, что σ для клеток с нарушенной репарацией ОР при одинаковых L будет иметь большие значения по сравнению с объектами, имеющими нормальный репарационный генотип. Вследствие этого кривая $\sigma(L)$ 1-го рода не только будет сдвигаться влево относительно кривой $\sigma(L)$ для клеток с диким генотипом, но и выход на плато этой кривой будет происходить в области меньших значений L , при одинаковых значениях σ_0 (рис. 6, а).

К этому выводу можно прийти и другим путем. Действительно, пострадиационное восстановление у клеток дикого типа, не влияя на экспоненциальный характер кривой выживания, изменяет лишь крутизну зависимости $S(D)$ [3]:

$$S = \exp\left[(-DD_0^{-1})(1 - R)\right], \quad (9)$$

где R – вероятность репарации отдельных повреждений, когда клетки репарируют каждое из них независимо от других. Если $R = \text{const}$ в области плато

кривой $D_0^{-1}(L)$, репарация, не изменяя формы кривой $D_0^{-1}(L)$, будет приводить к сдвигу области плато по оси ординат на величину $(1 - R)$ (рис. 6,б):

$$S = \exp\{-D\sigma_0[1 - \exp(-L\omega^{-1}l)]L^{-1}(1 - R)\}, \quad (10)$$

Теперь рассмотрим возможные модификации кривых $\sigma(L)$ 2-го рода, характерных для эукариот. Уже упоминалось, что в отличие от кривых $\sigma(L)$ 1-го рода, где σ линейно возрастает с L , у кривых $\sigma(L)$ 2-го рода имеется область степенного возрастания σ , которая соответствует повышению биологической эффективности излучения с ростом L до максимальных значений. Согласно [36]

$$\sigma = \frac{m}{\omega} L \frac{\bar{A}}{N} (1 - R), \quad (11)$$

где m – число мишеней, ответственных за поражение клетки, \bar{A} – средняя атомная масса, N – число Авогадро. Из сопоставления (11) и рис. 6,в следует, что степенное возрастание σ можно объяснить только тем, что на данном интервале L вероятность восстановления R уменьшается.

У репарационных мутантов диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которых понижена способность к репарации ДР ДНК, как уже отмечалось, повышается чувствительность к γ -лучам, но мало меняется к α -частицам. Как показано на рис. 6,г, кривая $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода трансформируется при этом в кривую 1-го рода.

На рис. 6,в пунктиром показана ожидаемая трансформация кривой $\sigma(L)$ при полном подавлении способности к репарации ДР ДНК у клеток млекопитающих. Высота пика кривой $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода, т.е. максимальное значение ОБЭ, как можно думать, обусловлены тем, насколько эффективно клетки репарируют ДР ДНК при действии излучений с малой L . Это, по-видимому, находит отражение в особенностях зависимости $D_0^{-1}(L)$ для некоторых типов клеток млекопитающих, например, для клеток лимфомы мышей [37], не способных репарировать ДР ДНК [38]. Характерными особенностями этих клеток, в отличие от других клеток млекопитающих, являются более высокая радиочувствительность и экспоненциальность кривых выживания при действии γ -лучей, меньшие максимальные значения ОБЭ, более широкий максимум на кривой $D_0^{-1}(L)$ и сдвиг его в область меньших значений L (примерно 70 кэВ/мкм).

По-видимому, зависимость радиочувствительности от ЛПЭ для клеток эукариот с разной степенью выраженности репарации ДР будет описываться семейством кривых $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода, которые при полном блоке репарации ДР могут трансформироваться в кривую $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода; при нарушении репарации не только ДР, но и ОР можно ожидать дальнейшей трансформации кривой $D_0^{-1}(L)$ путем сдвига ее плато вверх по оси ординат, а перегиба – в область меньших значений L (рис. 7,а).

Для тех клеток прокариот, которым свойственна репарация ДР, можно ожидать трансформации кривой $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода в кривую 2-го рода (рис. 7,б). Такую трансформацию, по-видимому, можно будет наблюдать у полигеномных клеток *E. coli*, способных репарировать ДР [39], а также

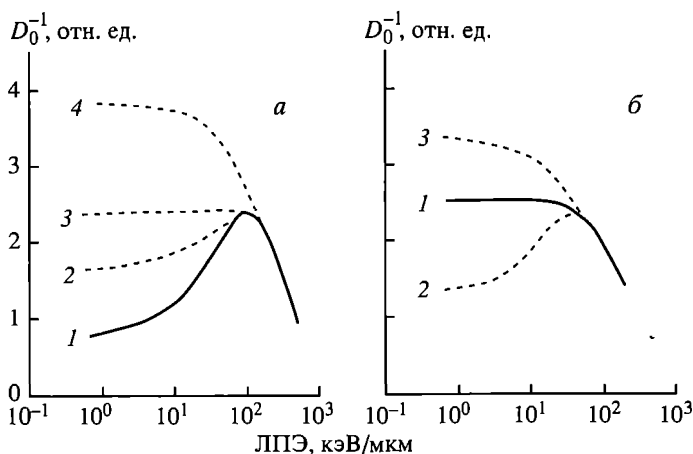


Рис. 7. Ожидаемые модификации зависимости радиочувствительности D_0^{-1} от ЛПЭ при разной степени выраженности репарации

a – для диплоидных клеток эукариот при ненарушенной способности репарации ДР и ОР (1), при частичном нарушении способности репарировать ДР (2), при полном блоке репарации ДР (3) и при нарушении репарации ОР (4); *б* – для клеток прокариот: дикого репарационного генотипа (1), в случае репарации ДР ДНК (2) и при подавлении репарации ОР (3)

у суперрезистентных мутантов *E. coli* с хорошо сбалансированными процессами эндонуклеазной активности и ресинтезом поврежденных участков ДНК [40]. Зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода, характерная для *Bac. subtilis* [5], также, по-видимому, может быть объяснена присущей им способностью репарации ДР [41].

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Попробуем теперь суммировать наши представления об основных факторах, определяющих различия в биологической эффективности ионизирующих излучений с разной L .

Как у про-, так и у эукариот основными летальными повреждениями являются ДР ДНК.

Большинство прокариот, в том числе *E. coli* с диким репарационным генотипом, не способны репарировать ДР, и возникновение одного ДР в генетическом аппарате является абсолютно летальным событием; об этом свидетельствует совпадение D_0 , определяемой по выживаемости клеток, и дозы, при которой образуется в среднем один нерепарированный ДР на геном. Для таких клеток характерна кривая $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода, область плато которой соответствует одному ДР на D_0 на геном, а нисходящая ветвь отражает возрастание числа ДР на D_0 на геном.

При действии излучений с малой L значительное количество ДР образуется из ОР, которые обычно эффективно репарируются клеткой. Нерепарированные ферментативные ДР, по-видимому, играют большую роль в летальном действии редкоионизирующих излучений. Выход таких повреждений можно уменьшить, применяя радиопротекторы. С повышением L излучений вероятность образования прямых ДР увеличивается, а ферментативных ДР уменьшается, что и находит свое отражение в ослаблении

модифицирующего влияния радиопротекторов с увеличением L . Как следствие этого, под влиянием радиопротекторов у прокариот наблюдается трансформация кривой $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода в кривую 2-го рода. Аналогичную трансформацию можно ожидать для гиперрезистентных мутантов *E. coli* и для полигеномных бактерий, способных к репарации прямых ДР. У радиочувствительных репарационных мутантов летальными являются также повреждения, не относящиеся к ДР, и для этих клеток характерна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода.

Для клеток эукариот ДР также являются наиболее тяжелыми повреждениями ДНК, которые служат у них молекулярной основой формирования хромосомных aberrаций. Клетки диплоидных эукариот, в отличие от гаплоидных, активно репарируют ДР благодаря наличию механизма диплоидспецифической репарации. У клеток млекопитающих первичный выход ДР на D_0 на геном одинаков в диапазоне L от 0,3 до 150 кэВ/мкм и составляет несколько десятков; большую часть таких ДР эти клетки при действии редкоизирующих излучений могут репарировать. При дальнейшем возрастании L выход ДР на D_0 увеличивается. Область перегиба кривой ($G \cdot D_0$ геном) (L) соответствует максимуму радиочувствительности. В пике радиочувствительности репарация ДР замедлена или отсутствует, и данное число ДР, образующихся при прохождении частиц с данными L , является летальным.

Разная репарируемость ДР, образующихся при действии редкоизирующих излучений и тяжелых частиц, может свидетельствовать о качественных различиях первичных повреждений в том и другом случае: о преимущественном образовании ферментативных ДР из ОР при облучении клеток электромагнитными излучениями и прямых ДР – при действии тяжелых частиц. Поскольку ферментативные ДР активно репарируются, пострadiационное восстановление наиболее эффективно осуществляется у клеток, облученных излучениями с малыми L . Можно думать, именно поэтому репарируемость лучевых повреждений уменьшается при увеличении количества энергии z_ν , приходящейся на одно событие попадания в мишень объема ν . Можно, следовательно, постулировать существование функции $R(z_\nu)$, которая связывает степень репарируемости элементарных мишеней с глубиной их поврежденности. Очевидно, что форма этой функции зависит от генотипа клеток.

Таким образом, биологическая эффективность излучений с разными L определяется факторами физической (z_ν) и биологической (R) природы. В работе сделана попытка показать, что фактор физической природы z , влияет на выход прямых ДР ДНК, трудно репарируемых клеткой, а фактор биологической природы R направлен на исправление, ликвидацию повреждений ДНК и находится под генетическим контролем.

Авторы чрезвычайно признательны профессору Х. Абелю за обсуждение рукописи и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В.И., Лысцов В.Н. Основы микродозиметрии. М.: Атомиздат, 1979.
2. Brustad T. // Adv. Biol., Med. Phys. 1962. Vol. 8. P. 161–224.
3. Fluke D., Brustad T., Birge A. // Radiation Res. 1960. Vol. 13. P. 788–808.
4. Красавин Е.А. Радиобиологические эффекты тяжелых ионов и изучение воздействия модифицирующих факторов. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1971.

5. *Yatagai F., Takahashi T., Matsuyama A.J.* // *Radial Res.* 1975. Vol. 16. P. 99–112.
6. *Munson R., Neary G., Bridges B., Preston R.* // *Internat. J. Radiat. Biol.* 1967. Vol. 13. P. 205–224.
7. *Sayeg I., Birge A., Beam C., Tobias C.* // *Radiation Res.* 1959. Vol. 10. P. 449–461.
8. *Mortimer R., Brustad T., Cormack D.V.* // *Radiation Res.* 1965. Vol. 26. P. 465–482.
9. *Thacker J., Stretch A., Stephans H.* // *Internat. J. Radiat. Biol.* 1979. Vol. 36. P. 137–148.
10. *Todd P.* // *Radiation Res.* 1975. Vol. 61. P. 288–297.
11. *Лу Д.Е.* Действие радиации на живые клетки. М.: Госатомиздат, 1963.
12. *Timofeeff-Ressovsky N.V., Zimmer K.G.* *Das Trefferprinzip in der Biologie.* Leipzig: S. Hirzel Verlag, 1947.
13. *Циммер К.Г.* Проблемы количественной радиобиологии. М.: Госатомиздат, 1962.
14. *Gunter K., Schulz W., Leistner W.* // *Studia Biophys.* 1976. Vol. 60. P. 163–209.
15. *Жестяников В.Д.* Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979.
16. *Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В.* // *Радиобиология.* 1981. Т. 21, вып. 1. С. 3–7.
17. *Hartwig M.* // *Studia Biophys.* 1977. Vol. 66. P. 231.
18. *Петров С.И.* // Повреждение и репарация ДНК. Пушино, 1980. С. 114–128.
19. *Бреслер С.Е., Носкин Л.А.* // *Радиобиология.* 1978. Т. 18, № 4. С. 548–555.
20. *Natarajan A.T., Obe J.* // *Mutat. Res.* 1978. Vol. 52. P. 137.
21. *Scott D., Fox M., Fox B.* // *Mutat. Res.* 1974. Vol. 22. P. 207–221.
22. *Dewey W.C., Miller H.H., Leeper D.V.* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1971. Vol. 68. P. 667.
23. *Корогодин В.И., Гудкова Н.К., Близник К.М.* // *Радиобиология.* 1978. Т. 13, № 4. С. 516–528.
24. *Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V.* // *Mol. Biol. Repts.* 1977. Vol. 3. P. 437–442.
25. *Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г. и др.* // *Радиобиология.* 1977. Т. 17, № 6. С. 700–710.
26. *Kampf G., Tolkendorf E.* // *Studia Biophys.* 1980. Vol. 78. P. 1–10.
27. *Тарасов В.А.* Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М.: Наука, 1982.
28. *Scott O.C.A.* // *Radiat. Effects in Phys., Chemist and Biol.* Amsterdam, 1963. P. 294–304.
29. *Рыжов Н.И., Ворожцова С.В., Кощеева Л.А.* // *Вопросы радиобиологии и биологического действия цитостатических препаратов.* Томск, 1970. Т. 3. С. 21–28.
30. *Рыжов Н.И., Ворожцова С.В., Красавин Е.А.* // *Радиобиология.* 1980. Т. 20, № 3. С. 373–379.
31. *Cole A., Shonka F., Corry P., Cooper W.G.* // *Molecular mechanisms for repair of DNA.* N.Y., 1975. P. 665–676.
32. *Weibezahn K.F., Sexauer C., Coquerelle T.* // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1980. Vol. 38. P. 365–371.
33. *Герасименко В.Н., Говорун Р.Д., Рыжов Н.И.* // *Радиобиология.* 1980. Т. 20, № 2. С. 206–211.
34. *Кудряшов Е.И., Маренный А.М., Мещерякова О.М., Попов В.И.* // *Вопрос микродозиметрии: Тр. I Всес. совещ. по микродозиметрии.* М.: Атомиздат, 1973. С. 49–55.
35. *Buttes J.J., Katz R.* // *Radiation Res.* 1967. Vol. 30. P. 855–871.
36. *Ковалев Е.Е., Сакович В.А.* // Там же. С. 17–29.
37. *Berry R.J.* // *Radiation Res.* 1977. Vol. 70. P. 355–361.
38. *Lehman A.R., Ormerod M.G.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. Vol. 217. P. 268–277.
39. *Krasin F., Hutchinson F.* // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 116. P. 81–98.
40. *Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л.* // *Генетика,* 1980. Т. 16. С. 1753–1763.
41. *Harikaran P.V., Hutchinson F.* // *J. Mol. Biol.* 1973. Vol. 75. P. 479–494.

FACTORS DETERMINING DIFFERENCES IN BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF IONIZING RADIATIONS POSSESSING DIFFERENT PHYSICAL CHARACTERISTICS

V.I. Korogodin, E.A. Krasavin

Radiosensitivity of pro- and eukaryotes (D_0^{-1}) is considered with regard to the linear energy transfer (LET) of ionizing radiations. It was shown that the dependence of radiosensitivity on LET, D_0^{-1} (LET), is determined by not merely physical characteristics of radiations but also by the ability of repair of DNA double strand breaks (DSB).

The increase in the radiosensitivity of eukaryotes with the increase of LET is connected with the decrease in the DSB repair when cells are exposed to densely ionizing particles. The decrease in DSB repair is apparently connected with the increment of straight DSB, comparing to the yield of enzymatic DSB. Potential mechanisms of D_0^{-1} (LET) modifications for radiosensitive and superresistant mutants are analyzed.

Глава 2

КАСКАДНЫЙ МУТАГЕНЕЗ, ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КЛЕТОК

Эта тема возникла у В.И. Корогодина, как всегда, «случайно». По пришеству ему свойству внимательного наблюдателя всего живого, Владимир Иванович взялся рассматривать забытые на несколько недель чашки с колониями облученных клеток дрожжей и был поражен появлением новых, ранее не учтенных колоний и разнообразием их форм. Хорошо зная работы Г.А. Надсона и Г.С. Филиппова [1, 2], он понял, что это «сальтанты», описанные этими исследователями еще в 20–30-е гг. Владимир Иванович, вместе с К.М. Близник, стал изучать явление лучевого расообразования у дрожжей, которое перешло в исследование неустойчивости радиорас, наблюдавшейся ими на протяжении сотен клеточных генераций. Это явление он назвал «каскадным мутагенезом», подчеркивая фенотипические различия отдаленных потомков облученных клеток. Серию статей, посвященных расообразованию, он посвятил академику Г.А. Надсону.

Со своими коллегами – в основном К.М. Близник, Ю.Г. Капульцевич и В.Г. Петиным – В.И. Корогодина описал феномены лучевого расообразования и неустойчивости клонов у дрожжей. Полученные закономерности образования неустойчивых клонов они связали с эффектом дорастания, формами инактивации и летальным действием радиации, которые были описаны ими в серии статей «Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток» (1972). Ученые пришли к выводу, что повреждения, вызывающие летальный эффект и появление сальтантов, имеют одну и ту же природу.

Далее В.И. Корогодина и его молодые сотрудники стали изучать механизмы этого явления. Они показали, совместно с Ю.В. Корогодиной, что механизм неустойчивости не связан с репарационной системой и ядерными мутациями. Следующим этапом было исследование роли митотической рекомбинации в формировании неустойчивых клонов. Используя созданную ими модель, описывающую вероятность деления клеток в зависимости от числа повреждений [3], они определили, что максимальное число рекомбинантных событий соответствует максимальному числу повреждений клетки. Это согласовывалось и с данными, опубликованными другими авторами [4], о существенной роли митотической рекомбинации в расообразовании у диплоидных дрожжей. Во Всесоюзном НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Корогодина осуществил проверку влияния гетерозиготности на повышение частоты митотической рекомбинации и образование неустойчивых клонов (1972–1977). Гипотеза о митотической рекомбинации как механизме неустойчивости не получила подтверждения. Зато стало ясно, что повышение вероятности расообразования и выхода неустойчивых клонов у дрожжей увеличивается с экстраполяционным числом кривой выжи-

вания. Оказалось, что эффекты дорастания и расообразования отсутствуют у гаплоидных дрожжей (у них нет плеча кривой выживания). Анализ случайности наследственных изменений (дыхательных мутаций, нестабильности и митотической рекомбинации) в клонах сальтантов выявил повышенную вероятность изменений только в том типе колоний, который характеризуется высокой вероятностью расообразования.

Подводя итоги, В.И. Корогодина определил возможную природу изменений, вызываемых в клетках радиацией, как различные хромосомные аберрации, приводящие к нарушениям митотического деления ядра и клетки. Для диплоидных клеток такие нарушения не являются летальными, могут наследоваться и суммироваться. Серию статей «Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов» продолжила небольшая серия «Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*», в которой описаны исследования роли митотического кроссинговера и нарушения митотического деления ядра и клетки в спонтанном и радиационно-индуцированном расщеплении. Авторы показали, что механизм митотического кроссинговера сохраняет стабильность клеток, а природой митотической нестабильности являются нарушения митотических процессов в клетках. Регистрируемая нестабильность – хромосомная нестабильность, являющаяся не мутационной, а рекомбинационной.

Впервые анализ генетической нестабильности был проведен Б. Мак Клинтон [5], в нашем отечестве исследования хромосомной нестабильности проводила А.А. Прокофьева-Бельговская [6]. Однако более подробное описание феномена нестабильности, включая механизм расообразования, было сделано впервые В.И. Корогодиным и его коллегами на дрожжах. Описанную ими изменчивость В.И. Корогодина связывал с проявлением «в мире микроорганизмов закона гомологических рядов наследственной изменчивости, сформулированного Вавиловым».

Исследования В.И. Корогодина оказались в преддверии «эры» изучения генетической нестабильности, которая началась в конце 70-х годов и продолжается до сих пор. Этот период интенсивных исследований связан с открытием мобильных генетических элементов и их роли в феномене нестабильности [7]. Характерные черты явления были впервые изучены в работах В.И. Корогодина: связь нестабильности с нарушениями генетического аппарата, летальными мутациями, представляющими собой крупные хромосомные аномалии [8]. Позже на дрозофиле было показано, что генетическая нестабильность является характерным признаком особого класса мутаций – условных доминантных леталей [9].

Западные генетики и радиобиологи, изучающие влияние стрессовых воздействий, описывают процесс появления вторичных нарушений, индуцированный первичным повреждением [10, 11]. Выводы Корогодина и его коллег о высокой вероятности расообразования в неоптимальных условиях культивирования клеток, возможности суммирования в клетке хромосомных аберраций и наибольшем числе наследственных изменений в гибнущей части популяции имеют особое значение для изучения последствий в области стрессовых воздействий, где накопление повреждений происходит во времени и приводит к адаптации [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Надсон Г.А. О действии радия на дрожжевые грибки в связи с проблемой действия радия на живую материю // Вестн. рентгенол. радиолог. 1920. № 1. С. 45–137.
2. Надсон Г.А., Филиппов Г.С. Образование новых резистентных рас микроорганизмов при действии X-лучей. Радиорасы *Sporobolomyces* // Вестн. рентгенол. радиолог. 1932. № 10. С. 275–299.
3. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.
4. Захаров И.А., Наумов Г.И. // Генетика. 1969. Т. 5, № 2. С. 139.
5. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes // Genetics. 1938. Vol. 23. P. 315–376.
6. Prokofjeva-Belgovskaya A.A. Radiation damage in chromosomes at early stages of development of salmo salar // Cytologiia. 1961. Vol. 3. P. 437–445.
7. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1985. 472 с.
8. Корогодин В.И., Гудкова Н.К., Близник К.М. Рецессивные летальные мутации и их роль в лучевой инактивации клеток (эксперименты на дрожжевых организмах) // Радиобиология. 1978. Т. 18, № 4. С. 516–528.
9. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А. и др. От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства // Генетика. 2004. Т. 40, № 9. С. 1157–1172.
10. Rosenberg S.M., Thulin C., Harris R.S. Transient and Heritable Mutators in Adaptive Evolution in the Lab and in Nature // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 1559–1566.
11. Mothersill C., Seymour C.B. Genomic instability, bystander effect and radiation risks: implications for development of protection strategies for man and environment // Radiats. Biologija. Radioecologija. 2000. Vol. 40. P. 615–620.
12. Florko B.V., Korogodina V.L. Analysis of the distribution structure as exemplified by one cytogenetic problem // Phys. Particles Nuclei Lett. 2007. Vol. 4. P. 331–338.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ

*Серия сообщений, публикуемых под этим общим заглавием,
посвящается светлой памяти академика Г.А. Надсона*

Сообщение 1. РАДИОРАСЫ ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS (VINI)*

В 1925 г. Надсон и Филиппов [1] сообщили, что после действия рентгеновых лучей на плесневые грибки *Mucor genevensis* ими получены новые, стабильные при вегетативном размножении расы. В дальнейшем работы по получению и изучению новых рас микроорганизмов Надсон и его сотрудники проводили в основном на дрожжах [2–12]. Расы, полученные с помощью рентгеновых лучей, Надсон называл «рентгенорасы», а с помощью лучей радия или радона – «радиорасы».

Для получения радиорас Надсон и его сотрудники использовали различные методики. В некоторых опытах рентгеновыми лучами облучали водную суспензию дрожжевых клеток, которую рассеивали затем в чашки Петри на агаризованное или желатинизированное сусло. В других случаях рентгеновыми лучами или излучением радия однократно или несколько раз облучали куль-

туру дрожжей, растущую на твердой среде, и наблюдали за ее дальнейшим развитием. Иногда насыщали радоном пивное сусло, в которое вносили затем дрожжевые клетки; после размножения дрожжи рассеивали на твердую среду.

Во всех случаях, независимо от способа облучения, при дальнейшем развитии клеток на облученной среде или при рассеивании на поверхность свежей среды среди вырастающих колоний можно было обнаружить колонии, содержащие видоизмененные секторы или целиком измененные по сравнению с контролем. Измененные колонии чаще встречались среди тех, которые достигали макроскопических размеров в более поздние сроки. Эти колонии и служили исходным материалом для выделения радиорас.

В лаборатории Надсона радиорасы были получены у представителей родов *Saccharomyces* (главным образом *S. cerevisiae*, XII раса), *Sporobolomyces*, *Nadsonia* и некоторых других. Радиорасы отличались от исходных штаммов размерами, формой и цветом гигантских колоний, размерами и формой клеток, скоростью роста, интенсивностью брожения. Основываясь на морфологии гигантских колоний и составляющих их клеток, Надсон подразделял радиорасы на два (гладкие – *S* и негладкие – *R*) или четыре типа (*K*, *A*, *B* и *C*).

Многие радиорасы, полученные в лаборатории Надсона, сохраняли свои свойства на протяжении десятков и сотен пассажей (пересевов на свежую питательную среду). В некоторых работах Надсон называл такие расы *мутантами*. Позднее для их обозначения он использует термин «сальтанты» (от лат. *saltus* – скачок), желая подчеркнуть, что природа наследственных изменений, приводящих к возникновению радиорас, неизвестна. Мы сохраним за радиорасами дрожжей наименование «сальтанты», не только следуя традиции, но и по той причине, что этим термином иногда обозначают новые популяционные типы или таксономические единицы различного ранга, внешне возникающие из генетически сильно видоизмененных особей [13].

В дальнейшем оказалось, что у дрожжевых организмов новые расы можно получить не только при воздействии ионизирующими излучениями, но и под влиянием ультрафиолета, пониженной или повышенной температуры, цианистых солей, хлороформа и других агентов [4–12, 14–16].

Несмотря на то, что обнаруженное Надсоном расообразование у дрожжей оказалось широко распространенным, закономерности этого явления до сих пор недостаточно изучены даже в случае действия ионизирующих излучений. Так, неизвестно, какова зависимость выхода сальтантов от дозы облучения, обратимы ли повреждения, приводящие к появлению сальтантов, связано ли лучевое расообразование с задержкой роста колоний из облученных клеток. Приступая к изучению закономерностей формирования радиорас у дрожжевых организмов, мы сосредоточили внимание на этих вопросах, а также на возможной природе соответствующих генетических изменений. В этом сообщении описаны использованная нами методика и основные типы полученных радиорас.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили диплоидные дрожжи *S. ellipsoideus* (*vini*), штамм Мегри 139-В. Этот штамм был выделен Кудрявцевым из природных источников в районе реки Мегри (Армения) [17] и в 1954 г. любезно

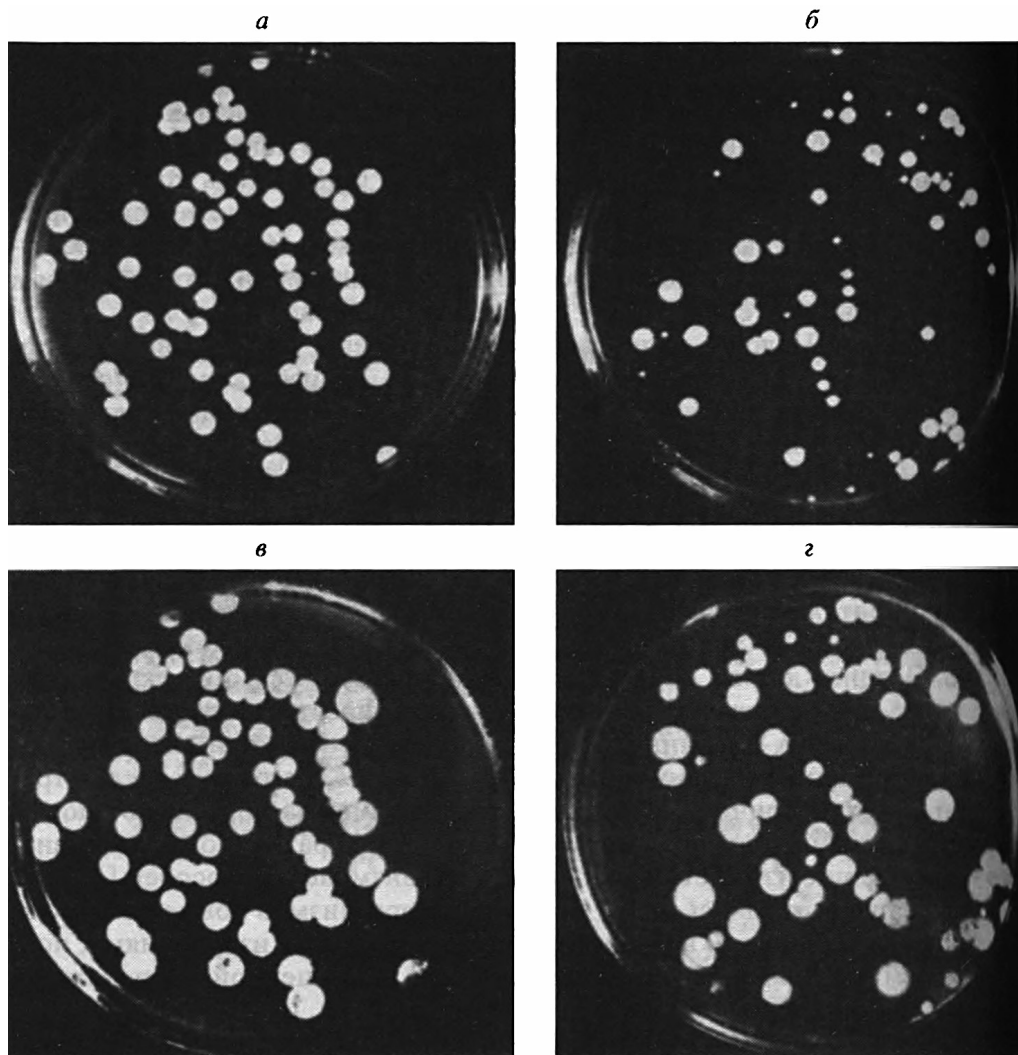


Рис. 1. Макроколонии разного возраста, выросшие из облученных и необлученных дрожжей
а – контроль, 4 сут; *б* – 70 крад, 4 сут; *в* – контроль, 14 сут; *г* – 70 крад, 14 сут

передан в наше распоряжение; радиобиологические реакции дрожжей этого штамма весьма полно изучены [18].

Средой для культивирования дрожжей служило агаризованное пивное неохмеленное сусло крепостью 4° Балл. Для получения сальтантов клетки 2–4-суточной культуры суспендировали в стерильной воде и облучали γ -лучами Co^{60} (установка «Гамма-целл 220») в дозах порядка 70 крад (мощность 2,3 крад/мин), снижающих их выживаемость до 1–3%. Облученные дрожжи высевали на поверхность агаризованного суслу в чашки Петри с таким расчетом, чтобы в каждой чашке выросло 30–50 колоний, инкубировали неделю при 30 °С и 2–3 недели при комнатной температуре.

Необлученные дрожжевые клетки, посеянные на поверхность суслу-агара, через 3–4 сут образуют крупные колонии одинаковых размеров, кру-

глые, гладкие, белого или светло-кремового цвета (рис. 1,а). После облучения формирование колоний затягивается и даже на 4–5-е сут некоторые колонии весьма мелки; в этом возрасте их морфологические особенности еще не выявлены и различаются они только по величине (рис. 1,б). При дальнейшей инкубации колонии, выросшие из необлученных клеток, в большинстве случаев сохраняют свою форму и окраску и только увеличиваются в размерах (рис. 1,в). Колонии, выросшие из облученных клеток, с течением времени начинают различаться между собой. Некоторые из них по окраске и форме остаются подобными контрольным, другие же отличаются от контрольных либо наличием измененных секторов, либо по величине, форме и окраске всей колонии в целом (рис. 1,г).

Видоизмененные колонии, вырастающие из облученных клеток, и служили материалом для выделения радиорас. Клетки, взятые из таких колоний, суспендировали в воде и, определив их концентрацию, высевали в чашки Петри на толстый слой твердой питательной среды. Морфологические особенности вырастающих колоний и составляющих их клеток служили показателем наличия или отсутствия вызванных облучением наследуемых изменений.

Новые морфологические варианты, появляющиеся в таких посевах, вновь суспендировали и рассеивали, и так поступали неоднократно, выбирая для каждого пассажа колонию, типичную для данного варианта, и, отмечая особенности колоний-спутников. Радиорасам, полученным в результате такого пассирования, присваивали свои обозначения. Колонии-спутники в ряде случаев также использовали для выделения новых радиорас.

Культуры радиорас сохраняли на столбиках агаризованного суслу под слоем стерильного вазелинового масла. Музейные культуры обновляли 2–3 раза в год, проводя каждый раз через отдельные клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описанная выше методика позволила нам выделить и изучить около ста радиорас дрожжей. Эти расы по морфологическим признакам можно разделить на 12 групп. В какой мере расы, принадлежащие к одной группе, несут сходные генетические изменения, сказать трудно, и поэтому объединению их в группы мы придаем только феноменологическое значение. Последовательность описания групп также не имеет отношения к возможному их генетическому родству.

В таблице приведены принятые у нас названия основных групп радиорас, описания клеток и гигантских колоний, а также номера рас, принадлежащих к этим группам. Здесь нет сведений только об отличающихся повышенной нестабильностью расах из семейств 2 и 10, которые будут описаны в следующем сообщении. На рис. 2 приведены фотографии колоний типичных представителей разных групп радиорас, а на рис. 3 – микрофотографии их клеток.

Как мы уже отмечали, необлученные клетки *S. ellipsoideus* Мегри 139-В образуют на твердой питательной среде круглые гладкие колонии чечевицеобразной формы, с ровными краями и слегка матовой поверхностью белого или светло-кремового цвета. Морфологически измененные колонии в

Основные морфологические группы радиорас

	Морфология колоний	Морфология клеток	Номера радиорас
I. Гладкие	Колонии крупные или средние, круглые, с ровным краем, гладкие, мягкие, матовые. Молодые колонии белые, с возрастом становятся бежевыми, центральная зона иногда пигментируется. У некоторых рас при старении в центре колонии появляется углубление или сосочек, по периферии – легкая опушенность; могут образовываться узкие белые сектора.	Клетки крупные или средние, эллипсоидные или округлые; встречаются крупные вытянутые клетки с несколькими вакуолями.	Контроль 1-1 1-2 6-4 6-8-2 6-9-1 16-2-1 16-3 17-1 19-1-2 22-2
II. Пигментированные	Колонии мелкие, круглые, с ровным краем, мягкие, блестящие. Молодые колонии обычно белые, при старении становятся темно-коричневыми; пигментация охватывает или всю колонию, или ее центральную зону.	Клетки мелкие, овальные или продолговатые.	6-1 6-2 6-3 6-5 8-4 17-2 42-3 48
III. Ромашки	Колонии средних размеров, круглые, гладкие, мягкие, образуют по периферии многочисленные белые секторы. Центр колонии матовый, белый, с возрастом становится бежевым или кремовым.	Клетки крупные или средние, овальные или круглые, у некоторых штаммов продолговатые, иногда встречаются неправильной формы.	6-8-1 19-3-1 22-1 30
IV. Бородавчатые	Колонии средних размеров, выпуклые, круглые, иногда с неровным краем, мягкие, бежевые или светло-коричневые, на поверхности белые бородавки. Иногда по периферии образуются белые секторы.	Клетки средних размеров, круглые или овальные. У некоторых клеток имеются отростки, по форме напоминающие стеригмы с конидиями.	16-1
V. Складчатые	Колонии крупные, круглые, с ровным краем, мягкие, белые, с возрастом становятся светло-серыми или кремовыми. Поверхность складчатая. Складчатость может быть слабо выражена только в центральной части колонии или может охватывать всю колонию в виде переплетающихся нитей. У некоторых рас при старении по периферии колоний образуются гладкие белые секторы.	Клетки обычно крупные, округлые или продолговатые, изредка узкие, вытянутые.	2-1 6-9-2 16-2-2 19-1-1 23-2 24-1-2 28-1 29 31 42-1 47 51
VI. Звездчатые	Колонии крупные, равномерно разрастающиеся по поверхности агара, приобретающие с возрастом форму многолучевой звезды. Поверхность шероховатая, консистенция сухая. Цвет серовато-коричневый.	Клетки крупные, гетерогенные, от круглых до вытянутых, часто гипертрофированные, иногда неправильной формы; образуют комки.	45-1-2

Основные морфологические группы радиорас (окончание)

	Морфология колоний	Морфология клеток	Номера радиорас
VII. Ребристые	Колонии крупные, круглые, сероватые, с неровным краем, плоские, со слегка выступающим центром. Поверхность ребристая (от центра отходят радиальные валики), иногда с концентрической исчерченностью. Консистенция рыхлая, как бы водянистая.	Клетки крупные, вытянутые, иногда грушевидные или булавовидные.	19-3-5 24-1-3 35 41-1 41-2 46-1
VIII. Кружевные	Колонии средние или крупные, круглые, состоящие из центральной и периферической зон. Центральная зона слегка выпуклая, гладкая, блестящая, бежевая; периферическая зона плоская, рыхлая, с неровным, как бы кружевным краем.	Клетки средних размеров, преимущественно неправильной, амебoidной формы, изредка овальные и круглые.	11-1-3 11-1-1 3-1 11-1-1 3-1
IX. Губчатые	Колонии крупные, плоские, неправильной формы, с пористой, как бы губчатой поверхностью. Консистенция мягкая, цвет белый или светло-коричневый.	Клетки округлые, грушевидные или продолговатые; для молодых колоний характерен мицелиеподобный рост клеток.	36-2 36-2 37 38-1-1 38-2-1 38-2-2
X. Слоистые	Колонии средних размеров, выпуклые, неправильной формы. Состоят из плоского, шероховатого, пигментированного основания сухой консистенции и верхнего мягкого слоя кремового цвета, иногда образующего белые секторы.	Клетки основания и кремового слоя гетерогенные – круглые, амебoidные или вытянутые, иногда соединенные в друзы; клетки секторов средних размеров, округлые и эллипсоидные.	49-1-1 2-2
XI. Чешуйчатые	Колонии средних размеров, с неровным краем, сухие, шероховатые, состоящие как бы из отдельных чешуек.	Клетки средних размеров, круглые или эллипсоидные, у некоторых рас продолговатые; образуют комки.	8-1 11-1-2 38-1-2 39 42-2 52-1 52-2
XII. Булгорчатые	Колонии средних размеров, конусовидные или куполообразные, мягкие или суховатые, белого или серого цвета; с возрастом у основания колонии образуются врастающие в агар отроги.	Клетки средних размеров, однородные, округлые, эллипсоидные или вытянутые (у разных рас). В колониях сухой консистенции клетки образуют комки.	2-2-4 3 7-1 11-1-1 19-4 23-3 40

контроле встречаются весьма редко, примерно 1 : 1000. Просмотрев около десятка тысяч колоний, выросших из необлученных клеток, мы отобрали семь морфологически измененных форм, из которых путем пассирования выделили 13 новых рас. По внешним признакам колоний и клеток эти расы не отличались заметным образом от тех, которые были получены с помощью облучения.

Гигантские колонии радиорас, относящихся к разным группам, отличаются от колоний исходного «дикого» типа размерами, формой и окраской,

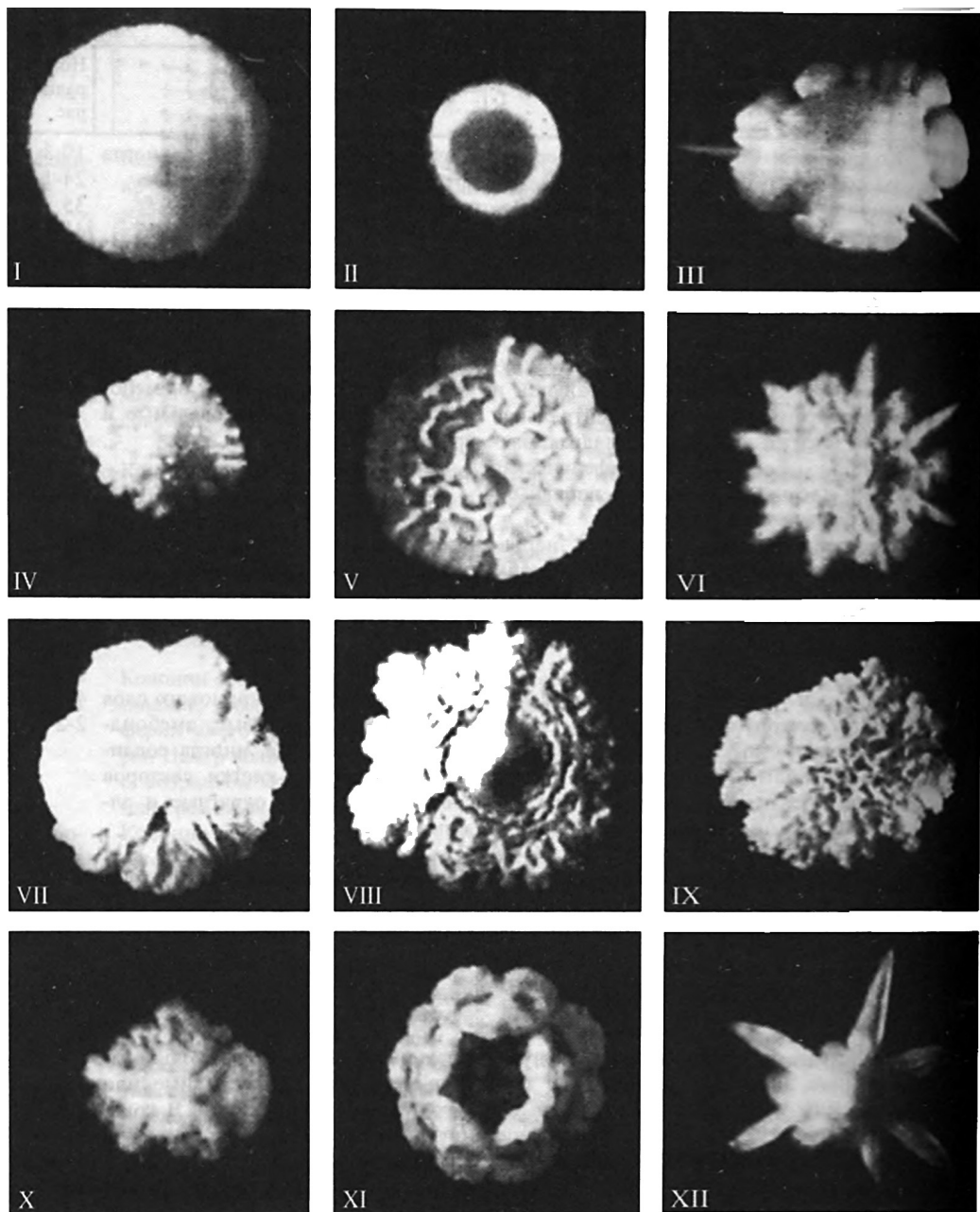


Рис. 2. Колонии дрожжей, относящихся к радиорасам разных морфологических групп (ув. $\times 5$)

I – гладкие (контроль), II – пигментированные, III – ромашки, IV – бородавчатые, V – складчатые, VI – звездчатые, VII – ребристые, VIII – кружевные, IX – губчатые, X – слоистые, XI – чешуйчатые, XII – бугорчатые

характером поверхности, склонностью к образованию секторов. Такие колонии могут быть круглые и гладкие, ребристые, складчатые или бородавчатые, состоят как бы из отдельных чешуек или имеют кружевную кайму. Для некоторых рас характерны плоские колонии неправильной формы с губча-

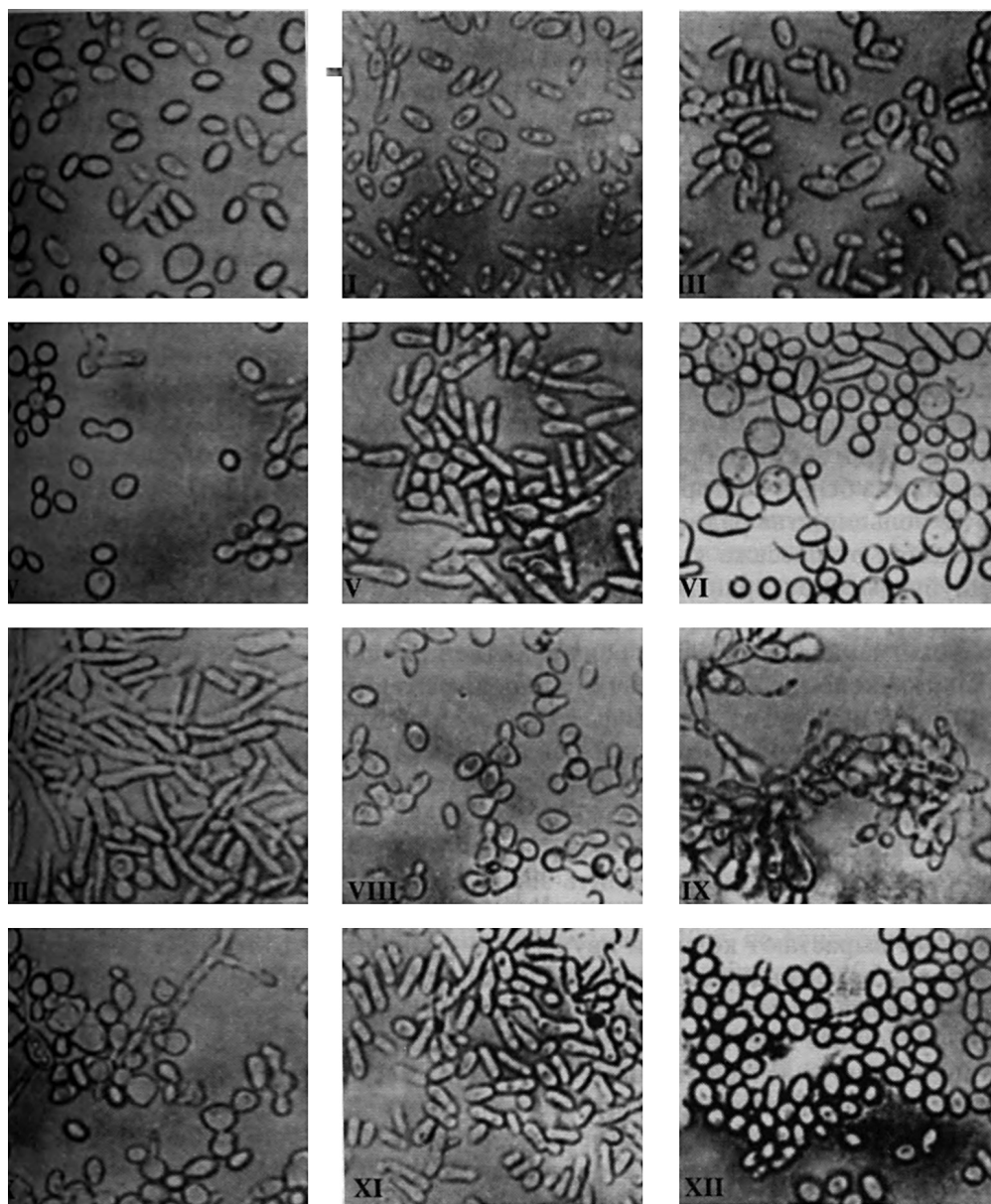


Рис. 3. Клетки дрожжей, относящихся к радиорасам разных морфологических групп (ув. $\times 500$)
 Обозначения I–XII см. на рис. 2

той поверхностью, а для других – колонии с пигментированным основанием и верхним слоем кремового цвета, иногда образующим белые секторы. Для колоний бугорчатых рас характерны врастающие в агар отростки, а у звездчатых рас колонии равномерно разрастаются по поверхности агара, приобретая с возрастом форму многолучевой звезды.

Клетки разных радиорас также могут существенно различаться по размерам и форме. Так, для дикого типа и многих гладких рас характерны эллипсоидные клетки средних размеров ($8,4 \times 4,8$ мк), для складчатых рас – удли-

ненные, овальные или круглые клетки ($11,6 \times 3,0$, $10,7 \times 5,4$ или $5,2 \times 5,1$ мк) для кружевных – клетки неправильной амебоидной формы ($6,9 \times 3,0$ мк). У рас, образующих ребристые колонии, клетки очень гетерогенны, иногда гипертрофированные, уродливые на вид, со вздутиями и перетяжками. Для губчатых рас характерен мицелиеподобный рост клеток, что особенно выражено в молодых колониях.

Радиорасы, относящиеся к одной и той же группе, различаются между собой благодаря варьированию признаков, специфичных для этой группы, или благодаря наличию каких-либо дополнительных особенностей. Имеются также расы, которые, будучи отнесены к какой-либо группе по одному или нескольким признакам, наиболее привлекающим внимание, обладают также признаками, свойственными расам других групп. Например, раса 28-1 относится к группе складчатых, однако у колоний этой расы ярко выражена склонность к секторообразованию, так что с возрастом они обрастают как бы воланом из белых секторов, что характерно для рас из группы «ромашки».

У большинства радиорас типичные признаки и свойства хорошо воспроизводятся от пассажа к пассажи. Исключение составляют, пожалуй, лишь чешуйчатые и бугорчатые расы. Так, некоторые чешуйчатые расы довольно часто образуют колонии бугорчатого типа; иногда в одной из двух параллельных чашек вырастают преимущественно чешуйчатые, а в другой – бугорчатые колонии. У этих рас степень выраженности формы колоний зависит, по-видимому, от многих факторов и, в частности, от густоты посева.

Таким образом, применявшаяся нами методика пересевов радиорас (отдельными клетками) и получения гигантских колоний (из отдельных же клеток, а не из капель суспензий) позволила нам различать и поддерживать большое количество рас и подразделить их на 12 основных групп. Эта же методика позволила выделить значительное число радиорас, у которых колонии с возрастом образуют гладкие белые секторы. При рассеве таких колоний вырастают колонии двух типов – колонии, подобные исходной, и колонии, напоминающие «дикий» штамм; колонии второго типа условно можно называть ревертантами. При пересевах петель или капель суспензии расы, склонные к секторообразованию, будут быстро вытесняться ревертантами, имитируя возврат к норме. По-видимому, именно такие расы Надсон называл «нестойкими» и считал, что они возникают вследствие «физиологических», а не генетических, изменений [2]. Некоторые авторы [19] считают, что «нестойкие» или «нестабильные» расы, иногда возникающие у дрожжей после облучения ультрафиолетом, могут быть связаны с цитоплазматическими изменениями, имеющими «ограниченную наследуемость» и поэтому быстро исчезающими в процессе культивирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные по лучевому расообразованию у дрожжей полностью подтвердили соответствующие наблюдения Надсона и его сотрудников [2]. Действительно, высевая облученные клетки на твердую питательную среду и делая такие же рассевы из выросших колоний, можно выделить большое число весьма разнообразных рас дрожжевых организмов, стойко сохраняющих в чреде пассажей свои морфологические особенности.

Многие расы, выделенные нами из дрожжей *S. ellipsoideus* Мегри 139-В, судя по морфологии колоний и клеток (см. таблицу и рис. 2 и 3), подобны или идентичны тем, которые были получены в лаборатории Надсона у дрожжей разных видов и родов под влиянием ионизирующих излучений [2] и при воздействии различными химическими агентами [5, 6, 10], а также повышенной или пониженной температурой [4, 7]. Весьма характерно, что, судя по работам Имшенецкого [3] и Красильникова [4], а также согласно нашим наблюдениям, такие же расы могут возникать у дрожжей и «спонтанно», без каких-либо специальных воздействий или под влиянием продуктов собственной жизнедеятельности (в стареющих культурах).

Все сказанное выше позволяет нам присоединиться к мнению Надсона [2] и Филиппова [12], что в результате облучения дрожжи однородной культуры могут давать начало расам, диапазон изменчивости которых весьма широк и напоминает диапазон изменчивости природных представителей разных видов и родов. «Если сравнить типичные формы клеток определенных родов и видов дрожжей, – писал Надсон, – например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Mucoderma Torula* и т.д., то поражает сходство их с формами, представленными расами, произошедшими от одной дрожжевой клетки *Saccharomyces cerevisiae* при облучении..., и напрашивается мысль, что это не просто совпадение, а выражение определенной закономерности» ([2], стр. 141–142). Эту закономерность можно сформулировать следующим образом. Вследствие того, что наследуемые изменения, возникающие спонтанно или под влиянием каких-либо воздействий у представителей разных видов и родов микроорганизмов, затрагивают у них сходные признаки и свойства, в пределах этих видов и родов могут возникать расы, сходные по ряду признаков как между собой, так и с вариантами, существующими в природе в форме других таксономических групп. А это и есть проявление в мире микроорганизмов закона гомологических рядов наследственной изменчивости, сформулированного Вавиловым в 1920 г. на основании изучения рядов изменчивости в разных таксонах высших растений [20].

В основе возникновения радиорас дрожжевых организмов могут лежать события самой различной природы. Как отмечает Симпсон [13], сальтанты у разных организмов могут образовываться благодаря одной или нескольким генным мутациям, различным хромосомным перестройкам, выщеплению или рекомбинации генов, находившихся у исходной формы в гетерозиготном состоянии. Эти соображения, по-видимому, вполне применимы к диплоидным дрожжам [21], у которых, в дополнение к указанным факторам, значительная роль в расообразовании может принадлежать и цитоплазматической наследуемой изменчивости [22]. Морфологические особенности колоний у дрожжевых организмов находятся под контролем большого числа генов, относящихся к разным группам сцепления [23], а высокая гетерозиготность природных рас дрожжей, описанная Захаровым и Наумовым [24], позволяет предположить, что у использованного нами природного штамма *S. ellipsoideus* (*vini*), Мегри 139-В [17] многие из этих генов также находятся в гетерозиготном состоянии. Это создает большие возможности для морфологического проявления последствий разных форм соматической рекомбинации (которые могут вызываться облучением), таких, как митотический кроссинговер, нерасхождение хромосом при митозе или стимулируемая анеуплоидией гапло-

идизация [25]. К таким же последствиям могут приводить некоторые виды хромосомных aberrаций (например делеции, затрагивающие участки хромосом, содержащие доминантные аллели соответствующих генов).

Многообразие изменений, которые могут лежать в основе лучевого ра-сообразования у дрожжей, означает, что для выяснения природы событий, приводящих к возникновению той или иной расы, в каждом конкретном слу-чае необходимо проводить специальный генетический анализ.

Авторы благодарят проф. Н. И. Шапиро и проф. Н. В. Лучника за крити-ческое обсуждение материалов этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Надсон Г.А., Филиппов Г.С. // Вестн. рентгенол. радиол. 1925. Т. 3, № 6. С. 305.
2. Надсон Г.А. Избранные труды. М.: Наука, 1967. Т. 2.
3. Имшенецкий А.А. // Микробиология. 1935. № 4. С. 350.
4. Красильников Н.А. // Изв. АН СССР. 1934. № 2-3. С. 335.
5. Мейсель М.Н. // Микробиол. журн. 1928. № 6. С. 225.
6. Мейсель М.Н. // Изв. АН СССР. 1932. № 9. С. 1337.
7. Надсон Г.А., Кудрявцев В.И. // Микробиол. журн. 1927. Т. 5, № 3. С. 166.
8. Оленов Ю.М. // Вестн. рентгенол. радиол. 1935. № 14. С. 255.
9. Рохлина Э.Я. // Изв. АН СССР. 1934. № 2-3. С. 327.
10. Стадниченко Н.Н. // Изв. АН СССР. 1934. № 5. С. 669.
11. Филиппов Г.С. // Вестн. рентгенол., радиол. 1926. № 4. С. 235.
12. Филиппов Г.С. // Вестн. рентгенол., радиол. 1932. № 10. С. 512.
13. Симпсон Д.Г. // Темпы и формы эволюции. М.: Изд-во иностр. лит., 1948.
14. Lacassagne A., Shoen M., Berand P. // Ann. Fermentations. 1939. Vol. 5. N 3. P. 129.
15. Захаров И.А. Действие ультрафиолетового излучения на размножение и выживание дрож-жей. Дипломная работа по радиационной генетике. Л.: ЛГУ, 1956.
16. Левин В.Л. // Реакция клеток и их белковых компонентов на экстремальные воздействия. М.; Л.: Наука, 1966. С. 110.
17. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954.
18. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
19. Horn P., Wilkie D. // J. Bacteriol. 1966. Т. 91. P. 1388.
20. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Саратов, 1920.
21. Захаров И.А. // Генетика. 1967. Т. 3, № 6. С. 3.
22. Джинкс Дж. Нехромосомная наследственность. М.: Мир, 1966.
23. Кузнецов В.В. // Генетика. 1968. Т. 4, № 9. С. 82.
24. Захаров И.А., Наумов Г.И. // Генетика. 1969. Т. 5, № 2. С. 139.
25. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов. М.: Мир, 1965.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS

*Series of communications published under this common heading
is dedicated to the memory of academician G.A. Nadson*

Comm. I. RADIORACES OF DIPLOID YEASTS *SACCAROMYCES ELLIPSOIDEUS (VINI)*

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik

Yeast cells in stationary phase were irradiated by 70 krad of ^{60}Co γ -rays and plated on nutrient agar. The colonies with changed size and/or form were selected and replated on solid medium. The pattern of manifestation of inherited changes induced by radiation was studied. About 100 radoraces

classified into 12 morphological groups were selected and studied. It appeared that a number of these radioraces were similar or identical to those obtained by G.A. Nadson and his coworkers (1925–1937) in different species and genera of yeasts under the influence of irradiation, lower and higher temperature, chloroform and other factors. The possible nature of genetic changes underlying the formation of radioraces produced by ionizing radiation in yeasts as well as some general biological aspects of the phenomenon are discussed.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 2. ПУТИ РАСООБРАЗОВАНИЯ

В первом сообщении [1] мы описали около 70 новых рас, выделенных после однократного облучения диплоидных дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В. Морфологические особенности колоний и клеток этих радиорас позволили подразделить их на 12 групп: гладкие, пигментированные, ромашки, бородавчатые, складчатые, звездчатые, ребристые, кружевные, губчатые, слоистые, чешуйчатые и бугорчатые (см. [1, табл. 1, рис. 2, 3]).

Большинство радиорас получено нами в ходе многократного пассирования клеток из колоний, непосредственно вырастающих из облученного материала. При этом было обнаружено, что колонии таких радиорас, как правило, резко отличаются от тех первичных колоний-сальтантов, из которых они были выделены. Это позволило предположить, что лучевое расообразование у дрожжей не ограничивается первыми делениями облученных клеток, а продолжается в течение более длительного времени. Настоящее сообщение посвящено результатам изучения этого явления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пути расообразования у облученных дрожжей изучали в тех же опытах, в которых были получены описанные ранее радиорасы [1]. Диплоидные дрожжи *S. ellipsoideus*, Мегри 139-В облучали γ -лучами в дозе 35 или 70 *крад* (выживаемость 50–60 или 1–3%) и высевали в чашки Петри на толстый слой агаризованного сусла. Колонии, достигающие макроскопического размера в то или иное время после посева (инкубация при 30 и 37 °С), суспендировали и вновь высевали в чашки Петри; таким образом поступали неоднократно на протяжении двух лет. В каждом пассаже учитывали морфологические особенности вырастающих колоний, на основании которых определяли их принадлежность к той или иной группе. В некоторых опытах оценивали эффективность роста (жизнеспособность) составляющих такие колонии клеток; для этого концентрацию клеток в суспензии определяли в камере Горяева, а количество жизнеспособных клеток – по числу вырастающих колоний; клетки рассеивали также на агаровые пластинки для последующего изучения под микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как мы уже отмечали, колонии, вырастающие из облученных дрожжей, лишь изредка напоминают колонии радиорас, описанных в сообщении [1]. По внешнему виду первичные колонии можно подразделить на четыре основных класса (рис. 1). Класс А – гладкие светлые колонии, отличающиеся от контроля лишь меньшими размерами; класс Б – складчатые, губчатые или бугорчатые колонии, идентичные колониям соответствующих радиорас; класс В представлен колониями, состоящими из двух-трех крупных, расходящихся из центра секторов, один из них обычно подобен контролю; к классу Г можно отнести пигментированные колонии неправильной формы, разных размеров, часто обрастающие многочисленными секторами, расположенными по периферии колонии либо покрывающими ее поверхность наподобие бородавок.

Анализ первичных колоний, используемых для рассева, показал, что составляющие их клетки в большинстве случаев неоднородны. Это проявляется в том, что клетки, входящие в состав одной и той же колонии, могут иметь разную жизнеспособность, а при расसेве часто образуют вторичные колонии, различающиеся по размерам и форме.

Эффективность роста необлученных клеток *S. ellipsoideus*, Мегри 139-В, независимо от возраста культуры, в условиях наших экспериментов близка к 1,00 как при 30 °С, так и при 37 °С. Выход сальтантов в контроле составляет примерно 0,1% при высеве клеток из молодых 3–5-суточных колоний и повышается до 1% при использовании 4–6-недельных колоний. Интересно отметить, что примерно такую же оценку выхода новых рас при рассеве молодых и старых колоний дрожжей получил Красильников [2] для *Sporobolomyces philippovi*.

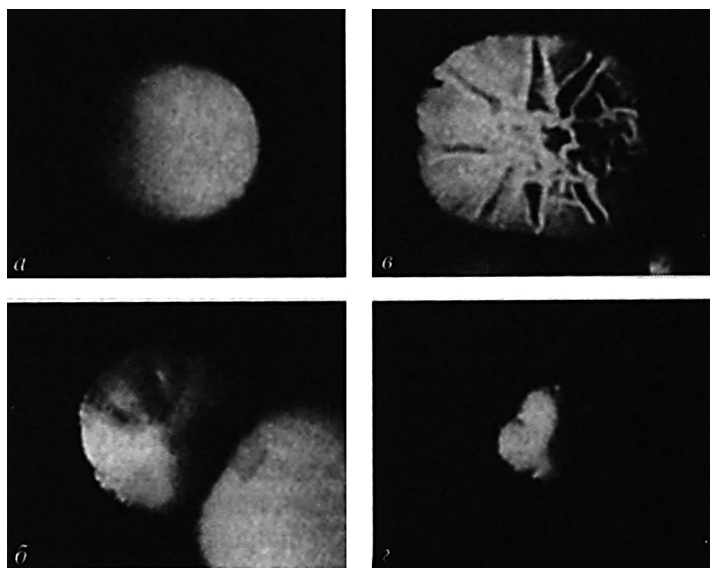


Рис. 1. Фотографии колоний, выросших из дрожжевых клеток после облучения в дозе 35 крад

а – гладкая колония, *б* – складчатая, *в* – секторная, *г* – мелкая пигментированная

Содержание жизнеспособных клеток (в долях единицы) и клеток-сальтантов (%) в колониях, вырастающих на твердой среде в разные сроки после посева дрожжевой суспензии, облученной в дозе 35 крад. Температура инкубации 30 °С.

Время после посева	Номер колоний	Содержание жизнеспособных клеток	Содержание клеток-сальтантов, %	Время после посева	Номер колоний	Содержание жизнеспособных клеток	Содержание клеток-сальтантов, %
	1	1,0	29		21	1,0	100
	2	1,0	0		22	1,0	0
	3	0,9	94		23	0,9	70
	4	0,8	94		24	0,8	0
	5	0,8	50		25	0,7	100
2 сут	6	0,8	3,8	4 сут	26	0,7	4,8
	7	0,7	29		27	0,6	26
	8	0,7	1,5		28	0,4	100
	9	0,6	100		29	0,4	50
	10	0,5	3,6		30	0,2	100
	11	1,0	50		31	1,0	100
	12	1,0	4,5		32	1,0	0
3 сут	13	1,0	0	5-7 сут	33	0,8	42,3
	14	0,8	100		34	0,8	0
	15	0,7	28		35	0,7	25
	16	0,7	0		36	0,5	54
	17	0,6	12		37	0,4	100
	18	0,5	100		38	0,4	19
	19	0,3	100		39	0,3	83
	20	0,3	46		40	0,1	100

Совершенно иные значения эффективности роста и содержания сальтантов получаются при расसेве колоний, выросших из облученных клеток. Эффективность роста клеток, составляющих такие колонии, различна для разных колоний и может варьировать от 1,00 до 0,01 и менее. Содержание сальтантов в таких колониях также может варьировать весьма широко, от 1-2 до 100%, причем эти сальтанты нередко относятся к разным морфологическим группам.

В табл. 1 и 2 приведены избранные результаты опытов, в которых определяли содержание жизнеспособных клеток и клеток-сальтантов в колониях, вырастающих при 30 °С в разные сроки после посева облученного материала. Анализ результатов этих опытов показал следующее. Во-первых, было обнаружено, что относительное содержание колоний с низкой эффективностью роста составляющих их клеток, а также относительное содержание колоний с высоким процентом клеток-сальтантов выше среди тех первичных колоний, которые вырастают в более поздние сроки. Минимальная эффективность роста и максимальное разнообразие вторичных колоний наблюдалось при рассеве мелких пигментированных колоний неправильной формы, вырастающих на 4-7-е сут после облучения; у клеток, составляющих такие колонии, эффективность роста при 37 °С обычно ниже, чем при 30 °С. Во-вторых, было обнаружено, что содержание в первичных колониях нежизнеспособных клеток и клеток-сальтантов не всегда связано между собой:

Эффективность роста (в долях единицы) и гетерогенность клеток, составляющих мелкие пигментированные колонии, вырастающие на 4–7-е сутки после облучения в дозе 70 крад

Номер колоний	Число клеток в первичной колонии	Эффективность роста		Характеристика вторичных колоний, выросших при 30*
		при 30 °С	при 37 °С	
1	$1,4 \cdot 10^6$	1,0	1,0	Гладкие, типа контроля и «ромашки»
2	$1,0 \cdot 10^6$	1,0	0,9	Гладкие, типа контроля и мелкие пигментированные
3	$1,5 \cdot 10^6$	1,0	0,1	«Ромашки» и мелкие пигментированные
4	$7,0 \cdot 10^4$	1,0	0,03	Очень гетерогенные по размерам и форме
5	$9,6 \cdot 10^4$	1,0	0,003	Гладкие, средних размеров
6	$2,1 \cdot 10^5$	0,9	0,5	Гладкие, типа контроля и «ромашки»
7	$2,4 \cdot 10^4$	0,9	0,1	Складчатые
8	$1,0 \cdot 10^5$	0,9	0,0	Бородавчатые
9	$8,0 \cdot 10^4$	0,7	0,6	Гладкие, средних размеров
10	$4,4 \cdot 10^5$	0,5	0,05	Бугорчатые, однородные
11	$6,4 \cdot 10^4$	0,4	0,1	Бугорчатые, гетерогенные по размерам
12	$2,2 \cdot 10^5$	0,4	0,0	«Ромашки» и мелкие пигментированные
13	$4,8 \cdot 10^4$	0,3	0,1	Гладкие, типа контроля
14	$1,6 \cdot 10^5$	0,2	0,03	Очень гетерогенные по размерам и форме
15	$1,0 \cdot 10^5$	0,16	0,03	Бугорчатые, с обильным секторообразованием

встречаются колонии, состоящие из клеток с низкой эффективностью роста, которые почти не содержат сальтантов, и колонии, содержащие много клеток-сальтантов, эффективность роста которых близка к 1,00. Это может означать, что нежизнеспособные клетки и клетки-сальтанты, по крайней мере в некоторых случаях, образуются в первичных колониях в результате независимых событий. Можно полагать также, что и нежизнеспособные клетки, и клетки-сальтанты, содержащиеся в первичных колониях, накапливаются в них постепенно, в ходе многих делений исходных облученных клеток.

Относительно нежизнеспособных клеток этот вывод очевиден; действительно, если колония состоит из 10^4 – 10^5 клеток, эффективность роста которых равна 0,1–0,01, то ясно, что тысячи неспособных к размножению клеток могли накопиться в такой колонии только указанным выше способом. Относительно же клеток-сальтантов этот вывод подтверждается наблюдениями за серией последовательных рассевов первичных колоний, показавшими, что сальтанты, выделенные из разных первичных колоний, существенно различаются между собой по степени стабильности.

Степень стабильности различных рас дрожжей можно, вообще говоря, охарактеризовать относительным содержанием в колониях изучаемой расы клеток, относящихся к расам-спутникам, и разнообразием этих клеток, проявляющемся в разнообразии вырастающих из них колоний. Однако, как отмечал еще Красильников [2], выход новых рас является менее надежным показателем частоты расообразования, чем содержание в посевах различных форм. Поэтому для оценки нестабильности мы использовали степень разнообразия колоний-спутников, вырастающих в чашках Петри при рассеве

двух-трехнедельной колонии той или иной расы, считая наличие таких спутников значимым, если относительное содержание их в рассевах превышает 1% (выше мы упоминали, что выход сальтантов у исходного штамма Мегри 139-В достигает 1% лишь при расसेве четырех-шестинедельных колоний).

Пользуясь этим критерием, выделенные нами радиорасы [1] можно подразделить (несколько условно) на две группы – *стабильные*, у которых содержание спутников не превышает обычно 1%, и *нестабильные*, у которых содержание спутников более высокое. Среди нестабильных радиорас, в свою очередь, можно выделить два крайних варианта – диморфные, у которых в качестве спутников появляются колонии одного какого-либо морфологического типа, и полиморфные, у которых разнообразие рас-спутников чрезвычайно велико. К числу стабильных относятся губчатые и кружевные радиорасы, некоторые пигментированные, гладкие и ребристые, всего около десяти. Ввиду того что при пассировании таких рас практически все вырастающие колонии подобны колонии, берущейся для рассева, эти расы будут сохранять свои свойства на протяжении многих пересевов петлей или каплей суспензии. Именно такие расы, по-видимому, и служили основным объектом изучения Надсону и его сотрудникам [3].

Остальные радиорасы, имеющиеся в нашем распоряжении, в той или иной степени нестабильны. На одном полюсе этой нестабильности, как мы уже отмечали, находятся диморфные расы, к которым можно отнести некоторые «ромашки», пигментированные, складчатые и чешуйчатые. При пассировании таких радиорас вырастают колонии двух типов – относящиеся к данной расе и какие-либо иные, обычно напоминающие контроль. Заметим, между прочим, что появление «ревертантов» у искусственно полученных или спонтанно возникших складчатых, пигментированных и некоторых других рас отмечали еще первые исследователи явления расообразования у дрожжей [4–7]. Однако сходство с исходной расой у таких «ревертантов», часто возникающих в виде секторов или бугорков на колониях-сальтантах, нередко бывает обманчивым. Так, из расы 39, относящейся к чешуйчатым, Ю.В. Корогодина (личное сообщение) выделила расу 39-2, у которой клетки и колонии были практически неотличимы от клеток и колоний *S. ellipsoideus*, Мегри 139-В. Однако опыты с облучением показали, что клетки расы 39-2 значительно радиочувствительнее, чем клетки штамма Мегри, и не способны к пострадиационному восстановлению.

Среди полученных нами радиорас диморфные расы встречались почти так же редко, как и стабильные; у большинства радиорас их нестабильность выражена сильнее, расы-спутники более разнообразны и появляются в большем числе. Именно такими являются многие чешуйчатые, бугорчатые, слоистые, пигментированные и звездчатые расы, спутники которых принадлежат к нескольким морфологическим группам.

На другом полюсе нестабильности находятся так называемые полиморфные расы, морфологическая классификация которых затруднена ввиду большого разнообразия выщепляемых ими форм-спутников. К числу полиморфных относятся расы из семейств 2 (17 рас) и 10 (9 рас). Ввиду особого интереса, который представляют такие расы для характеристики наследуемой изменчивости, вызываемой у дрожжей облучением, мы познакомимся с ними более подробно, рассмотрим в качестве примера родословную семей-

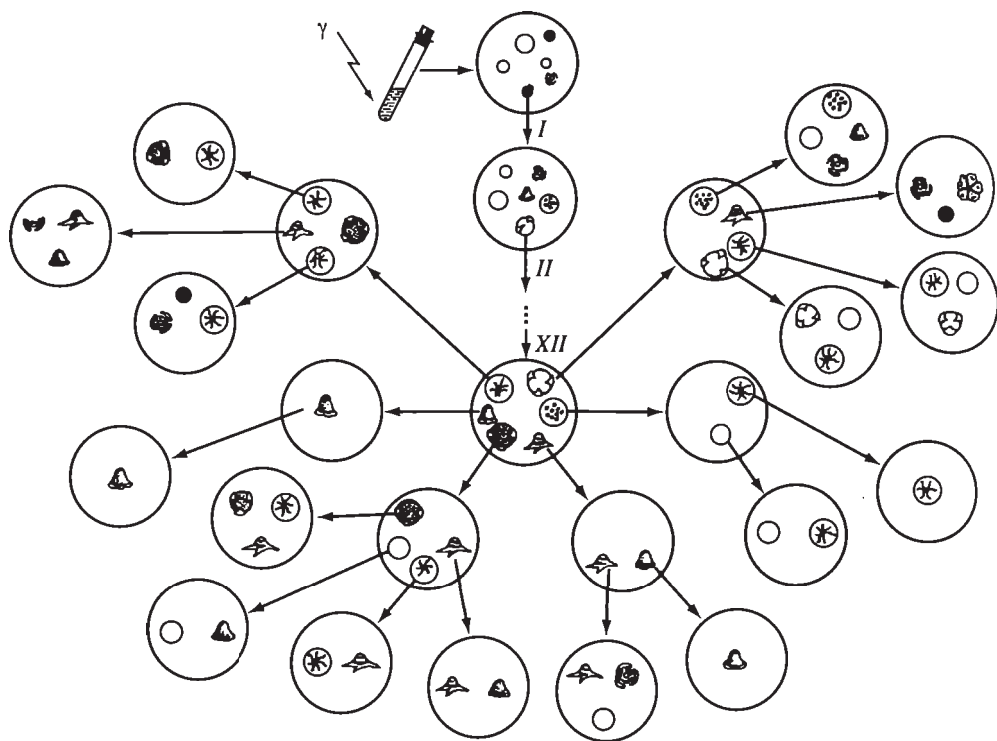


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая нестабильность радиорас из семейства № 2

Римские цифры – номера пассажей. В кружках символически изображены расы, относящиеся к разным морфологическим группам

ства 2. Другие полиморфные радиорасы ведут себя при пассировании сходным образом, различаясь между собой лишь преобладающей формой или окраской колоний.

На рис. 2 схематически изображена родословная радиорас из семейства 2. Исходным материалом для этой расы послужила мелкая колония неправильной формы, выросшая после облучения клеток в дозе 70 крад; на 7-е сут инкубации при 30 °С она состояла из $1,8-10^4$ клеток. Клетки из этой колонии были высеяны в чашки Петри и образовали вторичные колонии разных размеров и формы. Одна из них, выбранная случайно, была вновь суспендирована и рассеяна. Отбирая гладкие колонии мелких размеров, мы провели еще 12 пассажей, и в каждом пассаже наблюдали большое разнообразие. Вырастающие колонии варьировали по размеру и форме, а общий вид их напоминал картину, типичную для облученного материала [8]. Колонии, выросшие в 12-м пассаже, можно было разделить на шесть групп: складчатые колонии средних размеров; мелкие гладкие конусообразные колонии; колонии сухой консистенции, типа бугорчатых или чешуйчатых; пигментированные колонии, обильно обрастающие секторами; крупные желтоватые колонии типа ромашек; крупные круглые бородавчатые колонии. После их посева помимо колоний, идентичных материнским, выросли различные колонии-спутники, отчасти повторяющиеся в потомстве разных сублиний, но чаще относящиеся к другим морфологическим группам. Колонии из каждой группы были вновь

Расы-спутники, появляющиеся при расसेве радиорас разных морфологических групп

Исходные расы	Расы-спутники											
	Гладкие	Пигментированные	Ромашки	Бородавчатые	Складчатые	Звездчатые	Ребристые	Кружевные	Губчатые	Слоистые	Чешуйчатые	Бугорчатые
Гладкие	0	+	+	+	+		+		+	+	+	+
Пигментированные	+	0			+				+		+	+
Ромашки	+		0									
Бородавчатые				0								
Складчатые	+		+		0		+					
Звездчатые						0						
Ребристые					+		0		+			
Кружевные								0				
Губчатые									0			
Слоистые			+							0		
Чешуйчатые					+	+	+				0	+
Бугорчатые	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	0

супендированы, а затем рассеяны в чашки Петри (для определения эффективности роста и учета морфологических особенностей) и на агаровые пластинки (для последующего микроскопического исследования). Оказалось, что разнообразие дочерних колоний продолжает возрастать, а в ряде линий, отличающихся пониженной эффективностью роста, происходит выщепление нежизнеспособных клеток, погибающих без почкования или после нескольких циклов деления; напомним, что такого рода гибель характерна для клеток пораженных ультрафиолетом или ионизирующими излучениями [8].

Таким образом, мы видим, что ионизирующие излучения могут вызывать у диплоидных дрожжей состояние нестабильности, которое выражается в повышенной частоте появления новых морфологических вариантов и нежизнеспособных клеток и сохраняется на протяжении сотен клеточных поколений. Степень нестабильности, проявляющаяся в частоте появления и разнообразии рас-спутников, может широко варьировать у разных радиорас.

Обратим внимание теперь на следующее обстоятельство. Степень нестабильности неоднозначно связана с морфологическими характеристиками радиорас. Имеется ряд случаев, когда к одной и той же морфологической группе принадлежат расы весьма стабильные и расы, отличающиеся относительно высокой нестабильностью; таковы расы 28-1, 29 (стабильные) и 42-1, 47 (нестабильные) из группы «складчатые» расы 35 (стабильная) и 41-2 (нестабильная) из группы «ребристые», и некоторые другие. Это позволяет предположить, что степень стабильности и морфологическая характеристика радиорас могут обуславливаться независимыми изменениями.

Нестабильность большинства полученных нами радиорас приводит к тому, что расы, входящие в состав той или иной морфологической группы,

могут выщеплять расы, относящиеся к одной или нескольким другим морфологическим группам, причем в ряде случаев такое выщепление имеет реципрокный характер. Взаимоотношения этого рода между расами разных морфологических групп показаны схематически в табл. 3, где знаком «+» по горизонтали отмечены расы-спутники, выщепляемые некоторыми представителями данной морфологической группы, а по вертикали – морфологические группы, к которым относятся расы, способные выщеплять в виде спутников представителей данной группы.

В табл. 3, однако, не отражено то обстоятельство, что при рассеивании представителей почти каждой группы радиорас в незначительном количестве вырастают мелкие пигментированные колонии неправильной формы, образующие белые секторы. Эти колонии очень похожи на первичные сальтанты группы Г, о которых мы уже упоминали. Из таких колоний путем пассирования можно в свою очередь выделить представителей почти всех 12 групп радиорас. Спонтанное и индуцированное возникновение у дрожжей разных видов мелких пигментированных колоний, состоящих из клеток с пониженной жизнеспособностью и склонных к образованию секторов, неоднократно описывалось в литературе [4–7].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, формирование новых рас у облученных диплоидных дрожжей может продолжаться на протяжении многих клеточных поколений. Новые расы могут образовываться двумя способами: радиорасы могут возникать непосредственно из облученной клетки или ее ближайших потомков, и тогда их можно выявить среди первичных или вторичных колоний; новые расы могут выщепляться также в течение последовательных пассажей других радиорас. Из 67 радиорас, описанных в первом сообщении [1], 29 рас возникли из самих облученных клеток или их ближайших потомков, а 38 выщепились в ходе последующего пассирования первичных сальтантов. При этом, как мы уже отмечали, радиорасы, относящиеся к одной и той же морфологической группе, могут иметь разную степень стабильности и разное происхождение.

В первом сообщении [1] мы отмечали, что новые расы могут возникать у дрожжей вследствие генетических изменений самой различной природы. Столь же разнообразными могут быть причины, обуславливающие повышенную нестабильность некоторых полученных нами радиорас.

Накопление нежизнеспособных клеток в колониях некоторых сальтантов напоминает ту форму нестабильности, которая проявляется в повышенном выходе летальных секторов у *S. cerevisiae* в опытах Джеймса [9]. В случае диплоидных штаммов это может быть обусловлено возникающими при облучении рецессивными летальными мутациями, которые в результате соматической рекомбинации приводят к выщеплению нежизнеспособных клеток. Не исключено, однако, что пониженная жизнеспособность клеток некоторых радиорас, особенно ярко проявляющаяся при супероптимальных температурах, может вызываться теми же биохимическими изменениями, которые обуславливают морфологические особенности их колоний.

Нестабильные расы диплоидных дрожжей в ряде случаев, по крайней мере на первый взгляд, ведут себя в серии последовательных пассажей так же, как

нестабильные расы *Aspergillus nidulans*, описанные Джинксом [10]. Сейчас нельзя сказать, в какой мере нестабильность, выявленная в наших опытах и в опытах Джинкса, сходна с реплицирующейся нестабильностью, описанной Ауэрбах на дрозофиле [11] и Назимом на *Schizosaccharomyces pombe* [12]. Считается, что наследуемая нестабильность, проявляющаяся в повышенной частоте мутаций, может быть обусловлена наличием генов-мутаторов, как, например у *Escherichia coli* [13] и *Salmonella typhimurium* [14]. Не исключено также, что нестабильность некоторых радиорас диплоидных дрожжей может вызываться утратой, вследствие облучения, одной из гомологичных хромосом, приводящей к неустойчивому равновесию, поддерживаемому на протяжении многих клеточных генераций последовательными нерасхождением одних хромосом и потерями гомологов у других; основания для такого предположения дают исследования Понтекорво и Кефер [15]. Однако какова бы ни была природа нестабильности, вызываемой облучением у дрожжевых организмов, дальнейшее изучение ее весьма заманчиво.

Действительно, с одной стороны, анализ родословных полученных нами радиорас (при вегетативном размножении) показал, что многие сальтанты представляют собою нестабильные клоны. Иными словами, создается впечатление, что в генетическом действии излучений существенная роль может принадлежать именно нестабильности, приводящей к возникновению в облученной популяции как бы «очагов расообразования», представленных клонами, в процессе размножения которых с повышенной частотой выщепляются различные относительно стабильные расы. С другой стороны, имеются данные, позволяющие предполагать, что разная степень стабильности присуща не только тем расам дрожжей, которые получены с помощью облучения, но и расам, возникающим «спонтанно», без каких-либо дополнительных воздействий. Так, Красильников, специально изучавший спонтанное расообразование у дрожжей, отмечает, что «...многие из новых рас *Sporobolomyces philippovi* в процессе дальнейшего культивирования в свою очередь расщепляются, причем способность к расщеплению весьма различна у разных рас. Имеются расы, которые в течение 2–3 лет не дали ни одного отщепления..., тогда как у других это явление происходит постоянно... При расообразовании одни культуры постоянно отщепляют одну какую-нибудь расу, другие же дают целую гамму разнообразных форм. Такие расы служат как бы новым центром богатого расообразования» ([2], стр. 1485). В другой работе Красильников описывает спонтанно возникшие расы *Sacch. cerevisiae* (полученные из XII расы), существенно различающиеся между собой по степени стабильности, и указывает, что «...подобная же картина... наблюдается среди многих видов дрожжей. Часто встречаются дрожжи из *Torulopsis*, которые вскоре после того, как они были выделены из природного субстрата, расщепляются на много форм, другие же, наоборот, сохраняются в лабораторных условиях довольно стойко...» ([6], стр. 347). Все это позволяет нам предположить, что у дрожжей (а возможно, и некоторых других микроорганизмов) возникновение нестабильных клонов является скорее правилом, чем исключением.

Весьма существенно, что расы, возникающие у дрожжевых организмов в лабораторных условиях, при облучении, под влиянием цианистых солей, повышенных температур или «спонтанно», очень сходны с теми, которые

могут быть выделены из природных источников [3]. Экспериментальный анализ этого явления, предпринятый Филипповым 40 лет назад, привел его к выводу, что у дрожжей «...расообразование в природе протекает так же, как в лабораторных условиях при ближайшем и до некоторой степени этиологическом влиянии внешних факторов» ([16], стр. 543). А это в свою очередь позволяет ставить вопрос о роли «очагов расообразования» не только в индуцированной, но и в спонтанной наследуемой изменчивости микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Корогодин В.И., Близник К.М.* // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. *Красильников Н.А.* // Изв. АН СССР. Сер. 7. 1933. Т. 10. С. 1469.
3. *Надсон Н.А.* // Избранные труды. М.: Наука, 1967. Т. 2.
4. *Wickerham L., Fubian R.* // J. Bact. 1925. № 29. С. 11.
5. *Мейсель М.Н.* // Изв. АН СССР. 1932. Т. 9. С. 1337.
6. *Красильников Н.А.* // Изв. АН СССР. Сер. 7. 1934. № 2–3. С. 336.
7. *Имшенецкий А.А.* // Микробиология. 1935. № 4. С. 360.
8. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
9. *James A.P.* // Brookhaven Symposia in Biology. Brookhaven National Laboratory Associated Universities Inc., 1968. P. 77.
10. *Джинкс Дж.* Нехромосомная наследственность. М.: Мир, 1966.
11. *Auerbach Ch.* // Proc. Roy. Soc. 1947. Vol. 62. P. 307.
12. *Nasim A.* // Mutation Res. 1967. Vol. 4. P. 753.
13. *Teffers H.P., Spinelli V., Belser N.O.* // Proc. Nat. Acad. Sci. 1954. Vol. 40. P. 1064.
14. *Miyake T.* // Genetics. 1960. Vol. 45. P. 11.
15. *Pontecorvo G., Kafer E.* // Adv. Genetic. 1958. Vol. 9. P. 71.
16. *Филиппов Г.С.* // Вестн. рентгенол. и радиол. 1932. № 10. С. 512.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS Comm. 2. THE PATTERN OF RACE-FORMATION

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich

Diploid yeast cells, *Saccharomyces ellipsoideus* strain Megri 139-B, were irradiated by γ -rays in doses of 35 and 70 krad and plated on nutrient agar. The viability of cells from morphologically modified colonies, the presence of hereditary alterations, and their extent of stability were studied by selecting the modified colonies and repeatedly plating them on solid nutrient medium during two years.

It was shown that radoraces may differ in the extent of stability which is expressed in diversity and the different frequency of appearance of satellite races as well as in segregation of nonviable cells. The instability induced by irradiation may last for hundreds of cell generations in some radoraces. Due to this fact, the process of race-formation induced by single irradiation of yeast cells is not restricted to the initial divisions, but may proceed during a long time. A possible role of the appearance of unstable clones («race-formation centres») in the both induced and spontaneous hereditary variability of unicellular organisms is discussed.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЛУЧЕВОГО РАСОБРАЗОВАНИЯ У ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ

В предыдущих сообщениях были описаны морфологические особенности радиорас дрожжей, полученных нами из *Saccharomyces ellipsoideus* Мегри 139-В [1], а также пути формирования таких радиорас из облученных клеток [2]. Кроме того, было установлено, что выход видоизмененных колоний (так называемых первичных сальтантов), дающих начало радиорасам, увеличивается с дозой облучения и что такие колонии чаще встречаются среди тех, которые вырастают из облученных клеток в более поздние сроки [3]. Это побудило нас специально изучить следующие количественные закономерности лучевого расообразования у дрожжей: зависимость выхода и соотношения разных типов сальтантов от дозы облучения и от сроков формирования колоний, а также зависимость выхода сальтантов от продолжительности инкубации облученных клеток в условиях, приводящих к восстановлению их жизнеспособности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Диплоидные дрожжи *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В, выращивали 3–5 сут при 30 °С на сусло-агаровом косяке, затем суспендировали в стерильной водопроводной воде и облучали в разных дозах γ -лучами Co^{60} на установке «Гамма-целл 220» (мощность дозы 2,3 крад/мин). Контрольные и облученные клетки высевали в чашки Петри на толстый слой питательного агара (сусло 4° Балл+агар-агар 2%) с таким расчетом, чтобы в каждой чашке выросло около 50 колоний, и инкубировали неделю при 30 °С и еще 2–3 недели при комнатной температуре. Пострадиационное восстановление определяли, высевая клетки на питательную среду после инкубации в течение 4 сут в стерильной воде [4].

Как мы отмечали [2], колонии, вырастающие из облученных клеток, можно разделить на четыре класса: гладкие светлые колонии, подобные контролю (класс А); колонии, которые можно отнести к той или иной радиорасе, например складчатые, губчатые и др. (класс Б); колонии, состоящие из двух-трех расходящихся из центра секторов, один из которых обычно сходен с контролем (класс В); пигментированные колонии неправильной формы и разных размеров, часто обрастающие секторами (класс Г).

В рассевах колоний трех последних классов всегда выросло большое число видоизмененных форм. Это давало нам основание считать колонии классов Б–Г сальтантами и выражать выход сальтантов в процентах содержания таких колоний среди всех, вырастающих в данной группе опыта. При этом мы могли только занижить, а не завысить оценку истинного выхода сальтантов, ибо к числу «нормальных» мы относили все гладкие светлые колонии (класс А), без детального анализа других их свойств.

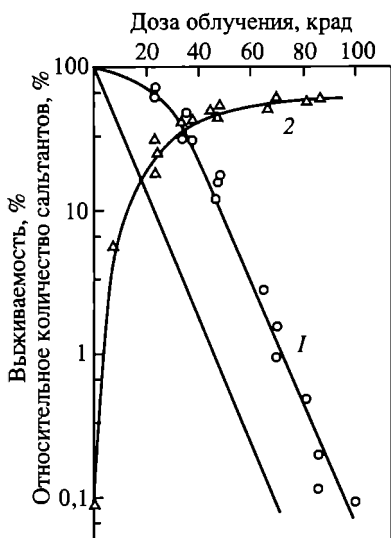


Рис. 1. Выживаемость (1), относительное количество сальтантов (2) среди выживающих клеток в зависимости от дозы облучения (в полулогарифмическом масштабе)

В опытах по определению зависимости выхода сальтантов от дозы облучения и продолжительности инкубации в режиме восстановления мы учитывали все сальтанты, вырастающие из облученного материала. В других опытах мы определяли выход сальтантов среди тех колоний, которые достигали макроскопических размеров в разные сроки после посева облученных клеток (такие колонии по мере их появления отмечали цветной тушью), а также относительное содержание среди таких колоний-сальтантов разных групп (Б-Г).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривая выживания дрожжей при γ -облучении и зависимость от дозы относительного содержания сальтантов среди вырастающих колоний изображены на рис. 1. Видно, что уже при облучении в дозе 35 крад, снижающей выживаемость до 50–40%, выход сальтантов равен 40%, а при дозах 70 крад и выше, после которых выживаемость равна 1% и менее, выход сальтантов достигает 60%.

В работах Надсона [5] отмечалось, что облученные дрожжи медленнее формируют колонии на твердой среде, чем необлученные, и что сальтанты чаще встречаются среди тех колоний, которые вырастают в более поздние сроки. Задержку формирования колоний из облученных клеток, или «эффект дорастания», можно выразить в виде зависимости от дозы процента колоний, вырастающих в более поздние сроки, чем в контроле (подробнее об этом [см. 6–9]).

У необлученных дрожжей штамма Мегри 139-В макроколонии появляются через 24–28 ч инкубации на питательной среде при 30 °С. На рис. 2, а показана зависимость относительного содержания сальтантов среди всех вырастающих колоний, а на рис. 2, б – зависимость от дозы облучения относительного количества колоний, вырастающих позже 28 ч, 2-х, 3-х и 4-х сут (кривые 1, 2, 3 и 4 соответственно). Видно, что с ростом дозы увеличивается и относительное количество макроколоний, появляющихся в поздние сроки, и количество колоний с измененной морфологией. В основе этого сходства могут лежать разные причины: 1) облучение может вызывать в клетках изменения, приводящие к возникновению сальтантов, и какие-либо другие изменения, обуславливающие замедленное формирование колоний, причем изменения обоих типов могут возникать независимо друг от друга, 2) изменения, приводящие к возникновению сальтантов, могут в то же время обуславливать и замедленное формирование колоний. В первом случае можно ожидать, что выход сальтантов, возрастающий с дозой, не будет зависеть от

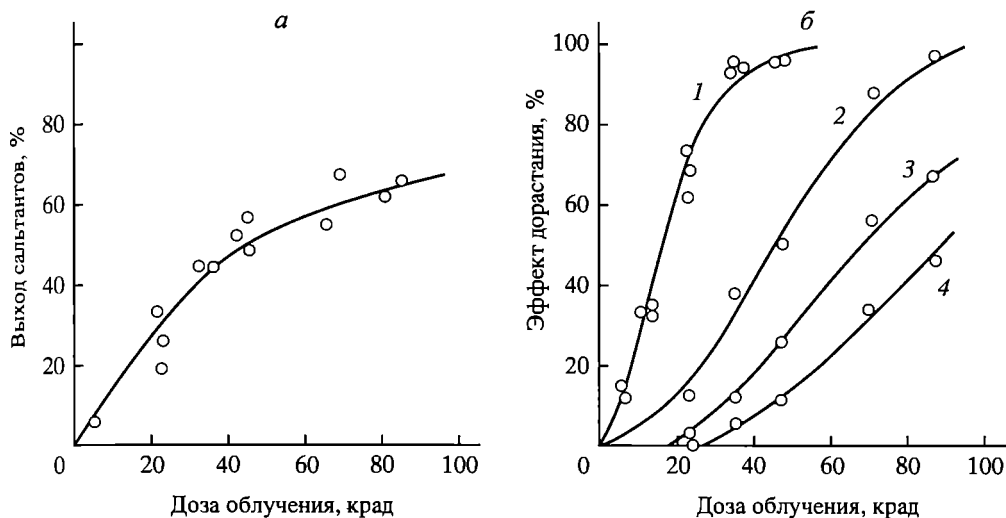


Рис. 2. Зависимость выхода сальтантов (а) и эффекта дорастания (б) от дозы облучения (в линейном масштабе)

1-4 – относительное количество колоний; вырастающих позже 28 ч, 2-х, 3-х, 4-х сут соответственно

сроков формирования колоний из клеток, облученных в данной дозе, а во втором – что при любой дозе облучения выход сальтантов будет выше среди тех колоний, которые вырастают в более поздние сроки.

Мы определили относительное содержание сальтантов среди колоний, вырастающих на 2-е, 3-е, 4-е и 5-7-е сут из клеток, облученных в разных дозах. Полученные результаты представлены в табл. 1. Видно, что чем позже появляются колонии, тем больше среди них сальтантов. Следовательно, образование сальтантов и задержка формирования колоний не являются независимыми.

Напомним, что количественные закономерности эффекта дорастания согласуются с гипотезой, согласно которой летальный эффект и задержка формирования колоний обуславливаются однотипными повреждениями [9]. Судьба облученной клетки, по этой гипотезе, определяется количеством полученных ею повреждений: клетки, получившие при облучении больше критического числа повреждений, погибают; клетки, не получившие ни одного повреждения, выживают и формируют колонии в те же сроки, что и необлученные; клетки, получившие меньше критического числа повреждений, также выживают, но, в отличие от неповрежденных, формируют колонии в

Таблица 1

Относительное содержание сальтантов среди колоний, вырастающих в разные сроки после облучения клеток в разных дозах, %

Доза облучения, крад	Сроки появления колонии, сут				Доза облучения, крад	Сроки появления колонии, сут			
	2	3	4	5-7		2	3	4	5-7
35	18±2	27±3	67±7	78±6	70	28±4	49±3	64±3	83±2
47	16±3	35±5	65±6	82±6	86,5	54±7	51±3	69±3	84±1

Распределение сальтантов по группам в зависимости от сроков их формирования и дозы облучения, %

Доза облучения, крад	Класс (группа)	Срок формирования колоний, сут				Σ
		2	3	4	5-7	
35	Б	38±5	51±6	50±9	22±7	41±3
	В	58±5	41±6	24±7	14±4,5	41±3
	Г	3,3±2,4	8,2±3,5	26±7	64±6	18±3
47	Б	58±9	35±6	24±5	11±4	31±4
	В	32±8	32±8	11±4	0	18±3
	Г	10±4	32±8	65±6	89±4	51±4
70	Б	14±5	25±4	20±3	7,8±1,6	15±2
	В	52±7	37±4	10±1	0,8±0,5	15±2
	Г	34±6	38±4	70±4	92±2	70±2
86,5	Б	23±8	29±3	22±3	8±1	16±1
	В	46±7	39±3	20±3	5±1	17±1
	Г	31±9	32±3	58±3	87±1	67±1

более поздние сроки. При этом чем сильнее повреждена выживающая после облучения клетка, тем позже из нее формируется колония.

Если это так, то мы вправе предполагать, что сальтанты, вырастающие после облучения в более поздние сроки (например, на 5–7-е сут), возникают из клеток, получивших больше повреждений, чем клетки, которые дают начало сальтантам, вырастающим в ранние сроки (например, на 2–3-е сут). А так как относительное число колоний, вырастающих в более поздние сроки, быстро увеличивается с ростом дозы (рис. 2, б), то можно полагать, что при облучении в более высоких дозах относительное число сальтантов, возникающих из клеток, получивших большое (но меньше критического) число повреждений, должно быть существенно выше, чем при меньших дозах облучения. Если морфологические особенности сальтантов как-то связаны с числом повреждений, полученных при облучении клеткой-родоначальницей, то можно ожидать, что относительное число сальтантов разных групп будет зависеть от сроков их формирования и от дозы облучения: распределение сальтантов по разным группам должно изменяться с увеличением сроков их формирования (при любой дозе) примерно так же, как и с увеличением дозы облучения.

Результаты изучения распределения сальтантов по разным группам в зависимости от сроков их появления и от дозы облучения приведены в табл. 2. Мы видим, что как с увеличением сроков появления колоний, так и с ростом дозы облучения, действительно, начинают преобладать сальтанты одной и той же группы, а именно группы Г. Напомним, что к этой группе относятся пигментированные колонии неправильной формы, часто образующие секторы. По-видимому, именно такие сальтанты чаще формируются из клеток, получивших большое число повреждений, а сальтанты, относящиеся к группам Б и В, – из клеток, получивших меньшее число повреждений. Интересно отметить, что колонии-сальтанты группы Г отличаются большой гетерогенностью составляющих их клеток (что может выражаться в пониженной жиз-

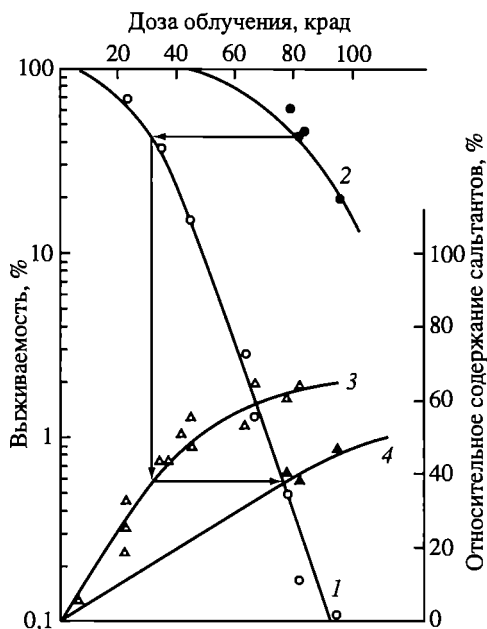
Рис. 3. Кривые выживаемости (1, 2) и выхода сальтантов (3, 4) сразу после облучения (светлые символы) (1, 3) и после 4-суточного восстановления (темные символы) (2, 4)

неспособности этих клеток и принадлежности их к разным радиорасам) и нередко дают начало нестабильным клонам [2].

Таким образом, мы пришли к представлению, что повреждения, вызывающие гибель облученных клеток, и повреждения, приводящие к возникновению колоний-сальтантов, могут иметь сходную природу. Если это так, то можно ожидать, что инкубация облученных клеток перед посевом на питательную среду при 30 °С в стерильной водопроводной воде будет приводить к их восстановлению не только от потенциальных летальных повреждений [4] и от повреждений, вызывающих задержку формирования колоний [8], но и от повреждений, приводящих к возникновению сальтантов. Можно ожидать также, что количественные закономерности восстановления во всех трех случаях будут идентичными. Идентичность количественных закономерностей восстановления дрожжей от потенциально летальных повреждений и от повреждений, вызывающих задержку формирования колоний, была показана раньше [8].

Мы уже отмечали [1], что в основе формирования сальтантов могут лежать изменения разной генетической природы. Восстановление дрожжевых клеток от лучевых повреждений, вызывающих точковые мутации, рекомбинации и некоторые другие генетические изменения, были неоднократно описаны в литературе [10–12]. Это позволяло ожидать, что повреждения, приводящие к возникновению сальтантов, окажутся обратимыми.

Результаты изучения изменения выживаемости и выхода сальтантов при инкубации облученных клеток в режиме восстановления приведены на рис. 3. Видно, что при выдерживании облученных клеток в режиме восстановления не только увеличивается их выживаемость (кривые 1 и 2), но и уменьшается относительное количество сальтантов среди выживающих клеток (кривые 3, 4). Если это уменьшение обусловлено тем, что при выдерживании клеток в воде абсолютное количество сальтантов остается постоянным, а клетки, восстановившие свою жизнеспособность, образуют нормальные колонии, то выход сальтантов должен уменьшаться во столько же раз, во сколько возросла жизнеспособность. Мы видим, однако, что выживаемость клеток, облученных в дозе 85 крад, увеличивается в результате восстановления от 0,3 до 50%, т.е. более чем в 100 раз, а выход сальтантов уменьшается от 65 до 40%, т.е. всего лишь в 1,5 раза. Поэтому резонно предположить, что наблюдаемое уменьшение выхода сальтантов обусловлено восстановлением клеток от повреждений, приводящих к их образованию.



Посмотрим теперь, одинаковы ли количественные закономерности восстановления клеток от повреждений, вызывающих возникновение сальтантов, и от повреждений, обуславливающих летальный эффект. Известно, что восстановление клеток от потенциальных летальных повреждений можно описать уменьшением эффективной дозы [4]. На основании кривых 1 и 2 (см. рис. 3) можно рассчитать, что отношение эффективной дозы к дозе облучения в случае восстановления жизнеспособности близко к 0,4. Если количественные закономерности восстановления клеток от повреждений, вызывающих возникновение сальтантов, такие же, как и закономерности восстановления от потенциальных летальных повреждений, то у клеток, облученных в дозе D и претерпевших восстановление, выход сальтантов должен быть таким же, как сразу после облучения в дозе $0,4 D$. Кривая 4 рассчитана в соответствии с этим предположением, как показано на рисунке стрелками. Видно, что экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами этих расчетов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение некоторых количественных закономерностей формирования сальтантов у облученных диплоидных дрожжей показало следующее. Во-первых, оказалось, что возникновению сальтантов принадлежит немаловажная роль в проявлении реакций клеток на облучение: содержание сальтантов среди колоний, вырастающих из облученных клеток, может достигать 65%, и «эффект дорастания» в значительной степени, если не целиком, связан с возникновением сальтантов. Во-вторых, мы пришли к предположению, что летальный эффект и возникновение сальтантов у облученных дрожжей могут быть обусловлены сходными или идентичными первичными повреждениями.

Когда мы говорим о сходстве первичных повреждений, приводящих к возникновению сальтантов или вызывающих летальный эффект, мы избегаем называть такие повреждения мутациями, т.е. теми или иными изменениями отдельных хромосом или генов. Мы не знаем, где локализованы в клетке первичные повреждения, приводящие к летальному эффекту или возникновению сальтантов, и как связаны эти повреждения с числом и типом наследуемых изменений, проявляющихся в формировании одной или нескольких радиорас в недрах колонии-сальтанта. На основании изучения летальных последствий облучения [4] мы можем полагать только, что такие первичные повреждения возникают в клетках в потенциальной форме, и клетка может восстанавливаться от них вплоть до осуществления первого пострадиационного деления ядра. Если же такового восстановления не произошло, то эти повреждения вызывают в клетках изменения невыясненной пока природы, завершающиеся формированием сальтантов или гибелью. Несколько условно такие повреждения, приводящие не только к гибели, но и к различного рода наследуемым изменениям, можно, пожалуй, назвать премутагенными.

Сделаем теперь некоторые сопоставления. С одной стороны, описанные в этой статье результаты свидетельствуют о сходстве (или идентичности) лучевых повреждений, приводящих у дрожжевых клеток к возникновению сальтантов и вызывающих летальный эффект. С другой стороны, многие авторы [1, 2, 5, 13, 14] отмечали у дрожжей разных видов большое сходство

лучевого и спонтанного расообразования. «Не означает ли это, что в экспериментах по пострадиационному восстановлению мы выявляем активность тех биохимических систем, которые у необлученных организмов направлены на ликвидацию премутагенных изменений, т.е. на снижение (или регулировку) темпа естественного мутационного процесса?» ([15], стр. 127). Хотя в настоящее время такая точка зрения кажется почти тривиальной [16, 17], мы все еще не располагаем данными, позволяющими с уверенностью ответить на этот вопрос. Чтобы получить такой ответ, необходимы прежде всего методы, позволяющие выявлять и количественно оценивать вклад процессов восстановления в естественный мутагенез у различных биологических объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. № 3. С. 416.
3. Близник К.М. // *Studia Biophys.* 1971. Vol. 26. P. 183.
4. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
5. Надсон Г.А. Избранные труды. М.: Наука, 1967. Т. 2.
6. Корогодин В.И. // Биофизика. 1957. Т. 8, № 1. С. 178.
7. Корогодин В.И., Малиновский О.В., Порядкова Н.А., Изможеров Н.А. // Цитология. 1959. № 1. С. 306.
8. Капутьцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 6. С. 913.
9. Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 267.
10. Арман И.П., Кузнецова О.Б. // Генетика. 1965. № 1. С. 89.
11. Кузнецова О.Б., Олтеану В., Арман И.П. // Структура и генетические функции биополимеров. М.: ИАЭ, 1969. С. 78.
12. Moustacchi E., Enteric S. // *Molec. Gen. Genetics.* 1970. Vol. 109. P. 69.
13. Красильников Н.А. // Изв. АН СССР. Отд. естеств. и мат. наук. 1934. № 2-3. С. 335.
14. Захаров И.А. Проблемы радиационной генетики эукариотических микроорганизмов. Дис. ... докт. биол. наук. М., 1971.
15. Корогодин В.И. // Основы радиационной биологии. М.: Наука, 1964. С. 82.
16. Парибок В.П., Вальдштейн Э.А. // Пострадиационная репарация. М.: Атомиздат, 1970. С. 314.
17. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1970.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS. Comm. 3. THE QUANTITATIVE REGULARITIES OF RADIORACE FORMATION BY IONIZING RADIATION IN DIPLOID YEASTS

V. I. Korogodin, K. M. Bliznik, Yu. G. Kapultsevich,
V. G. Petin, N. M. Kabakova

The dependence of the yield of saltants (morphologically modified colonies produced by irradiated cells) on the dose of irradiation, the time of colony appearance and duration of recovery; as well as the influence of the dose and the time of colony appearance on the correlation between the saltants of different groups have been studied in *Saccharomyces ellipsoideus*, strain Megri 139-B. It was shown that the yield of saltants may achieve 65% at the doses of about 70-80 krad; that the effect of the delayed appearance of colonies clearly expressed in diploid yeasts was greatly associated with the formation of saltant colonies with the reduced rate of growth; that the damages responsible for the saltant appearance were reversible. The hypothesis is discussed that radiation damages responsible for a lethal effect and those leading to radorace formation have the similar nature.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 4. ЗАВИСИМОСТЬ ВЫХОДА САЛЬТАНТОВ ОТ УСЛОВИЙ ПОСТРАДАЦИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Исследование количественных закономерностей возникновения сальтантов из облученных дрожжевых клеток показало, что доля видоизмененных (сальтантных) колоний увеличивается как с ростом дозы облучения, так и с увеличением сроков формирования колоний при постоянной дозе облучения [1]. Закономерности задержанного формирования колоний хорошо объясняются гипотезой, согласно которой в основе этого явления лежат те же повреждения, которые обуславливают и инактивацию клеток [2]. Следовательно, можно предположить, что возникновение сальтантов также обусловлено этими повреждениями. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что количественные закономерности восстановления облученных дрожжевых клеток от повреждений, приводящих к образованию сальтантов, и от летальных повреждений одинаковы [1].

Обобщая результаты этих исследований, можно сформулировать следующую гипотезу. В дрожжевых клетках при действии ионизирующих излучений благодаря осуществлению событий попадания возникают дискретные первичные повреждения. Такие повреждения могут вызывать либо летальный эффект, либо наследуемые изменения, приводящие к возникновению сальтантов. Судьба облученной клетки определяется числом таких повреждений: клетки, не получившие ни одного или очень мало повреждений, образуют «нормальные» колонии; клетки, получившие больше критического числа повреждений, погибают; клетки, получившие субкритическое число повреждений, выживают и образуют сальтантные колонии.

Настоящее сообщение посвящено экспериментальной проверке некоторых следствий, которые можно вывести из этой гипотезы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали диплоидные дрожжи *Saccharomyces ellipsoideus* (*vini*) штамма Мегри 139-В. Облучение производили γ -лучами Co^{60} . Методика облучения была описана ранее [1, 2]. Оптимальными (стандартными) условиями пострадиационного культивирования клеток считали 30 °С и сусло-агар (4° Балл. неохмеленного пивного сусла, 2% агар-агара), неоптимальными – 37 °С и сусло-агар, содержащий 7% поваренной соли. Следует подчеркнуть, что в обоих случаях эффективность роста необлученных клеток близка к 1.

Выживаемость облученных клеток оценивали по методике макроколоний. Содержание сальтантов в колониях, вырастающих во всех вариантах опытов, определяли следующим образом. Пробу клеток, взятых из каждой колонии, суспендировали в воде и рассеивали в чашки Петри с таким расчетом, чтобы в одной чашке выросло примерно по 50 колоний. Затем чашки

инкубировали при 30 °С в течение 3–4 недель и среди выросших колоний подсчитывали относительный выход видоизмененных колоний; характерные признаки сальтантных колоний, позволяющие отличать их от «нормальных» колоний, описаны в работе [3]. Такая методика позволяет определять до 1% клеток-сальтантов, содержащихся в первичных колониях. Эффективность роста клеток, входящих в состав разных колоний, определяли методом микроколоний [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия экспериментов. Если в основе возникновения сальтантов и летального эффекта лежат одни и те же первичные повреждения и судьба клетки определяется лишь числом этих повреждений, то можно ожидать, что у кривой уменьшения с дозой облучения числа клеток, образующих «нормальные» колонии, экстраполяционное число должно быть меньше, чем у кривой выживания, при построении которой учитывают все клетки, способные образовать макроколонии.

Действительно, если для гибели клетки необходимо, например, десять повреждений, а для образования сальтанта достаточно двух повреждений, то у дозовой кривой «нормальных» колоний (двуударной кривой) экстраполяционное число должно быть гораздо меньше, чем у кривой выживания (десятиударной кривой), а значения D_0 у этих кривых должны быть близкими. Если же возникновение сальтанта и инактивация клетки обусловлены разными, независимо возникающими повреждениями, то у дозовой кривой «нормальных» колоний величина D_0 должна быть меньше, а экстраполяционное число таким же или большим, чем у кривой выживания. Действительно, вероятность выживания клетки после облучения в дозе D , соответствующей экспоненциальному участку кривой выживания, равна

$$S = n_1 e^{-\alpha D},$$

где n_1 – экстраполяционное число кривой выживания, а α – вероятность образования летального повреждения на единицу дозы облучения. Пусть вероятность того, что клетка не получила ни одного повреждения, приводящего к образованию сальтанта, есть

$$P_0 = n_2^{-\beta D},$$

где β – вероятность образования сальтантного повреждения на единицу дозы облучения, а n_2 – коэффициент. Если сальтанты образуются по одноударному механизму, то $n_2 = 1$.

Допустим, что летальные и сальтантные повреждения возникают независимо друг от друга. Тогда вероятность образования «нормальной» колонии есть

$$S_0 = P_0 \cdot S = n_1 n_2 e^{-(\alpha+\beta)D}.$$

Отсюда следует, что у дозовой кривой «нормальных» колоний экстраполяционное число должно быть больше или равно экстраполяционному числу кривой выживания, а D_0 этой кривой, равное $1/\alpha + \beta$, должно быть меньше величины D_0 кривой выживания, равной $1/\alpha$.

Таким образом, сравнивая форму дозовой кривой «нормальных» колоний и кривой выживания, можно сделать выбор между двумя указанными случаями.

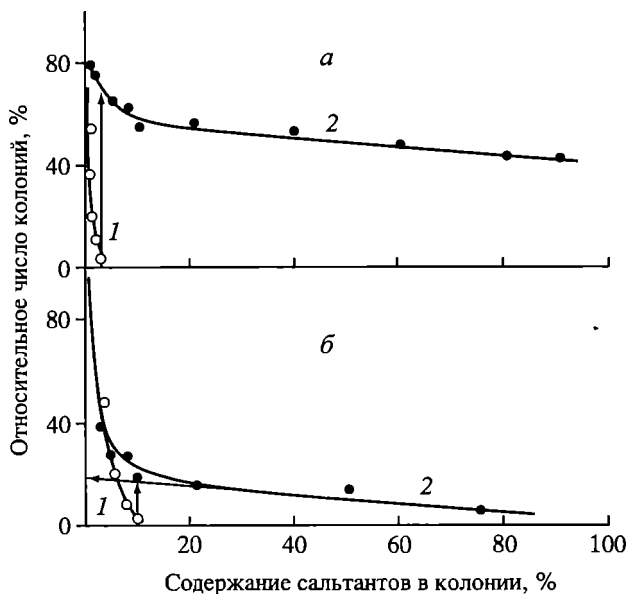


Рис. 1. Интегральные распределения колоний по содержанию в них клеток-сальтантов при стандартных условиях культивирования (*а*) и при 37 °С на среде, содержащей 7% NaCl (*б*)

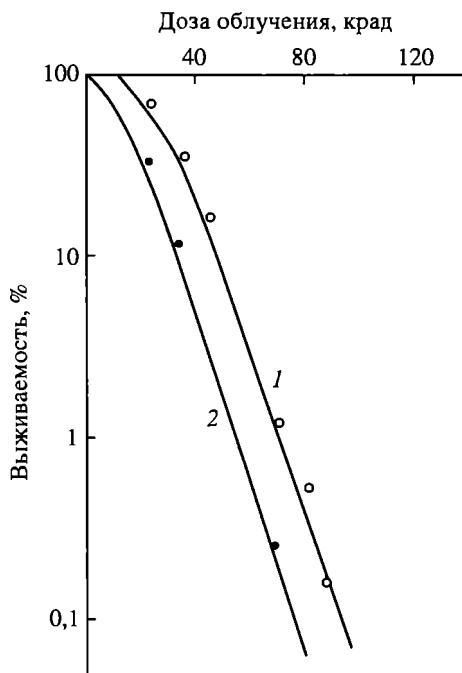
1 – контроль, *2* – облучение в дозе 35 крад

В предыдущем сообщении мы показали, что колонии, вырастающие непосредственно из облученных клеток, можно разделить на четыре класса: гладкие (класс А) и с видоизмененной морфологией (классы Б–Г) [5]. Колонии трех последних классов состоят в значительной мере из клеток, дающих при рассевах начало новым (по сравнению с исходной формой) расам дрожжей, и поэтому могут быть отнесены к категории колоний-сальтантов. Это не означает, однако, что все колонии из класса А состоят из неизменных клеток. Рассев случайно выбранных 83-х гладких колоний, выросших после облучения в дозе 35 крад, показал, что 52 из них содержали от 2,5 до 50% клеток-сальтантов, и только расевы клеток из 31-й колонии дали начало колониям, внешне не отличающимся от контрольных. Следовательно, подсчет в чашках Петри первичных колоний, относящихся к классам Б, В и Г, не позволяет учитывать все колонии, отличающиеся по содержанию клеток-сальтантов от контроля. Точность оценки выхода сальтантов можно значительно повысить, если к их числу относить все колонии, у которых содержание клеток с измененной наследственностью достоверно превышает контроль.

При расसेве необлученных дрожжевых клеток из 3–5-суточных культур выход видоизмененных колоний обычно не превышает 0,1% [3]. В колониях же 3–4-недельного возраста, которые мы использовали в опытах, содержание клеток-сальтантов увеличивается.

Для выбора критерия, по которому ту или иную колонию следует относить к сальтантной, мы построили интегральное распределение колоний, вырастающих из необлученных клеток, по содержанию в них клеток-сальтантов (рис. 1, *а*, кривая 1). Ордината каждой точки кривой указывает относитель-

Рис. 2. Кривые выживания (1) и уменьшения с дозой числа клеток, образующих «нормальные» колонии (2)



ное количество колоний, в которых содержание сальтантов не меньше заданного значения, равного абсциссе этой точки. Из рисунка видно, что в контроле основная масса колоний содержит небольшое число клеток-сальтантов (в среднем 1%), а число колоний, содержащих более 2,5% клеток-сальтантов, составляет менее 4%. На основании полученных данных при оценке выхода сальтантов у облученных клеток мы считали колонию «сальтантной», если она содержала 2,5% и более клеток-сальтантов, и «нормальной», если содержание сальтантов в ней не превышало 2,5%.

На этом же рисунке (кривая 2) представлено интегральное распределение колоний по содержанию в них сальтантов после облучения клеток в дозе 35 крад. Видно, что колонии, выросшие из облученных клеток, очень различаются между собой в этом отношении: содержание клеток-сальтантов варьирует у них от уровня контроля до 100%.

Используя серию доз облучения, мы определили кривую выживания дрожжей (рис. 2, кривая 1) и в этом же опыте кривую уменьшения с дозой относительного числа клеток, образующих «нормальные» колонии (кривая 2). Обе эти кривые имеют почти одинаковые наклоны экспоненциальных участков и разные значения экстраполяционного числа: у кривой 1 $D_0 = 9,5$ крад и $n = 12$, а у кривой 2 $D_0 = 8,7$ крад и $n = 3$. Уменьшение экстраполяционного числа у дозовой кривой для «нормальных» колоний свидетельствует в пользу гипотезы об идентичности повреждений, приводящих к образованию сальтантов и вызывающих летальный эффект.

Вторая серия экспериментов. Модификация выживаемости, наблюдаемая при изменении температуры пострадиационного культивирования или при добавлении в питательную среду поваренной соли, не связана с подавлением восстановления клеток от лучевых повреждений [6, 7] и обусловлена, по-видимому, тем, что клетки, получившие относительно большое, но не критическое для оптимальных условий культивирования число повреждений, погибают при субоптимальных условиях культивирования [7, 8]. В пользу этого предположения свидетельствуют наши наблюдения, показавшие, что при выращивании облученных диплоидных дрожжей при 37 °С на среде, содержащей NaCl, кривая выживания по форме приближается к экспоненте, а у гаплоидных дрожжей, кривая выживания которых экспоненциальна и в оптимальных условиях культивирования, модификация выживаемости вообще не наблюдается [7, 8]. Если такая интерпретация пострадиационной модификации выживаемости правильна и если возникновение сальтантов обуслов-

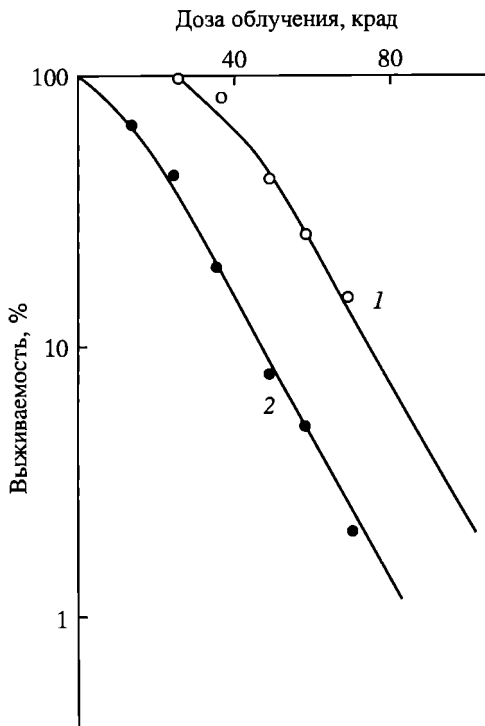


Рис. 3. Кривые выживания при стандартных условиях культивирования (1) и при 37 °С на среде, содержащей 7% NaCl (2)

лено теми же повреждениями, что и летальный эффект, то можно ожидать пониженный выход сальтантов при пострadiационном культивировании клеток на солевой среде при 37 °С, так как в этих условиях должны выживать лишь клетки, не получившие ни одного или очень малое число повреждений.

Мы определили выживаемость облученных дрожжевых клеток при разных условиях культивирования, в том числе при 37 °С на среде, содержащей 7% NaCl. Значения n и D_0 варьировали от опыта к опыту, но в каждом отдельном опыте экстраполяционное число n кривой выживания клеток на солевой среде при 37 °С было гораздо меньше, чем при стандартных усло-

виях культивирования, а величина D_0 изменялась незначительно (табл. 1).

Результаты одного из этих опытов (опыт № 7 из табл. 1) представлены на рис. 3. В этом же опыте мы определяли содержание сальтантов в колониях, выросших в неоптимальных (7% NaCl, 37 °С) условиях из необлученных клеток и после облучения в дозе 35 крад. Интегральные распределения этих колоний по содержанию в них сальтантов представлены на рис. 1, б (кривые 1 и 2 соответственно).

Оказалось, что необлученные клетки при размножении на среде с солью образуют больше сальтантов, чем при стандартных условиях (см. рис. 1 а, б, кривые 1). Повышенное содержание сальтантов в колониях, вырастающих

Таблица 1

Характеристики кривых выживания (n , D_0) дрожжевых клеток при разных условиях пострadiационного культивирования

Номер опыта	30 °С, сусло-агар		37 °С, сусло-агар		30 °С, сусло-агар +7% NaCl		37 °С, сусло-агар +7% NaCl	
	n	D_0 , крад	n	D_0 , крад	n	D_0 , крад	n	D_0 , крад
1	16	11	15	8	1	10,5	1	10,5
2	17	11,5	17	9	2	11	1	12
3	12	12,5	20	10	1	10	1	10
4	17	13	10	12	1,4	10	—	—
5	30	13	—	—	1	14	—	—
6	14	9	—	—	—	—	—	—
7	9	16	—	—	—	—	1,4	16,5
8	11	8	4	6	—	—	—	—

из необлученных клеток в неоптимальных условиях, относится, несомненно, к той же категории явлений, что и повышенное содержание сальтантов в стареющих культурах, в культурах, выращиваемых при суб- или супероптимальных температурах, и т.п., неоднократно описанных в литературе [9].

Из рис. 1, б видно, что содержание сальтантных клеток в контрольных колониях, выросших при 37 °С на среде с солью, может достигать 10%. Число колоний с большим содержанием сальтантов не превышает 2%. Поэтому при оценке влияния облучения на формирование сальтантов в неоптимальных условиях мы считали колонию сальтантной, если она содержала 10% или более клеток-сальтантов. Число сальтантных колоний, вырастающих в неоптимальных условиях из клеток, облученных в дозе 35 крад, составляет лишь 18%, в то время как при стандартных условиях культивирования число сальтантных колоний равно 70%, как показано на рис. 1 стрелками. Таким образом, уменьшение выживаемости облученных клеток в неоптимальных условиях культивирования сопровождается не увеличением, как с ростом дозы облучения, а уменьшением числа сальтантных колоний, хотя в контроле на солевой среде содержание сальтантов выше, чем на стандартной среде. Заметим, что все точки кривой 2 на рис. 1, б лежат гораздо ниже соответствующих точек кривой 2 на рис. 1, а. Следовательно, сделанный нами вывод о пониженном выходе сальтантов в неоптимальных условиях не может быть связан с возможными ошибками при выборе критериев сальтантной колонии.

Третья серия экспериментов. Данные, приведенные на рис. 1, б, показывают, что относительное число колоний, вырастающих из облученных клеток в неоптимальных условиях, тем меньше, чем больше в таких колониях содержится сальтантов. Это может означать, что по мере увеличения числа повреждений, содержащихся в клетках, увеличивается и их чувствительность к неоптимальным условиям культивирования. Проверить этот вывод можно следующим образом.

Ранее было показано, что колонии класса Г (мелкие пигментированные колонии неправильной формы, по периферии часто обрастающие секторами) отличаются большим содержанием в них сальтантов и, что еще более существенно, максимальным разнообразием этих сальтантов по сравнению с колониями классов А, Б и В [1]. С ростом дозы облучения или сроков появления колоний распределение колоний по классам А, Б, В и Г изменяется в сторону преобладания класса Г. Следовательно, колонии класса Г вырастают из клеток, получивших больше повреждений, чем клетки, дающие начало колониям классов А, Б и В. Поэтому можно ожидать, что именно клетки из колоний класса Г будут обладать большей чувствительностью к отклонению условий культивирования от оптимальных, чем клетки из колоний, относящихся к классам А, Б и В. Показателем этой чувствительности может служить относительная эффективность роста клеток, взятых из этих колоний, при неоптимальных и оптимальных условиях.

Мы определили относительную эффективность роста клеток из контрольных колоний и из колоний классов А, Б, В и Г при 37 °С на среде, содержащей 7% NaCl, по сравнению со стандартными условиями культивирования. В табл. 2 приведены средние значения x относительной эффективности роста для разных групп. Данные для классов Б и В ввиду малого различия между ними объединены. Из табл. 2 видно, что относительная эффективность ро-

Результаты статистической обработки данных по относительной эффективности роста дрожжевых клеток из колоний разных классов на солевой среде по сравнению со стандартными условиями культивирования

Класс	n	\bar{x}	σ_x^2	$S_{\bar{x}}$	Класс	n	\bar{x}	σ_x^2	$S_{\bar{x}}$
Контроль	13	93,5	16,3	1,3	Б + В	18	62	748	6,6
А	42	68	775,4	4,3	Г	27	22,7	845,4	5,6

Примечание: n – число изученных колоний; \bar{x} – среднее значение относительной эффективности роста клеток на среде, содержащей 7% NaCl при 37 °С по сравнению со стандартными условиями культивирования; σ_x^2 – дисперсия относительной эффективности роста клеток; $S_{\bar{x}} = \sigma_x / \sqrt{n-1}$ – квадратичное отклонение среднего значения относительной эффективности роста клеток \bar{x} .

ста клеток на среде с солью для класса Г минимальная, что свидетельствует о повышенной гибели клеток из этих клонов при неоптимальных условиях культивирования по сравнению с необлученными клетками и потомками клеток, получивших при облучении меньшее число повреждений и сформировавших колонии типа А, Б и В.

Таким образом, данные по относительной эффективности роста подтверждают наше предположение о повышенной гибели на среде с солью при 37 °С клеток, получивших при облучении большее число повреждений. Это и проявляется в уменьшении выживаемости облученных клеток и пониженном выходе колоний с высоким содержанием сальтантов при неоптимальных условиях пострадиационного культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов, представленные в этом сообщении, не только подтверждают сформулированные ранее гипотезы об идентичности повреждений, вызывающих летальный эффект и образование сальтантов [1], и о зависимости степени проявления летальных последствий таких повреждений от условий культивирования [7, 8], но показывают также, что клетки, имеющие меньшее число повреждений, формируют колонии с меньшим содержанием сальтантов, чем клетки, имеющие большее число повреждений. Действительно, только это положение позволяет непротиворечиво объяснить результаты всех трех серий экспериментов. В аспекте же радиобиологии и радиационной генетики это положение и факты, на которых оно основывается, означают следующее.

Во-первых, нам удалось выяснить природу той формы модификации выживаемости клеток условиями пострадиационного культивирования, которая действует независимо от влияния этих условий на процессы восстановления и которая была впервые описана нами несколько лет назад [6, 7]. В неоптимальных условиях культивирования чаще погибают те клетки, которые получили при облучении достаточно большое, но не летальное для оптимальных условий, число повреждений. Повышенная чувствительность к неоптимальным условиям свойственна не только самим клеткам, получившим достаточное число повреждений, но также их отдаленным потомкам, составляющим формирующиеся из таких клеток клоны. Это делает понятным, почему в ряде случаев условия культивирования могут оказывать влияние на выживаемость облученных клеток даже спустя несколько циклов их деления, тог-

да как условия, модифицирующие выживаемость благодаря их влиянию на репарационные процессы, эффективны только в течение периода, предшествующего первому пострадиационному делению ядра [6, 7, 10, 11].

Во-вторых, мы показали, что, помещая облученные клетки в определенные условия культивирования (в нашем случае сусло-агар+7% NaCl и 37 °C), можно добиться преимущественной гибели тех из них, которые, размножаясь в оптимальных условиях (сусло-агар, 30 °C), дали бы начало клонам с высоким содержанием сальтантов, т.е. клеток с измененной наследственностью. Регистрируемое в эксперименте количество таких клеток из-за повышенной чувствительности их к неблагоприятным условиям среды зависит от степени селективного давления этих условий; относительное содержание клеток, которые, будучи способны размножаться, с высокой частотой дают потомков с наследуемыми изменениями, всегда выше среди погибающей, чем среди выживающей части популяции. Тем самым ставится под сомнение один из основных постулатов радиационной генетики, согласно которому изменения наследственности, не приводящие сами по себе к летальному эффекту, с одинаковой частотой возникают как среди выживающей, так и среди погибающей части облученной популяции клеток, и на котором основывается общепринятый способ определения формы зависимости частоты таких изменений от дозы облучения. В нашем случае частота таких изменений, регистрируемая при разных условиях пострадиационного культивирования клеток одной и той же облученной популяции, тем выше, чем выше в данных условиях значение экстраполяционного числа кривой выживания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. и др. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 6. С. 857.
2. Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Там же. № 2. С. 267.
3. Корогодин В.И., Близник К.М. // Там же. № 2. С. 163.
4. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
5. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 3. С. 416.
6. Капутьцевич Ю.Г. // Там же. 1967. Т. 7, № 3. С. 367.
7. Кабакова Н.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. 1969. Т. 9, № 6. С. 892.
8. Капутьцевич Ю.Г., Петин В.Г., Корогодин В.И., Близник К.М. // Там же. 1972. Т. 12, № 3. С. 408.
9. Надсон Г.А. Экспериментальное исследование наследственных свойств микроорганизмов. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1935.
10. Korogodin V.I., Kapultsevich Yu.G., Myasnik M.N. et al. // Advances in Biological and Medical Physics. New York; London: Acad. Press, 1968. Vol. 12. P. 253.
11. Капутьцевич Ю.Г., Близник К.М. // Радиобиология. 1967. Т. 7, № 4. С. 572.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS.

Comm. 4. THE DEPENDENCE OF THE SALTANT YIELD ON POSTIRRADIATION CULTIVATION CONDITIONS

K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich, V.I. Korogodin, V.G. Petin

In the experiments with diploid yeast cells of *Saccharomyces ellipsoideus* (vini), strain Megri 139-B, irradiated with γ -rays (^{60}Co) the following results have been obtained. A decrease with dose in the number of cells forming colonies (optimal conditions: 30 °C,

wort agar), indistinguishable from the controls by the saltant content, is described by the curve with the same D_0 value as for the survival curve but a considerably smaller extrapolation number. Upon incubation of irradiated cells under suboptimal conditions (37 °C, wort agar + 7% NaCl) the extrapolation number of the survival curve was less while the value of D_0 was about the same as for optimal cultivation conditions, the yield of colonies with high saltant content being considerably reduced. At last, cells from colonies with high level and variety of saltants formed out of yeasts with presumably large number of damages are relatively more sensitive to suboptimal conditions than those out of yeasts with small number of damages. The abovementioned data can be explained by the hypothesis in accordance with which cell inactivation and saltant appearance are due to the similar type of damages. The larger the number of damages to a cell, the higher the frequency of saltant formation in its progeny and the lower its viability, particularly under suboptimal cultivation conditions may be observed.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 5. ОЦЕНКА ВКЛАДА ДЫХАТЕЛЬНЫХ МУТАНТОВ В ЛУЧЕВОЕ РАСООБРАЗОВАНИЕ

Описывая закономерности формирования радиорас у диплоидных дрожжей [1, 2], мы отмечали, что в этом явлении определенная роль может принадлежать дыхательным мутантам (ДМ). Основанием для такого мнения служило как внешнее сходство колоний некоторых полученных нами радиорас с колониями дыхательных мутантов, так и соображения общего характера, касающиеся особенностей возникновения цитоплазматических (преимущественно дыхательных) мутантов у грибов [3]. В настоящем сообщении приводятся результаты оценки вклада дыхательных мутантов в лучевое расообразование у дрожжей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Как и в предыдущих сообщениях [1, 2], объектом исследования служили диплоидные дрожжи *Saccharomyces ellipsoideus*, Мегри 139-В. Контрольные и облученные в разных дозах клетки (γ -лучи Co^{60} , мощность дозы 2 крад/мин) высевали в чашки Петри на толстый слой сусло-агара, инкубировали 7–10 дней при 30 °C, а затем среди выросших колоний определяли содержание ДМ. Содержание ДМ определяли в посевах этих колоний и в посевах клонов, выделенных три года назад из облученного материала и неоднократно пересевавшихся. Учитывали также выход сольтантов других морфологических групп (не являющихся ДМ).

Прежде чем начать опыты с облучением, было получено у дрожжей Мегри 139-В большое число ДМ, возникших под влиянием акрифлавина. Для этого использовали методику работы [4]: клетки высевали на питательную среду, содержащую 0,01% акрифлавина, и выращивали до образования колоний. Колонии изолировали, пассировали через среду, лишенную акрифлавина, и высевали в чашки Петри для изучения морфологии вырастающих ко-

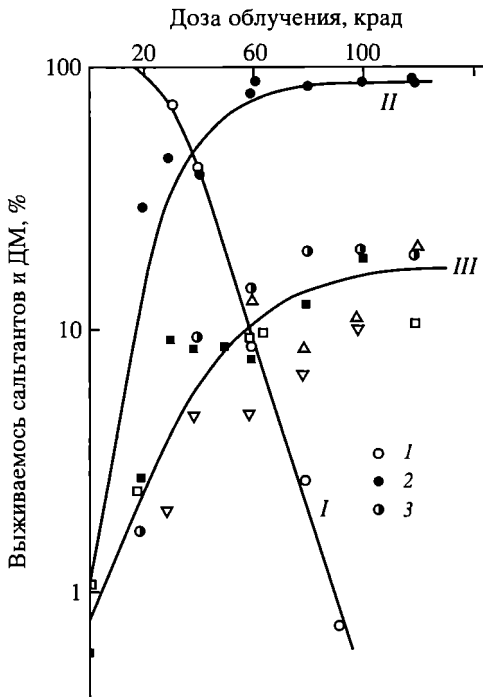
лоний и окрашиваемости их тетразолом. Из рассевов необлученных клеток Мегри 139-В было выделено 26 независимо возникших штаммов ДМ. Некоторое количество ДМ выделили также из рассевов сегрегантов, полученных у дрожжей этого штамма В.И. Кондратьевой с помощью микроманипуляционной техники; так при анализе линий 39 сегрегатов, выделенных из четырех- и трехспоровых асков, шесть из них целиком состояли из ДМ, а 12 имели повышенное по сравнению с контролем содержание ДМ. Дыхательные мутанты, полученные под влиянием акрифлавина и возникшие спонтанно, использовали для сравнения с ДМ, образующимися из облученных клеток.

Для идентификации ДМ использовали тетразолную методику [5]. Непосредственно перед употреблением готовили среду, содержащую 1,5% агара в 0,067 М фосфатном буфере (рН 7,0, 40 °С), добавляли в нее 0,1% тетразола (2,3,5-трифенилтетразолиний хлористый) и полученным раствором заливали колонии, выросшие в чашках Петри. Спустя 1 ч инкубации при комнатной температуре колонии, состоящие из клеток с нормальным дыханием, становились красными, а колонии, состоящие из ДМ, оставались белыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дыхательные мутанты, возникающие под влиянием облучения, образовывали мелкие по сравнению с контролем колонии, которые по морфологическим признакам можно разделить на пять групп: гладкие, пигментированные, чешуйчатые, бугорчатые и слоистые [1]. Гладкие, пигментированные, чешуйчатые и бугорчатые колонии целиком состояли из клеток ДМ. Слоистые колонии состояли из двух частей – основания, представленного ДМ, и верхнего слоя, состоящего из нормальных в отношении дыхания клеток. При расसेве клеток из основания таких колоний вырастали колонии чешуйчатого типа, состоящие только из ДМ, а при расसेве верхнего слоя вырастали как колонии, целиком состоящие из клеток с нормальным дыханием, так и слоистые колонии. В отношении такой нестабильности наши слоистые колонии весьма напоминали «мутантные гибриды», полученные Захаровым [6] при скрещивании дрожжей разных видов. Дыхательные мутанты, возникшие из необлученных клеток и их сегрегантов, образовывали такие же по внешнему виду колонии, как и после облучения. После обработки дрожжей акрифлавином возникали гладкие, пигментированные, чешуйчатые и бугорчатые ДМ.

В 3–5-суточных культурах необлученных клеток содержится обычно менее 0,1% ДМ. При старении культуры содержание ДМ увеличивается; в некоторых колониях 2–3-недельного возраста, вырастающих из необлученных клеток, встречается до 1–2% ДМ. Колонии, вырастающие из облученных дрожжевых клеток (первичные колонии), либо целиком состояли из нормальных по дыханию клеток, либо содержали от 1–2 до 100% клеток ДМ. Нормальные по дыханию колонии окрашивались тетразолом, как и в контроле, в красный цвет; колонии, целиком состоящие из ДМ, оставались белыми; остальные же колонии имели либо красные и белые секторы, либо секторы разной степени окраски – от бледно-розовой и до ярко-красной. Последнее, по-видимому, свидетельствовало о гетерогенности составляющих такие колонии клеток по интенсивности дыхания.



Радиобиологические характеристики дрожжей

I — кривая выживания, II — кривая выхода сальтантов среди первичных колоний, III — кривая выхода ДМ среди первичных колоний; показаны значения выживаемости (1), выхода сальтантов (2) и ДМ (3), полученные в одном и том же опыте

Определяя зависимость выхода ДМ от дозы облучения, мы относили к ДМ только те первичные колонии, которые либо вовсе не окрашивались тетразолом, либо имели четко выраженные окрашивающиеся и неокрашивающиеся секторы. Зависимость выхода таких колоний от дозы облучения, выявленная в пяти разных опытах, показана на рисунке (кривая 3); здесь же приведена кривая выживаемости дрожжей (кривая 1) и кривая выхода сальтантов (кривая 2), полученные в одном из этих опытов. Видно, что содержание ДМ среди всех первичных колоний хотя и варьирует

от опыта к опыту, достигает с ростом дозы 10–20%, а среди сальтантов изменяется в среднем от 12 до 25%. Интересно отметить, что содержание ДМ среди сальтантов при использованных дозах относительно мало зависит от величины дозы и существенно ниже, чем в контроле, где среди 62 спонтанно возникших сальтантов зарегистрировано 26 ДМ, т.е. около 42%.

Посмотрим теперь, как распределены первичные колонии по содержанию в них клеток, являющихся ДМ. Как уже отмечалось [2], первичные колонии можно разделить на три класса: гладкие, типа контроля (класс А); колонии, имеющие форму, соответствующую одной из 12 групп сальтантов, или состоящие из гладкого сектора и сектора-сальтанта (класс Б); колонии неправильной формы, обильно образующие секторы разных оттенков и морфологии и дающие начало нестабильным расам (класс В). Предварительные опыты с необлученными клетками показали, что в 2–3-недельных контрольных колониях в среднем содержится около 0,4% ДМ, и в 95% колоний содержание ДМ не превышает 2%. В рассевах же колоний, образуемых облученными клетками, содержание ДМ гораздо выше, причем максимальное количество ДМ наблюдается в колониях класса В (таблица).

Неравномерное распределение первичных колоний по содержанию ДМ и явное преобладание ДМ в колониях класса В позволило нам предположить, что как и в случае формирования других радиорас [2], ДМ могут образовываться с повышенной частотой не только при первых делениях облученных клеток, но и в ходе их дальнейшего размножения. Это предположение нашло хорошее подтверждение при изучении содержания ДМ в рассевах радиорас, выделенных из облученных клеток в 1969 г. и с тех пор многократно пассированных (не менее 15 раз). Из 70 изученных в этом отношении радиорас 16 рас оказались ДМ, а 15 рас отличались от исходного штамма повышенным

Распределение первичных колоний разных классов по содержанию в них клеток, являющихся ДМ

(в проценте от общего числа колоний данного класса)

Доза, крад	Класс первичных колоний	На уровне контроля, <2%	Выше, чем в контроле			Доза, крад	Класс первичных колоний	На уровне контроля, <2%	Выше, чем в контроле		
			2–10%	10–50%	50–100%				2–10%	10–50%	50–100%
20	А	100	–	–	–	60	А	80	16	2	2
	Б	83	12	5	–		Б	52	12	20	16
	В	20	60	20	–		В	32	16	28	24

содержанием клеток с нарушенным дыханием. И в этом случае ДМ являются расы, принадлежащие к группам гладких, пигментированных, чешуйчатых, бугорчатых и слоистых, а расы, в рассевах которых обнаружено повышенное содержание ДМ, относятся преимущественно к классу нестабильных (или полиморфных) радиорас.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенный выше материал позволяет довольно однозначно охарактеризовать морфологические особенности колоний, вырастающих при рассевах дрожжей, являющихся ДМ, пути формирования ДМ из облученных клеток и вклад их в лучевое расообразование.

Независимо от того, как возникли в наших опытах ДМ, – спонтанно или были выделены из моноспоровых сегрегантов, образовались под влиянием акрифлавина или облучения – все они принадлежали к какой-либо из пяти морфологических групп: гладкие, пигментированные, чешуйчатые, бугорчатые или слоистые. Под влиянием акрифлавина, как известно, возникают преимущественно цитоплазматические ДМ. Однако серию ДМ, морфологически идентичных акрифлавиновым, мы выделили из моноспоровых сегрегантов необлученных клеток, и эти ДМ были, по-видимому, ядерного происхождения. Поэтому, основываясь только на морфологических данных, невозможно решить вопрос, относятся ли расы ДМ, возникшие после облучения, к цитоплазматическим или ядерным.

Весьма показательно, что в отношении своего возникновения из облученных клеток ДМ ведут себя примерно так же, как и радиорасы с нормальным дыханием [2]. Дыхательные мутанты могут возникать как из самой облученной клетки или при первых циклах ее деления (и тогда образуется колония, целиком состоящая из ДМ, или колония, имеющая два крупных сектора, один из которых состоит из ДМ, а второй – из нормальных по дыханию клеток); ДМ могут возникать также с определенной частотой (более высокой, чем в контроле) в ходе неограниченного числа последовательных почкований облученной клетки или ее потомков (и тогда образуется колония, состоящая из смеси нормальных клеток и клеток ДМ, содержание которых может изменяться в широких пределах). Клетки, при размножении которых с повышенной частотой образуются ДМ, относятся, как правило, к нестабильным радиорасам и происходят от клеток, получивших при облучении максимальное нелетальное число повреждений и образующих первичные колонии

группы В [7]. Интересно, что такие нестабильные в отношении формирования ДМ клоны возникают не только после облучения, но относительно часто встречаются среди моноспоровых клонов-сегрегантов.

Количественные закономерности формирования ДМ под влиянием облучения также аналогичны количественным закономерностям формирования всех возникающих при облучении сальтантов. Если добавить к этому, что расы ДМ относятся к пяти из 12 морфологических групп радиорас, формирующихся при облучении, и что на долю ДМ приходится до 20% всех возникающих после облучения сальтантов, то можно прийти к выводу о весьма весомом вкладе ДМ в общий процесс лучевого расообразования. Правда, вопросы об идентичности первичных повреждений, приводящих к возникновению ДМ и радиорас других групп, а также о механизме их формирования (мутации или рекомбинации), остаются пока нерешенными.

Авторы благодарят В.И. Кондратьеву за выделение сегрегантов дрожжей, использованных в этой работе, и Ю.Г. Капутьцевича за помощь в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. № 3. С. 416.
3. Джинкс Дж. Нехромосомная наследственность. М.: Мир, 1966.
4. Ephrussi B., Hottinguer H., Chimenes A.M. // Ann. Institut Pasteur. 1949. Vol. 76, N 4. P. 351.
5. Ogur M., John R. St., Nagai S. // Science. 1957. Vol. 125. P. 928.
6. Захаров И.А. Исследования по генетике. Л.: Изд-во ЛГУ, 1961. Сб. 1. С. 38.
7. Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Радиобиология. 1974. Т. 14, № 2. С. 230.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS.

Comm. 5. EVALUATION OF RESPIRATION MUTANTS CONTRIBUTION TO RADIATION RACE FORMATION

K.M. Bliznik, V.I. Korogodin

Respiration mutants (RM) occurring spontaneously or resulting from γ -irradiation (^{60}Co) of diploid yeasts *Saccharomyces ellipsoideus*, strain Megri 139-B, have been revealed by means of the tetrazol technique Both in the control and after irradiation, RM of similar morphological groups have been appeared. RM level in the controls makes up less than 0.1%, while after the irradiation the yield of RM increases with dose up to 10–20%, so that RM fraction is about of 12–25% of the total number of saltants. RM are more frequent in the colonies grown from irradiated cells, which usually give rise to unstable radioraces. Colonies of such unstable races exhibited an increased (against the controls) RM content as late as three years after their isolation from irradiated cells.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 6. ОЦЕНКА МУТАБИЛЬНОСТИ КЛОНОВ, ВЫРАСТАЮЩИХ ИЗ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

Ранее было показано, что после однократного облучения γ -лучами у дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus*, штамм Мегри, часто возникают нестабильные клоны [1–3]. Новые расы в таких клонах могут образовываться в результате повышенной частоты цитоплазматических мутаций, ядерных мутаций или рекомбинаций. При этом на долю дыхательных (по-видимому, цитоплазматических) мутаций приходится около 20% вновь образующихся рас [4]. Какова роль в процессе расообразования ядерных мутаций? Если их вклад достаточно весом, то, учитывая большое разнообразие рас, порождаемых нестабильными клонами [2], можно ожидать, что эти клоны должны отличаться от стабильных повышенной частотой мутирования самых разных генов. Проверке этого предположения посвящено настоящее сообщение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дрожжи штамма Мегри, ранее использовавшиеся в работах по лучевому расообразованию [1–4], не изучены в генетическом отношении и не имеют маркеров, с помощью которых можно оценить мутабельность какой-либо определенной группы генов. Поэтому в работе использовали диплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, полученные в 1967 г. от С.Г. Инге-Вечтомова. Этот штамм возник путем аутодиплоидизации гаплоидного штамма 6ПЗ, несущего мутацию *adel-6*, и является гомозиготным по этой мутации [5]. На среде с аденином и на сусло-агаре клетки этого штамма образуют крупные круглые гладкие колонии красного цвета. Ревертанты образуют крупные белые колонии, способные расти на среде без аденина. Иногда в рассевах клеток встречаются белые колонии средних размеров, не растущие на среде без аденина; с помощью тетразольной методики [6] установлено, что это колонии дыхательных мутантов.

Дрожжи культивировали на сусло-агаре при 30 °С. Клетки 5–7-суточной культуры суспендировали, облучали γ -лучами Co^{60} (мощность дозы ~2 крад/мин) и высевали на сусло-агар в чашки Петри. Необлученные дрожжи образуют видимые невооруженным глазом колонии в течение 2 сут, а облученные – в течение 5–6 сут. Колонии подсчитывали через 2 сут (N_2) и 6 сут (N_6). Отношение $N_6/N_0 \times 100\%$, где N_0 – число посеянных клеток, служило показателем выживаемости S , а отношение $\frac{N_6 - N_2}{N_6} \cdot 100\%$ – показателем эффекта дорастания. По срокам появления колонии, вырастающие из облученных клеток, делили на две группы: А – колонии, вырастающие на 2-е сутки, т.е. примерно в те же сроки, что и в контроле, и В – колонии, вырастающие на 5–6-е сутки. Ранее было показано [3], что к группе А относятся преимущественно колонии, дающие начало стабильным клонам, а к группе

В – дающие начало нестабильным клонам. Спустя 10 сут инкубации по морфологии колоний определяли их принадлежность к нормальным колониям или к сальтантам [2], а также определяли выход колоний, частично или целиком состоящих из дыхательных мутантов [4].

Случайно выбранные колонии, вырастающие из необлученных клеток, и колонии групп А и В, вырастающие из клеток, облученных в дозе 60 крад (выживаемость около 5%), суспендировали в воде (каждую колонию отдельно), часть суспензии высевали на сусло-агар для определения гетерогенности клеточного состава (по морфологии вторичных колоний), а часть использовали для оценки мутабельности. В некоторых опытах мутабельность оценивали сразу после приготовления суспензии, в других – после пассирования клеток через жидкое сусло (инкубация 7 сут при 30 °С). Серию клонов культивировали в жидком сусле на протяжении пяти пассажей (в течение 35 сут), а затем вновь рассевали на сусло-агар для определения характеристик вырастающих колоний. Несколько субклонов, выделенных после пятого пассажа из клонов, отличавшихся наибольшим разнообразием клеточного состава, опять рассевали на сусло-агар для учета морфологии колоний и на лимитирующую среду для оценки мутабельности.

Оценку мутабельности проводили по несколько модифицированной методике Девина и Арман [7]. Клетки высевали на среду, содержащую помимо минеральных солей, глюкозы и витаминов ~ 0,01 мг/мл аденина. На этой среде каждая клетка штамма 6ПЗ делится 16–17 раз (при посеве 200–300 клеток на чашку), образуя мелкие красные колонии, состоящие примерно из 10^6 клеток. С определенной частотой на мелких красных колониях вырастают вторичные колонии более крупных размеров. Такие колонии обычно белого цвета, круглые, гладкие, по диаметру в несколько раз превышают первичные колонии, хорошо растут на среде без аденина. Иногда в контроле, а после облучения довольно часто, вырастают вторичные колонии неправильной формы, розового цвета или мелких размеров. Хотя клетки розовых и мелких колоний тоже обычно растут на среде без аденина, для оценки частоты появления ревертантов мы использовали только результаты подсчета крупных белых колоний (гладких или с измененной морфологией). Отношение числа таких колоний M к числу клеток, составляющих все мелкие красные колонии N , выросшие в данном опыте, равно частоте f возникновения одного ревертанта на одно клеточное деление $f = M/N$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Радиобиологические характеристики. Как видно на рис. 1, кривая выживания дрожжей имеет плечо; экстраполяционное число $n = 3,0$; $D_0 = 14,6$ крад. Как и в случае других штаммов, для которых $n > 1$, у дрожжей штамма 6ПЗ хорошо выражен эффект дорастания (кривая 2). Зависимость от дозы облучения относительного содержания среди первичных колоний сальтантов (кривая 3) и дыхательных мутантов (кривая 4) у клеток штамма 6ПЗ не отличается от таковой для клеток штамма Мегри [1–4].

В табл. 1 представлены радиорасы, которые можно выделить из клонов, вырастающих из облученных клеток штамма 6ПЗ. В посевах 20 первичных колоний, при просмотре около 6000 вторичных, были обнаружены расы,

Рис. 1. Радиобиологические характеристики штамма 6ПЗ

1 – кривая выживания, 2 – эффект дорастания, 3 – выход измененных колоний, 4 – выход дыхательных мутантов

относящиеся к нескольким морфологическим группам. Содержание сальтантов в расевах отдельных колоний колебалось от 0 до 100%. По содержанию сальтантов и по их разнообразию клоны из группы А, как правило, заметно уступали клонам из группы В. Но даже в клонах группы В разнообразие расового состава было выражено значительно меньше, чем у дрожжей Мегри: так, лишь в трех случаях из 14 в клонах группы В были обнаружены сальтанты, относящиеся к четырем разным расам, в то время как у дрожжей штамма Мегри большинство клонов этой группы содержат сальтанты, относящиеся к пяти-шести разным расам.

Все 22 клона (табл. 1) пассировали 5 раз через жидкое сусло, а затем вновь определяли их расовый состав. В ходе пассирования большинства клонов стали преобладать клетки типа контроль. Однако почти все клоны (особенно группы В) содержали до 5–10% дыхательных мутантов, что можно объяснить только их постоянным новообразованием. Расовый состав в ходе пассирования мало изменился лишь у двух клонов, А4 и В5, которые и были использованы для дальнейших экспериментов.

Как следует из табл. 2, частота возникновения ревертантов у клеток штамма 6ПЗ в контроле составляет $(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$ и возрастает с дозой облучения, достигая $(65,5 \pm 13,1) \cdot 10^{-7}$ после 60 крад.

Оценка мутабельности клонов, вырастающих из облученных клеток. Результаты определения частоты возникновения ревертантов в клонах, выделенных из необлученных и облученных клеток, приведены в табл. 3.

В серии опытов 1 была оценена мутабельность 11 клонов, выделенных из необлученных клеток. Данные разных опытов не различались между собой. В контроле частота возникновения ревертантов в среднем составляла $(1,21 \pm 0,07) \cdot 10^{-7}$ на клетку на деление.

В серии опытов 2 приведены результаты оценки мутабельности клеток, взятых непосредственно из колоний классов А и В, выросших после облучения. Ни в одном из 18 случаев частота возникновения ревертантов не превышала значения контроля, а в двух случаях была даже несколько ниже. В среднем для клеток класса А эта величина составляла $(1,28 \pm 0,16) \cdot 10^{-7}$, а для клеток класса В – $(0,55 \pm 0,09) \cdot 10^{-7}$, но различия эти мало достоверны.

В серии опытов 3 приведены результаты оценки мутабельности тех клонов, выделенных из облученных клеток, расовый состав которых пред-

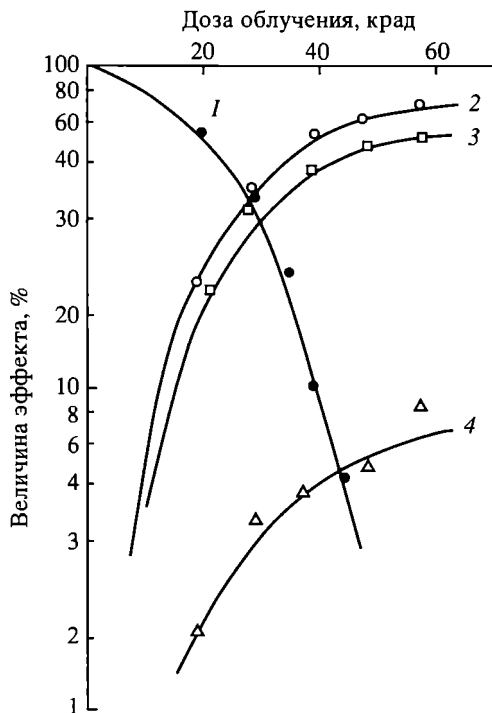


Таблица 1

Расовый состав клонов, выделенных из облученных клеток (% от общего числа выросших колоний)

Клон	Число колоний	Колонии, относящиеся к разным расам*						
		1	2	3	4	5	6	7
Контроль	281	98,5						1,5
A1	108	100						
A2	295	100						
A3	302	99			0,5			0,5
A4	264	85	5		7		0,5	2,5
A5	164	83	17					
A6	153	98						2
A7	437		98				1	1
A8	519	99,5	0,5					
B1	368	85						15
B2	328	10		10	60		10	10
B3	148					98		2
B4	373	4			5	50	3	38
B5	249		30				10	60
B6	327	35	20		25		10	10
B7	142	30		69				1
B8	318	90				7	1,5	1,5
B9	210	98			1,5			1,5
B10	205	30			20	10		40
B11	180			0,5		91		8,5
B12	405	20				80		
B13	215	50						50
B14	141	90		2				8

* Обозначения рас: 1 – гладкие (типа контроль), 2 – морщинистые (складчато-ребристые); 3 – губчатые, 4 – бугорчатые, 5 – ромашки, 6 – неопределенные, 7 – дыхательные мутанты.

Таблица 2

Изменение мутабельности клеток штамма 6ПЗ в зависимости от дозы облучения

Доза, крад	Выживаемость	Число ревертантов	Число жизнеспособных клеток, $\times 10^7$	Частота появления ревертанта, $\times 10^7$
Контроль	100	85	82	1,04 \pm 0,11
20	64	67	6,3	10,6 \pm 1,4
40	20	61	2,5	24,6 \pm 3,9
60	5,2	27	0,41	65,5 \pm 13,1

ставлен в табл. 1. Перед определением мутабельности эти клоны один раз пассировали через жидкое сусло. Из 12 клонов лишь в одном (клон B1) был зарегистрирован высокий выход ревертантов ($15,0 \cdot 10^{-7}$), что, однако, вряд ли стоит принимать во внимание, ибо в этом опыте абсолютное число колоний-ревертантов было невелико, а число клеточных делений оказалось чрезвычайно низким, в 10–15 раз ниже, чем в опытах этой серии с другими клонами. В среднем для клеток клонов А частота возникновения ревертан-

Мутабельность клонов, выделенных из необлученных клеток (контроль) и клеток, выживших после облучения в дозе 60 крад

Серия опытов 1				Серия опытов 2				Серия опытов 3			
Номер клона	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	Номер клона	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	Номер клона	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>f</i>
1	22	14	1,5	1A	2	4,1	0,5	A1	8	7,9	1,0
2	24	19	1,3	2A	10	5,2	1,9	A2	6	15	0,4
3	24	18	1,3	3A	10	2,5	4,0	A3	24	20	1,3
4	29	19	1,5	4A	1	2,2	0,5	A4	22	28	0,8
5	22	22	1,0	5A	2	5,2	0,4	A5	25	20	1,2
6	6	4,2	1,6	7B	1	0,9	1,1	A6	32	24	1,4
7	11	12	0,9	8A	11	4,3	2,6	A7	14	14	1,0
8	8	4,1	2,0	9A	4	3,6	1,1	A8	34	24	1,4
9	25	15	1,7	10B	1	2,8	0,4	B1	5	0,34	15
10	8	9,2	0,9	11B	6	13	0,5	B3	26	27	1,0
11	85	82	1,0	12B	10	15	0,7	B4	6	14	0,4
–	–	–	–	14B	5	13	0,4	B5	4	10	0,4
–	–	–	–	15B	3	9,9	0,3	B6	14	23	0,8
–	–	–	–	16B	8	10	0,8	B7	3	14	0,3
–	–	–	–	17B	3	3,1	1,0	B8	17	27	0,7
–	–	–	–	18A	13	9,9	1,3	B9	17	13	1,3
–	–	–	–	19A	8	7,6	1,0	B10	15	7,6	2,2
–	–	–	–	20A	6	7,6	0,8	B11	8	9,9	0,8
–	–	–	–	–	–	–	–	B12	16	10	1,6
–	–	–	–	–	–	–	–	B13	21	7,8	2,7
–	–	–	–	–	–	–	–	B14	11	11	1,0

Примечание. Серия опытов 1 – контроль, 2 – первичные колонии, 3 – клоны, прошедшие через один пассаж в жидкой среде. Обозначения: *M* – число колоний-ревертантов; *N* – число клеточных делений, $\times 10^7$; *f* – частота появления клетки-ревертанта на одно клеточное деление, $\times 10^{-7}$.

тов равнялась $(1,08 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$, а для клеток клонов В (за исключением клона В1) – $(0,89 \pm 0,07) \cdot 10^{-7}$, т.е. в обоих случаях не отличалась достоверно от контроля. Из сопоставления данных, приведенных в табл. 1 и табл. 3, видно, что никакой связи между гетерогенностью расового состава клонов и частотой возникновения ревертантов по *ade 1–6* не обнаруживается.

Результаты анализа клонов А4 и В5. Для дополнительной оценки связи между наследуемой нестабильностью и мутабельностью были использованы клон А4, в рассевах которого преобладали расы типа контроль, и клон В5, где преобладали дыхательные мутанты, образующие слоистые или мелкие гладкие колонии. После выделения эти клоны пассировали 5 раз в жидком сусле, но расовый состав их мало изменился, что можно объяснить лишь повышенной наследуемой нестабильностью, свойственной этим клонам. Результаты опытов схематически изображены на рис. 2.

По пять-десять субклонов разных классов, выделенных из клонов А4 и В5, после пассирования вновь рассевали на твердую среду. Учет выросших колоний показал, что нестабильные расы, входящие в состав клона А4, а также гладкие и слоистые расы, входящие в состав клона В5, продолжают с повышенной частотой выщеплять расы других морфологических групп,

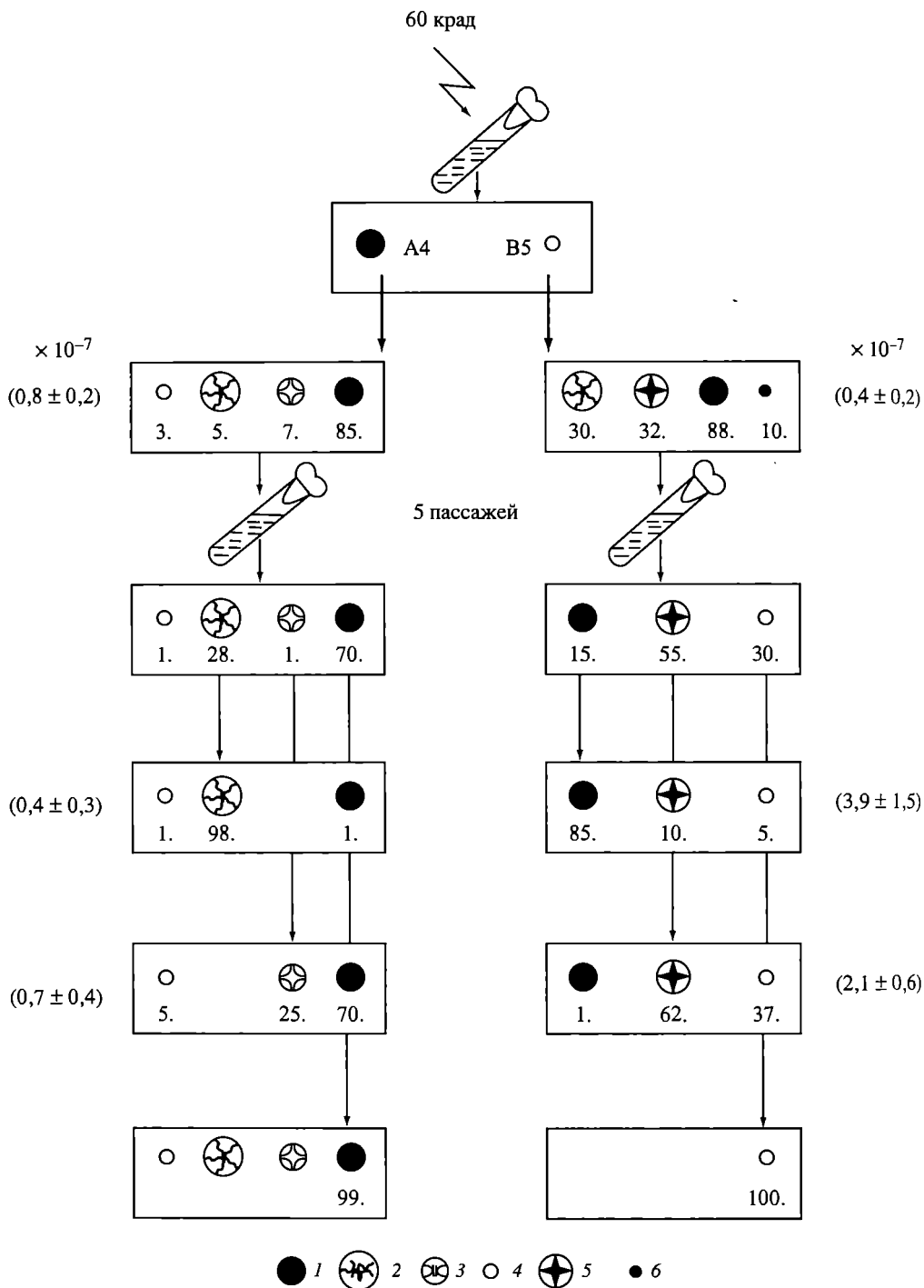


Рис. 2. Характеристики разных субклонов нестабильных клонов А4 и В5

1 – гладкие колонии типа контроль, 2 – шероховатые колонии, 3 – мелкие пигментированные колонии, обрастающие секторами, 4 – дыхательные мутанты гладкие, 5 – дыхательные мутанты слоистые, 6 – мелкие гладкие колонии. Цифры под колониями означают их содержание в рассевах, %; цифры в скобках – мутабельность (частоту появления ревертантов в данном расसेве)

а шероховатые расы и дыхательные мутанты, образующие мелкие гладкие колонии, ведут себя более стабильно.

Частоту появления ревертантов оценивали как сразу после выделения клонов А4 и В5 из облученных клеток, так и в субклонах этих клонов, выделенных после пассирования. И хотя в субклонах клона А4 выщепляющих расы с нормальным дыханием, как будто имеется тенденция к понижению частоты образования ревертантов, а в субклонах клона В5, выщепляющих в основном дыхательные мутанты, – к повышению, в обоих случаях отличия от контроля незначительны и мало достоверны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные радиобиологические характеристики дрожжей штамма 6ПЗ (см. рис. 1 и табл. 1) оказались такими же, как и у дрожжей штамма Мегри [1–4], на которых были описаны количественные закономерности формирования после облучения нестабильных клонов. Следовательно, дрожжи штамма 6ПЗ – вполне подходящий объект для решения вопроса, связана ли вызываемая облучением наследуемая нестабильность с повышением частоты ядерных мутаций.

Ревертанты, которые мы учитывали в наших опытах, могут возникать за счет мутаций двух типов – обратных мутаций в локусе *adel-6* и прямых супрессорных мутаций в других локусах; частота появления ревертантов есть сумма частот возникновения мутаций обоих типов. Принципиальную возможность существенного повышения частоты таких мутаций показывают опыты с облучением (см. табл. 2). Следовательно, если наследуемая нестабильность радиорас как-то связана с общим повышением частоты ядерных мутаций, мы вправе надеяться зарегистрировать это повышение, используя избранную нами генетическую систему.

Однако, как мы уже отмечали (см. табл. 3), среди 40 испытанных клонов, выделенных из облученных клеток, не удалось найти ни одного, у которого частота возникновения ревертантов была бы существенно выше, чем в контроле. Не отличались повышенной мутабельностью и заведомо нестабильные субклоны, выделенные из клонов А4 и В5, стойко, на протяжении серии пассажей, выщеплявшие с повышенной частотой новые расы, в том числе и дыхательные мутанты (см. рис. 2). Следовательно, ни повышенная наследуемая изменчивость морфологии колоний, ни повышенная наследуемая изменчивость цитохромной системы не сопровождается у этих дрожжей повышением частоты ядерных мутаций, по крайней мере, мутаций тех генов, изменения которых мы могли зарегистрировать в наших опытах.

Если нестабильные расы не отличаются повышенной частотой ядерных мутаций от стабильных рас и от контроля, чем же может быть обусловлена их повышенная наследуемая изменчивость? Оставив в стороне вопрос о причинах возникновения дыхательных мутантов, выскажем предположение, что ведущая роль в лучевом расообразовании у диплоидных дрожжей принадлежит стойко сохраняющемуся на протяжении многих клеточных делений повышению частоты митотической рекомбинации. В этом случае можно ожидать, что штаммы диплоидных дрожжей, существенно отличающиеся друг от друга по степени гетерозиготности, будут различаться между собой и по

разнообразие возникающих после облучения радиорас. Это мы и наблюдали в наших опытах. Разнообразие радиорас весьма велико у дрожжей штамма Мегри [1] – диплоидных дрожжей, выделенных из природного источника [8] и, следовательно, высоко гетерозиготных. У дрожжей же штамма 6ПЗ, возникших путем аутодиплоидизации всего шесть лет назад и, следовательно, гомозиготных по большинству генов, разнообразие возникающих после облучения рас относительно невелико.

Авторы благодарят С.Г. Инге-Вечтомова за любезно предоставленный штамм дрожжей 6ПЗ и Т.А. Иванову за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. № 3. С. 416.
3. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. и др. // Там же. № 6. С. 857.
4. Близник К.М., Корогодин В.И. // Там же. 1974. Т. 14, № 3. С. 369.
5. Сокурова Е.Н. // Там же. 1970. Т. 10, № 5. С. 720.
6. Ogur H., Jhon R.St., Nagai S. // Science. 1957. Vol. 125. P. 3254.
7. Девин С.А., Арман И.П. // Генетика. 1970. Т. 11. С. 121.
8. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1950.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS. Comm. 6. ESTIMATION OF THE MUTABILITY OF CLONES GROWN FROM IRRADIATED CELLS

Yu.V. Korogodina, V.I. Korogodin

After exposure of diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* (strain 6P3), homozygous by mutation *ade1-6*, to γ -rays of ^{60}Co the survival curve was sigmoidal ($n = 3.0$; $D_0 = 14.6$ krad). Colonies growth from the irradiated cells varied in size, shape and saltant content (morphological variants and respiration mutants). To estimate mutability, clones grown from cells irradiated in the dose of 60 krad (5% survival) have been used. Clones isolated from nonirradiated cells were the controls. In the controls (clones from nonirradiated cell) the frequency of revertant appearance per a cell and a division was $(1.21 \pm 0.07) \cdot 10^{-7}$. This frequency of revertant appearance increased in the irradiated cells. 40 clones isolated from the irradiated material exhibited the mutability almost the same with the controls. Correlation between the mutability level, morphological instability, and formation of respiration mutants was not observed.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 7. ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ МИТОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В КЛОНАХ, ВЫРАСТАЮЩИХ ИЗ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

Как уже отмечалось в литературе [1, 2], одним из путей лучевого расобразования у диплоидных дрожжей может служить митотическая рекомбинация. В этом случае, основываясь на результатах изучения формирования

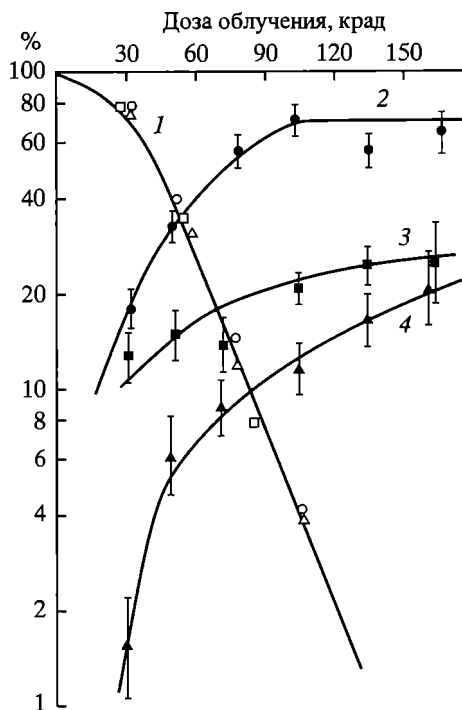
новых рас из облученных клеток [3], можно ожидать, что выход митотических рекомбинантов должен быть выше среди тех колоний, вырастающих после облучения, которые содержат больше сальтантов и чаще дают начало нестабильным клонам, а также, что в клонах, выделенных из таких колоний, частота митотической рекомбинации должна быть выше, чем в контроле.

Для оценки возможного вклада митотической рекомбинации в лучевое расообразование у дрожжей мы использовали диплоидный штамм, гетерозиготный по двум адениновым мутациям, полученный путем скрещивания ауксотрофных гаплоидных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, производных XII расы, 3В-2Б-(4-10) и 5, генотипы которых α *ade1-6* и *ade2-5* соответственно (α - и *a*-тип спаривания, *ade1-6* и *ade2-5* – мутации локусов, контролирующих синтез аденина). Гибридные диплоидные дрожжи образовывали крупные гладкие колонии белого цвета и росли на среде без аденина.

Дрожжи выращивали на сусло-агаре, трехсуточную культуру суспендировали, облучали γ -лучами Co^{60} (мощность дозы 1 крад/мин) и высевали на такую же питательную среду в чашки Петри. Спустя 10–12 сут инкубации подсчитывали число выросших колоний (для оценки выживаемости) и определяли частоту встречаемости среди них колоний-сальтантов разных классов и колоний-рекомбинантов. Колонии, вырастающие из облученных клеток, в соответствии с принятой ранее градацией [3] подразделяли на три класса: класс А – гладкие колонии, похожие на контроль; класс Б – колонии, по внешнему виду идентичные какой-либо из описанных ранее радиорас [4]; класс В – мелкие колонии неправильной формы, обычно дающие начало нестабильным клонам. К числу колоний-сальтантов относили колонии классов Б и В. Частоту встречаемости колоний-рекомбинантов (отличающихся красной окраской или наличием красного сектора), отражающую частоту митотической рекомбинации в нескольких первых делениях облученных клеток, определяли среди всех колоний, вырастающих после облучения клеток в разных дозах, а при дозе облучения 30 крад отдельно среди колоний классов А, Б и В. В посевах контрольных колоний и в посевах колоний классов А, Б и В, вырастающих из клеток, облученных в дозе 30 крад, определяли выход красных колоний, отражающий события рекомбинации в первых пострадиационных делениях, и выход секторных колоний, отражающий частоту митотической рекомбинации у клеток этих колоний при их последующем размножении.

На рисунке показана зависимость от дозы облучения выживаемости (кривая 1), выхода колоний-сальтантов (кривая 2) и выхода колоний-рекомбинантов (кривые 3 и 4). В отношении форм кривой выживания и кривой, описывающей выход сальтантов, дрожжи, использованные в этой работе, ведут себя точно так же, как дрожжи штамма Мегри 139-В, количественные закономерности лучевого расообразования которых были подробно изучены ранее [5].

Посмотрим теперь, как зависит от дозы облучения выход рекомбинантов. В контроле частота встречаемости колоний-рекомбинантов близка к 0,3%; после облучения в дозе 30 крад она равна $13 \pm 2\%$ и медленно увеличивается с дальнейшим ростом дозы (кривая 3). Это увеличение, однако, происходит в основном за счет увеличения выхода целиком красных колоний (кривая



Радиобиологические характеристики дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

1 — кривая выживания, 2 — выход сальтантов (колоний классов Б и В), 3 — выход всех рекомбинантов, 4 — выход рекомбинантов, образующих целиком красные колонии

4), относительное содержание которых среди всех рекомбинантов при дозе 30 крард равно 12%, а при дозе 130 крард и выше — 70% и более. Причины этого явления не ясны; можно лишь предположить изменение с увеличением дозы относительного вклада в общий эффект разных событий, которые могут приводить к митотической рекомбинации. Так, не исключено, что роль в общем эффекте митотического кроссинговера, приводящего к возникновению секторной колонии, с ростом дозы облучения уменьшается, а роль событий, приводящих к возникновению целиком рекомбинантных колоний, возрастает; такими событиями могут быть, например, утрата фрагмента хромосомы или элиминация одной из гомологичных хромосом. С этим может быть связано и неравномерное распределение выхода митотических рекомбинантов среди колоний разных классов, вырастающих из облученного материала.

Как показано в табл. 1, относительное содержание красных и секторных колоний среди колоний классов А, Б и В различно: митотическая рекомбинация чаще происходит в тех выживающих после облучения клетках, которые дают начало колониям класса В.

Если среди n колоний общее число красных и секторных колоний равно m , то $f = m/n$ есть вероятность осуществления рекомбинации в любом из первых N клеточных делений (минимальный регистрируемый в наших опытах красный сектор занимает примерно 0,01 часть площади всей колонии, поэтому в данном случае N примерно равно 100). Поскольку события рекомбинации происходят относительно редко с частотой P на одно клеточ-

Таблица 1

Содержание рекомбинантов среди колоний разных классов, вырастающих из клеток, облученных в дозе 30 крард

Класс колоний	Количество колоний	Из них рекомбинантов			f	$1 - f$	$-\ln(1 - f)$
		целиком красные	секторные	всего			
А	394	4	32	36	0,09	0,91	0,09
Б	52	1	11	12	0,24	0,76	0,27
В	36	3	14	17	0,47	0,53	0,63

Относительное количество колоний, содержащих не менее 1% рекомбинантов, среди колоний разных классов, вырастающих из клеток, облученных в дозе 30 крад (анализ вторичных колоний)

Класс колоний	Всего колоний	Из них рекомбинантных	f	$1 - f$	$-\ln(1 - f)$
А	121	13	0,107	0,893	0,11
Б	67	23	0,34	0,66	0,41
В	25	13	0,52	0,48	0,73

Таблица 3

Относительное содержание рекомбинантов в рассевах колоний разных классов, выросших из клеток, облученных в дозе 30 крад и в контроле

Класс колоний	Рассеяно колоний	Выросло колоний	Из них рекомбинантов		f_1	f_2
			целиком красных	секторных		
Контроль	13	768	1	2	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$
А	59	6966	181	33	$2,6 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-3}$
Б	34	3695	267	29	$7,2 \cdot 10^{-2}$	$7,8 \cdot 10^{-3}$
В	12	927	158	32	$1,73 \cdot 10^{-1}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$

ное деление, то можно полагать, что

$$f_1 = 1 - e^{-PN} \text{ или } P = -\ln(1 - f)/N.$$

Следовательно, частота рекомбинации на одно клеточное деление пропорциональна $-\ln(1 - f)$. Как видно из последнего столбца табл. 1, частоты рекомбинации в клонах А, Б и В относятся между собой как 1:3:7.

В табл. 2 представлены данные о содержании рекомбинантных колоний среди колоний разных классов, полученные при анализе результатов рассева первичных колоний. Полученные результаты близки к результатам анализа первичных колоний, которые были представлены в табл. 1. Если в наших опытах регистрируются лишь те события рекомбинации, которые происходят в первых 100 клеточных делениях, то средняя частота рекомбинаций на одно деление в клонах класса А составляет примерно 10^{-3} , а в клонах класса В – около $7 \cdot 10^{-3}$.

В табл. 3 приведены данные о среднем содержании целиком красных колоний и колоний с красными секторами в рассевах контрольных колоний и колоний разных классов, которые выросли из клеток, облученных в дозе 30 крад. Относительное содержание f_1 целиком красных колоний в рассевах отражает частоту митотической рекомбинации, происходящей в процессе формирования первичных колоний. Нетрудно показать, что если среднее число клеток в рассеваемых колониях равно N , то

$$f_1 = 2P \ln N,$$

т.е. величина f_1 пропорциональна вероятности P рекомбинации на одно клеточное деление. Результаты этих опытов хорошо соответствуют данным, представленным в табл. 1 и 2: во всех случаях частота рекомбинации в колониях класса В в 7 раз выше, чем в колониях класса А. Относительное

содержание секторных колоний в рассевах отражает среднюю частоту митотической рекомбинации у клеток из разных колоний при их дальнейшем размножении, т.е. у отдаленных потомков облученных клеток. Мы видим, что и в этом отношении колонии разных классов различаются между собой: если у клеток из колоний классов А и Б митотическая рекомбинация происходит всего в 2–3 раза чаще, чем в контроле, то у клеток колоний класса В она происходит в 15 раз чаще, чем в контроле, и в 5–7 раз чаще, чем у клеток из колоний классов А и Б. А так как колонии класса В обычно дают начало нестабильным клонам, то это может означать, что процессы расообразования, идущие в таких колониях с повышенной интенсивностью, тесно связаны с митотической рекомбинацией.

В пользу вывода о повышенной частоте митотической рекомбинации в клетках из колоний класса В свидетельствуют результаты еще одного опыта. В этом опыте 14 белых колоний класса В, выросших из клеток, облученных в разных дозах, рассевали на толстый слой сусло-агара и инкубировали 10 сут при 30 °С. В рассевах пяти таких колоний встречались отдельные колонии с крупными красными секторами – всего 13 секторных колоний на 459 выросших, или около 3% (как в опыте, результаты которого приведены в табл. 3). В рассевах же остальных девяти колоний, помимо таких же колоний с крупными красными секторами, было обнаружено большое число колоний, по периферии которых при старении возникали многочисленные мелкие красные сектора, чего никогда не наблюдалось в контроле. Это, несомненно, свидетельствовало о повышенной частоте в таких колониях событий митотической рекомбинации.

О чем же говорят полученные данные? Напомним, что хотя лучевая индукция митотической рекомбинации у дрожжей была обнаружена около 20 лет назад [6, 7], лишь в немногих работах содержатся сведения о характере распределения этого явления среди облученных клеток и в их потомстве. Так, Вильке и Левис [8] установили, что частота митотической рекомбинации неравномерно распределена среди клеток, облученных УФ-лучами, т.е. что у некоторых клеток, названных ими «компетентными», частота митотической рекомбинации существенно повышена по сравнению с контролем (и доля таких клеток увеличивается с дозой УФ-облучения), а у остальных остается на уровне контроля; к сожалению, эти авторы учитывали лишь те события митотической рекомбинации, которые осуществлялись во время первого пострадиационного деления. Хефнер [9] показал, что у клеток, облученных УФ-лучами, повышенная частота митотической рекомбинации может сохраняться на протяжении трех-четырех делений, однако он не изучал распределение частоты митотической рекомбинации по разным клонам.

Наши данные показывают, что частота митотической рекомбинации, действительно, неравномерно распределена среди разных выживающих после облучения клеток и что в ряде случаев существенное повышение частоты митотической рекомбинации по сравнению с контролем можно наблюдать на протяжении многих клеточных делений.

Повышенная частота митотической рекомбинации, как мы видели, присуща в основном клеткам, входящим в состав колоний класса В. Ранее высказывалось мнение [5], что в отличие от колоний классов А и Б, колонии класса В образуются из клеток, получивших при облучении максимальное

нелетальное число повреждений. Результаты этой работы позволяют предположить, что такие повреждения приводят к повышению частоты митотической рекомбинации, а также вызывают в клетках какие-то изменения, которые наследуются при вегетативном размножении и вызывают повышение частоты митотической рекомбинации среди последующих поколений. Это хорошо согласуется с предположением И.А. Захарова и Г.И. Наумова [1] о существенной роли митотической рекомбинации в лучевом расообразовании у диплоидных дрожжей. Следует подчеркнуть, однако, что вопрос о том, является ли митотическая рекомбинация единственным фактором в лучевом расообразовании или наряду с ней важная роль принадлежит и каким-то другим событиям, пока остается открытым.

Авторы благодарят С.Г. Инге-Вечтомова за любезно предоставленные гаплоидные штаммы дрожжей, использованные в этой работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А., Наумов Г.И. // Генетика. 1969. Т. 5, № 2. С. 139.
2. Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. // Радиобиология. 1974. Т. 14. С. 4.
3. Корогодин В.И., Ближник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. 1972. Т. 12, № 3. С. 416.
4. Корогодин В.И., Ближник К.М. // Там же. № 2. С. 163.
5. Корогодин В.И., Ближник К.М., Капутьцевич Ю.Г. и др. // Там же. № 6. С. 857.
6. James A. // J. Bacteriol. 1954. Vol. 67. P. 237.
7. James A.P., Lee-Whiting // Genetics. 1955. Vol. 40. P. 826.
8. Wilcke D., Lewis E. // Genetics. 1963. Vol. 48. P. 1701.
9. Haefner K. // Z. Vererbungsl. 1966. Vol. 98. P. 82.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS.

Comm. 7. ESTIMATION OF THE MITOTIC RECOMBINATION FREQUENCY IN CLONES GROWN FROM IRRADIATED GELLS

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich

Diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous by genes *ADE1* and *ADE2* has been used for the experiment. Survival curve of these yeasts was sigmoidal after γ -irradiation with ^{60}Co . Colonies grown from irradiated cells varied widely in size and shape. The frequency of the mitotic recombinations was estimated by the yield of red colonies and colonies with red sectors; this frequency increased with the dose of radiation, the yield of red colonies prevailing over sector ones. At the dose of 30 krad (about 75% survival) the colonies-recombinants were unevenly distributed among primary colonies of different classes – their content was minimal in colonies giving rise to stable clones, and maximal – among colonies giving rise to unstable clones. The frequency of the mitotic recombination in the unstable clones was about 7 times as high as in stable ones. It is suggested that an increased frequency of the mitotic recombination plays an essential role in radiation-induced formation of races in diploid yeast.

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС
У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.
Сообщение 8. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ
ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ
В ФОРМИРОВАНИИ РАДИОРАС**

При изучении лучевого расообразования у аутодиплоидного (и, следовательно, высокогомозиготного) штамма 6ПЗ *S. cerevisiae* было отмечено меньшее разнообразие новых морфологических вариантов, чем у природного (и, следовательно, гетерозиготного) штамма Мегри 139-В *S. ellipsoideus*; это позволило предположить, что в лучевом расообразовании у диплоидных дрожжей определенное значение может иметь митотическая рекомбинация [1]. Это предположение как будто бы подтвердилось обнаружением существенного повышения частоты митотической рекомбинации у нестабильных клонов, возникших из облученных клеток, гетерозиготных по генам *ADE1* и *ADE2*, дрожжей штамма 5 × 3В *S. ellipsoideus* [2]. Если митотической рекомбинации действительно принадлежит существенная роль в лучевом расообразовании у дрожжей, то выход новых рас и их разнообразие должны быть тем выше, чем больше гетерозиготность облучаемых клеток. Изучению роли гетерозиготности в лучевом расообразовании у диплоидных дрожжей и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали два штамма диплоидных дрожжей. Штамм 5 × 3В *S. cerevisiae* был получен скрещиванием гаплоидных штаммов 5 и 3В-2Б-(4–10) с генотипами *a ade2-5* и *α ade1-6* соответственно, любезно предоставленных нам С.Г. Инге-Вечтомовым. Дрожжи этих гаплоидных штаммов образуют на полной среде крупные круглые гладкие колонии красного цвета, а дрожжи диплоидного штамма – такие же колонии белого цвета. Влияние облучения на частоту митотической рекомбинации у этих дрожжей (определяемой по выщеплению красных колоний и колоний с красными секторами) описано ранее [2]. Штамм Мегри 139-В *S. ellipsoideus* – природный диплоидный штамм – получен нами от В.И. Кудрявцева и около 20 лет культивируется в лаборатории; основные исследования по лучевому расообразованию у дрожжей были выполнены нами на клетках этого штамма [3–7]. Дрожжи обоих штаммов культивировали при температуре 30 °С на сусло-агаровой среде (4° Балл пивного неохмеленного сусла, 2% агар-агара).

Гетерозиготность обоих штаммов по факторам, влияющим на морфологию колоний, оценивали методом тетрадного анализа. Для стимуляции спорообразования суточную культуру дрожжей пересевали на ацетатную среду (ацетат натрия 1%, КСl 0,5%, агар-агар 2%). Если на вторые-третьи сутки аски не обнаруживали, то производили несколько пассажей культуры с чередованием полной и ацетатной сред (на полной среде 1 сут, на ацетатной 7–10 сут, в течение которых вегетативные клетки погибали, а выживали

только споры). Изоляцию спор из асков проводили микроманипулятором по методике работы [8]. Изолированные споры помещали на полную питательную среду. Микроскопически определяли их жизнеспособность и характер гибели нежизнеспособных спор. Клоны, вырастающие из жизнеспособных спор, использовали для определения типа спаривания (по копуляции со стандартными a - и α -тестерами или по реакции агглютинации), способности к спорообразованию и морфологии колоний, вырастающих из составляющих такие клоны клеток.

Радиобиологические исследования проводили с диплоидными клетками обоих штаммов. Источником гамма-лучей служила установка «Гамма-селл 220» (мощность дозы около 2 крад/мин). По описанным ранее методикам [3–5] определяли кривые выживания, морфологию первичных колоний, вырастающих из жизнеспособных облученных клеток, а также морфологию вторичных колоний, вырастающих после посева клеток, составляющих первичные колонии. Для описания морфологических особенностей таких колоний принята классификация, предложенная нами ранее [3]; морфологические варианты разных типов, включая дыхательные мутанты, как и ранее [1–7], мы будем называть сальтантами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дрожжи штамма 5 × 3В *Saccharomyces cerevisiae*. Как мы уже отмечали, необлученные дрожжи этого штамма на твердой среде образуют крупные круглые гладкие колонии белого цвета. В посевах 13-ти таких колоний среди 769 выросших колоний обнаружено ~0,8% сальтантов, четыре из них представляли собой дыхательные мутанты (таблица).

На ацетатной среде дрожжи этого штамма хорошо спорулировали. Большинство асков содержало по четыре споры. Выживаемость аскоспор достигала 96%. Расщепление сегрегантов по окраске колоний (красные: белые) близко к 3:1, а по типу спаривания (a : α) – 2:2, что соответствует теоретическому ожиданию. Следовательно, процесс мейоза у клеток этого штамма не нарушен. Все колонии, образуемые жизнеспособными аскоспорами (более 300), были крупными, круглыми, гладкими. Следовательно, дрожжи штамма 5 × 3В не содержали ядерных генов, вызывающих изменение морфологии колоний или дыхательную недостаточность.

Кривая выживания диплоидных клеток штамма 5 × 3В после облучения (рис. 1, a) характеризуется наличием плеча и экспоненциального участка ($n = 3,5$, а $D_0 = 20$ крад). Выживающие клетки формируют на твердой среде колонии, различающиеся по срокам появления, размерам и форме. Дозовая зависимость относительного содержания измененных колоний (сальтантов) среди всех колоний, вырастающих непосредственно из облученных клеток, показана здесь же (кривая 2). При облучении в дозе 30 крад эта величина близка к 15%, а при больших дозах приближается к 60–70%.

Ранее в исследованиях на дрожжах штамма Мегри 139-В нами было установлено [4], что первичные измененные колонии представляют собой лишь часть сальтантов, возникающих при облучении; если к сальтантам относить все колонии, содержащие достоверно больше измененных клеток, чем в контроле, выход их превышает выход первичных измененных колоний

Количество сальтантов разных типов в колониях, вырастающих из необлученных и облученных в дозе 30 крад дрожжевых клеток

Типы сальтантов (по [3, 7])	Число колоний, содержащих сальтанты данного типа					
	5 × 3В			Мегри 139-В		
	без облучения		30 крад, диплоидные клетки	без облучения		30 крад, диплоидные клетки
	диплоидные клетки	сегреганты		диплоидные клетки	сегреганты	
Дыхательные мутанты						
пигментированные	3	29	29	25	21	48
чешуйчатые			1		10	5
бугорчатые	1	1	3	5	2	10
слоистые		17	9	4	6	3
Нормальное дыхание						
ромашки			19	14	13	48
складчатые		3	3	12	13	27
бородавчатые			1		8	11
ребристые		4	1	2	10	3
кружевные					1	1
губчатые		4	1		2	5
ноздреватые						8
лучистые			5	4	2	3
неопределенные	2	10	6	34	20	61
Всего изучено колоний*	6	52	44	64	59	128

* Сумма колоний, содержащих сальтанты разных типов, превышает общее число изученных колоний потому, что многие из них содержат сальтанты нескольких типов.

и приближается к теоретическому значению [6]. Теоретическое значение выхода сальтантов можно рассчитать по формуле $\frac{S_1 - S_2}{S_1} \cdot 100\%$, где S_1 – выживаемость клеток, облученных в некоторой дозе; S_2 – теоретическое значение выживаемости тех из них, которые дают начало клонам, не отличающимся от контроля (рис. 1).

В случае дрожжей 5 × 3В при облучении в дозе 30 крад теоретическое значение выхода сальтантов примерно равно 50%.

Для проверки, в какой мере эта закономерность приложима к дрожжам штамма 5 × 3В, 100 колоний (случайная выборка), выросших из дрожжей этого штамма после облучения в дозе 30 крад, были рассеяны на твердую среду в чашки Петри (каждая колония отдельно). Всего выросло 13 334 вторичных колонии, среди них 1304 сальтанта. Для каждой первичной колонии определяли процентное содержание клеток-сальтантов, морфологические характеристики вырастающих из них колоний, а также число содержащихся в них разных типов клеток (включая клетки типа контрольных).

Интегральное распределение первичных колоний по содержанию в них клеток-сальтантов показано на рис. 2, кривая 1. Видно, что относительное коли-

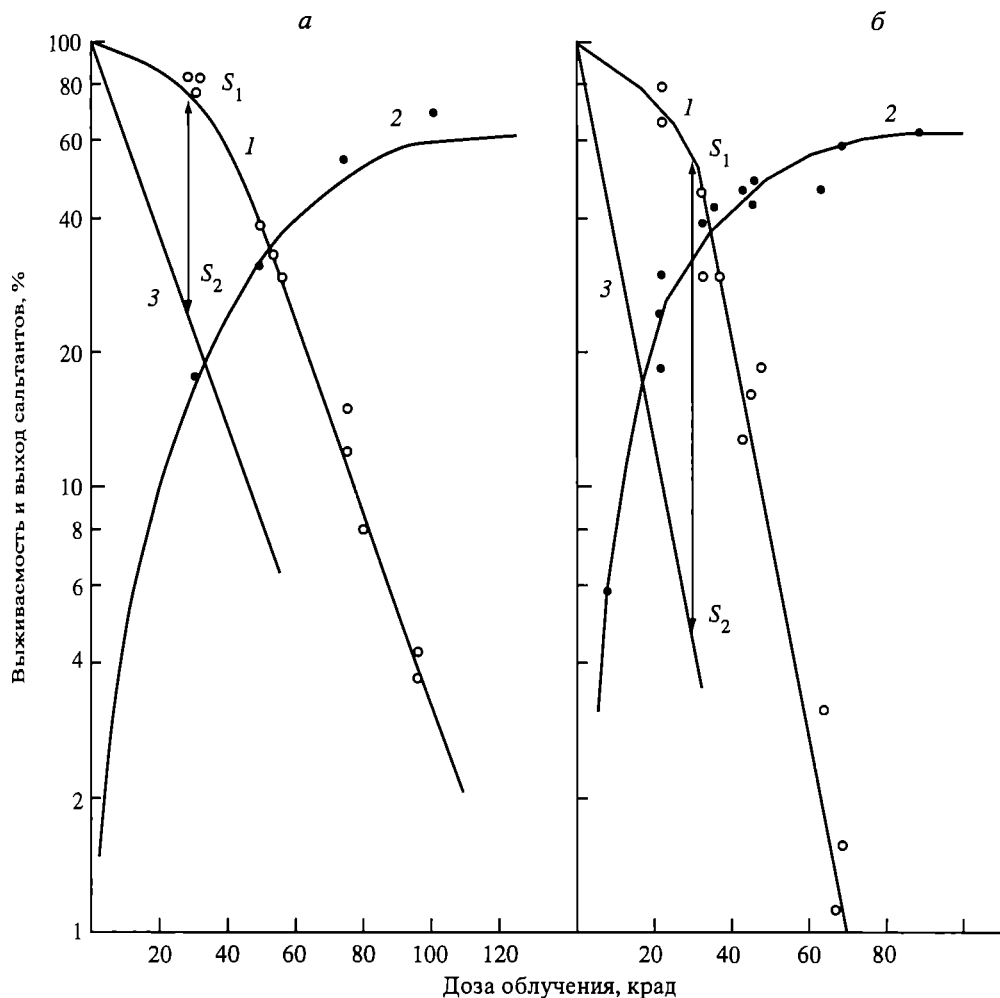


Рис. 1. Изменение выживаемости (1) и выхода первичных измененных колоний-сальтантов (по отношению ко всем выросшим колониям) (2) в клетках дрожжей штаммов $5 \times 3В$ (а) и Мегри 139-В (б) в зависимости от дозы облучения, 3 – теоретические кривые выхода колоний, не отличающихся от контрольных (по отношению ко всем облученным клеткам)

чество колоний, содержащих более 1% клеток-сальтантов (т.е. достоверно больше, чем в контроле), равно примерно 43%, что близко к теоретическому значению. Число колоний, содержащих все большее количество клеток-сальтантов, уменьшается, и лишь около 15% их содержит от 50 до 100% таких клеток.

Разнообразие типов сальтантов, выросших в этих рассевах, показано в таблице. По морфологии колоний их можно разделить на 11 типов. Чаще всего встречаются дыхательные мутанты и ромашки. Характерно, что около 50% первичных колоний-сальтантов содержали клетки, относящиеся к двум и более разным морфологическим вариантам, в том числе около 10% колоний содержали клетки четырех–шести разных типов.

Дрожжи штамма Мегри 139-В *Saccharomyces ellipsoideus*. Необлученные дрожжи штамма Мегри 139-В также образуют крупные круглые глад-

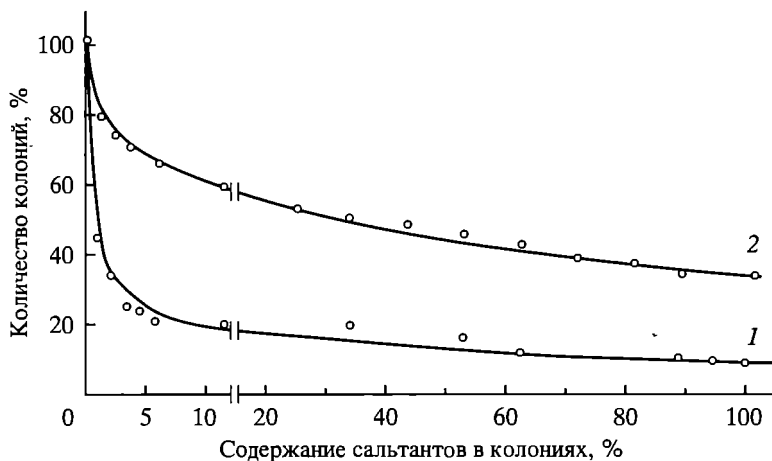


Рис. 2. Распределение колоний дрожжей штамма 5 × 3В (1) и Мегри 139-В (2) по содержанию в них измененных клеток (сальтантов) при облучении в дозе 30 рад

кие колонии белого цвета. В рассеве ста таких колоний среди 19 229 выросших колоний обнаружено 169 сальтантов, что составляет примерно 0,9%. Эти сальтанты также относятся к разным морфологическим типам (см. таблицу).

Дрожжи штамма Мегри 139-В спорулировали плохо. Только после нескольких пассажей с чередованием полной и ацетатной сред удалось обнаружить аски. Аски содержали в основном по три споры, реже по четыре. Выживаемость аскоспор была низкая — около 30%. Расщепление по жизнеспособности носило нерегулярный характер: встречались аски, содержавшие все жизнеспособные споры, все нежизнеспособные или разное число тех и других. Нежизнеспособные споры погибали не прорастая, или после одного почкования, или образуя формы инактивации, состоящие из 3–30 клеток; формы инактивации таких спор весьма напоминали формы инактивации облученных клеток этого штамма [9]. Изучение расщепления по типу спаривания не дало определенных результатов. Так, в некоторых асках расщепление по типам спаривания (судя по реакции агглютинации) было близко к 2 : 2, а в других приближалось к 2 : 1, что позволяло предположить преимущественную гибель сегрегантов какого-либо одного типа спаривания. У одного из аскоспоровых клонов была обнаружена споруляция, что может иметь место лишь в случае гомоталлических клеток.

Жизнеспособные сегреганты формировали колонии, имеющие различную морфологию. В чашки Петри были рассеяны 62 такие колонии для определения морфологии вторичных колоний. Только три колонии содержали однородные клетки типа контрольных. Остальные 59 колоний состояли в основном из клеток-сальтантов; при их посевах колонии вырастали в разные сроки и различались по размерам и форме, как после облучения клеток ионизирующими излучениями [3, 4]. Среди примерно 5000 выросших колоний встречались сальтанты разных морфологических типов, включая дыхательные мутанты (см. таблицу). Характерно, что большинство моноспоровых клонов содержали клетки-сальтанты нескольких типов — в 50% случаев двух

типов, а в 30% случаев – трех и более. Такие клоны, как правило, давали начало нестабильным расам.

Результаты изучения аскоспоровых клонов дрожжей штамма Мегри 139-В позволяют предположить, что дрожжи этого штамма обладают целым спектром рецессивных летальных мутаций и мутаций, нарушающих дыхание и изменяющих морфологию колоний и клеток, которые проявляются в гаплоидном состоянии. Высокую гетерозиготность природных диплоидных дрожжей отмечали и другие исследователи [10, 11]. Весьма вероятно также, что у дрожжей штамма Мегри 139-В нарушен процесс мейоза, что приводит как к летальным событиям, так и к несбалансированности хромосомного набора.

Кривая выживания диплоидных клеток штамма Мегри 139-В после облучения приведена на рис. 1, б (кривая 1). Эта кривая также имеет плечо и экспоненциальный участок ($n = 7$, а $D_0 = 10$ крад). Выживающие клетки образовывали колонии, различающиеся по срокам появления, размерам и форме. Дозовая зависимость относительного содержания сальтантов среди первичных колоний показана здесь же (кривая 2). При облучении в дозе 30 крад эта величина равна примерно 20%, а с увеличением дозы приближается к 60–70%. Теоретическое значение выхода сальтантов при облучении в дозе 30 крад, рассчитанное по формуле $\frac{S_1 - S_2}{S_1} \cdot 100\%$, близко к 75%.

На твердую среду были рассеяны 175 колоний (случайная выборка), выросших из клеток, облученных в дозе 30 крад (каждая колония отдельно). Всего выросло 24 704 колоний, среди них 8953 сальтантов. Интегральное распределение первичных колоний по содержанию в них клеток-сальтантов показано на рис. 2 (кривая 2). Видно, что относительное количество колоний, содержащих более 1% клеток-сальтантов (т.е. достоверно больше, чем в контроле), равно примерно 70%, что близко к теоретическому значению. Число колоний, содержащих от 50 до 100% сальтантов, равно примерно 50%.

Разнообразие типов сальтантов, выросших в посевах первичных колоний, показано в таблице. Чаще всего встречались дыхательные мутанты, а также ромашки и складчатые. Около 70% первичных колоний-сальтантов содержали клетки двух и более разных морфологических типов, в том числе около 10% колоний содержали клетки четырех-семи разных типов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тетрадный анализ показал, что дрожжи штамма $5 \times 3В$ высокогомозиготные, а штамма Мегри 139-В – гетерозиготные по генам, влияющим на жизнеспособность клеток и морфологию клеток и колоний. Следовательно, эти штаммы хорошо соответствовали задаче настоящего исследования. Необлученные диплоидные клетки обоих штаммов образовывали сальтанты с одинаково низкой частотой – среднее содержание их в посевах не превышало 1%.

Сегреганты гомозиготного штамма образовывали однородные колонии типа контрольных. В посевах моноспоровых клонов этого штамма сальтанты встречались чаще, чем в посевах диплоидных клеток – до 2,4%, что не было связано с гетерозиготностью – расщепления по этому признаку не

обнаружено. Это означает, по-видимому, просто несколько большую чувствительность гаплоидных клеток по сравнению с диплоидными к факторам, вызывающим различные наследственные изменения, преимущественно цитоплазматические дыхательные мутации.

Сегреганты гетерозиготного штамма или погибали, образуя разные формы инактивации, или формировали разнообразные колонии-сальтанты, в том числе дефектные по дыханию; часто такие колонии были нестабильными и при расसेве давали начало разным морфологическим вариантам. По своим морфологическим признакам, а также по морфологии и разнообразию составляющих их клеток эти колонии были похожи на измененные колонии, вырастающие из облученных клеток. Это означает, что диплоидные клетки штамма Мегри 139-В весьма гетерозиготны по рецессивным генам, вызывающим летальный эффект и морфологические изменения колоний и клеток; у этих клеток также, по-видимому, существенно нарушен мейоз.

При действии ионизирующих излучений на диплоидные клетки обоих штаммов кривые выживания имели сходную форму (рис. 1, а, б, кривые 1), но различались по величине плеча – экстраполяционное число n кривой выживания гомозиготных клеток равнялось 3,5, а гетерозиготных – 7; мы не будем касаться обсуждения различий в значениях D_0 . Большая величина экстраполяционного числа у гетерозиготных клеток может означать, что наличие у них рецессивных летальных мутаций не повышает чувствительности к ионизирующим излучениям.

Колонии, вырастающие из жизнеспособных облученных клеток обоих штаммов, различались между собой по срокам появления, размерам и форме. В обоих случаях число измененных первичных колоний быстро увеличивалось с дозой облучения, стремясь к некоторому плато (рис. 1, б, в, кривые 2). Однако выход колоний, содержащих достоверно больше измененных клеток, чем в контроле, при облучении в дозе 30 крад у гомозиготных дрожжей был меньше, чем у гетерозиготных – 43 и 70% соответственно. Но это вряд ли связано со степенью гетерозиготности: в обоих случаях выход таких колоний близок к теоретически ожидаемому, равному 50 и 75% соответственно, величина которого тем выше, чем больше значение экстраполяционного числа.

Различие в значении экстраполяционного числа объясняет и различие в содержании сальтантов в отдельных колониях. Чем больше значение экстраполяционного числа, тем больше должно выживать клеток с большим числом повреждений и, следовательно, тем больше среди выживающих клеток должно быть таких, которые дают начало клонам с повышенной нестабильностью и более высоким содержанием сальтантов [5]. Это мы и наблюдали. Как видно из рис. 2, доля клонов, выросших из облученных клеток и содержащих более 50% сальтантов, для штамма $5 \times 3В$ ($n = 3,5$) составляет 12–15%, а для штамма Мегри 139-В ($n = 7,0$) – около 50%. О том, что такие клоны нестабильны, свидетельствует тот факт, что почти все они содержали по четыре и более разных типов клеток.

Степень гетерозиготности не влияет и на качественное разнообразие сальтантов. Как следует из таблицы, и в контроле, и после облучения возникали сальтанты самых разнообразных и примерно одинаковых типов. Во всех случаях чаще встречались дыхательные мутанты разных типов, затем – ромашки и складчатые, реже – остальные. Естественно, что разнообразие

типов сальтантов увеличивалось при увеличении объема выборки, и это происходило за счет редко встречающихся форм.

Таким образом, хотя облучение и повышает частоту митотической рекомбинации, и это повышение у нестабильных клонов сохраняется на протяжении многих последовательных делений [2], вклад митотической рекомбинации в лучевое расообразование у диплоидных дрожжей, по-видимому, невелик. Правда, можно предположить, что облучение, даже при относительно невысоких (по летальному эффекту) дозах, вызывает так много генных мутаций, что нивелируются различия в исходной гетерозиготности штаммов; такое предположение, однако, мало правдоподобно. По-видимому, повышение частоты митотической рекомбинации является другим проявлением тех же наследственных изменений, которые приводят и к проявлению сальтантов.

Почему же в таком случае нестабильные клоны и сальтанты, возникающие после облучения, подобны нестабильным клонам и сальтантам, возникающим из аскоспор у дрожжей штамма Мегри 139-В? Во-первых, сходные фенотипические изменения могут обуславливаться и повреждениями, возникающими в результате облучения, и рецессивными мутациями, вылепляющимися во время мейоза у дрожжей гетерозиготного по таким мутациям штамма. Во-вторых, если у дрожжей штамма Мегри 139-В нарушен процесс мейоза, это может приводить к анеуплоидности и различным хромосомным aberrациям, имитирующим действие ионизирующих излучений. В пользу этого свидетельствует и сходство форм инактивации, возникающих после облучения и образуемых нежизнеспособными сегрегантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. // Радиобиология. 1974. Т. 14, № 4. С. 496.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. 1974. № 5. С. 681.
3. Корогодин В.И., Близник К.М. // Там же. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
4. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. № 3. С. 416.
5. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. и др. // Там же. № 6. С. 857.
6. Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Там же. 1974. Т. 14, № 2. С. 229.
7. Близник К.М., Корогодин В.И. // Там же. № 3. С. 369.
8. Johnston J.R., Mortimer R.K. // J. Bacteriol. 1959. Vol. 78. P. 292.
9. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
10. Захаров И.А., Наумов Г.И. // Генетика. 1969. Т. 5, № 2. С. 139.
11. Руснак А.Ф. Генетическое изучение и селекция некоторых рас винных дрожжей Молдавии. Дисс. Л., 1973.

FORMATION OF RADIORACES BY YEASTS.

Comm. 8. THE STUDY OF THE ROLE OF DIPOLOID YEAST HETEROZYGOSIS IN RADIORACE FORMATION

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Karultsevich, V.I. Kondratieva

The regularities of formation of new races under the action of ionizing radiation were studied for two strains of diploid yeasts, namely, high-homozygous $5 \times 3B$ *Saccharomyces cerevisiae* and natural heterozygous Megri 139-B *Saccharomyces ellipsoideus*. It has been

shown that the degree of heterozygosis (estimated by the method of tetrad analysis) does not substantially affect either the quantitative regularities of radiorace formation or the qualitative variations in the new-formed races. The differences between the yield new races in the both strains after γ -irradiation with doses similar in biological effectiveness might be explained by various extrapolation numbers of their survival curves.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 9. ОСОБЕННОСТИ РАСООБРАЗОВАНИЯ У ГАПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ

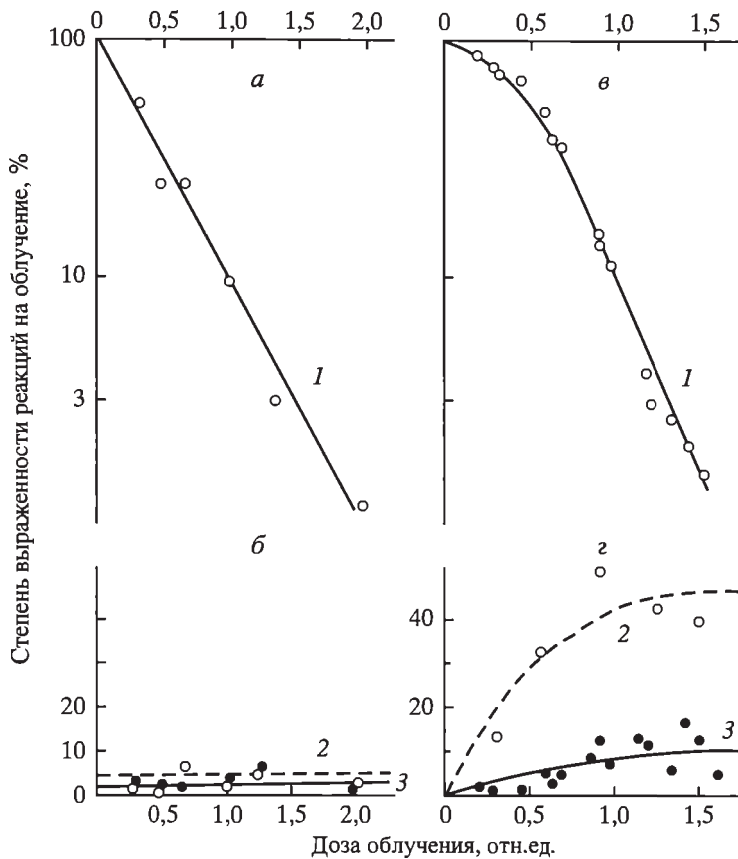
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В опытах использовали гаплоидные дрожжи *Zygosaccharomyces bailii*, ранее изученные в радиобиологическом отношении [5]. До и после облучения клетки выращивали на твердой питательной среде (пивное сусло 4° Балл, агар-агар 2%) при 30 °С. Трехсуточную культуру суспендировали в стерильной воде, облучали γ -лучами Co^{60} (установка «Гамма-селл 220», мощность дозы 2,3 крад/мин) или ультрафиолетовыми лучами (лампа БУВ-15, мощность дозы около 1 эрг \cdot с $^{-1}$ \cdot см $^{-2}$), рассеивали на сусло-агар в чашки Петри и инкубировали в термостате. В контроле (без облучения) колонии вырастали на вторые сутки. После облучения число выросших колоний учитывали на вторые N_2 и седьмые N_7 сутки; отношение $(N_7 - N_2)/N_7$ (в %) служило мерой эффекта дорастания. Выход колоний, содержащих новые расы, оценивали на 15-е сут инкубации по морфологическим признакам (см. [1]) и выражали в процентах ко всем выросшим колониям; в контроле эта величина не превышала 1–1,5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные результаты трех независимых опытов приведены на рисунке; дозы нормированы по значениям ЛД_{90} , несколько различающимся в разных опытах, и выражены в относительных единицах. Из рисунка видно, что после γ -облучения кривые выживания экспоненциальные; экстраполяционное число $n \approx 1$ (а). Эффект дорастания и выход новых рас (б), несколько варьируя от опыта к опыту, в среднем остаются на одном уровне и мало отличаются от контроля. Эти данные хорошо соответствуют многочисленным наблюдениям, сделанным нами при проведении различных экспериментов с гаплоидными дрожжами разных родов и видов (*Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* и др.), и тому факту [3], что в случае диплоидных дрожжей, культивируемых после γ -облучения в неоптимальных условиях, когда кривые выживания приближаются по форме к экспоненте, эффект расообразования резко уменьшается.

В случае УФ-облучения кривые выживания гаплоидных дрожжей имеют сигмоидную форму; экстраполяционное число $n = 5$ (в). Эффект дорастания здесь хорошо выражен: при 1–10% выживаемости он достигает 40–50%



Реакции гаплоидных дрожжей *Zygosaccharomyces bailii* на действие γ -лучей (а, б) и ультрафиолетового света (в, г)

1 – кривые выживания, 2 – эффект дорастания, 3 – выход новых рас

(г, кривая 2). Выход новых рас здесь также увеличивается с дозой облучения, но значительно медленнее, чем эффект дорастания; среднее значение выхода новых рас при облучении в изученном диапазоне доз не превышало 10% (г, кривая 3).

Интересно сравнить реакции гаплоидных дрожжей при действии УФ-лучей с реакциями диплоидных дрожжей при действии ионизирующих излучений [2–4] в случае близких значений экстраполяционных чисел. В обоих случаях эффект дорастания ярко выражен и близок по величине, достигая 40–60%. У диплоидных дрожжей после γ -облучения выход новых рас сопоставим по величине с эффектом дорастания; этот факт послужил одним из оснований для заключения, что у диплоидных дрожжей лучевые повреждения, вызывающие летальный эффект, задержку роста колоний и формирование новых рас, имеют одну и ту же природу [3]. У гаплоидных дрожжей, облученных УФ-лучами, выход новых рас в 4–5 раз ниже, чем эффект дорастания (г); это может означать, что в данном случае повреждения, обуславливающие задержку роста колоний, не всегда идентичны повреждениям, приводящим к появлению новых рас.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьевич Ю.Г. и др. // Там же. № 6. С. 857.
3. Близник К.М., Капутьевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Там же. 1974. Т. 14, № 2. С. 229.
4. Близник К.М. // *Studia Biophys.* 1971. Vol. 26, N 3. P. 183.
5. Корогодин В.И., Лю Ай-шень // Цитология. 1959. Т. 1. 379.

REGULARITIES OF RADIORACE FORMATION IN YEASTS

Comm. 9. RADIORACE FORMATION IN HAPLOID YEASTS

K.M. Bliznik, N.M. Kabakova, Yu.G. Kapultsevich, V.I. Korogodin

The survival curve of haploid yeast cells of *Zygosaccharomyces bailii* is exponential after γ -irradiation (^{60}Co), and sigmoidal after exposure to the ultraviolet light ($n \sim 5$). The cells surviving after γ -irradiation produce colonies at about the same time as control cells, and the yield of new races does not exceed 1–3 percent being independent on radiation dose. The formation of colonies after UV-irradiation is delayed in comparison with intact control. After doses decreasing cell survival down to 10–1 percent the late appearance of clones makes 40–50 percent. The yield of new races is higher than in the control and reaches 10 percent of the total number of grown colonies at a 5–1-percent of survival.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 10. О НЕСЛУЧАЙНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПО КЛОНАМ, ВЫРАСТАЮЩИМ ИЗ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

В предыдущих работах было показано, что облучение диплоидных дрожжей ионизирующими излучениями приводит не только к возникновению клонов, отличающихся измененной морфологией колоний и содержащих клетки-сальтанты, дающие начало новым расам [1], но также вызывает образование клонов, выщепляющих с большой частотой нежизнеспособные клетки [2], индуцирует появление дыхательных мутантов [3] и повышает частоту митотической рекомбинации [4]. Случайно ли распределены клетки, несущие то или другое из этих наследственных изменений, по колониям, вырастающим из облученного материала, или же локализованы преимущественно в колониях какого-либо типа? Чтобы ответить на этот вопрос, диплоидные дрожжи *S. ellipsoideus*, Мегри 139-В, не содержащие идентифицированных генетических маркеров, и *S. cerevisiae*, 5a × 3Ba, гетерозиготные по генам *ADE1* и *ADE2*, облучали γ -квантами Co^{60} , рассеивали на сусло-агар в чашки Петри, инкубировали при 30 °С до появления колоний и отдельные выросшие колонии анализировали на содержание клеток четырех указанных типов. Методики культивирования, облучения и учета измененных колоний, а также содержания в колониях клеток с различными генетическими изменениями описаны ранее [1–4].

Как мы уже отмечали [2], колонии, вырастающие непосредственно из облученных клеток, можно разделить на три основные группы: колонии типа

Содержание клеток-сальтантов в колониях разных типов
(штамм Мегри 139-В, облучение в дозе 60 крад)

Тип колонии	Число рассеянных колоний	Число выросших колоний		Содержание клеток-сальтантов в рассеянных колониях	
		всего	из них сальтантов	среднее, %	лимиты, %
Контроль	28	4763	53	1,1	0:4,2
А	50	2978	496	16,6	0:100
Б	22	2399	2265	94,4	30:100
В	28	3717	3077	82,8	0,5:100

Таблица 2

Содержание нежизнеспособных клеток в колониях разных типов
(штамм Мегри 139-В, облучение в дозе 60 крад)

Тип колонии	Число рассеянных колоний	Содержание клеток, нежизнеспособных при оптимальных условиях		Содержание клеток, нежизнеспособных при неоптимальных условиях	
		среднее, %	лимиты, %	среднее, %	лимиты, %
Контроль	28	17	7:40	24	19:49
А	50	20	2:65	43	12:99
Б	22	27	3:61	54	18:92
В	28	36	8:94	87	25:100

А, внешне подобные контрольным; колонии типа Б, относящиеся к одной из радиорас или содержащие четко выраженные измененные секторы, начинающиеся из центральной части колонии; колонии типа В, имеющие мелкие размеры, неправильную форму и образующие по периферии многочисленные секторы. Колонии типа В обычно дают начало нестабильным клонам.

Из табл. 1 видно, что содержание сальтантов в колониях типа Б и В резко превышает таковое в контроле и в колониях типа А. При этом было установлено, что в колониях типа Б содержатся сальтанты, относящиеся, как правило, к одной-двум морфологическим группам (описание морфологических групп сальтантов см. [1]), а в колониях типа В – к трем-пяти и более морфологическим группам.

Данные о содержании в этих же колониях клеток, неспособных к росту при оптимальных (30 °С, сусло-агар) и неоптимальных (37 °С, сусло-агар+7% поваренной соли) условиях, приведены в табл. 2. Видно, что максимальное число нежизнеспособных клеток содержится в колониях типа В, что особенно выражено при неоптимальных условиях культивирования. Последнее заключение подтверждается результатами опытов, в которых определяли относительную эффективность роста (т.е. способность образовывать колонии) клеток из разных колоний при неоптимальных и оптимальных условиях культивирования: чувствительность к неоптимальным условиям клеток из колоний типа В была в 3 раза больше, чем клеток из колоний типа А и Б,

Таблица 3

Относительная эффективность роста клеток из колоний разных типов при неоптимальных и оптимальных условиях (штамм Мегри 139-В, облучение в дозе 60 крад)

Тип колонии	Число рассеянных колоний	Средняя относительная эффективность роста, %	Коэффициент вариабельности C_v , %
Контроль	13	93,5±1,3	4,9
А	42	68,0±4,3	40
Б	18	62,0±6,6	44
В	27	22,7±5,6	128

Таблица 4

Содержание клеток – дыхательных мутантов в колониях разных типов (штамм Мегри 139-В)

Доза облучения, крад	Тип колонии	Количество колоний, содержащих разное количество клеток – дыхательных мутантов, %			
		0–2	2–10	10–50	50–100
0	Контроль	100	–	–	–
20	А	100	–	–	–
	Б	83	12	5	–
	В	20	61	19	–
60	А	80	16	2	2
	Б	53	12	20	15
	В	32	16	28	14

Таблица 5

Содержание клеток-рекомбинантов в колониях разных типов (штамм 5а × 3Ва, облучение в дозе 30 крад)

Тип колонии	Число рассеянных колоний	Число выросших колоний	Число выросших колоний-рекомбинантов			
			полные	секторные	всего	всего в % ко всем выросшим колониям
Контроль	13	768	1	2	3	0,39
А	59	6966	181	33	214	3,08
Б	34	3695	267	29	296	8,03
В	12	927	158	32	190	20,05

и в 4 раза больше, чем в контроле (табл. 3). При этом было установлено, что вариабельность этого показателя (C_v) для колоний типа В в 3 раза больше, чем для колоний типа А и Б, и в 25 раз больше, чем в контроле.

Данные о содержании в колониях разных типов клеток – дыхательных мутантов приведены в табл. 4. Видно, что хотя облучение увеличивает содержание дыхательных мутантов во всех колониях, это особенно ярко выражено для колоний типа В; при обеих использованных дозах облучения повышенное (по сравнению с контролем) содержание дыхательных мутантов в

таких колониях в несколько раз превышает их содержание в колониях типа А и Б. В табл. 5 приведены данные о содержании клеток-рекомбинантов в колониях разных типов, не имевших рекомбинантных секторов; такие клетки, следовательно, возникали в процессе роста этих колоний, и их содержание отражает частоту митотической рекомбинации у составляющих такие колонии клеток. И в этом случае, как и в предыдущих, колонии типа В содержат существенно больше наследственно-измененных клеток, чем колонии типа А и Б и тем более контрольные.

Таким образом, представленные данные показывают, что различного рода наследственные изменения с неодинаковой частотой возникают в потомстве разных выживающих после облучения диплоидных клеток. Клетки-сальтанты, нежизнеспособные клетки, дыхательные мутанты и клетки-рекомбинанты значительно чаще встречаются в колониях типа В, чем в колониях типа А и Б, тем более в контроле. Следовательно, процесс расобразования, наиболее интенсивно протекающий именно в колониях типа В [2], сопровождается весьма широким спектром наследственных изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С. 163.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. // Там же. № 3. С. 416.
3. Близник К.М., Корогодин В.И. // Там же. 1974. Т. 14, № 3. С. 369.
4. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. // Там же. № 5. С. 681.

REGULARITIES OF RADIORACE FORMATION IN YEASTS.

Comm. 10. ABOUT NON-RANDOM DISTRIBUTION OF SOME HEREDITARY CHANGES AMONG THE CLONES GROWN FROM IRRADIATED CELLS

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich, V.G. Petin

In colonies grown from cells (*Saccharomyces ellipsoideus*, Megri 139-B and *Saccharomyces cerevisiae* 5a × 3Bα) exposed to gamma-rays of Co⁶⁰, the following test effect have been analysed: the content of cells-saltants producing the colonies with changed morphology, nonviable cells as well as respiratory mutant cells and recombinant cells in gene *ADE1* and *ADE2*. It was revealed that the cell content of these four types is non-random distributed among these colonies: the higher the content of cells of some one of these types, the more cells having other hereditary changes.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОРАС У ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Сообщение 11. ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

Начало радиобиологии дрожжевых организмов было положено исследованиями Надсона и его сотрудников. Еще в 1920–1925 гг. Надсон [1] описал разнообразие проявлений последствий облучения дрожжевых клеток ионизирующими излучениями – гибель клеток после одного или нескольких

делений, задержку формирования колоний, зависимость эффективности облучения от условий культивирования, возникновение морфологических вариантов – радиорас, или сальтантов.

В 1930–1950 гг. внимание исследователей привлекал в основном анализ зависимости форм кривых выживания облученных дрожжей от их плоидности [2, 3]. Полученные данные Мортимер [3] объяснил гипотезой, согласно которой в дрожжевых клетках при облучении возникают рецессивные и доминантные летальные мутации; причиной гибели гаплоидных дрожжей служат в основном рецессивные летали, а диплоидных и полиплоидных – доминантные. Подтверждением этой гипотезы служили результаты гибридологического и тетрадного анализов облученных гаплоидных и диплоидных клеток, показавшие возникновение мутаций обоих типов как у гаплоидных [4], так и диплоидных [5] дрожжей.

Изучение другой группы фактов, описанных Надсоном: соотношения разных форм инактивации облученных дрожжей, задержки формирования колоний и зависимости выживаемости от условий культивирования [6–9] – привело к другой гипотезе, формально объясняющей количественные закономерности действия ионизирующих излучений на дрожжевые клетки. Согласно этой гипотезе [10], основная роль в летальном эффекте облучения и гаплоидных, и диплоидных клеток принадлежит однотипным «летальным повреждениям» (ЛП). Для гаплоидных клеток такие повреждения абсолютно летальны. Для диплоидных клеток отдельные повреждения вызывают инактивацию лишь с некоторой вероятностью, увеличивающейся при отклонении условий пострадиационного культивирования от оптимальных. Эффект отдельных повреждений, содержащихся в одной и той же клетке, суммируется. Если клетка, несущая повреждения, не погибает, эти повреждения передаются ее потомкам. С некоторой вероятностью, увеличивающейся с числом повреждений, они вызывают гибель потомков облученной клетки, что приводит к появлению летальных секторов и задержке формирования колонии. Эта гипотеза отличается от гипотезы Мортимера тем, что вместо двух типов повреждений (рецессивных и доминантных леталей) здесь постулируется существование повреждений одного типа.

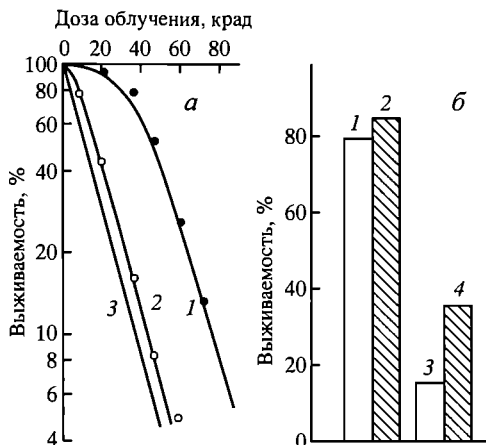
Результаты количественного изучения третьей группы фактов, описанных Надсоном, относящихся к явлению лучевого расообразования, приведены нами в сообщениях этой серии [11–20]. Задача данного сообщения – разработать представления, объясняющие выявленные закономерности.

Основные закономерности лучевого расообразования у дрожжей можно сформулировать следующим образом. Данные, полученные нами [11], подтвердили результаты исследований Надсона и сотрудников [1] о резком повышении частоты расообразования у дрожжей под влиянием ионизирующих излучений; при этом было установлено, что около 20% новых рас представляли собой дыхательные мутанты [15].

Рассеивая отдельные колонии, вырастающие из облученных клеток, и изучая разнообразие вырастающих колоний, а затем повторяя эту процедуру много раз, мы установили, что основной вклад в лучевое расообразование вносят так называемые «нестабильные клоны» (НК) – клоны, при размножении которых новые, мутантные расы появляются с повышенной частотой

Рис. 1. Кривые выживания диплоидных дрожжей после γ -облучения (а)

1 – пострадиационное культивирование при 30 °С на сусло-агаре (оптимальные условия), $n = 9,1$; 2 – то же при 37 °С на сусло-агаре + 7% поваренной соли (неоптимальные условия), $n = 1,4$; 3 – кривая выхода «немутантных» (стабильных) колоний, $n = 1$, $D_0 = 16$; б – выживаемость (1, 3) и выход нестабильных клонов (2, 4) у дрожжей, облученных в дозе 35 крад и выращенных в оптимальных (1, 2) и неоптимальных (3, 4) условиях



[12]. Нестабильность таких клонов свидетельствует о том, что возникающие в результате облучения изменения, вызывающие мутации (будем называть их мутагенными повреждениями, МП), наследуются при митотическом размножении дрожжей или приводят к наследственным изменениям, продолжающим индуцировать нестабильность.

Нестабильные клоны отличаются от стабильных клонов, вырастающих из облученных клеток, и от контроля повышенным содержанием клеток-мутантов разных типов [12]. Клоны, вырастающие из необлученных клеток, содержат обычно не более 1% мутантов; критерием того, что данный клон относится к нестабильным, является содержание мутантов, превышающее 1%. Пользуясь этим критерием, можно провести количественную оценку выхода НК из клеток, выживающих после облучения в разных дозах.

В опытах с непочкующимися гаплоидными клетками, облученными ионизирующими излучениями, нам ни разу не удалось зарегистрировать появление мутантов или НК в количествах, значительно превышающих контроль [19]. Следовательно, гаплоидные клетки, выживающие после облучения, в подавляющем большинстве случаев не содержат МП. Напомним, что кривая выживания гаплоидных дрожжей имеет экспоненциальную форму; для такой кривой экстраполяционное число $n = 1$, а наклон ее можно охарактеризовать значением D_0 .

В опытах с диплоидными клетками нами установлено [12, 13], что выход НК быстро увеличивается с дозой облучения, достигая высоких значений, 50–75% и более; выход НК здесь, следовательно, имеет массовый характер. Напомним, что кривая выживания диплоидных дрожжей имеет обычно сигмоидную форму (рис. 1, а, кривая 1); для такой кривой экстраполяционное число $n > 1$, а наклон ее экспоненциального участка можно охарактеризовать значением D_0 . Дозовая зависимость выхода *стабильных* клонов (рассчитанного по отношению ко всем облученным клеткам) описывается кривой, близкой к экспоненте (рис. 1, а, кривая 3); для такой кривой $n = 1$, а D_0 имеет такое же значение, что и для кривой выживания [14]. Выход НК (по отношению ко всем выживающим клеткам) можно описать соотношением $A = (S_1 - S_2) : S_1$, где S_1 – выживаемость при данной дозе облучения, S_2 – теор-

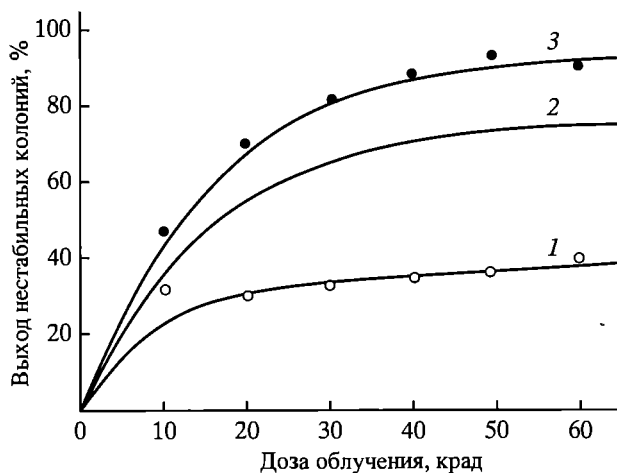


Рис. 2. Зависимость выхода «мутантных» (нестабильных) колоний от дозы облучения для кривых выживания, имеющих разные значения экстраполяционного числа n : 1,4 (1), 3,0 (2) и 9,1 (3)

По оси ординат – содержание «мутантных» колоний среди всех колоний, вырастающих из облученных клеток, %

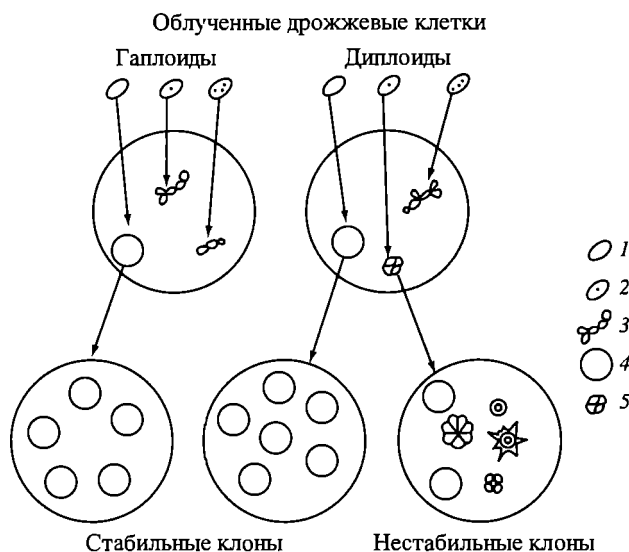


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая гипотезу возникновения нестабильных клонов из облученных дрожжевых клеток

1 – клетки, не содержащие ДЛП; 2 – клетки, содержащие ДЛП; 3 – формы инактивации летально пораженных клеток; 4 – колонии, вырастающие из клеток, которые не содержат ДЛП, и дающие начало стабильным клонам; 5 – колонии, вырастающие из клеток, которые содержат ДЛП, и дающие начало нестабильным клонам

ретическое значение выхода стабильных клонов при данной дозе. Значения S_1 и S_2 различаются тем больше, чем больше значение экстраполяционного числа n кривой выживания, а при $n = 1$ совпадают; выход НК увеличивается при увеличении значения n (рис. 2).

Это означает, что некоторые диплоидные клетки, выживающие после облучения, не имеют МП, а другие имеют такие повреждения, причем дозовая зависимость выхода клеток без МП описывается экспоненциальной кривой со значением D_0 , близким к значению D_0 кривой выживания. Однако согласно гипотезе [10], именно такой характер зависимости от дозы облучения должна иметь кривая выхода клеток, не содержащих ни одного ЛП. Это позволяет предположить, что МП и ЛП идентичны.

Формулировка гипотезы. Сказанное выше позволяет сформулировать следующую гипотезу, объясняющую с единых исходных позиций количественные закономерности летального и расообразующего влияния ионизирующих излучений на дрожжевые клетки.

Можно предположить, что и в летальном эффекте, и в лучевом расообразовании ведущая роль принадлежит однотипным дискретным лучевым повреждениям (ДЛП), обладающим следующими свойствами (рис. 3). Дискретное лучевое повреждение формируется в облученных клетках во время первого пострадиационного деления ядра; до того как ядро поделилось, клетка может восстановиться от части вызванных излучением изменений, приводящих к ДЛП. Для гаплоидных клеток каждое ДЛП абсолютно летально; выжившие облученные гаплоидные клетки не содержат ни одного ДЛП и формируют клоны, не отличающиеся от контрольных. Для обычных диплоидных клеток единичные ДЛП не являются абсолютно летальными (имеются в виду клетки, не содержащие в гомозиготном состоянии мутаций типа *rad*, повышающих радиочувствительность). В этом случае ДЛП в процессе митотического размножения передаются потомкам облученных клеток, приводя с некоторой вероятностью или к гибели, или к появлению морфологических вариантов. Вероятность летального действия ДЛП зависит от условий пострадиационного культивирования, возрастая при отклонении этих условий от оптимальных. Действие отдельных ДЛП суммируется.

Таким образом, согласно нашей гипотезе, некоторые облученные клетки не имеют ни одного ДЛП и тогда образуют стабильные клоны типа контроля; другие имеют одно или больше ДЛП и тогда либо погибают (с вероятностью, обусловливаемой числом ДЛП, генотипом клетки и условиями культивирования), либо выживают и дают начало НК; степень нестабильности таких клонов тем выше, чем больше число ДЛП. Выход клеток, не содержащих ДЛП, описывается экспоненциальной кривой примерно с тем же значением D_0 , что и у кривой выживания. Относительный выход НК определяется дозой облучения и величиной экстраполяционного числа, возрастая с его увеличением. Видно, что из этой гипотезы следуют именно те закономерности лучевого расообразования, о которых речь шла выше.

Проверка гипотезы. Сформулированная гипотеза позволяет сформулировать несколько следствий, допускающих экспериментальную проверку.

Первое следствие. Если ЛП и МП идентичны, можно ожидать, что при выращивании облученных клеток в неоптимальных условиях, когда вероятность летального действия каждого повреждения увеличивается и кривая выживания приближается по форме к экспоненте [21], уменьшение выживаемости будет сопровождаться не увеличением выхода НК, как при возраст-

тании дозы облучения, а уменьшением. Как показано на рис. 1, это и было установлено нами в соответствующих опытах [13].

Второе следствие. Если ЛП и МП идентичны, можно ожидать, что при выдерживании облученных клеток в непитательной среде (условия, способствующие их восстановлению от ЛП [6]) такие клетки будут восстанавливаться не только от ЛП, но и от МП, причем закономерности восстановления в обоих случаях будут одинаковы. Это и было установлено в экспериментах [14].

Третье следствие. Если ЛП и МП идентичны, можно ожидать, что чем позже вырастают колонии из облученных клеток, тем большей радиочувствительностью должны отличаться клетки, составляющие такие колонии (точнее, тем меньшим значением экстраполяционного числа), и тем чаще среди них должны встречаться НК. Оба эти следствия были подтверждены экспериментально [7, 22].

Четвертое следствие. Если степень нестабильности клона обуславливается числом ДЛП, содержащихся в его клетках, то количество нежизнеспособных клеток, морфологических вариантов и дыхательных мутантов будет не независимо распределено по колониям, вырастающим из облученного материала, а должно быть тесно взаимосвязано, т.е. чем больше содержится в колониях клеток одного какого-либо типа, тем больше должно содержаться и других измененных клеток. Это следствие также получило экспериментальное подтверждение [20].

Возможная природа изменений, вызываемых в клетках ДЛП. Предположим, что эти изменения представляют собою генные мутации. В таком случае частота возникновения разных генных мутаций в клетках НК должна быть существенно выше, чем в клетках стабильных клонов и в контроле. Мы проверили это допущение в опытах с аутодиплоидными дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, гомозиготными по мутации *adel* [15]: определяли частоту появления ревертантов, возникающих в результате обратных мутаций в локусе *ADE1* и прямых супрессорных мутаций. Различий в частотах мутабельности между клетками НК, с одной стороны, и клетками стабильных клонов и контрольными, с другой, не обнаружено. Можно думать, что вклад генных мутаций в процесс лучевого расообразования, разыгрывающийся в НК, невелик.

Мы определили также, как влияет степень нестабильности клонов на частоту возникновения митотических рекомбинантов [17]. Показателем рекомбинации служило появление целиком красных или секторных колоний у дрожжей, гетерозиготных по генам *ADE1* и *ADE2*, образующих белые колонии. Оказалось, что повышение степени нестабильности сопровождается повышением частоты митотической рекомбинации на протяжении многих клеточных делений. Возник вопрос, а не связан ли процесс расообразования в НК с повышением частоты выщепления (благодаря митотической рекомбинации) рецессивных мутаций, содержащихся в диплоидных клетках в гетерозиготном состоянии? Чтобы ответить на этот вопрос, мы изучили количественные закономерности лучевого расообразования у природного гетерозиготного штамма *S. ellipsoideus* Мегри 139-В и у высокогомозиготного штамма *S. cerevisiae*; степень гетерозиготности контролировали методом тетрадного анализа [18]. Оказалось, что степень гетерозиготности не влияет ни на количество вновь образующихся рас и их качественное разнообразие,

ни на выход нестабильных клонов. Следовательно, митотическая рекомбинация не вносит значительного вклада в процесс лучевого расообразования.

Существенным выводом из этих исследований является то, что появление дыхательных мутантов (а их вклад в лучевое расообразование достигает 20% [15]) не является следствием мутирования ядерных генов или выщепления соответствующих генных мутаций в результате митотической рекомбинации. Следовательно, дыхательные мутанты возникают в НК в результате цитоплазматических митохондриальных мутаций. Нежизнеспособные клетки и морфологические варианты возникают, скорее всего, в результате не генных, а хромосомных мутаций. Летальный эффект, так же как и изменение морфологии клеток и колоний, может быть следствием утраты отдельных хромосом или их фрагментов, инверсий, транслокаций и т.п. Такие последствия крупных хромосомных aberrаций в генетике известны.

Можно предположить, следовательно, что ДЛП, обуславливающие явление наследственной нестабильности, вызывают нарушения митотического деления ядра и клетки, следствием чего и являются митохондриальные мутации (что приводит к появлению дыхательных мутантов) и различные хромосомные aberrации (что приводит к появлению нежизнеспособных клеток и различных морфологических вариантов).

Возможная природа ДЛП. Это не могут быть генные мутации – массовый выход при облучении доминантных генных мутаций, обладающих широким спектром мутагенного действия, неправдоподобен. Это не могут быть и цитоплазматические митохондриальные мутации – большинство дыхательных мутантов, возникающих из облученных клеток или в ходе размножения НК, относится к классу стабильных [15]. Остается предположить, что ДЛП представляют собою хромосомные aberrации типа утраты отдельных хромосом или крупных фрагментов, а также несимметричные обмены. Очевидно, что такие aberrации абсолютно летальны для гаплоидных клеток. Известно также, что у диплоидных клеток такие aberrации могут приводить к состоянию хромосомной нестабильности, проявляющейся в утрате или удвоении отдельных хромосом.

Заключение. Наша гипотеза в ее окончательном варианте в одном отношении согласуется с гипотезой Мортимера [3], а в другом существенно отличается от нее.

Сходство это следующее. Согласно Мортимеру причиной гибели облученных диплоидных дрожжей также служат мутации, представляющие собою, вероятнее всего, хромосомные aberrации. По последним оценкам Мортимера [24], количество таких мутаций, образующихся при облучении гаплоидных клеток, составляет примерно 65% от общего числа летальных для таких клеток событий; это очень большая величина.

Различие двух гипотез следующее. Согласно Мортимеру [3, 24] такие повреждения являются «доминантными летальями», т.е. каждое из них абсолютно летально и для гаплоидных, и для диплоидных клеток. Согласно нашей гипотезе для диплоидных клеток одиночные ДЛП обладают лишь относительной летальностью; именно поэтому, если их содержится в клетке не очень много, они могут наследоваться при вегетативном размножении, вызывая состояние нестабильности.

Согласно Мортимеру [24] различие в реакциях на такие повреждения диплоидных клеток дикого типа и диплоидных клеток, гомозиготных по

какому-либо из генов типа *RAD* (повышающих радиочувствительность), обусловлено тем, что первые могут восстанавливаться от основной доли потенциальных повреждений, приводящих к появлению «доминантных деталей», а вторые не могут. На основании работы [25] можно, однако, предположить, что различия радиочувствительности таких штаммов связаны не только с восстановлением. Можно думать, что большое значение здесь принадлежит также различиям в реакциях клеток дикого типа и клеток с фенотипом *Rad* на уже сформировавшиеся летальные повреждения: для первых вероятность летального эффекта отдельных ДЛП невелика, а вторые реагируют на них как гаплоидные клетки или как диплоидные клетки дикого типа при неоптимальных условиях культивирования [21], когда даже одного ДЛП достаточно, чтобы вызвать гибель.

Интересно отметить, что уже упоминавшиеся результаты опытов Мортимера, показавших возникновение «рецессивных леталей» при облучении диплоидных дрожжей [5] и «доминантных леталей» при облучении гаплоидных [4], объяснимы и с нашей точки зрения. Действительно, единичные ДЛП, возникающие в облученной диплоидной клетке и нелетальные для нее, переходя при мейозе в гаплоидные аскоспоры, будут вызывать их гибель и тем самым проявлять себя как «рецессивные летали»; несколько ДЛП, возникших при облучении в одной гаплоидной клетке, при скрещивании ее с необлученной гаплоидной будут вызывать гибель зиготы, проявляя себя как «доминантная леталь». Это не означает, конечно, что облучение не вызывает истинных рецессивных летальных мутаций; мы думаем только, что такие мутации возникают значительно реже, чем ДЛП.

Можно предполагать, что закономерности расообразования, в основе которых лежит появление нестабильных клонов, свойственны не только дрожжам, но и другим грибам [26], водорослям [27], клеткам млекопитающих [28, 29] и других организмов, имеющих более одного хромосомного набора, и проявляются не только при действии ионизирующих излучений, но и после действия других мутагенных факторов. Мы уже высказывали предположение, что такого рода «клоновому мутагенезу» может принадлежать существенная роль в процессах расообразования протекающих в природе [12]. Возможно, что именно здесь лежат основные различия в особенностях мутационной изменчивости гаплоидных и диплоидных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Надсон Г.А.* Избранные труды. М.: Наука, 1967. Т. 2.
2. *Latarjet R., Ephrussi B.* // *Compt. rend.* 1949. Vol. 229. P. 306.
3. *Mortimer R.K.* // *Radiat. Res.* 1958. Vol. 9. P. 312.
4. *Owen M.E., Mortimer R.K.* // *Nature.* 1956. Vol. 177. P. 625.
5. *Mortimer R.K., Tobias C.A.* // *Science.* 1953. Vol. 118. P. 517.
6. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966.
7. *Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г.* // *Радиобиология.* 1972. Т. 12, № 2. С. 267.
8. *Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г., Корогодин В.И., Близник К.М.* // Там же. № 3. С. 408.
9. *Капульцевич Ю.Г., Близник К.М., Корогодин В.И.* и др. // Там же. № 4. С. 554.
10. *Капульцевич Ю.Г.* // Там же. № 1. С. 3.
11. *Корогодин В.И., Близник К.М.* // Там же. № 2. С. 163.
12. *Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г.* // Там же. № 3. С. 416.

13. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Петин В.Г., Кабакова Н.М. // Там же. № 6. С. 857.
14. Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. // Там же. 1974. Т. 14, № 2. С. 229.
15. Близник К.М., Корогодин В.И. // Там же. № 3. С. 369.
16. Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. // Там же. № 4. С. 494.
17. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. № 5. С. 681.
18. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Кондратьева В.И. // Там же. 1976. Т. 16, № 3. С. 395.
19. Близник К.М., Кабакова Н.М., Капутьцевич Ю.Г., Корогодин В.И. // Там же. № 6. С. 924.
20. Корогодин В.И., Близник К.М., Капутьцевич Ю.Г., Петин В.Г. // Там же. Т. 17, № 1. С. 27.
21. Кабакова Н.М., Капутьцевич Ю.Г. // Там же. 1969. Т. 9, № 6. С. 892.
22. Bliznik K.M. // *Studia Biophys.* 1971. Vol. 26, N 3. P. 183.
23. Kafer E. // *Genetics.* 1963. Vol. 48. P. 27.
24. Ho K.S.Y., Mortimer R.K. // *Mutation Res.* 1973. Vol. 20. P. 45.
25. Капутьцевич Ю.Г., Петин В.Г., Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. // Изв. АН. Сер. биол. 1974. № 4. С. 549.
26. Ньюкомб Г. // Вопросы радиобиологии. М.: Изд-во иностр. лит. 1956. С. 517.
27. Козан И.Г., Аникеева И.Д. // *Генетика.* 1973. Т. 9, № 12. С. 76.
28. Sinclair W.K. // *Radiat. Res.* 1964. Vol. 21, N 4. P. 548.
29. Thompson L.H., Suit H.D. // *Radiat. Biol.* 1969. Vol. 15. P. 347.

REGULARITIES OF RADIORACE FORMATION IN YEASTS

Comm. II. FACTS AND HYPOTHESES

V.I. Korogodin, K.M. Bliznik, Yu.G. Kapultsevich

A hypothesis explaining the regularities of radiorace formation in yeasts is presented. According to this hypothesis a leading role in this process belongs to the same primary damages causing also a lethal effect. Each damage is absolutely lethal for haploid cells. In diploid cells, a lethal effect occurs but with a certain probability. Effects of single damages are summarized. If a cell has no single damage it survives and gives rise to a clone that does not differ from the controls. If there are one or several primary damages in the cell it either dies or gives rise to a mutable and/or instable clone. In the latter case, the lesions are inherited by a series of generations (upon vegetative reproduction) causing various mitotic disorders that increase the frequency of occurrence of nonviable cells (lethal sectors are formed), morphological variants and respiratory mutants. The degree of clone mutability is the higher the greater the number of lesions in the original irradiated cell; at a sufficiently large number of damages all the descendants of the irradiated cell die. Vast chromosome aberrations seem to be the damages possessing the properties mentioned above.

МИТОТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *PICHTIA PINUS*.

Сообщение I. СПОНТАННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ

Вегетативные клетки дрожжей *Pichia pinus*¹ в естественных условиях гаплоидны. Искусственно, путем скрещивания ауксотрофных мутантов на селективной среде у них выделены диплоидные культуры. При изучении вегетативного потомства гибридных диплоидных клеток была продемон-

¹*Pichia methanolica*. Реидентифицирован (Толсторуков И.И. // *Генетика.* 1994. Т. 30, № 5. С. 635–640). – *Примеч. сост.*

стрирована их относительная митотическая стабильность: частота встречаемости сегрегантов по одному гетерозиготному ядерному маркеру оказалась в среднем равной $2 \cdot 10^{-3}$ на клетку на деление [1]. Эта величина, однако, в 10–100 раз превышает частоту спонтанного митотического кроссинговера в диплоидных клетках дрожжей-сахаромицетов, диплоидов, для которых данный генетический процесс является ведущим механизмом расщепления вегетативных диплоидных клеток [2, 3].

Вопрос о том, связана ли более высокая частота расщепления диплоидных культур *P. pinus* с повышенной частотой митотического кроссинговера или сегрегация в этом случае обусловлена иными генетическими событиями, интересен для характеристики генетических свойств дрожжей *P. pinus*. Линии этих дрожжей, в отличие от подавляющего большинства используемых генетических линий дрожжей, в высокой степени изогенны: они происходят от одной гаплоидной аскоспоры природного штамма *P. pinus* МН4, а особенности их жизненного цикла, гомоталличных гаплонтов, позволяют скрещивать эти культуры в любых комбинациях [1]. К настоящему моменту у дрожжей *P. pinus* отработаны точные методы ген-анализа, начато построение генетической карты хромосом, получены цитоплазматические мутации [1, 4, 5]. Все это указывает на перспективность данного вида в качестве нового объекта генетики дрожжей.

Известно несколько механизмов сегрегации генетических маркеров в вегетативных клетках. Митотический кроссинговер и митотическая конверсия приводят к выщеплению у гетерозигот гомозиготных потомков, сохраняющих диплоидное состояние. К такому же результату приводят мутации в одном из аллелей гетерозиготного локуса [2, 6]. Гаплоидизация, т.е. утрата отдельных хромосом за счет нерасхождения, ведущая к анеупloidии, также обеспечивает сегрегацию маркеров. Некоторым организмам, обладающим длительной гетерокариотической фазой, свойственна сегрегация ядер в гетерокарионе. Последние два механизма, чаще встречающиеся у мицелиальных грибов, обуславливают редукцию числа хромосом в клетке [7, 8]. Наконец, выщепление маркеров может происходить в результате делеции; клетки с небольшими делениями, по-видимому, мало отличаются от клеток, ставших гомозиготными за счет точковых мутаций, а случаи крупных делеций близки к анеупloidии.

Большинство перечисленных процессов сегрегации можно наблюдать при митотическом размножении различных диплоидных организмов [2, 3, 6–10]. Они происходят спонтанно и могут быть индуцированы различными мутагенными факторами. Вклад каждого из этих процессов в митотическую нестабильность разных организмов различен.

В данной работе механизмы выщепления рецессивных гетерозиготных маркеров при митотическом размножении диплоидных клеток дрожжей *P. pinus* анализируются путем изучения свойств сегрегантов и их митотического потомства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Генетические линии происходят от штамма *P. pinus* МН4. Одна из родительских гаплоидных культур – МН-36 (*α lys4*) – индуцированный мутант исходного штамма, другая – М55-6А (*a ade2 ade5 arg1 his1*) – гибридного

Локализация маркеров на хромосомной карте *P. pinus* [4]

Пара маркеров	Расстояние, стрейны	Пара маркеров	Расстояние, стрейны
Центромера I – <i>arg1</i>	0,3	Центромера III – <i>lys4</i>	12,5
Центромера II – <i>ade2</i>	5,1	<i>a/α</i> – <i>ade5</i>	1,5
Центромера III – <i>a/α</i>	1,3	<i>a/α</i> – <i>lys4</i>	12,0
Центромера III – <i>ade5</i>	1,8	<i>ade5</i> – <i>lys4</i>	10,0

происхождения. Прототрофный диплоидный гибрид M57 получен при скрещивании родительских гаплоидов на селективной среде, как описано ранее [1]. Проведенный тетрадный анализ показал гетерозиготность диплоида M57 по введенным в скрещивание маркерам и регулярность расщепления (методика тетрадного анализа описана ранее [1]).

Локализация мутаций на хромосомной карте *P. pinus* приведена в табл. 1. Все использованные здесь маркеры, за исключением мутации *his1*, картированы вблизи центромер трех хромосом; ядерный ген *HIS1* не обнаружил сцепления с центромерами или другими маркерами [4]. Мутация *ade2* в гомозиготном состоянии обуславливает образование красной колонии, мутация *ade5* подавляет образование пигмента в колонии генотипа *ade2 ade5*. Все мутации рецессивны.

Составы агаризованных сред, полной (YEPD), минимальной (M) и споруляционной (Rg), условия культивирования и методы генетического анализа дрожжей *P. pinus* описаны ранее [1, 4].

Анализ митотического расщепления. Трехсуточный клон диплоида M57, выращенный на селективной среде M, рассеивали на чашки Петри со средой YEPD (100 клеток на 1 чашку). Через 2 сут отмечали и подсчитывали появившиеся колонии. В течение этого срока вырастает основная масса колоний, которые поэтому и относили к классу «нормальных». В течение дальнейшей инкубации подсчитывали число «доросших» колоний, т.е. колоний, выросших после основной массы, а именно на третьи–десятые сутки. Отношение числа доросших колоний к общему числу выросших колоний есть величина эффекта дорастания [11].

Колонии с части чашек отпечатывали с помощью фильтровальной бумаги на диагностические среды M с добавками аргинина, аденина, гистидина и лизина (по 20 мг/л) в различных комбинациях. На репликах устанавливали фенотипы выросших колоний; отдельно отмечали красные.

С другой серии чашек колонии, по мере их появления, суспендировали в воде и делали из суспензий следующие высевы: без разведения на среду Rg для учета эффективности спорообразования (у диплоида она превышает 50%, у гаплоида – менее 40% [1]); на той же среде устанавливали способность изолированной культуры формировать зиготы и копуляционные выросты (свойство, характерное для гомоталличных гаплоидных клеток *P. pinus* [1, 4]); часть суспензии рассеивали на предметные стекла со средой YEPD для определения жизнеспособности клеток методом микроколоний [12]; другую

часть рассевали на чашки со средой YEPD для получения субклонов (от каждой колонии приблизительно по 100 субклонов). Фенотипы субклонов устанавливали по описанной методике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

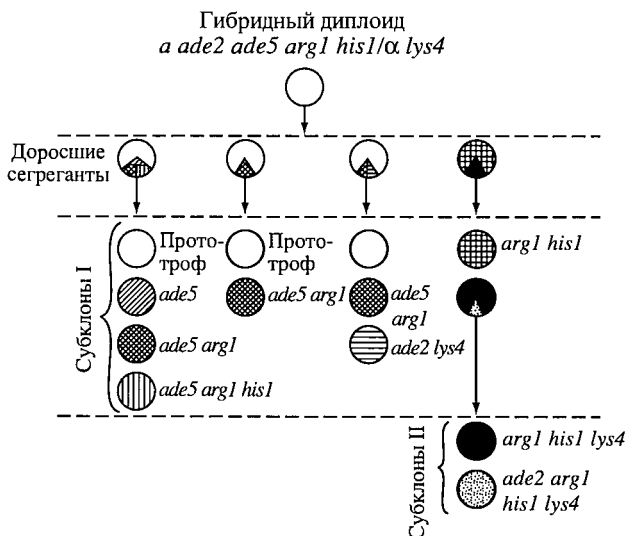
В расसेве вегетативных клеток культуры M57 среди 7500 «нормальных», т.е. выросших на вторые сутки колоний, обнаружено три одиночных ауксотрофных сегреганта (табл. 2) – белый аденин-, аргинин- и гистидинзависимый. По стабильности размеров и фенотипа субклонов, споруляционной активности и жизнеспособности клеток эти сегреганты, а также 700 случайно отобранных прототрофных колоний из числа нормальных не отличались от исходной культуры.

Таблица 2

Эффект «дорастания» и митотическое расщепление в расसेве диплоидных клеток дрожжей *P. pinus* генотипа *a ade5 ade2 arg1 his1/α lys4*

Класс колоний	Колонии данного класса в рассеве		Митотическое расщепление		
			обнаружено сегрегантов	средняя частота встречаемости сегрегантов по одному маркеру	
	число	%		среди колоний данного класса	на всю выборку колоний
Нормальные	7500	99,17	3	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$0,8 \cdot 10^{-4}$
Доросшие	63	0,83	55	0,17	$1,45 \cdot 10^{-3}$
Сумма	7563	100	58		$1,53 \cdot 10^{-3}$

Величина эффекта дорастания культуры M57 равна 0,8% (63/7500, см. табл. 2). Из доросших колоний восемь были прототрофными, 22 ауксотрофными и 33 секторными, т.е. 55 из 63 колоний данного класса являются мито-



Примеры сегрегации маркеров в доросших колониях

**Сегрегация аусотрофных маркеров в доросших колониях диплоида
(*a ade2 ade5 arg1 his1/α lys4*)**

Зарегистрировано маркеров	Комбинация маркеров*			Доля клонов, выщепляющих данную комбинацию маркеров, %		
1		<i>ade5</i>		46,8		
		<i>lys4</i>		34,3		
		<i>ade2</i>		22,3		
		<i>arg1</i>		54,0		
		<i>his1</i>		34,0		
2		<i>ade5</i>	<i>arg1</i>	26,0		
		<i>ade5</i>	<i>his1</i>	22,2		
		<i>lys4</i>	<i>arg1</i>	31,5		
		<i>lys4</i>	<i>his1</i>	16,0		
		<i>ade2</i>	<i>arg1</i>	16,0		
		<i>ade2</i>	<i>his1</i>	14,5		
		<i>arg1</i>	<i>his1</i>	29,0		
		<i>ade2</i>	<i>lys4</i>	17,0		
		<i>ade2</i>	<i>ade5**</i>	4,3		
		<i>ade5</i>	<i>lys4**</i>	3,2		
3		<i>ade5</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	17,3	
		<i>arg1</i>	<i>his1</i>	<i>lys4</i>	14,5	
		<i>ade2</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	13,0	
		<i>ade2</i>	<i>arg1</i>	<i>lys4</i>	15,6	
		<i>ade2</i>	<i>his1</i>	<i>lys4</i>	14,3	
		<i>ade2</i>	<i>ade5</i>	<i>his1**</i>	2,1	
		<i>ade2</i>	<i>ade5</i>	<i>arg1**</i>	1,1	
		<i>ade2</i>	<i>ade5</i>	<i>lys4**</i>	2,1	
4		<i>ade2</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	<i>lys4</i>	13,0
		<i>ade5</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	<i>lys4**</i>	1,1
5	<i>ade2</i>	<i>ade5</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	<i>lys4**</i>	1,1

* К клонам, выщепляющим данную комбинацию маркеров, относили такие, которые выщепляли или сегреганты данного фенотипа, или различные одиночные аусотрофы, входящие в данную комбинацию (например, к *ade2 arg1 his1* относили клоны фенотипа *Ade⁻ Arg⁻ His⁻*, также те клоны, которые выщепляли субклоны *Ade⁻ Arg⁻ His⁻*, или *Ade⁻ Arg⁻* и *His⁻* и др.).

** Сегрегантов данного типа не выявлено.

тическими сегрегантами по регистрируемым маркерам. Средняя суммарная частота сегрегации для одного маркера

$$F = \frac{f_{\text{доросших}} \cdot d + f_{\text{нормальных}} \cdot D}{m},$$

где f – частоты сегрегантов среди данного класса колоний; d и D – доля доросших и нормальных колоний соответственно; m – число анализируемых аусотрофных маркеров. В нашем случае

$$F = \left(\frac{55}{63} \cdot 0,008 + \frac{3}{7500} \cdot 0,992 \right) \cdot \frac{1}{5} = 1,53 \cdot 10^{-3}.$$

Эта величина совпадает с определенной ранее частотой митотической се-

Таблица 4

Сопоставление свойств нормальных и взрослых колоний в расеве диплоидных клеток дрожжей *P. pinus*

Класс колоний	Проанализировано колоний	Колонии с различной жизнеспособностью клеток						Колонии с фенотипом*					
		1-0,9		0,9-0,8		<0,8		диплонда		гаплонда		неопределены**	
		число	%	число	%	число	%	число	%	число	%	число	%
Нормальные	700	595	85	84	12	21	3	700	100	0	0	0	0
Доросшие	63	41	65	15	24	7	11	30	48	30	48	3	4

* Диплоидным условно называем фенотип, проявляющийся на споруляционной среде в формировании >50% асков в популяции, а гаплондным, – когда эффективность спорообразования не превышала 40% и в культуре встречались зиготы и клетки с копуляционными выростами.
 ** Культуры на споруляционной среде не спорулируют и не образуют копуляционных выростов.

Таблица 5

Распределение взрослых колоний по разным признакам

Степень стабильности	Стабильные		Нестабильные		χ^2
	14	49			
Жизнеспособность клеток	>0,9	<0,9	>0,9	<0,9	
Обнаружено колоний	11	3	30	19	0,65<3,8
Фенотип на споруляционной среде*	диплоид	гаплонд	диплоид	гаплонд	диплоид
Обнаружено колоний	6	5	3	0	13
			17	8	11
					0,2<3,8
					0,8<3,8

* См. примеч. к табл. 4.

грегации в диплоидной культуре *P. pinus* [1]. Из представленных в табл. 2 данных видно, что основной вклад (95%) в митотическое расщепление диплоидной культуры *P. pinus* приходится на долю доросших колоний.

Каковы свойства доросших колоний, возникающих при рассеве вегетативных диплоидных клеток *P. pinus*?

Из табл. 4 видно, что жизнеспособность клеток у части доросших колоний ниже, чем у нормальных. Это, по-видимому, может быть одной из причин, обуславливающих задержку формирования таких колоний. На споруляционной среде 30 из 63 доросших клонов вели себя как диплоидные культуры, 30 – как гаплоидные, т.е. спорулировали менее эффективно, образовывали зиготы и копуляционные выросты (см. [4]); три клона не спорулировали и не образовывали зигот.

Рассмотрим, как распределялись доросшие колонии и их субклоны по содержанию ауксотрофных клеток. Среди доросших колоний встречались прототрофы, не выщеплявшие в рассевах ауксотрофных сегрегантов (восемь колоний), шесть клонов были стабильными ауксотрофными сегрегантами с одной потребностью (четыре – *ade5* и два – *lys4*); эти 14 колоний отнесены к «стабильным». Остальные 49 колоний были либо секторными, выщеплявшими от двух до шести фенотипических классов сегрегантов в выборке из ста субклонов, либо ауксотрофами, выщепившими от двух до четырех маркеров, локализованных в разных группах сцепления. Эти 49 «нестабильных» клонов могут быть охарактеризованы как клоны, в которых при митотическом размножении с высокой частотой происходит выщепление гетерозиготных маркеров, приводящее к образованию различных комбинаций генов (табл. 3). Некоторые примеры подобной сегрегации приведены на рисунке. Доросшие колонии, таким образом, существенно различаются между собой по степени генетической стабильности (т.е. по выщеплению сегрегантов), по жизнеспособности составляющих их клеток и по поведению на споруляционной среде («диплоидный» и «гаплоидный» фенотипы). Однако, как следует из табл. 5, тесной корреляции по генетической стабильности, содержанию нежизнеспособных клеток и поведению на споруляционной среде не наблюдается – три признака распределены в изученной выборке случайно. Это позволяет думать, что по своей природе доросшие колонии весьма однородны и в основе задержки их роста лежат общие причины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, установлено, что при рассеве вегетативных диплоидных клеток дрожжей *P. pinus* формируется два типа колоний – нормальные (99,2%) и доросшие (0,8%). Подавляющее большинство колоний, относящихся к нормальным, стабильные диплоидные клоны. Есть все основания считать, что выщепление ауксотрофных сегрегантов в данной части клеточной популяции – результат следующих процессов: митотического кроссинговера, митотической конверсии, точковой мутации (видимо, с убывающей вероятностью). Только эти три механизма могут обеспечить сегрегацию с сохранением стабильного диплоидного состояния генома. Суммарная частота этих процессов в диплоидных клетках *P. pinus* (для одного маркера) равна $1 \cdot 10^{-4}$.

Что касается доросших колоний, то они обеспечивают 95% митотического расщепления диплоидной культуры. Основным свойством этой части колоний является высокая степень митотической нестабильности. Наблюдаемая нестабильность является не мутационной, а рекомбинационной: она приводит к огомозигчиванию гетерозиготных маркеров гибридной культуры. Какова же природа событий, обуславливающих нестабильность доросших колоний?

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что все свойства доросших колоний – снижение скорости роста и жизнеспособности клеток, изменение споруляционных и копуляционных характеристик клонов, выщепление маркеров в первичных кломах и среди субклонов – являются следствием нарушений митотических процессов в клетках – родоначальницах доросших колоний, а регистрируемая нестабильность есть нестабильность хромосомная, ведущая к частичной или полной гаплоидизации. Действительно, из табл. 3 видно, что среди сегрегантов этих колоний наблюдались все возможные сочетания пяти родительских маркеров, кроме комбинации *ade5 lys4*. Не было также обнаружено клонов генотипа *ade2 ade5*, поскольку для выявления аллеля *ade2* в сочетании с *ade5* необходим комплементационный анализ, который мы не проводили. Поскольку мутации *ade5* и *lys4* расположены в гомологичных хромосомах, очевидно, что все сегреганты фенотипа Ade^- (белые) и Lys^- возникли вследствие утраты гомологичной хромосомы, несущей аллели $Ade5^+$ и $Lys4^+$. Данный вывод подтверждается изменением споруляционных и копуляционных свойств всех сегрегантов Ade^- (белые) и Lys^- , что обусловлено огомозигчиванием сцепленных с той же хромосомой аллелей локуса типа спаривания a и α . Еще одним подтверждением гаплоидизации доросших клонов и их митотического потомства является частая встречаемость сегрегантов по двум, трем и даже четырем маркерам, локализованным в разных хромосомах. Иначе, гаплоидизация, идущая в доросших кломах, затрагивает все хромосомы диплоидной клетки. Об этом же свидетельствует относительное равенство частот выщепления отдельных маркеров, т.е. отсутствие связи между этими частотами и расстоянием от гена до центромеры (см. табл. 3).

Мейотическую природу гаплоидизации можно легко отвергнуть на основании следующих данных: 1) часть нестабильных доросших колоний имеет «диплоидный» фенотип (см. табл. 5), т.е. они гетерозиготны по маркерам a/α , *ade5*, *lys4*; 2) обнаружены доросшие колонии, в расसेве которых появляются некомплементирующие фенотипические классы сегрегантов, число которых часто превышает число фенотипов в тетрадах тетратипа; 3) ряд доросших колоний выщепляют секторные субклоны. Последнее свидетельствует еще и о продолжительности процессов гаплоидизации диплоидной культуры *P. pinus*.

Если сделанные выше заключения верны и сегрегация маркеров в диплоидных клетках дрожжей *P. pinus* действительно происходит за счет гаплоидизации, то мы должны прийти к выводу, что одновременная утрата одного, двух или трех гомологов из тех, что несут маркеры дикого типа $Ade2^+$, Arg^+ , $Ade5^+$ или $Lys4^+$, не летальна для клетки. Ведь среди сегрегантов, как видно из табл. 3, встречаются тройные ауксотрофные культуры фенотипа $AdeArgLys$. Можно думать, что утрата любого числа гомологов от 1 до n (не

только маркированных мутациями) не является абсолютно летальной для клеток *P. pinus*.

Митотические процессы, наблюдаемые в диплоидных клетках дрожжей *P. pinus*, аналогичны по своим механизмам процессам гаплоидизации, описанным у грибов в классических работах [7, 8]. Возможно, общим у этих организмов благодаря преимущественному существованию вегетативных клеток в гаплоидном состоянии является несбалансированность митотических процессов в диплоидных клетках.

Не исключено, что «эффект дорастания», наблюдаемый при рассеве облученных диплоидных клеток дрожжей-сахаромицетов [11], также связан с нарушением митотических делений части клеточной популяции. На это, во всяком случае, указывает наблюдаемая у сахаромицетов нестабильность доросших колоний и их субклонов [13, 14]. Очевидно, что эффект дорастания, обусловленный гаплоидизацией, можно использовать для отбора анеуплоидных клеточных культур, а также для картирования хромосом, как это делается у грибов [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Толсторуков И.И., Дутова Т.А., Беневоленский С.В., Соом Я.О. Гибридизация и генетический анализ метанолюкисляющих дрожжей *Pichia pinus* // Генетика. 1977. Т. 13, № 2. С. 322.
2. Nakai S., Mortimer R.K. Studies of the genetic mechanism of radiation-induced mitotic segregation in yeast // Mol. Gen. Genet. 1969. Vol. 103. P. 329.
3. Thornton R.J., Jonston J.R. Rates of spontaneous mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // Genet. Res. 1971. Vol. 18. P. 147.
4. Толсторуков И.И., Беневоленский С.В. Изучение механизмов спаривания и самодиплоидизации у гаплоидных дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 1. Биполярность спаривания // Генетика, 1978. Т. 14, № 3. С. 519.
5. Попова И.А., Соом Я.О. Нехромосомные мутации у метанолюкисляющих дрожжей *Pichia pinus* // Тез. докл. III съезда ВОГиС им. Н.И. Вавилова. Л.: Наука, 1977. С. 365.
6. Zimmermann F.K., Kern R., Rasenberger H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation // Mutat. Res. 1975. Vol. 28. P. 381.
7. Pontecorvo G., Roper I.A., Hemmons L.M. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans* // Adv. Genet. 1953. Vol. 5. P. 141.
8. Koffer E. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans* // Genetics. 1961. Vol. 46. P. 1581.
9. Lhoos P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluorophenylalanine // Nature. 1961. Vol. 190. P. 744.
10. Lefevre K.G., Jr. The relative effectiveness of fast neutrons and gamma rays on producing somatic crossing over in *Drosophila* // Genetics. 1948. Vol. 33. P. 113.
11. Корогодин В.И. Некоторые закономерности роста макроколоний после облучения дрожжевых клеток гамма-лучами радиокобальта // Биофизика. 1957. Т. 2. С. 178.
12. Корогодин В.И. Формы инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией // Биофизика. 1958. Т. 3. С. 206.
13. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщение 2. Пути расообразования // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 3. С. 416.
14. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщение 11. Факты и гипотезы // Там же. 1977. Т. 17, № 4. С. 492.

MITOTIC INSTABILITY OF *PICHIA PINUS* DIPLOID YEAST CELLS, Comm. 1. SPONTANEOUS SEGREGATION

I.I. Tolstorukov, K.M. Bliznik, V.I. Korogodin

It was shown that during mitotic reproduction of artificially obtained diploid yeast cells of *Pichia pinus* the disturbance of division takes place with a frequency of 0.008, which results in the appearance of cells forming slowly growing (delayed appearance) colonies. The successive loss of chromosomes and haploidization resulting in genetic instability of the cell progeny in the delayed appearing colonies, the loss of any number of homologs (from 1 to n) was being not absolutely lethal for the cell.

The frequency of mitotic segregation of *P. pinus* diploid cells for a single marker was $1.5 \cdot 10^{-3}$ per cell division. Total part of mitotic crossing-over, gene conversion and point mutations in this process is 5%, the rest 95% of segregants have originated as a result of the chromosome loss.

A method for selection of aneuploid cultures and for chromosome mapping is worked out using the delayed appearance of colonies.

МИТОТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PINUS*. Сообщение 2. РАСЩЕПЛЕНИЕ, ВЫЗЫВАЕМОЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕМ

Ранее при изучении вегетативно размножающихся диплоидных клеток дрожжей *P. pinus*, гетерозиготных по нескольким ауксотрофным мутациям, установлено, что частота спонтанного митотического расщепления равна $1,5 \cdot 10^{-3}$ на клетку на деление, причем 95% сегрегантов возникают в результате утраты отдельных хромосом [1, 2]. Клетки, утратившие одну или несколько негомологичных хромосом, дают начало мелким колониям, вырастающим на питательной среде позже основной массы колоний. В таких «доросших» колониях продолжается процесс гаплоидизации, в чем проявляется их генетическая нестабильность. Наличие среди «доросших» колоний сегрегантов, ауксотрофных по нескольким маркерам, локализованным в разных группах сцепления, свидетельствовало о том, что утрата любого числа негомологичных хромосом от 1 до n для диплоидных клеток *P. pinus* не является абсолютно летальной.

В настоящей работе анализ свойств «нормальных» и «доросших» колоний применяли для изучения тех генетических последствий облучения клеток γ -лучами, которые могут обуславливать летальное действие, «эффект дорастания» и явления генетической нестабильности. Хотя такие последствия облучения, как «эффект дорастания» [3] и нестабильность дорастающих клонов [4], описаны на дрожжах-сахаромицетах много лет назад, генетические события, с ними связанные, оставались объектами гипотез [5].

До сих пор подавляющее большинство радиобиологических и радиационно-генетических исследований дрожжей проводилось на дрожжах рода *Saccharomyces*. Однако мощные репарационные процессы в диплоидных

клетках сахаромикетов существенно затрудняют установление дозовых зависимостей и связи с плоидностью тех пусковых событий, которые обуславливают инактивацию клеток после облучения или возникновение генетических изменений. Дрожжи *P. pinus* в этом отношении более удобный объект, так как, по нашим предварительным данным [6], у них в стационарной культуре диплоидспецифичная репарация отсутствует или слабо выражена, и различия в реакциях на облучение гаплоидных и диплоидных клеток отражают в основном различия в плоидности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали следующие штаммы дрожжей *P. pinus* МН4 (табл. 1): прототрофный гаплоидный штамм МН4 [1], диплоидный штамм МН4D, выделенный путем отбора автодиплоидов у штамма МН4 [7], гетерозиготный прототрофный диплоид, полученный при скрещивании ауксотрофных культур 36 и 414.

Таблица 1

Гаплоидные и диплоидные культуры дрожжей *P. pinus* МН4, использованные в работе

Штамм, культура	Генотип	Примечание
МН4	Прототроф	Исходный гаплоидный штамм
МН4D	Прототроф	Автодиплоид исходного штамма
414	<i>a(α) ade2 ade5 arg1 his1</i>	Гаплоидный сегрегант
36	<i>α (a) lys4</i>	Гаплоидный ауксотрофный мутант
М57*	<i>a ade2 ade5 arg1 his1/α lys4</i>	Прототрофный диплоидный гибрид 414 × 36

* Генотип диплоида М57 проверен в тетрадном анализе.

Как показано на рис. 1, локусы *ARG1* и *ADE2* тесно сцеплены с центромерами хромосом I и II соответственно, локусы *a/α*, *ADE5* и *LYS4* локализованы на хромосоме III, локус *HIS1* не обнаружил сцепления с другими маркерами. Мутация *ade2* в гомозиготном состоянии обуславливает накопление в колонии красного пигмента, мутация *ade5* подавляет пигментацию колоний генотипа *ade2 ade5*. Все ауксотрофные мутации рецессивны.

Методики работы с дрожжами *P. pinus* и составы используемых сред (полной YEPD, минимальной M и споруляционной Rg) описаны ранее [1, 7].

После 3 сут выращивания на среде M при 30 °C (стационарная фаза роста) дрожжи суспендировали в воде и облучали γ-лучами ¹³⁷Cs (установка «ГУПОС» Стебель 3А, мощность дозы 0,7 крад/мин). Выживаемость определяли путем подсчета макроколоний, вырастающих на среде YEPD в течение 10 сут. Колонии, вырастающие в течение 2 сут (т.е. за

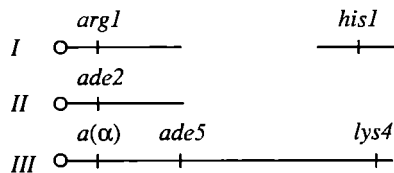


Рис. 1. Локализация маркеров на хромосомах дрожжей *P. pinus*

1 стрейн

время, достаточное для образования колоний из подавляющего большинства необлученных клеток), относили к «нормальным», а колонии, вырастающие в более поздние сроки, – к «доросшим». Величину эффекта дорастания выражали отношением числа «доросших» колоний в расसेве ко всем колониям, выросшим в течение 10 сут [3].

У отдельных колоний (как «нормальных», так и «доросших») изучали митотическое расщепление. Методика изучения митотического расщепления у диплоидных дрожжей *P. pinus*, состоящая в анализе колоний по жизнеспособности составляющих их клеток, спорообразованию, сегрегация ауксотрофных маркеров и стабильности, описана в предыдущем сообщении [2].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

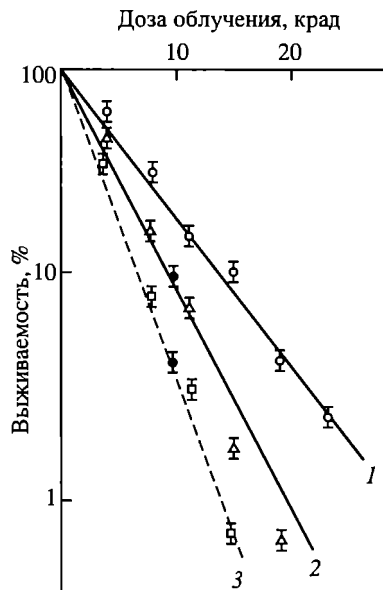
Кривые выживания и их анализ. Кривые выживания гаплоидных и диплоидных клеток *P. pinus* при действии γ -лучей приведены на рис. 2. Кривая 1, отражающая радиочувствительность гаплоидных клеток (штамм МН4), имеет экспоненциальную форму. Эффект дорастания отсутствует. Это означает [8], что для гибели облученной гаплоидной клетки *P. pinus* необходимо и достаточно одного летального повреждения, а колонии образуются только из клеток, у которых таких повреждений не возникло. Наклон экспоненциальной кривой выживания пропорционален вероятности возникновения одного летального повреждения на клетку на единицу дозы облучения.

Кривые 2 и 3 отражают радиочувствительность диплоидных клеток *P. pinus* (штамм МН4D); кривая 2 построена с учетом всех выросших колоний, а кривая 3 – только тех, которые выросли одновременно с контролем. Видно, что у диплоидных клеток *P. pinus* облучение существенно увеличивает эффект дорастания.

Согласно вероятностной модели [8], «нормальные» колонии формируются из клеток, не получивших ни одного повреждения, а «доросшие» – из клеток, получивших одно или больше повреждений. Следовательно, для лучевой гибели диплоидных клеток *P. pinus* одного летального повреждения может быть недостаточно. Наклон кривой, описывающей зависимость выхода «нормальных» колоний от дозы облучения, пропорционален вероятности возникновения одного повреждения на клетку на единицу дозы [8]. Так как наклон кривой 3 на рис. 2 примерно в 2 раза больше наклона кривой 1, можно утверждать, что у дрожжей *P. pinus* вероятность возникновения летального повреждения на единицу дозы облучения в пересчете на один набор хромосом для гаплоидных и диплоидных клеток примерно одинакова.

Естественно, что в случае диплоидных клеток лучевую гибель обуславливают только такие генетические повреждения, которые могут проявляться в гетерозиготном состоянии; рецессивные летальные мутации в число таких повреждений не входят. А так как выход регистрируемых летальных повреждений на единицу дозы на геном у гаплоидных и диплоидных клеток одинаков, это означает, что по крайней мере у *P. pinus* лучевая инактивация и гаплоидных, и диплоидных клеток обуславливается однотипными повреждениями, не являющимися рецессивными летальными мутациями. Ранее установлено [6], что у диплоидных клеток *P. pinus* одно такое повреждение

Рис. 2. Кривые выживания клеток *P. pinus* после γ -облучения: 1 – гаплоидные клетки (штамм МН4); 2 – диплоидные клетки (штамм МН4D); 3 – диплоидные клетки без учета «доросших» колоний (штамм МН4D). Черными точками показаны данные, полученные на штамме М57



обуславливает «отказ» деления с вероятностью $\approx 0,4$. Следовательно (см. [8]), подавляющее большинство выживающих после облучения клеток либо не получило ни одного повреждения, либо получило только одно повреждение – вероятность «выжить» для клетки, получившей два или более повреждений, очень мала. Естественно предполагать, что «нормальные» колонии у *P. pinus* происходят от клеток, не получивших ни одного летального повреждения, а «доросшие» образуются главным образом из клеток, у которых при облучении возникло одно повреждение.

Изучая такие колонии, мы получаем возможность судить о том, какова судьба отдаленных потомков «неповрежденных» клеток и клеток, получивших при облучении одно летальное повреждение, но образовавших колонии.

Какими же свойствами обладают «нормальные» колонии? Как видно из табл. 2, частота встречаемости митотических сегрегантов среди первичных «нормальных» колоний повышается после облучения на один порядок по сравнению с контролем.

Однако ауксотрофные сегреганты, выделенные из таких колоний, относительно стабильны (табл. 3). Из табл. 4 видно, что эффективность роста и способность к спорообразованию клеток «нормальных» колоний, выросших из облученного материала, мало отличаются от контроля.

Таблица 2

Эффект дорастания и частота митотического расщепления (F) среди нормальных и доросших колоний в расевах диплоидных клеток *P. pinus* М57, γ -облученных в дозе 9 крар*

Вариант	Нормальные колонии			Доросшие колонии			F средняя суммарная
	Доля колоний в общей выборке, %	F	Вклад в митотическое расщепление, %	Доля колоний в общей выборке, %	F	Вклад в митотическое расщепление, %	

Контроль	99,2 (7500/7563)	$0,4 \cdot 10^{-4}$ (2/10850)	3	0,8 (63/7563)	0,18 (67/73)	97	$1,5 \cdot 10^{-3}$
Облучение	90,4 (11 300/12 500)	$3,6 \cdot 10^{-4}$ (10/5500)	2	9,6 (1205/12500)	0,17 (105/123)	98	$1,8 \cdot 10^{-2}$

* В скобках приведены абсолютные числа. F – частота митотического расщепления для одного маркера.

Митотическое расщепление и стабильность колоний диплоида *P. pinus* M57 в контроле и после γ -облучения в дозе 9 крад*

Класс колоний	Вариант	Проанализировано клонов	Частота выщепления одного маркера (F), $\cdot 10^{-3}$					F средняя
			<i>ade2</i>	<i>ade5</i>	<i>lys4</i>	<i>arg1</i>	<i>his1</i>	
Нормальные	Контроль	Первичные	0	0,1	0	0	0,1	0,04
		10850	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(2)
	Облучение	Субклоны**	0,4	0,15	0	0,15	0,68	0,27
		74 · 100	(3)	(1)	(0)	(1)	(5)	(10)
		Первичные	0,4	0,2	0	0	1,3	0,36
		5500	(2)	(1)	(0)	(0)	(7)	(10)
Доросшие	Контроль	Субклоны**	1,2	0,6	0,3	0,6	3,3	1,2
		33 · 100	(4)	(2)	(1)	(2)	(11)	(20)
	Облучение	Первичные	13,7	342	260	247	41	181
		73	(1)	(25)	(19)	(18)	(3)	(66)
		Субклоны**	3,5	6,0	4,4	7,4	4,8	5,2
		62 · 100	(22)	(37)	(27)	(46)	(30)	(162)
Облучение	Первичные	56,9	81,3	138	114	163	111	
	123	(7)	(10)	(17)	(14)	(20)	(68)	
	Субклоны**	2,6	3,2	3,6	5,6	5,4	4,1	
	50 · 100	(13)	(16)	(18)	(28)	(27)	(102)	

* В скобках указано абсолютное число зарегистрированных сегрегантов с данной ауксотрофностью.

** Проанализировано по 100 субклонов от указанного числа первичных колоний; при расчете F учитывается сумма проанализированных субклонов.

Таблица 4

Сопоставление свойств «нормальных» и «доросших» колоний в рассевах диплоидных клеток *P. pinus* в контроле и после γ -облучения в дозе 9 крад*

Класс колоний	Проанализировано колоний	Доля колоний с данной жизнеспособностью клеток, %			Доля (%) колоний с фенотипом	
		0,9–1	0,8–0,9	<0,8	диплоида	гаплоида или неспорулирующих
Нормальные	700/263	85/92	12/8	3/0	100/99,3	0/0,7
Доросшие	63/129	65/45	24/16	11/39	48/55	52/45

* В числителе указано число колоний данного типа в контроле, в знаменателе – после облучения.

Приведенные данные, а также тот факт, что повышение после облучения частоты сегрегации маркеров в выборке «нормальных» колоний диплоида M57 касается в большей степени дистального маркера *his1*, чем маркеров, сцепленных с центромерами (см. рис. 1 и табл. 3), означают, что облучение увеличивает в диплоидных клетках, служащих родоначальницами «нормальных» колоний (и, по-видимому, в их потомках, см. табл. 3), частоту митотического кроссинговера.

Анализ доросших колоний. Рассмотрим результаты анализа сегрегации ядерных маркеров и другие генетические изменения в «доросших» колониях, образовавшихся из диплоидных клеток штамма M57 (см. табл. 1), облученных в дозе 9 крад. Выживаемость при этой дозе равна 10%, а доля «доросших» колоний увеличивается от 0,8% в контроле до 10% в опыте (см. табл. 2). Наличие ауксотрофных мутаций в гетерозиготном состоянии не изменяет реакции диплоидных клеток (см. рис. 2).

Из табл. 2 и 3 видно, что в рассевах «доросших» колоний, образующихся из диплоидных клеток как в контроле, так и после облучения, с высокой частотой встречаются ауксотрофные культуры. Отдельные маркеры, содержащиеся в родительском диплоиде в гетерозиготном состоянии, выщепляются примерно с одинаковой частотой. Многие сегреганты или их потомки оказываются ауксотрофными сразу по нескольким маркерам.

«Доросшие» колонии отличаются от «нормальных» еще по ряду свойств. Так, большинство их нестабильно и в субклонах выщепляет новые ауксотрофные сегреганты (см. табл. 3); «доросшие» колонии часто содержат много нежизнеспособных клеток, иногда в них наблюдается полное или частичное подавление споруляционной активности (см. табл. 4). В «нормальных» колониях ни одного из таких последствий облучения не обнаружено. Все это хорошо согласуется с допущением, что «доросшие» колонии произошли от клеток, получивших при облучении по крайней мере одно летальное повреждение.

Из табл. 2–4 видно, что различия между «доросшими» колониями, возникшими из облученных и необлученных клеток, сводятся к небольшому увеличению в первом случае размеров летальных секторов и доли неспорулирующих культур. Сходство свойств «доросших» колоний в опыте и в контроле означает, что в «доросших» колониях, выросших после γ -облучения, так же как и в контроле [2], происходит гаплоидизация – утрата отдельных негомологичных хромосом. Если бы наблюдаемая в «доросших» колониях сегрегация происходила за счет других генетических процессов (например, за счет резкого повышения частоты кроссинговера), мы видели бы не только повышение частоты рекомбинации между геном и центромерой (сегрегацию маркеров *ade2*, *arg1*, *ade5*), но также между сцепленными генами *ADE5* и *LYS4*, расстояние между которыми равно 10 стрейнам (см. рис. 1). Однако ни одной культуры с фенотипом, соответствующим генотипу *ade5 lys4*, при анализе «доросших» колоний и их субклонов не обнаружено. Более того, у каждой из 61 проанализированной культуры фенотипа *Ade5⁻ Lys⁺* и *Ade5⁺ Lys⁻* произошло, по-видимому, выщепление сцепленных с локусами *ADE5* и *LYS4* аллелей α или α : все эти сегреганты вели себя на споруляционной среде подобно гаплоидным штаммам – образовывали копуляционные отростки и не спорулировали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Облученные диплоидные клетки *P. pinus* можно разделить на три группы. Первая группа – клетки, не несущие никаких повреждений, регистрируемых применявшимися нами методами; эти клетки полностью подобны необлученным. Вторая группа – клетки, не получившие летальных повреж-

дений, но с такими изменениями генетического аппарата, которые повышают частоту митотического кроссинговера; эти клетки достаточно стабильны и образуют колонии одновременно с контролем. Третья группа – клетки, получившие летальные повреждения; большинство таких клеток погибает после одного или нескольких делений и лишь некоторые из них выживают и образуют «доросшие» нестабильные клоны. Как показано выше, колонии вырастают только из клеток, получивших не более одного повреждения; два повреждения, как правило, абсолютно летальны. Это позволяет обсудить простейшее предположение: не являются ли летальные повреждения утратами целых хромосом?

Если такое предположение справедливо, то среди «доросших» колоний должны встречаться анеуплоиды типа $2n - 1$, но не могут встречаться анеуплоиды типа $2n - 2$ и $2n - 3$. В действительности же (см. табл. 3) в «доросших» колониях часто встречаются жизнеспособные клетки, утратившие две и три негомологичные хромосомы: фенотип $Ade^- Arg^- Lys^-$ (красные) и $Ade^- Arg^- His^-$ (белые). Следовательно, утрата после облучения двух или трех негомологичных хромосом сама по себе столь же нелетальна для диплоидных клеток *P. pinus*, как и утрата двух и трех хромосом в необлученных клетках [2]. Это означает, что утрата отдельной хромосомы может представлять собой лишь следствие какого-то первичного повреждения клетки, но не само это повреждение.

Выше уже отмечалось, что лучевая инактивация гаплоидных и диплоидных клеток *P. pinus* обусловливается однотипными первичными повреждениями. Следовательно, и у гаплоидных дрожжей *P. pinus* первичным летальным повреждением в большинстве случаев является не утрата отдельной хромосомы, а какое-то другое событие.

Мы видели, что летальные лучевые повреждения возникают при облучении клеток дрожжей *P. pinus* как одноударные события. Интересно отметить, что среди проанализированных «доросших» клонов и их потомков культуры М57 мы не обнаружили других ауксотрофов, кроме $Ade^- Arg^- Lys^-$ и His^- и не выявили рекомбинантов с генотипом *ade5 lys4*. Это означает, что сами по себе летальные повреждения не вызывают в диплоидных клетках ни резкого повышения частоты генных мутаций, что уже отмечалось ранее для дрожжей *S. cerevisiae* [9], ни резкого повышения частоты митотического кроссинговера. Эти повреждения, однако, вызывают в потомстве несущих их клеток нарушения митотических делений и, как следствие, замедленный рост, выщепление летальных секторов, анеуплоидию, подавление спорообразования. Генетическая нестабильность клонов, происходящих от таких клеток, проявляется в утрате негомологичных хромосом, т.е. в постепенной гаплоидизации. За счет повышения после γ -облучения доли нестабильных «доросших» колоний увеличивается суммарная частота митотического расщепления диплоидной культуры, хотя в самих «доросших» колониях облученной культуры частота митотической сегрегации не отличается от соответствующей частоты в «доросших» колониях, происходящих от необлученных клеток (см. табл. 2). Мы пока не можем сказать, что же собой представляют эти летальные повреждения, но не исключено, что это разрывы хромосом или несимметричные обмены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Толсторуков И.И., Дутова Т.А., Беневоленский С.В., Соом Я.О. Гибридизация и генетический анализ метанолюкисляющих дрожжей *Pichia pinus* // Генетика. 1977. Т. 13, № 2. С. 322.
2. Толсторуков И.И., Близник К.М., Корогодин В.И. Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 1. Спонтанное расщепление // Генетика, 1979. Т. 15, № 12. С. 2140.
3. Корогодин В.И. Некоторые закономерности роста макроколоний после облучения дрожжевых клеток гамма-лучами радиокобальта // Бюфизика, 1957. Т. 2. С. 178.
4. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщение 2. Пути расообразования // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 3. С. 416.
5. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщение 11. Факты и гипотезы // Радиобиология. 1977. Т. 17, № 4. С. 492.
6. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. и др. // Роль плоидности в радиочувствительности клеток (эксперименты на дрожжевых организмах разных видов и генотипов) // Радиобиология. 1977. Т. 17, № 5. С. 700.
7. Толсторуков И.И., Беневоленский С.В. Изучение механизмов спаривания и самодиплоидизации у гаплоидных дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 1. Биополярность спаривания // Генетика. 1978. Т. 14, № 3. С. 519.
8. Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978. 232 с.
9. Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщение 6. Оценка мутабельности клонов, вырастающих из облученных клеток // Радиобиология. 1974. Т. 14, № 4. С. 494.

MITOTIC INSTABILITY OF PICHIA PINUS DIPLOID YEAST CELLS 2. SEGREGATION INDUCED BY GAMMA-IRRADIATION

I.I. Tolstorukov, K.M. Bliznik, V.I. Korogodin

Two types of genetic damages induced by γ -rays in diploid cells of *Pichia pinus* MH4 were described: «nonlethal» damages causing the increase in frequencies of mitotic crossingover and lethal damages resulting in the cell death or the occurrence of unstable clones.

Cell surviving after irradiation and carrying some lethal damages (whose nature remains obscure) give rise to slowly growing colonies, which instability is revealed in the increased frequency of segregation of lethal sectors and aneuploids. In such colonies, segregants lacking one, two or three non-homologous chromosomes are often observed.

It is concluded that the losses of single chromosomes are not to be considered as primary damages leading to irradiation-induced inactivation of cells.

CASCADE MUTAGENESIS: REGULARITIES AND MECHANISMS

1. INTRODUCTION

As early as 1920, Nadson [1] put forward an idea that lesions of cellular nuclear structures underlie the action of ionizing radiation. Later, Nadson and Filippov [2, 3] described the mutagenic action of radium on mould fungi and yeasts *Nadsonia* and *Sporobolomyces*. Shortly thereafter, these authors reported the en masse appearance of morphologically diverse colonies and cells in the progeny of irradiated yeast [4, 5]. Initially, the authors designated these new races «mutants»; however, the specialists did not recognize this phenomenon because of races appearance en masse and inadequate knowledge about yeast genetics. After stormy discussion, Nadson had to abandon the term «mutants» with respect to new yeast races and designated them «saltants» or «radiatoraces». These works were stopped in Russia in 1934 after Fillipov's death caused by tuberculosis, and after Nadson was taken into custody and shot in 1936. In France, studies of this kind were started by Lacassagne and co-authors [6], but were terminated due to the World War II. At the end of the 1960s, when the so called growing-up effect [7] was studied in yeasts, it was found that, upon subcloning of the late arising colonies obtained from irradiated cells, the appearing subclones also grew with a decreased rate. From that time on, the specific form of radiation race formation has been studied. In this paper, we summarized the results of our studies, considered some new quantitative aspects of this phenomenon, responsible genetic mechanisms, and presented an evidence for the connection of this phenomenon with chromosomal instability.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. STRAINS

Saccharomyces cerevisiae: homozygous for genes controlling colony morphology; hybrid diploids – 2A × 6C and 5A × 3B; the diploid 1210/21–25 that is heterozygous for the *ade2* mutation; natural heterozygous diploid Megri 139-B; autodiploid 6P3 that is homozygous for the *ade1–6* mutation; and haploid meiotic segregants of some of this diploids. *Pichia methanolica* (formerly *Pichia pinus*) [8, 9]: natural haploid, its autodiploid, diploids that are heterozygous for auxotrophic mutations. All *P. methanolica* lines are highly homozygous. Most of the above strains generate large round white colonies on a solid nutrient medium (strain 6P3 produces red colonies).

2.2. MEDIA AND GROWTH CONDITIONS

We used medium with 4° Ball. wort or YEPD medium. Medium AL-01 consists of minimal medium with 0.01 mg/ml adenine. The growing was performed at 30 °C.

To determine the content of mitotic recombinants in diploids that are heterozygous for the *ade1* and *ade2* mutations, colonies were plated on YEPD and the number of white, red and sectorized colonies was counted.

The reversion frequency of *ade1-6* mutation of strain 6P3 was determined by plating single culture clones on YEPD, and, after 10 days of growth, suspending them separately (several randomly selected colonies). The suspension was plated on a complete medium to define subclone morphology and on AL-01 medium (200-300 cells) to assess the reversion rate with respect to the formation of white secondary colonies. The frequency of the reversion per cell per division was estimated as a ratio of the number of white secondary colonies to the cell number in the analyzed colony sample.

When estimating culture growth rate, cells of separate clones were grown in liquid YEPD in tubes under aeration; the number of cells, capable of forming colonies was determined in plating. The growth rate was calculated according to the exponential region of growing curve.

The quantitative evaluation of respiratory mutants was performed as in [10], and the content of nonviable cells was determined according to [11] by detecting, under a microscope, budding and nonbudding cells on the surface of the nutrient agar after growing for one day.

Tetrad analysis followed a standard procedure. Standard methods of native chromosome separation were employed using pulse-field electrophoresis [12].

2.3. IRRADIATION TREATMENTS

Cells were grown on plates for 4 days up to stationary growth phase and irradiated in a water suspension (not more than 10^6 cells/ml) with γ -rays ^{60}Co or ^{137}Cs (the dose rate was about 20 or 10 Gy/min, respectively) at doses that kill from 1 to 99.9% cells. The survival was assessed by counting colonies in platings. Primary colonies, which appear after irradiation, were used to obtain subclones. Colonies, subclones of which grew simultaneously with a control and did not differ from the control phenotypically, were identified as stable (normal cell clones). Colonies, which formed slowly growing subclones and/or subclones that differed in morphology, were believed to be unstable clones.

2.4. EVALUATION OF CELL AND COLONY MORPHOLOGY

Colonies (30-50 per plate) were grown on wort agar (2 weeks at 30 °C plus 10 days at room temperature). Cells were analyzed under a microscope. For electron microscope examination [13], colonies were grown for 3-4 days, cell were fixed successively in 1.5% KMnO_4 (2 h) and in 1% solution of osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (18 h). Preparations were dehydrated using increasing concentrations of ethanol. Ultrathin cuts were contrasted with a 5% uranyl acetate and lead citrate and visualized with a JEM-5V and S-100 microscopes.

3. RESULTS

3.1. PECULIARITIES OF CASCADE MUTAGENESIS IN YEASTS

Clones that formed new races were isolated by plating late arising colonies obtained from cells surviving after irradiation (Fig. 1). Here photos of colonies from nonirradiated (A) and irradiated (B) cells of diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain Megri 139-B are presented. In the latter case, small colonies that provide the effect of the late arising colonies are clearly seen. These races were extremely variable in morphology. The majority of colonies generate subclones or radoraces of several types [14]. Fig. 2 shows the scheme of experiments used to study this phenomenon. Individual single clones emerging after the first replating of colonies produced by irradiated cells have been proceeded to replate once per month during five years. For such a replating, we choose colonies differing in morphology as well as those like in nonirradiated population. It is important to note that colonies emerging from single irradiated cells as a rule contain varying amounts of radoraces. In every replating a number of colonies (subclones) with different morphology were counted. As a result, main properties of radiation race formation were established which are adduced below.

After irradiation, a proportion of the late arising colonies markedly differed from a control in colony growth rate and morphology. These differences are inherited in the subsequent replating. Each of these colonies usually generates much more than 1% of unstable clones of various morphological variants (Fig. 3). Normal clones arising after irradiation produce only normal clones in all generations. Note that radoraces of various types may be brought out both from directly irradiated cells and during proceeding replating of other radoraces. This effect was independent of whether the plating occurred immediately or shortly after irradiation or after a large number of postirradiation replatings. It is worth to emphasize that no any rule was revealed with respect of the sequence of

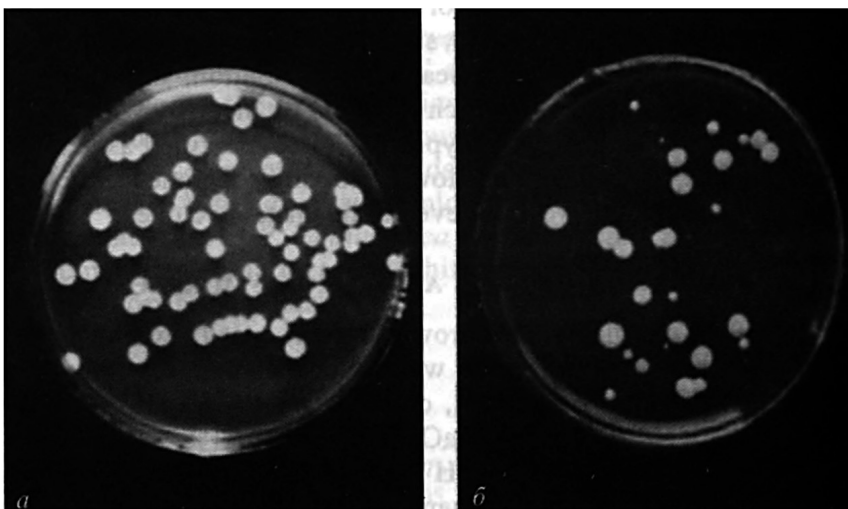


Fig. 1. Photos of colonies grown from nonirradiated (A) and irradiated (B) cells of diploid yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, strain Megri 139-B

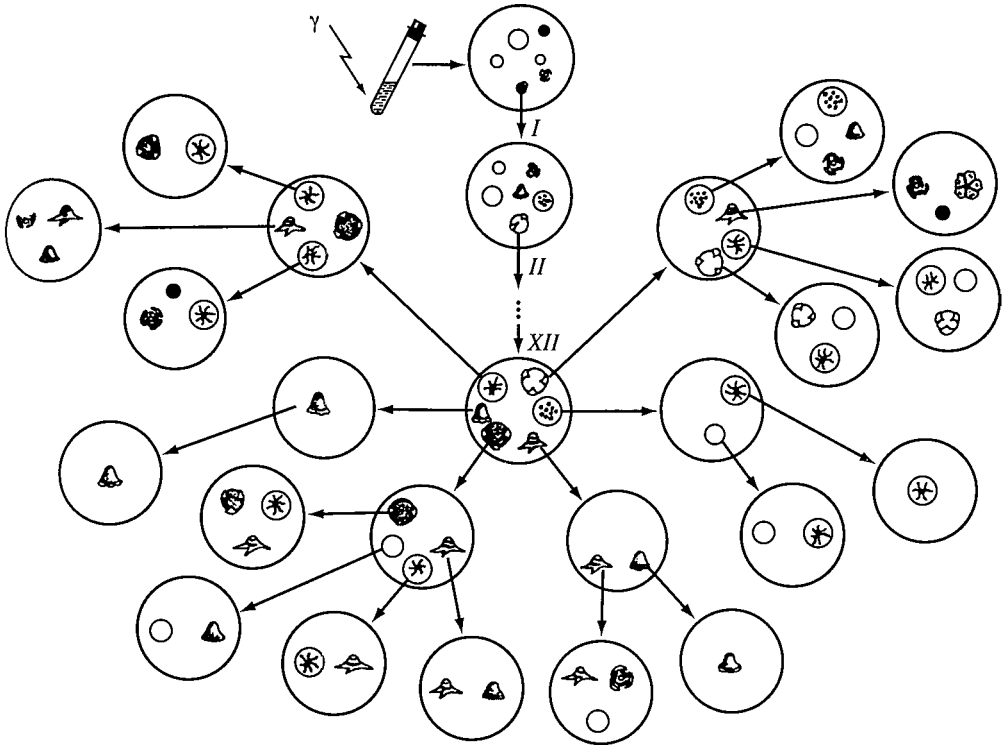


Fig. 2. Scheme of experiments on the analysis of cascade mutagenesis. Roman numerals indicate passage numbers

race formation or with the time of unstable clone appearance. During five years observations we could see repeated emerging of similar radioraces from quite different original unstable clones as well as various races from the same original colony. Such a heterogeneity of new morphological radioraces in the distant progenies of cell surviving after exposure to ionizing radiation was shown to be supported for hundreds of cell generations. It is the first peculiarity of this phenomenon. The second originality of this phenomenon is that the mutation process, caused by a single irradiation act, occurs at a greater rate, much more than 10^{-2} mutations per cell per division. This has spurred us to design this phenomenon to a particular type of mutation processes, which was designated «cascade mutagenesis» [15]. The cascade of mutations induced by a single irradiation is going on for practically unrestricted time duration producing new and new yeast radioraces.

Colony morphology of radioraces, which differed markedly from each other, and the shape of cells constituting these colonies are given in Figs. 4 and 5, respectively. It is essential that morphology of radiorace colonies presented in Fig. 4 is fairly identical to those of saltant colonies presented in works performed on yeasts of other taxons [4]. We may conclude the same when morphology of our cells (Fig. 5) is compared with the drawings of cells from different radioraces shown in Nadson and Fillipov's works [4, 5].

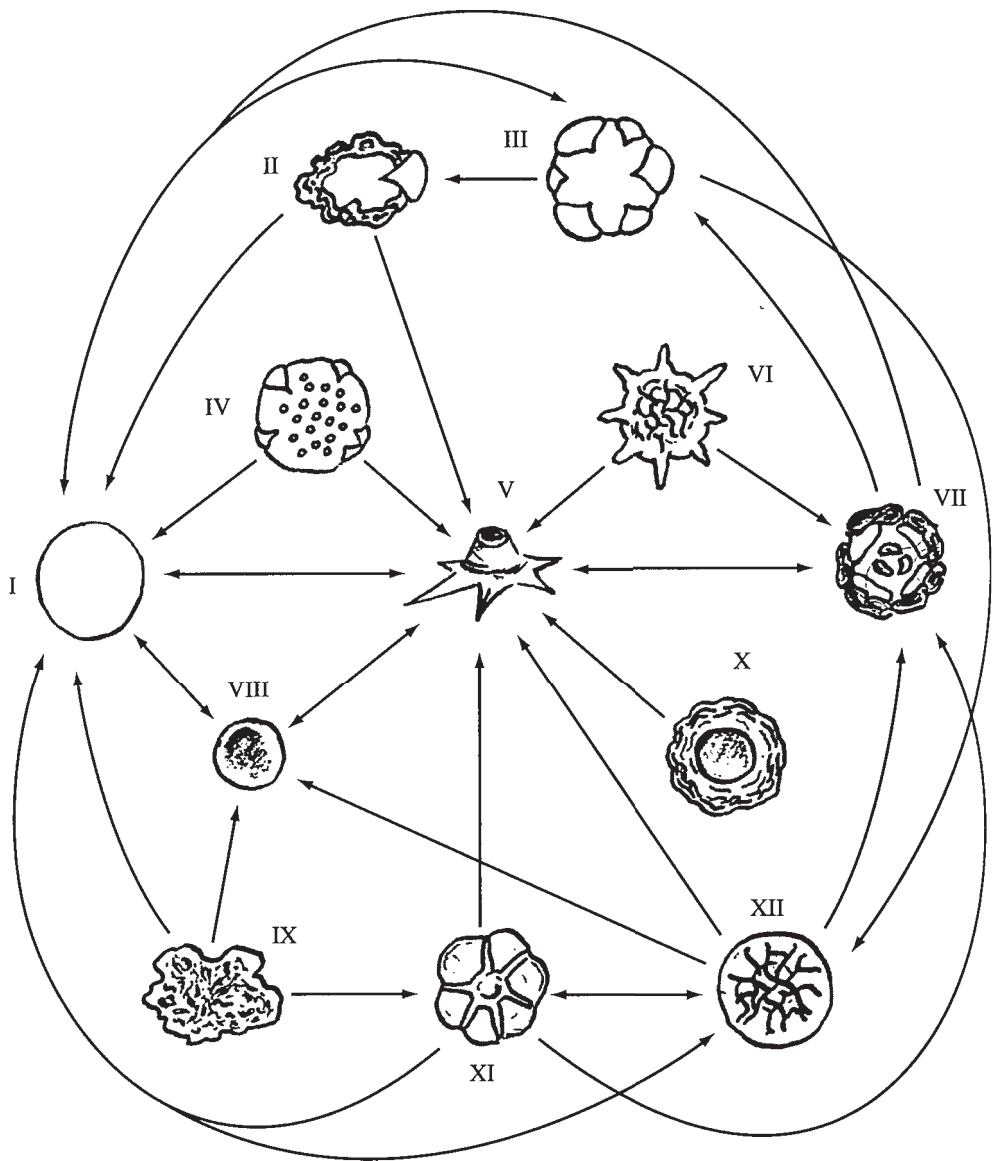


Fig. 3. Scheme of race formation in unstable colonies that emerged from single cell surviving after irradiation

Numbers of colony drawings correspond to colony and cell numbers in Fig. 4 and 5

3.2. THE DISTRIBUTION OF SURVIVING YEAST CELLS IN ACCORDANCE WITH THE NUMBER OF PRIMARY LESIONS

It is well known that single cells among both surviving and inactivating parts of a homogeneous population respond differently to the same dose of irradiation. Inactivated cells produce microcolonies consisting of various numbers of cells (different inactivation forms) [11]; surviving cells produce macrocolonies of

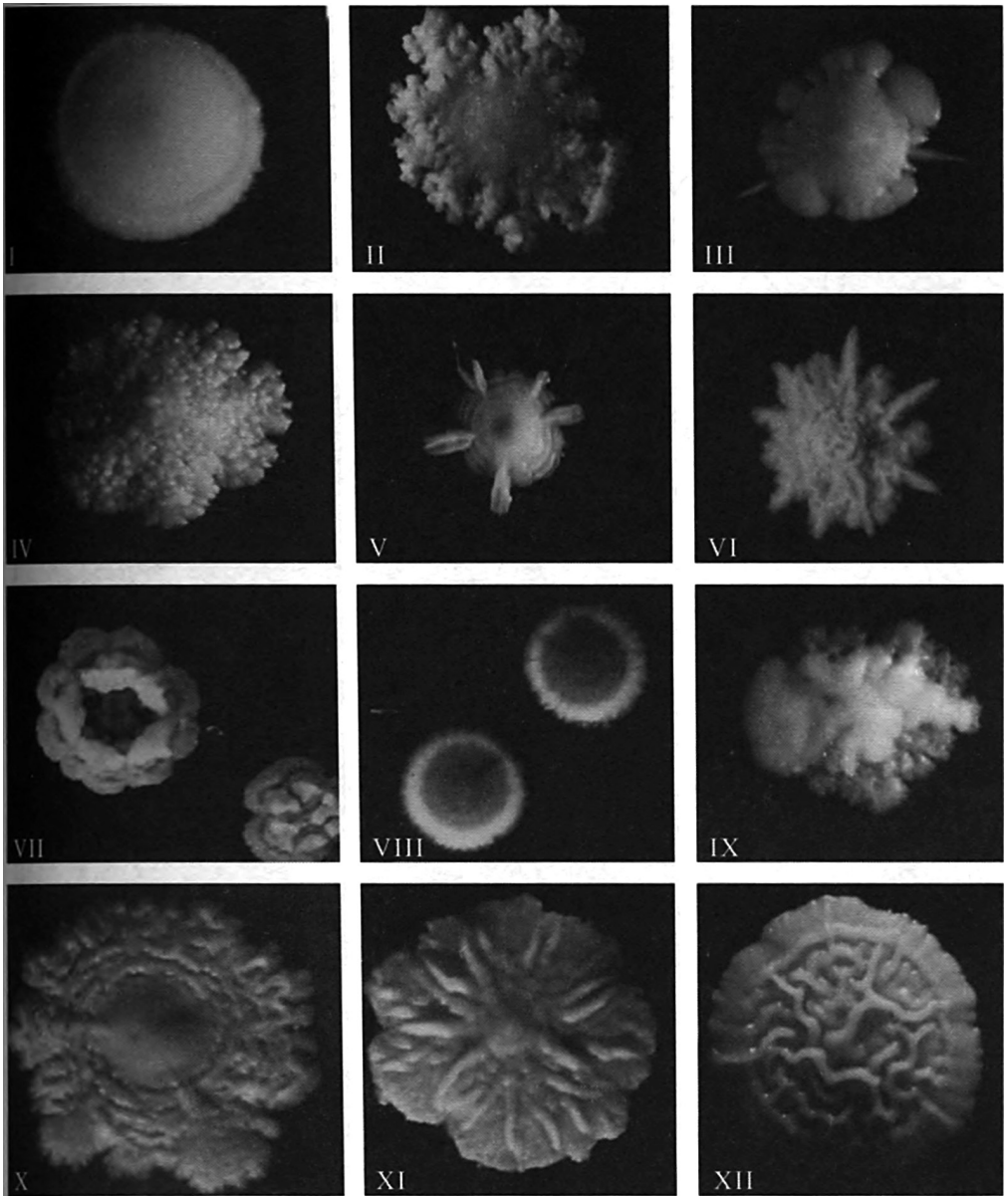


Fig. 4. Colonies of different radioraces of *S. cerevisiae* Megry 139-B, cells of which are shown in Fig. 5. Colony numbers correspond to colony and cell numbers presented in Fig. 3 and 5. On the left above (I) are colonies of the original strain (control)

various sizes which appear within different times after irradiation. The latter case is expressed only for diploid and polyploid cells for which sigmoidal survival curves after exposure to ionizing radiation are obtained. In the course of producing of macrocolonies by diploid irradiated cells «lethal sectors» are often formed.

It was shown before that different manifestation of cell radiation damage can be quantitatively described by the probability model [16, 17]. According to this model, single irradiated cells are damaged in a random fashion in accordance

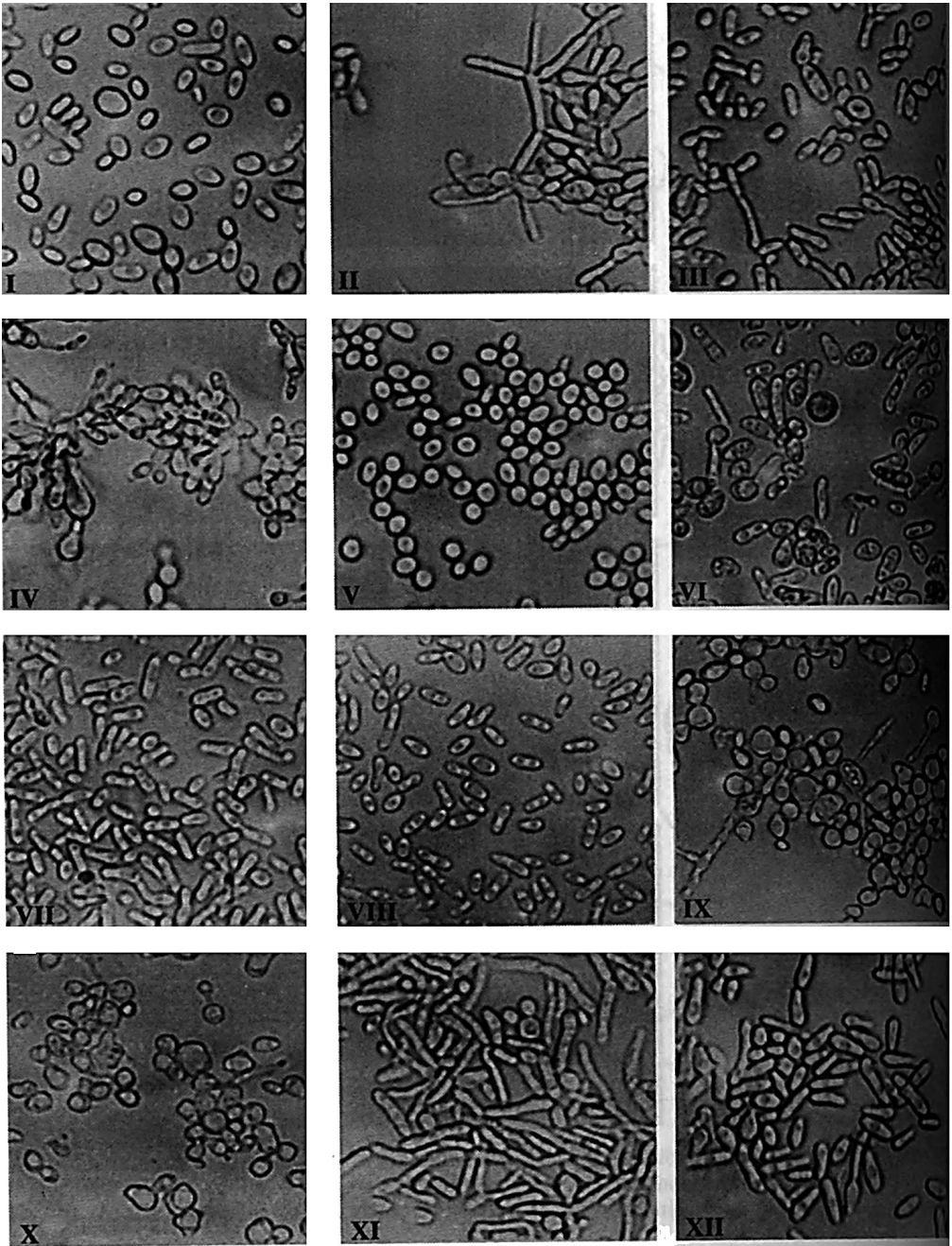


Fig. 5. Cells of different radioraces of *S. cerevisiae* Megri 139-B. On the left above (I) are cells of the original strain (control)

with the hit principle and the number of damages defines the probability P for the successful division. If the probability of damage expression (the probability of refusal) is α , the probability for the successful division of a cell with one damage is $P_1 = (1 - \alpha)$. For independent interaction of radiation damages, the probability for

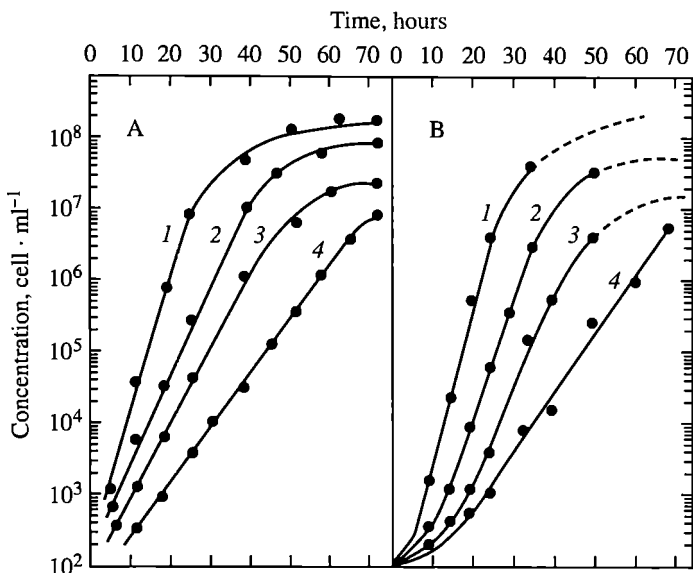


Fig. 6. Dynamics of propagation of nonirradiated cells (1) and distant progenies of cells surviving after irradiation and generating unstable colonies (2-4). Strains *S. cerevisiae*: A - Megri 139-B, B - 5A × 3B

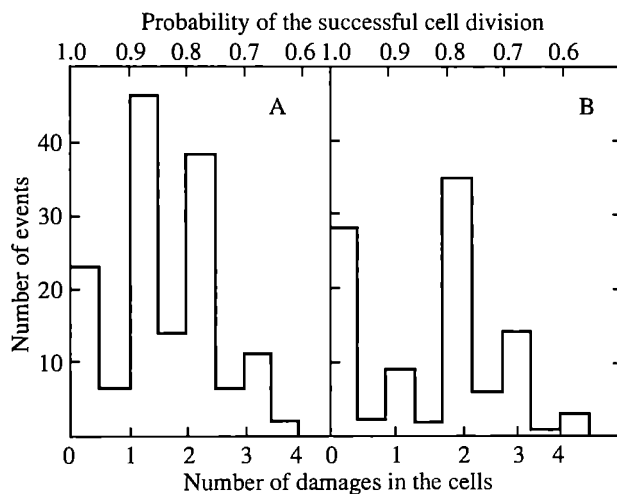


Fig. 7. Distribution of clones grown from irradiated cells according to the probability for successful division (upper scale of the abscissa), corresponding to the number of primary damages (sublethal lesions) in the original cell (lower scale of the abscissa). Strains of *S. cerevisiae*: A - Megri 139-B, B - 5A × 3B

the successful division of a cell with i primary damage (sublethal lesion, hit) may be presented as $P_i = (1 - \alpha)^i$. For diploid yeasts *S. cerevisiae* strains Megri 139-B and 5A × 3B $\alpha = 0.12$ [17]. Hence, the following probabilities for the successful division of cells with 1, 2, 3 and 4 damages can be obtained: $P_0 = 1$, $P_1 = 0.88$,

$P_2 = 0.77$, $P_3 = 0.68$ and $P_4 = 0.60$. It turned out that the reduced probability for the successful division of damaged cell is retained for a large number of cell generation [16, 17]. It leads to the decrease of clone-formation rate immediately after irradiation and upon the successive replating.

We determined the growth rate of cells from colonies of various sizes appearing in different time after irradiation. The growth of control cells in liquid nutrient medium at 30 °C, the optimum-growth-rate temperature, is shown in Fig. 6 (curves 1). Curves 2–4 represent growth curves of yeast cells from individual colonies, produced by cells surviving after irradiation and having 1–3 primary damages (sublethal lesion, hit) respectively. These curves have much lower slopes (i.e., slower growth rate). The growth rate of cells from the same colony was retained unchanged during a lot of passages.

If the reduction of growth rate is related with the decreasing of the probability P_i for the successful division, the specific growth rate of cells with i damages may be described as $\mu_i = \mu_c(2P_i - 1)$, where μ_c is the specific growth rate of control cells. We determined the specific growth rate of cells from 150 (Megri 139-B) and 100 (5A × 3B) colonies produced by the surviving irradiated diploid yeast cells (^{60}Co , 600 Gy, surviving ≈20%).

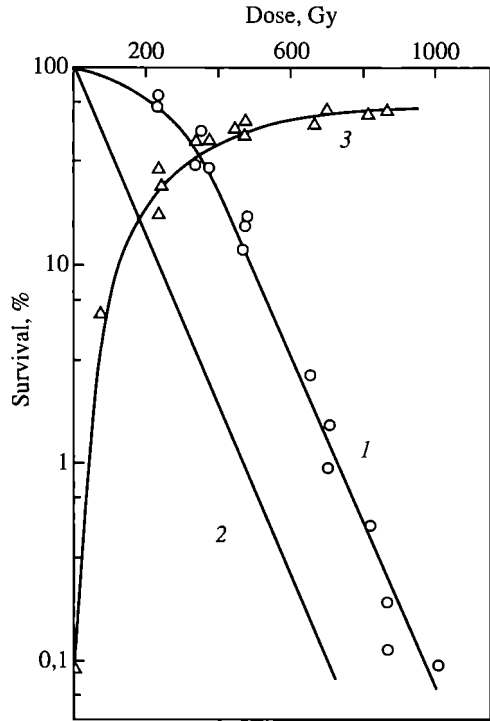
Knowing μ_i and μ_c , we calculated P_i for these clones. Experimental results are presented in Fig. 7. It is of interest that the maxima of the distribution coincide fairly well with theoretical values of P_i predicted for cells with 0, 1, 2, and 3 primary damages (sublethal lesions). It would be of interest to test whether clones with various values of damages differ in their radiosensitivity, viability, sensitivity to environmental conditions, frequency of recombination and respiratory-deficient mutations, etc. Some of these results are presented below.

3.3. RADIOSENSITIVITY OF DISTANT PROGENIES OF IRRADIATED CELLS

Thus, after a single irradiation of diploid culture, a portion of cells generates unstable clones, and the remaining portion forms normal colonies. In the former cells, subclones are unstable in platings, whereas in the latter, no unstable subclones are detected. Unstable and normal colonies can be easily identified with respect to their ability to form unstable subclones. We determined the dependence of the appearance of each type of colonies on the irradiation dose (Fig. 8). The survival is described by the traditional curve with the clearly manifested shoulder (curve 1). The yield of normal clones decreased exponentially as the dose increased (curve 2) while the relative content of unstable clones increased reaching a plateau (curve 3). The exponential decrease of normal clones with radiation dose reflects the fact that surviving cells can produce normal clones if they haven't any primary sublethal lesion. The presence of one or more such primary sublethal lesions results in the deceleration of the growth rate of cells surviving after exposure to ionizing radiation and hence in an inevitable appearance of unstable clones.

When colonies of *S. cerevisiae* haploid and diploid strains, which were obtained after a single irradiation, were irradiated repeatedly, Tobias [18] was the first to state that radiosensitivity of repeatedly irradiated haploids does not differ from that of the original cultures.

Fig. 8. The survival curve of *S. cerevisiae* Megri 139-B after exposure to γ -rays (1); the yield of normal colony – curve 2; the curve of relative content of unstable colonies among colonies grown after irradiation (3)



However, in diploids, cells of some colonies that appeared after irradiation manifested an increased radiosensitivity. Tobias explained these results by mitotic inheritance of sublethal lesions occurring in diploid cells. No morphological differences between these colonies or any sign of instability were mentioned in his work [18]. It was therefore of interest to know whether there is a difference between radiosensitivity of cells from normal cells and various unstable clones. We performed these studies, separately irradiating cells from normal stable large colonies and unstable late arising colonies, which appeared after cell

irradiation at a dose of 700 Gy. Cells from normal clones (Fig. 9, curves 1) proved to be similar to the initial nonirradiated cells in radiosensitivity (compare with curve 1 in Fig. 8), whereas cells from unstable clones (curves 2–5 in Fig. 9) have an increased radiosensitivity compared to control. This is expressed as a decrease

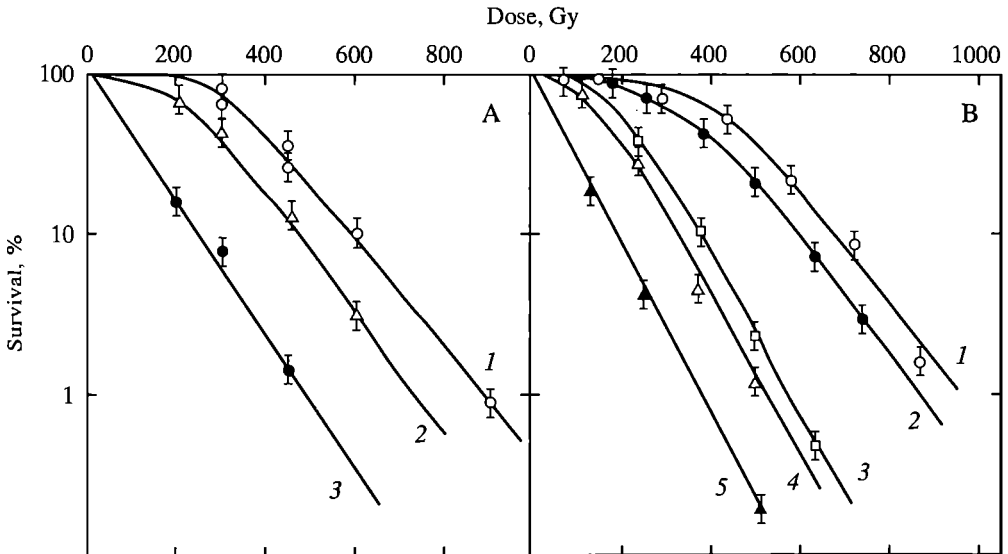


Fig. 9. Survival curves of nonirradiated cells and normal colony cells (1) and cells from various unstable colonies (2–5) of *S. cerevisiae* yeasts. Strains of *S. cerevisiae*: A – Megri 139-B ($i = 0, 1, 2$ for curves 1, 2, 3 correspondingly), B – $5A \times 3B$ ($i = 0, 1, 2, 3, 4$ for curves 1, 2, 3, 4, and 5 correspondingly)

The content of saltant cells among colonies produced by irradiated diploid yeast cells

The number of primary radiation sublethal lesions (hits)	The number of replated colonies	The number of colonies produced after replating	The number of saltant colonies	
			Total sum	Percentage
0	28	4763	53	1.1
1	50	2978	496	16.6
2	22	2399	2265	94.4
3	28	3717	3077	82.8

in the survival curve shoulder and in an increase of its slope. In formal terms, the shoulder decrease means that cells initially had a number of primary sublethal lesions. The slope increase can indicate that the expression of the postradiation recovery process is somewhat weaker in these cells than in nonirradiated cells or cells from normal clones. As can be seen from Fig. 9, radiosensitivity of distant progenies of single cell surviving after irradiation correlates with the number of primary sublethal lesions. Effects of separate lesions are summarized. Cells with a great number of primary sublethal lesions are inactivated with a great probability while those with a lesser number of sublesions can give rise to clones differing in both growth rate and radiosensitivity, the degree of radiosensitivity being the higher the greater number of sublesions are in the original cell surviving after irradiation. It is therefore not excluded that the appearance of unstable clones and cell death may be conditioned by similar primary sublethal lesions.

3.4. SALTANT COLONIES

The appearance among macrocolonies produced by irradiated diploid yeast cells various morphological variants (saltants) may be attributed to the example of the expression of primary sublethal lesions. The content of saltant cells in colonies produced by surviving diploid yeast cells (strain Megri 139-B, ^{60}Co γ -rays, 600 Gy) is summarized in Table 1. One can see that the content of saltant cells with two and three sublethal lesions are significantly greater as compared with that for clones without or with one primary sublethal lesion (hit).

It is known that survival of irradiated diploid cells depends on postradiation conditions [19, 20]. When irradiated cells are kept in water or buffer, their survival after plating increases, which can be described in terms of the effective dose decrease [21]. It appeared that the recovery of irradiated yeasts from lesions inducing unstable clone and saltant formation is described likewise [17]. This can also indicate that the appearance of unstable clone and cell death after irradiation may be conditioned by identical lesions.

3.5. NONVIABLE CELLS AMONG UNSTABLE CLONES

The increased probability of unsuccessful division («breakdown») must call forth the existence of nonviable cells in clones produced by single cells surviving after irradiation. One can believe that any deviation of cultivation conditions from optimal should result in the breakdown rise. Then there is a reasonable base to expect the increased number of nonviable cells in unstable clones. Experimental

Table 2

The content of nonviable cells in clones produced by diploid yeast cells surviving after exposure to ionizing radiation

The number of primary sublethal lesions (hits)	The number of tested clones	The content of nonviable cells, %	
		Optimal condition	Suboptimal condition
0	28	17 ± 6	24 ± 7
1	50	20 ± 5	43 ± 11
2	22	27 ± 9	54 ± 15
3	28	36 ± 13	87 ± 13

data concerning the content of cells incapable of proliferating at optimal (30 °C, standard nutrient media) and suboptimal (37 °C, standard nutrient media +7% NaCl) conditions for distant progenies of diploid yeast cells (strain Megri 139-B, 600 Gy) with various number of primary sublethal radiation lesions are presented in Table 2. It could be easily seen that the relative yield of nonviable cells in clones produced by surviving diploid yeast cells is increased with the number of inherited primary radiation sublethal lesions. Due to this fact, the growth effectiveness of cells under suboptimal conditions of culture was 76, 46 and 13% correspondingly to clones with 0, 2, and 3 primary sublethal lesions.

3.6. THE YIELD OF SEGREGANT CELLS IN DIFFERENT TYPE CLONES

It is well known that potential radiation damages are realized during cell division (proliferation). Then it should be expected that distant progenies of cells surviving after a single irradiation and revealing the decreased probability for the successful division have to be characterized by the increased yields of various mutation. Moreover, it should be expected that the number of primary sublesions (hits) must correlate with the yield of mutant cells. We tested this expected conclusions in experiments studying mitotic recombination in diploid yeast strain *S. cerevisiae* (strain 5A × 3B) heterozygous in adenine loci. The cells of this strain produced white colonies on a solid nutrient media, while a recombinant *ade1* or *ade2* cells – the whole or sectored red colonies. The recombinant cells were developed during the growth of clones produced by the surviving cells exposed to ionizing radiation (γ -rays of ^{60}Co , 300 Gy). The content of recombination cells in

Table 3

The content of recombinant cells in distant progenies of diploid yeast *S. cerevisiae* (strain 5A × 3B) surviving after irradiation

The number of primary sublethal lesions (hits)	The number of investigated clones	The number of colonies emerging after replating	The number of recombinant cells			
			whole coloration	sectored coloration	total number	percentage
0	13	768	1	2	3	0.4
1	59	6966	181	33	214	3.1
2	34	3695	267	29	296	8.0
3	16	927	158	32	190	20.5

clones with various numbers of primary sublethal lesions is presented in Table 3. One can see that clones with greater number of such lesions contain a greater number of segregant cells.

3.7. RESPIRATORY MUTANTS

Some unstable clones differ by a high segregation rate of respiratory mutants. Although respiratory mutants are virtually not encountered among primary colonies of irradiated diploid, these mutants can constitute more than 30% of all subclones in platings of some unstable clones. The unstable clones forming subclones of three types can also be detected: consisting of respiratory normal cells, consisting of only respiratory mutants, and mixed colonies (Fig. 4, IX). Respiratory normal progenies of these unstable clones again generate colonies of three types upon subcloning, whereas respiratory mutants retain their stability. Apparently, respiratory mutants may occur in the progeny from unstable clones as a result of cells division distortions, which prevent uniform distribution of mitochondria between a cell and bud.

The data concerning the yield of respiratory mutants in clones with various numbers of primary sublethal lesions are presented in Table 4. These experiments were performed with diploid yeast cells (strain Megri 139-B) which were irradiated in the stationary phase of growth (^{60}Co , γ -rays, 600 Gy). To identify respiration deficiency in yeast we used the tetrazolium overlage technique [10]. According to this method, cells with normal respiratory ability were colored in red color, while clones consisting of respiratory mutants stayed white. One can see that irradiation resulted in an increased content of respiratory mutants in clones produced by irradiated cells. The effect was particularly expressed for clones with a greater number of primary sublethal lesions (hits).

Thus, unstable clones differ from normal colonies not only with respect to growth rate, colony and cell morphology but also in an increased content of nonviable cells and in an increased rate of mitotic segregation.

The study of these effects in different unstable clones demonstrated their closest interrelation [22], i.e., the growth rate of the unstable clones correlates with the proportion of nonviable cells in a culture and these properties are retained in the unstable clones' progeny. Moreover, mitotic instability, typical for unstable clones, is retained upon subclonings.

Table 4

The content of respiratory mutants in clones produced by surviving diploid yeast cells exposed to ionizing radiation

The number of primary radiation sublethal lesions (hits)	The percentage of clones containing various numbers of respiratory mutants (%)			
	0-2%	>2-10%	>10-50%	>50-100%
0	100	—	—	—
1	80	16	2	2
2	53	12	20	15
3	32	16	28	24

3.8. ELECTRON MICROSCOPIC EXAMINATION OF CELLS

It turned out also that the number of primary radiation sublethal lesions determines the pattern of disturbance of cell budding displayed by electron microscopic examination of cells. Nonirradiated cells of the Megri 139-B strain

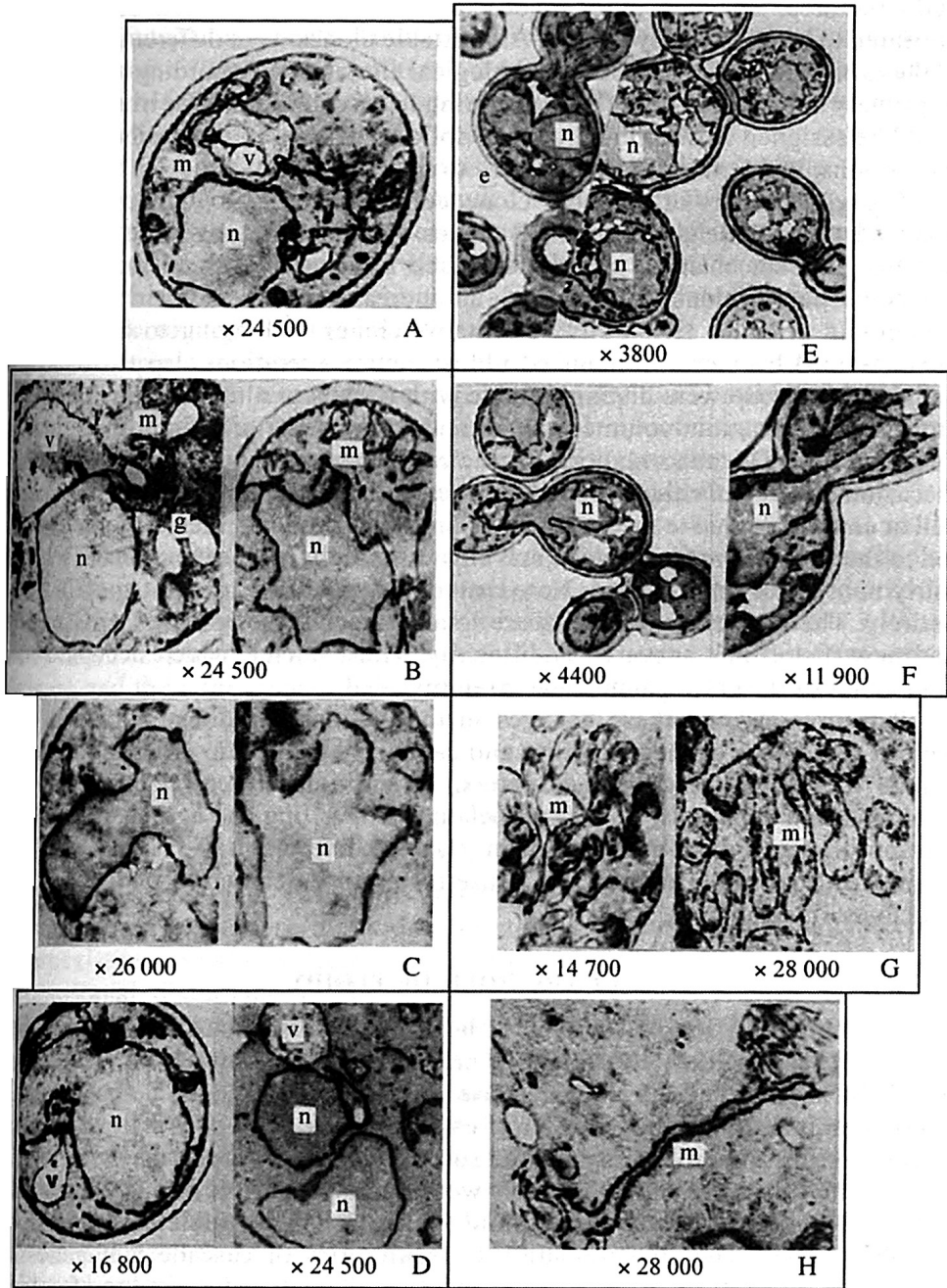


Fig. 10. Electron microscopic examination of yeast cells from normal (A) and unstable (B-H) clones. n - nucleus, v - vacuole, e - cell envelope, m - mitochondria, g - granules. See explanations in the text

along with cells from 15 normal clones and 17 unstable clones, which passed more than 100 cell generations after plating of the irradiated culture, were subjected to electron microscopic examination (Fig. 10). It was demonstrated that cells from normal clones do not really differ from the control (A), whereas cells from unstable clones were morphologically variable. The most important cell structures – nucleus, mitochondria, endoplasmatic reticulum, Golgi bodies – appeared to be specifically altered. All unstable clones were different with respect to the expression extent of cell morphological alterations. According to the number of primary sublethal lesions (hits) occurring in original cells after irradiation, they could be assigned to different groups as follows: Group I – one lesion; Group II – two lesions; and Group III – from three to four lesions.

The greater part of unstable clone cells, belonging to Group I, resemble nonirradiated and cells from normal clones. However, among these cells 5–10% had insignificant changes in individual cell structures, such as the clearing of nucleoplasm, nucleus deformation, an increase in the number of lipid and lipoprotein granules (B). Cells of unstable clones, belonging to Group II, are characterized by more pronounced ultrastructure alterations. Up to 20–30% of cells of this Group were distinguishable with respect to alterations in the nucleus structure and function: volume increase and form diversity, including «disturbed» nuclei (C and D), abnormalities in nucleus behavior upon budding (E and F). Occasionally, nuclei either stopped between cell and bud, or remained in maternal cell or entirely passed to the bud. Distortions in cell budding were observed, which led to the formation of undivided cell clusters or cells with several buds, which is fairly nontypical for a diploid. Note that a portion of buds did not contain nuclei entirely. The above abnormalities are total characteristics of cells of Group III, and new distortions appeared additionally. Thus, nuclei, which occupied more than a half of the cell volume, have been revealed.

It is obvious that these changes in the cellular hereditary apparatus must lead to a decrease of their viability and capability of mitotic propagation, which results in segregation of lethal sectors. In addition, structural changes in the mitochondrial apparatus, such as mitochondrial swelling and aggregation (G) and the appearance of giant mitochondrion (H) were detected in 1–3% cells of Groups II and III. Such abnormalities can cause respiratory deficiency, typical for some subclones of radioraces.

3.9. THE ROLE OF PLOIDY

By comparing survival curves of haploid and diploid cells, which exist in different phases of the cell cycle, one can conclude that any lesion is absolutely lethal for haploid cells in the G1 phase. And only undamaged cells survive. In yeast containing more than one set of chromosomes, each such a primary lesion (hit) decreases the probability for the successful cell division and is responsible for the late arising colonies. In other words, one primary lesion is expressed as sublethal in diploid and other polyploidy cells. Cells with sublethal lesions yield unstable clones. The above-mentioned peculiarities of cascade mutagenesis as well as the growing-up effect, i.e., the effect of the delayed emerging of colonies by cells surviving after irradiation, were registered only for diploid yeast cells for which survival curve is sigmoidal but never for haploid cells with exponential

dose-effect curve. It means that only diploid, but not haploid, cells are able to transfer from one progeny to another some primary sublethal radiation lesions which could be expressed immediately after irradiation and during the successive replating. Haploid yeast cells do not generate unstable clones after irradiation at all, their radiosensitivity does not depend on postradiation cultivation conditions, and the radiosensitivity of irradiated cells that passed several generations does not differ from that of control cells. However, this is true only for haploid cells, which are in G1 phase of the cell cycle during irradiation, i.e., cells possessing one set of chromosomes. At the same time, when asynchronous budding haploid culture, cells of which pass several phases of cell cycle, G1, S, and G2, are subjected to irradiation, unstable clones can appear as a result of irradiation. Survival curves of haploid budding cells have an extended «tail», the starting point of which corresponds to the content of those cells in a population which are in the S and G2 phase of the cell cycle. In the latter cells, chromosomes are formed or disjunction or doubled chromosomes start. For such a case a fairly large number of clones grown from irradiated budding haploid yeasts are unstable.

Pseudohaploid unstable clones can also be obtained due to isolating, by a micromanipulator, the monospore progeny from diploid unstable clone, which passed through meiosis. It is important that unstable meiotic segregants arise only from spores originating from incomplete tetrads, i.e., tetrads with 1, 2 or 3 viable spores, but not from tetrads with 4 viable spores [23]. One can assume that cells of the ascosporeogenous progeny with the parental diploid instability are not normal haploid products of meiosis and can contain more chromosomes than in one haploid set. So, all cases of unstable clone appearance are associated with the presence of more than one set of chromosomes in cells. On the contrary, cells with one set of chromosomes do not generate unstable clones with a decreased rate of cell division and the appearance of new radiatoraces in the successive platings. Thus, only diploid but not haploid cells possess the ability to cascade mutagenesis.

3.10. GENETIC ASPECTS OF CASCADE MUTAGENESIS AND ITS CONNECTION WITH CHROMOSOMAL DAMAGES

Generally speaking, cascade mutagenesis may be induced due to genetic events of three types: gene mutations, mitotic segregation (rendering conversion of preexisting mutations from the heterozygous to homozygous state), and chromosomal disturbances. The gene mutation possibility must be rejected, because, first, the majority of gene mutations are recessive and are non-expressed in diploid cultures and, second, this hypothesis can explain neither the mechanism of unstable clone appearance nor the frequency of saltant occurrence observed in experiments. For instance, the frequency of gene spontaneous mutations in *S. cerevisiae* and *P. methanolica* is in the range of 10^{-8} – 10^{-7} [24]. Irradiation can increase this value by not more than two orders of magnitude. In the homozygous *ade2-6/ade2-6* diploid 6P3, the frequency of $Ade^{-} \rightarrow Ade^{+}$ mutations was estimated to be $(1.0-7.0) \cdot 10^{-8}$ upon analysis of 56 independent unstable clones. This corresponds to the reversion frequency of the *ADE2* gene in the original diploid culture equal to $5.2 \cdot 10^{-8}$. Thus, mutability of an individual gene was equal in both nonirradiated culture and unstable clone. However, in the case of cascade

mutagenesis, late arising colonies are formed after irradiation at frequencies exceeding 10^{-2} (see Fig. 8).

As regards the mitotic segregation, the situation is identical. This event could ensure the appearance of unstable clone in heterozygous strain Megri 139-B. Really, tetrad analysis of this strain showed the presence of some recessive mutations even in nonirradiated cells of this strain which might be expressed after irradiation due to the mitotic segregation. That is why we tried to observe cascade mutagenesis in two high homozygous diploids $2A \times 6C$ and $5A \times 3B$. Tetrad analysis of nonirradiated cells of these strains verified the absence of mutations influencing the morphology of clones produced by these cells. The same quantitative regularities of unstable clone formation were observed in these two homozygous strains. Moreover, all three strains investigated after irradiation produced similar saltant colonies and this process of cascade mutagenesis was going on during five-year period of observation. For all three strains the unstable clone yield was described as a difference between survival curves of irradiated cells and exponential curves with the same slopes (see Fig. 8). Thus, heterozygous and homozygous cells revealed the similar rules of cascade mutagenesis. Hence, the mitotic recombination plays no part in the mechanism of cascade mutagenesis expression.

It remains to analyze the third opportunity – the connection of cascade mutagenesis with chromosome mutations. This hypothesis permits an experimental testing by genetic methods and by means of pulsed-field electrophoresis. Results of this testing are presented below.

Genetic analysis of unstable and normal clones was performed using artificially obtained diploids of haplont *Pichia methanolica* yeasts, which have four chromosomes in haploid set [9, 25]. All the four chromosomes in the analyzed diploids were marked with easily identified auxotrophic mutations in heterozygous state [26, 27]. The survival curve shoulder in *P. methanolica* diploid cells is weakly expressed, but it is sufficient to observe unstable clones appearance, the yield of which reaches 10% [28]. In nonirradiated cells of this strain, like in nonirradiated cells of *S. cerevisiae*, unstable clones emerge spontaneously with frequencies of 10^{-2} – 10^{-3} . Segregation analysis of heterozygous markers during mitotic unstable clones divisions demonstrated that a successive loss of individual chromosomes occurs in unstable clones. These chromosomes initially represented by two homologues can be lost after irradiation up to complete haploidization. A frequency of chromosome loss in unstable clones, calculated with respect to the mitotic segregation of one marker, was estimated to be $1.5 \cdot 10^{-3}$ per cell per division. This process ensured at least 95% of all recombination events in *P. methanolica* unstable clones [26, 27].

Using unstable clones and their subclones isolated from *S. cerevisiae* strain 1210/21, we also performed analysis of karyotypes by means of the pulsed-field electrophoresis. Some of the data obtained are presented in Fig. 11. The photos of gels (A, C) and band distribution reconstruction (B, D) clearly show that there are significant chromosomal abnormalities in unstable clones and their subclones, namely, the appearance of bands that are new for this strain. In this case, a portion of subclones of one unstable clones can demonstrate more or less equal band distribution (lanes 8–11), whereas in others, a number of additional bands disappear or novel bands emerge (lanes 12–17). Apparently, under these

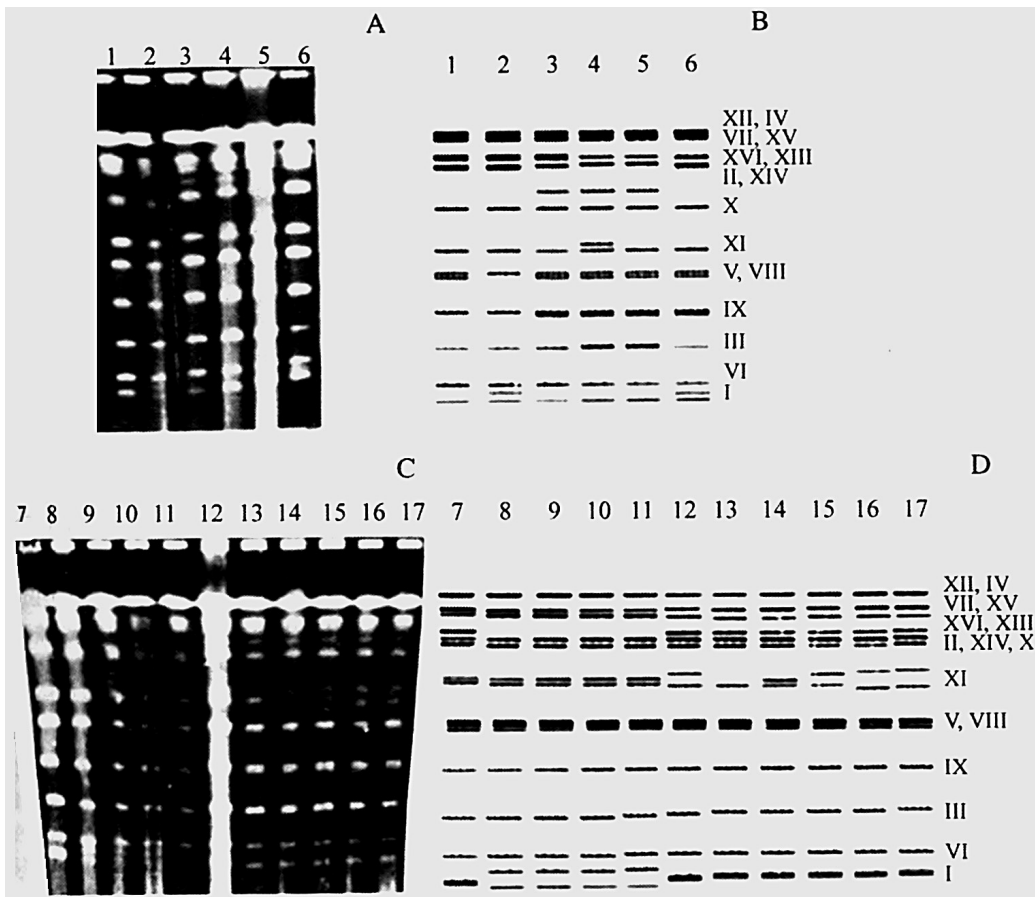


Fig. 11. CHEF gel electrophoresis analysis of chromosomal DNAs from unstable clones and their subclones of strain *S. cerevisiae* 1210/21-25

The ethidium bromide-stained gels (A, C) and diagrammatic representation of the karyotypes (B, D). Lane 1 - the initial diploid culture; lanes 2-6, 7 and 12 - unstable clones obtained from irradiated cells; lanes 8-11 - an unstable clone N3 and its independent unstable subclones; lanes 12-17 - an unstable clone N15

conditions, the most balanced population portion (with respect to chromosomal structures and viability) was advantageously involved in molecular analysis; nevertheless, one must consider that dispersed bands appear in many unstable clones, which were analyzed by this method (data not shown).

4. DISCUSSION

It was shown in this paper that among colonies growing out from diploid yeast cells surviving after irradiation, morphologically altered colonies are formed with high frequency. Repeatedly plating the cells from morphologically altered colonies, we were able to detect new races of diploid yeast cells with continually retained properties. This process of race formation induced by a single irradiation may last after hundreds of cell generations as well as during the first postirradiation plating. Cells from unstable clones exhibited an increased (as compared with the control) content of nonviable cells, respiration mutants and mitotic recombinants.

Cells from unstable clones are characterized by the enhanced radiosensitivity. The degree of expression of the foregoing effects was the higher the greater number of primary sublethal lesions are in the originally irradiated cell. It indicates the connection between the process of radorace formation (cascade mutagenesis) and the lethal effect of ionizing radiation.

The data obtained in this paper can be explained by the hypothesis in accordance with which the primary radiation lesion is not absolutely lethal for the diploid cell. With some probability which depends on the total number of primary sublethal lesions and conditions of culture, they result in the disturbance of cell division. Such a disturbance manifests itself by cell inactivation (nonviable cells among clones produced by irradiated cells), incorrect distribution of mitochondria between daughter cells (respiratory mutants), abnormal cell budding displayed by electron microscopic examination, and anomalous chromosome behavior expressed in an enhanced frequency of the mitotic recombination and cell karyotypes observation by means of pulsed-field electrophoresis.

The discussion of the results presented here must be prefaced by a brief consideration concerning the term «cascade mutagenesis». This term, as we believe, is more preferable in comparison with others denoting the hereditary instability. It is obvious that the cascade mutagenesis described here has no common features with replicating instabilities related with the increased frequency of direct and back mutations of drosophila genes which are characterized by site-specificity [29, 30]. As was shown [31], the replicating instability was not observed in other biological objects including yeast cells. The term «chromosomal instability» concerns the mechanism of cascade mutagenesis (and also the appearance of lethal sectoring) but it doesn't reflect such its specificity as a long-term appearance of new phenotype distinctions in the distant progeny of yeast cells surviving after exposure to ionizing radiation.

Judging by the data presented here cascade mutagenesis is initiated in a portion of diploid cells after a single irradiation and is going on for a period of unrestricted number of cell generations, consistently producing new races – unstable clones. The primary unstable clones formed by irradiated survival cells are distinguished by both the delay of cell-division and the reduced doubling rate. The instability of these clones is manifested in a changed morphology of colonies and cells, mitosis and meiosis disturbances, in the generation of nonviable cells, recombinant cells and respiratory mutants along with karyotype changes.

There have been several reports on radiobiological aspects of induced genetic instability [17, 32], and we will not discuss them in this work. We will only emphasize that studies of this phenomenon showed radiation inactivation of cells and cascade mutagenesis to be caused by primary sublethal lesions. It was shown before that different manifestation of cell radiation damages (the form of survival curve; forms of inactivation; the effect of delayed appearance of clones from irradiated cells, etc.) are described by the probability model [16, 17]. In this model, single irradiated cells are damaged in a random fashion in accordance with the hit principle (as in classical radiobiological models) and the number of damages defines the probability P for the successful division which depends on environmental conditions. In other words, the model is based on the supposition that clone formation is a probable process and the probability for the successful division of cell is determined by a number of primary radiation damages, i.e. this

model is a peculiar synthesis of hit-and-target principles and biological stochastics. We may suppose that cells which were not damaged generate normal clones, like control cell do. Upon mitotic division of cells having a number of primary sublethal lesions, unstable clones are formed, for which cascade mutagenesis is typical, as shown by the results of our experiments presented in this paper. The instability will be the higher the more number of primary sublethal lesions is in the cell surviving after irradiation.

The major class of DNA primary lethal lesions is double-strand breaks (DSB) [33, 34]. It is well known that one-strand DNA breaks and some other DNA lesions are rapidly repaired and do not affect the viability of eukaryotic cells with normal repair systems. The process of diploid cell postradiation recovery, which is controlled by specific genetic systems, such as *RAD51*, *RAD52*, etc., is directed toward DSB elimination. Thus, nonrepaired DSB are the major lethal factor, both in G1 of haploid cells that are unable to eliminate DSB and in diploid cells [33, 34]. Diploid cells that had received a number of DSB during irradiation and had not repaired them are able, with a certain probability, to form mitotic progeny inheriting primary sublethal lesions. It is obvious that DSB in itself cannot be inherited. However, one of the two chromosomal fragments that were formed as a result of DSB, which possessed the centromere, may be transmitted to daughter cells as a nontelomeric chromosome. As shown by Sandell and Zakian [35], the presence of a nontelomeric chromosome drastically increases chromosomal instability of *S. cerevisiae*. In general, the elimination of a telomere has a destabilizing effect on the mitotic apparatus in eukaryotes [36, 37]. Exactly these telomereless chromosomes in a diploid cell probably are sublethal lesions. It was mentioned in some works [38–40] that nonrepaired DSB specify chromosomal aberrations. Thus, DSB and subsequent chromosome fragmentation probably are the main reason of cascade mutagenesis, although it is not excluded that monosomy as well as less frequently occurring translocations, inversions, deletions and insertions can lead to a similar effect.

It is worth emphasizing that chromosomal instability produced by a single irradiation and continuing during a number of cell generations was first investigated by genetic method by McClintock [41–43]. She described for maize two types of long-term and repeating cycles of chromosomal damages. A long-term conservation of chromosome bridges was described for tail epithelium in Axolotl [44] and in sexual gland cells of irradiated monkey [45].

Later such a phenomenon was described by Prokofjeva-Belgovskaya [46] after radiation damage in chromosomes at early stages of development of salmo salar. In accordance with her data, after a single irradiation of salmon blastomere some chromosomal damages were discovered for eight days of embryo development, i.e., during 12–15 cell generations. It was also established that at this period more than 70% anaphase and telophase contained chromosomes with bridges and fragments. The number of cells with chromosome aberration in mitosis in the successive stage of embryo development was varied with the tendency towards to the increasing, the modification of chromosome damages taking place in the successive cell generations so that both chromosome and chromatid bridges and fragments of various size as well as three- or four-polar mitosis could be observed in different cells. Similar cases have been described for breakage-fusion in maize endosperm [47].

Prokofjeva-Belgovskaya [46] ascertained that besides cycles of chromosome and chromatid bridges which were described by McClintock [41–43] some additional chromosomal breakage can arise in irradiated cells during their propagation which can be accompanied by the appearance of new bridges with fragments or separate fragments. As was pointed out by Prokofjeva-Belgovskaya [46], their appearance could be related with metabolism disturbance of irradiated cells. Such a «spontaneous» appearance of chromosomal aberrations resulting from cell metabolism disturbance was observed under modification of developing conditions [48], under hybridization [49] and in tumor cells [50].

In this relation it is of interest to mention the paper [51] devoted to the population dynamics in a cell culture of Chinese hamster and based on a comparison of karyotypes (chromosome number and size) with DNA content in individual cells. Analysis of different clonal populations allowed one to assume that chromosomal rearrangement permanently occurred in cells. As a result, all possible variants of rearrangements are realized during several mitotic divisions, virtually irrespective of the initial cell karyotype. Note that many randomly localized rearrangements are proved to be incompatible with cell reproductive stability and are eliminated from the population [30]. On the contrary, rearrangements which are maintained in the population have the nonrandom nature. These observations agree well with the dynamics of race formation in yeast cells [52].

Ionizing radiation is not the only factor that induces unstable clones and cascade mutagenesis. In diploid yeasts of various species, unstable clones can be spontaneously generated with a frequency of 10^{-2} to 10^{-3} . As a rule, unstable clones is a fraction (much up to 1%) of slowly growing colonies in a plating of irradiated diploid cells. The unstable clone yield may also be induced due to cell exposure to both ionizing- and UV-radiation, after heat shock, treatment with caffeine, heavy metal salts, etc. [26, 28]. Hence, the cascade mutagenesis may be triggered by different DNA-tropic agents.

One of the important peculiarities of the cascade mutagenesis is a prolonged maintenance of genetic instability in a succession of cell generations. As can be seen from the data presented above (Fig. 11), aberrant chromosomes can be maintained in the progeny for a fairly long time, during hundreds of cell generations, permanently inducing chromosomal instability. Universality of the cascade mutagenesis as a phenomenon that is typical for diploid cells of various eukaryotes, is the most significant factor.

All these findings allow one to consider the cascade mutagenesis as one of the most important mechanisms of hereditary alteration, greatly affecting genetic processes and capable of inducing significant changes in the reproductive apparatus of eukaryotic cells.

REFERENCES

1. *Nadson G.A.* On the action of radium on yeast mushrooms in terms of the problem of radium action on living material // *Vestn. Rentgenol. Radiol.* 1920. Vol. 1. P. 45–137.
2. *Nadson G.A., Filippov G.S.* Influence des rayons X sur la sexualite et la formation des mutantes chez les champignons infe'rieurs (Mucoriné es) // *C.r. Soc. Biol.* 1925. Vol. 93. P. 473–475.
3. *Nadson G.A., Filippov G.S.* De la formation de nouvelles races stables chez les champignons infe'rieurs sous l'influence des rayons X-rays // *Ibid.* 1928. Vol. 186. P. 1566–1568.

4. Nadson G.A., Filippov G.S. Formation of new resistant races of microorganisms under the action of X-rays. Radioraces of *Sporobolomyces* // Vestn. Rentgenol. Radiol. 1932. Vol. 10. P. 275–299.
5. Filippov G.S. Formation of new resistant races of *Torulopsis glutinis* (*Tolula glutinis*) under the action of X-rays // Ibid. P. 512–517.
6. Lacassagne A., Schoen M., Beraud P. Contribution à l'étude des radioraces de levures. II. Caractères physiologiques de quelques radio-races d'une levure de vin // Ann. Fermentations. 1939. Vol. 5. P. 129–152.
7. Korogodin V.I. Some growth regularities of yeast cell macrocolonies after irradiation // Biophysica. 1957. Vol. 2. P. 178–186.
8. Tolstorukov I.I., Dutova T.A., Benevolensky S.V., Soom Ya.O. Hybridization and genetic analysis of methanol-utilizing yeast *Pichia pinus* MH4 // Russ. J. Genet. 1977. Vol. 13. P. 322–329.
9. Tolstorukov I.I. Genomic structure and reidentification of taxonomic status of *Pichia pinus* MH4 genetic lines // Ibid. 1994. Vol. 30. P. 1–6.
10. Ogur H., John R., Nagai S. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast // Science. 1957. Vol. 125. P. 928–931.
11. Korogodin V.I. Inactivation types of yeast cells after ionizing irradiation // Biophysica. 1958. Vol. 3. P. 206–214.
12. Schwartz D.H., Cantor C.R. Cantor separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // Cell. 1984. Vol. 37. P. 67–75.
13. Tsyb T.S. Structure analysis of distant progeny of yeast cells irradiated by ⁶⁰Co γ-rays // Radiation and organism / Ed. A.F. Tsyb. Obninsk, 1979. P. 50–53.
14. Korogodin V.I., Bliznik K.M. Radioraces of diploid yeasts *Saccharomyces ellipsoides* // Radiobiologiya. 1972. Vol. 12. P. 163–170.
15. Korogodin V.I. Karyotaxons, genome reliability and progressive biological evolution // Priroda. 1985. Vol. 2. P. 3–14.
16. Kapultsevich Yu.G., Petin V.G. Probability model for cell responses to irradiation // Stud. Biophys. 1977. Vol. 62. P. 151–165.
17. Kapultsevich Yu.G. Quantitative regularities of cell radiation lesions. Moscow: Atomizdat, 1978.
18. Tobias C.A. The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss // Symposium on radiobiology: The basic aspects of radiation effects on living systems / Ed. J.J. Nickson. N.Y.: Wiley, 1952. P. 357–392.
19. Korogodin V.I. Some regularities in the post-irradiation alterations of resting yeast cells, Biophysica. 1958. Vol. 3. P. 703–710.
20. Korogodin V.I., Kapultsevich Yu.G., Myasnik M.N. et al. Cellular repair processes: survival of irradiated yeast, bacteria, and phages under different postradiation conditions // Adv. Biol. Med. Phys. 1968. Vol. 12. P. 253–274.
21. Korogodin V.I. Problems of postirradiation recovery. Moscow: Atomizdat, 1966.
22. Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultsevich Yu.G., Petin V.G. On some regularities in distribution of hereditary variations in clones grown from irradiated cells // Radiobiologiya. 1977. Vol. 17. P. 27–30.
23. Korogodin V.I., Gudkova N.K., Bliznik K.M. Recessive lethal mutations and their role in radiation inactivation of yeast cells // Ibid. 1978. Vol. 18. P. 516–528.
24. Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajszki Cz. et al. On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes // Yeast. 1991. Vol. 7. P. 105–117.
25. Tolstorukov I.I., Efremov B.D. Genetic mapping of the yeast *Pichia pinus*. II. Mapping by tetrad analysis // Russ. J. Genet. 1984. Vol. 20. P. 880–887.
26. Tolstorukov I.I., Bliznik K.M., Korogodin V.I. Mitotic instability of diploid cells of the yeast *Pichia pinus*. I. Spontaneous segregation // Ibid. 1979. Vol. 15. P. 1436–1443.
27. Tolstorukov I.I., Bliznik K.M., Korogodin V.I. Mitotic instability of diploid cells of the yeast *Pichia pinus*. II. Segregation induced by gamma-irradiation // Ibid. 1982. Vol. 18. P. 1276–1282.
28. Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultsevich Yu.G. et al. The role of cell ploidy and radiosensitivity: (Experiments on yeast organisms of different species and genotypes) // Radiobiologiya. 1977. Vol. 17. P. 700–710.

29. Auerbach C. The induction by mustard gas of chromosomal instabilities in *Drosophila melanogaster* // Proc. Roy. Soc. Edinburgh B. 1947. Vol. 62. P. 307–320.
30. Auerbach C. Mutation research. L.: Chapman and Hall, 1967.
31. Kurennaya O.N., Devin A.B. On nature and specificity of replicating instability in fission yeast // Curr. Genet. 1985. Vol. 10. P. 291–296.
32. Korogodin V.I. The study of post-irradiation recovery of yeast: the premolecular period // Mutat. Res. 1993. Vol. 289. P. 17–26.
33. Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V. Repair of double-strand breaks requires two homologous duplexes // Mol. Biol. Rep. 1977. Vol. 3. P. 437–442.
34. Frankenberg-Schwager M., Frankenberg D., Blöcher D. et al. The role of irreparable and misrepaired double-strand breaks for the inactivation of yeast cells by sparsely and densely ionizing radiation // Radiation protection: Proc. 8th Symp. on microdosimetry / Ed. J. Booz // H.G. Ebert. Luxemburg: Commiss. of Europ. Communities, 1983. P. 373–381.
35. Sandell L.L., Zakian V.A. Loss of yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss // Cell. 1993. Vol. 75. P. 729–739.
36. Levis R.W. Viable deletions of a telomere from *Drosophila* chromosome // Ibid. 1989. Vol. 58. P. 791–801.
37. Runge K.W., Wellinger R.J., Zakian V.A. Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates // Mol. Cell. Biol. 1991. Vol. 11. P. 2919–2928.
38. Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Blöcher D., Harbich R. Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely and densely ionizing radiation under oxic or anoxic condition // Radiat. Res. 1981. Vol. 88. P. 524–532.
39. Perera D.R., Glasunov A.V., Glaser V.M., Boreiko A.V. Repair of double strand breaks in plasmid DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Genet. 1988. Vol. 213. P. 421–424.
40. Glasunov A.V., Glaser V.M., Kapultsevich Yu.G. Two pathways of DNA double-strand break repair in G1 cells of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 1989. Vol. 5. P. 131–139.
41. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes // Genetics. 1938. Vol. 23. P. 315–376.
42. McClintock B. The behavior of successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1939. Vol. 25. P. 405–416.
43. McClintock B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion // Ibid. 1942. Vol. 28. P. 458–463.
44. Dalton H.C., Hall J. Generation in Axolotl // Carnegie Inst. Wash. Yb. 1949–1950. Vol. 49. P. 181–188.
45. Tinyakov G.G., Arsenjeva M.A. The peculiarities of ionizing radiation exposure of nuclear apparatus of male monkey sexual cells // Dokl. Acad. Nauk SSSR. 1958. Vol. 122. P. 589–592.
46. Prokofjeva-Belgovskaya A.A. Radiation damage in chromosomes at early stages of development of *salmo salar* // Cytologiya. 1961. Vol. 3. P. 437–445.
47. Schwartz D., Murray S.B. A cytological study of breakage-fusion // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1956. Vol. 28. P. 458–463.
48. Darlington H.C., Upcott M.B. Spontaneous chromosome change // J. Genet. 1941. Vol. 41. P. 297–338.
49. Swärdson G. Chromosome studies on *Salmonidel* // Medd. Stat und Försöksanst. Sötvatt. Fisk. 1945. Bd. 23. S. 1–151.
50. Koller P.G. Dicentric chromosomes in arat tumor // J. Hered. 1953. Vol. 6, supplement: Symp. on chromosome breakage. P. 181–196.
51. Filatov M.V., Koltovanova L.V., Stepanenko A.N. et al. Reproductive instability of chromosomes of Chinese hamster original cell line, registered by means of flowing cytometry // Cytologiya. 1988. Vol. 30. P. 999–1006.
52. Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultsevich Yu.G. Models of race formation // Radiobiologiya. 1972. Vol. 12. P. 416–424.

Глава 3

КАРИОТАКСОНЫ И НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА КАК КРИТЕРИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

К концу 70-х годов В.И. Корогодиным и его коллегами из Обнинска и Москвы были завершены исследования по восстановлению клеток и нестабильности генома, и Владимир Иванович обратился к проблеме надежности генома. Впервые эта проблема была сформулирована в докладе Корогодина «Некоторые генетические аспекты надежности клеток» на Ученом совете Объединенного института ядерных исследований (Дубна), после которого в дирекции был подписан приказ об организации в ОИЯИ Сектора биологических исследований под его руководством (1.04.1977). Корогодин переехал в Дубну, а проблема надежности генома стала ведущим направлением исследований в секторе [1].

Представления о надежности как фундаментальном свойстве биологических объектов формировались давно. И.И. Шмальгаузен видел надежность в избыточности и малой специфичности реагирующих веществ и отмечал связь прогрессивной эволюции с повышением надежности генетических процессов [2]. В развитие представлений о надежности биологических систем значительный вклад внесли А.С. Серебровский [3], М. Эйген [4], А. Сперроу [5]. В 1977 г. и позже АН УССР и Институтом физиологии растений были организованы конференции «Надежность клеток и тканей» (г. Канев), в которых принимали активное участие Д.М. Гродзинский, Ю.А. Кутлахмедов, В.Д. Жестяников, А.В. Савич, М.И. Шальнов, Е.Б. Бурлакова, Н.Ф. Батыгин, И.Н. Гудков.

В.И. Корогодин был активным участником такой конференции в 1979 г. Он с соавторами представил три доклада [6–8], в которых определил надежность биологических систем как устойчивое и эффективное их функционирование в меняющихся условиях среды и во времени. В докладах была сформулирована гипотеза о преобразовании набора ферментов гаплонтов, использующих во время диплофазы двойной набор хромосом для репарации ДНК, в систему диплоид-специфической репарации, активной во время вегетативной фазы одноклеточных эукариот. Это генетическое событие имело двойное значение: повысилась надежность генома и увеличилась частота жизнеспособных хромосомных мутаций. Корогодин впервые применил в биологии античный принцип поризма для определения перехода решаемой природой в ходе борьбы за существование частной задачи в разряд общей эволюционно значимой. Накопление каких-либо свойств клетками и переход на этой основе к более крупным функциональным изменениям (принцип поризма) наблюдается достаточно часто. Иллюстрацией поризма может служить образование нового эволюционно важного свойства, так называемой «ампликонной памяти» [9], возникающей на основе длительных модификаций устойчивости.

Прогрессивное развитие организмов связано с увеличением в клетках количества ДНК [10]. Радиационные генетики заметили связь радиочувствительности клеток D_0 с количеством ДНК в ядре [11, 12] и неслучайное разбиение организмов на «радиотаксоны» (термин предложен А. Сперроу [5]). Пользуясь методологией радиационной генетики, Корогодина в статьях [13, 14] ввел понятие удельной надежности генома как количества поглощенной энергии в ДНК, необходимого и достаточного для вызывания одного элементарного повреждения. Он показал, что все организмы можно разбить на группы («кариотаксоны») примерно с одинаковыми удельными надежностями генома, что соответствует их структурной организации. Далее он сделал вывод, что структура генома определяет надежность и накладывает ограничения на количество ДНК в клетке. Следовательно, надежность генома является самым ценным селективным свойством. В.И. Корогодина пришел к выводу, что переход из одной таксономической группы в другую возможен только в результате структурных перестроек генома. Поэтому хромосомные aberrации могут служить материалом для прогрессивной эволюции, а генные мутации только «пришлифовке» организма к экологической нише. Важную роль в эволюции он отвел феномену нестабильности генома.

Анализируя гипотезы Корогодина с позиций современной науки, можно сказать, что его вывод о происхождении диплоид-специфической репарации хорошо согласуется со взглядами эволюционистов на онтогенез как процесс, в котором дезинтеграция может вести к коренным преобразованиям [15]. Обнаружение в современных бактериях ахроматинового аппарата деления клеток и сходство фермента рекомбинации *RAD51* эукариот с RecA белком прокариот [16], связь нарушений споруляции диплоидов с мутациями в генах эпистатической группы *RAD52*, вызывающих подавление мейотической рекомбинации [17], – являются косвенным подтверждением гипотезы, что современная схема жизненного цикла диплоидов появилась после возникновения диплоид-специфической репарации.

Современные представления о роли мутаций в эволюции развивают тезис Корогодина о том, что роль мутации в эволюции зависит от ее типа. Роли мутаций структурных генов, мутаций регуляторных генов, а также хромосомных мутаций в эволюции различаются [18–20]. Исследования молекулярной эволюции, проводимые в Институте цитологии и генетики СО РАН Новосибирска [21], подтверждают вывод Корогодина о разном значении для эволюции ароморфозов и идиоадаптаций [13, 14]. Н.А. Колчанов с соавторами провели компьютерный анализ явления так называемой адаптивной молекулярной эволюции в случаях образования ароморфозов и показали, что крупные ароморфозы, описанные палеонтологами, совпадают с мутациями регуляторных генов в сигнальных каскадах [21]. Процесс ароморфоза позволяет кардинально перестроить онтогенез, а затем освоить за счет специализации новые экологические ниши. Из этих же работ следует, что надежность генома определяет вектор прогрессивной эволюции [21, 22].

Идеи радиотаксономии организмов с различной организацией генома получили развитие в работах Б.И. Сарапульцева и С.А. Гераськина [23]. Используя понятия радиотаксонов [5] и кариотаксонов [13], они показали последовательные этапы формирования иерархической системы надежности генетического аппарата клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И. Основные итоги выполнения программы «Геном». Доклад на «Рабочем совещании по выполнению программы «Геном», Дубна, 20–22 XI 1985. (Рукопись.)
2. Шмальгаузен И.И. Избранные труды. Т. 1. Пути и закономерности эволюционного процесса. Т. 2. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.: Наука, 1982.
3. Серебровский А.С. Гены *scute* и *achaete* у *Drosophila melanogaster* и гипотеза их дивергенции // ДАН СССР. 1938. Т. 19. Вып. 1/2. С. 77–81.
4. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. 216 с.
5. Sparrow A.H., Underbrink A. G., Sparrow R.C. // *Radiat. Res.*, 1967. Vol. 32. P. 915.
6. Гродзинский Д.М., Корогодин В.И., Кутлахмедов Ю.А. Принципы анализа надежности биологических систем // Надежность клеток и тканей. Киев: Наукова думка, 1980. С. 19–26.
7. Толсторуков И.И., Корогодин В.И., Близник К.М. Хромосомная нестабильность, индуцированная гамма-лучами у диплоидных дрожжей *Pichia pinus* // Там же. С. 81–86.
8. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. и др. Некоторые аспекты проблемы надежности клеток и эволюции геномов // Там же. С. 124–136.
9. Голубовский М.Д. Неканонические наследственные изменения // *Природа*. 2001. № 8–9.
10. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973.
11. Dertinger H., Yung H. *Molecular Strahlenbiologie*. Berlin etc.: Springer-Verlag, 1969.
12. Савич А.В., Шальное М.И. // Системы надежности клетки. Киев: Наукова думка, 1977. С. 46–55.
13. Корогодин В.И. Радиотаксоны и надежность генома. (Памяти М.И. Шальнова) // *Радиобиология*. 1982. Т. 22, № 2. С. 147–154.
14. Корогодин В.И. Кариотаксоны, надежность генома и прогрессивная биологическая эволюция // *Природа*. 1985. № 2. С. 3–14.
15. Корочкин Л.И. Онтогенез, эволюция и гены // *Природа*. 2002. Т. 7.
16. Bogdanov Yu.F. Variation and evolution of meiosis // *Russian J. of Genetics*. 2003. 39, N 4. P. 363–381.
17. Иванов Е.Л. Структура и функции генов, контролирующих репарацию ДНК у дрожжей // *Генетика*. 1989. Т. 25, № 2. С. 197–206.
18. Инге-Вецтомов С.Г. *Генетика с основами селекции*. М.: Высшая школа, 1989. 592 с.
19. Федорова Н.Б., Хоцкина Е.А., Митренина Е.Ю., Чадов Б.Ф. Хромосомная перестройка и видообразование: объяснение связи между событиями // *Эволюционная биология / Под ред. В.Н. Стегния*. Томск: Томск. гос. ун-т. 2005. Т. 3. С. 107–120.
20. Кэрролл С.Б. Эволюция на двух уровнях. О генах и формах // *Вестник ВОГиС*. 2007. Т. 11, № 2. С. 401–415.
21. Гунбин К.В., Суслов В.В., Колчанов Н.А. Ароморфозы и адаптивная молекулярная эволюция // Там же. С. 373–400.
22. Колчанов Н.А., Суслов В.В., Шумный В.К. Молекулярная эволюция генетических систем // *Палеонтол. журн*. 2003. № 6. С. 58–71.
23. Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Энергоатомиздат, 1993. 209 с.

ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА НАДЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

ПРИНЦИП ВЫСОКОЙ НАДЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Надежность – это фундаментальное свойство биологических объектов, определяющее устойчивое и эффективное их функционирование в случайно варьирующих условиях среды и во времени. Биологические системы обла-

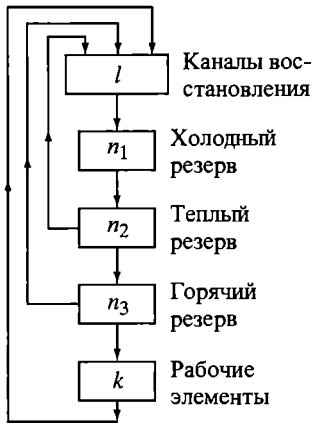


Рис. 1. Граф структуры высоконадежной системы

дают множеством функций, среди которых можно выделить функции, определяющие жизнеспособность. Под влиянием различных условий могут происходить отказы по каждой из основных функций. Отказом по функции будем называть такое состояние биологического объекта, когда эффективность его функционирования падает ниже порогового уровня (например, 50% оптимального значения эффективности функции). В биологической системе все функции взаимосвязаны. Отказом биологического объекта предлагается считать состояние, когда более половины его основных функций находятся в состоянии отказа. При этом остальные функции могут эффективно выполняться.

Надежность любой сложной системы может быть обеспечена либо чрезвычайно надежными элементами ($P - \text{надежность} = 1$), либо специальными системами обеспечения надежности, системами восстановления и резервирования. В целом биологическую систему можно определить как высоконадежную систему, построенную из малонадежных элементов [1]. Принимая за меру надежности среднее время безотказной работы, можно считать, что надежность элементов биосистемы (клеток, макромолекул) значительно ниже надежности системы. Это говорит о том, что высокая надежность биологических объектов не может полностью определяться надежностью элементов, а существенно зависит от работы систем, обеспечивающих надежность, – систем восстановления и резервирования.

Восстановление может состоять в ремонте и замене отказавшего элемента на исправный, с последующим восстановлением отказывающего элемента и использованием его в качестве резервного. На рис. 1 представлена схема функционирования высоконадежной системы, обладающей высокоэффективными каналами восстановления [2] и разнообразными типами резервов. Вторым методом обеспечения надежности системы, кроме восстановления, является введение избыточности – резервирование. Резервирование – введение в систему избыточных элементов, или подсистем, находящихся в различных режимах функционирования – ненагруженном (холодном), малонагруженном (теплом) и нагруженном (горячем) состоянии – резерве (см. рис. 1) [2].

В зависимости от режима работы с той или иной скоростью резервные элементы вступают в функционирование взамен отказавших рабочих элементов. Кроме структурного резервирования, различают и другие типы резервирования. Временное резервирование – метод повышения надежности объекта, предусматривающий использование избыточной информации. Функциональное резервирование – использование способности элементов выполнять дополнительные функции и т. д.

Надежность технической системы может быть определена на уровне проектирования путем создания более или менее удачной схемы, оптимально использующей различные типы восстановления и резервирования. Техническим системам свойственна одна важная закономерность, где схемы выбира-

ются таким образом, чтобы элементы длительного использования восстанавливались, а элементы кратковременного использования резервировались.

Существенное отличие, с которым мы встречаемся при анализе надежности биосистем по сравнению с техническими, это то, что структура системы является неизвестной или малоизвестной. Вопрос об организации системы, методах и способах обеспечения высокой надежности требует анализа и выяснения. Если бы мы знали структуру системы, принципы и характеристики систем обеспечения надежности, то вопрос о надежности биосистемы представлял бы только вычислительные трудности.

Основанием для развития теории надежности применительно к биологическим объектам является возможность с помощью идей и методов данной теории с достаточной эвристичностью изучать структуру биосистем и способы обеспечения надежности, заложенные в их структуре.

Для технических систем мы можем перечислить ряд внешних и внутренних факторов, вызывающих отказы, и определить надежность системы в этих условиях. Отличие биологических систем от технических состоит в этом плане в том, что внутренние и внешние факторы, вызывающие отказы, полностью неизвестны, не ясно место их воздействия и механизм формирования отказов от каждого из факторов. Другое отличие состоит в том, что в технике почти все внешние воздействия могут быть предусмотрены и можно проводить испытания на надежность к любому из факторов. В случае же биологических систем не все внешние факторы, вызывающие отказы, могут быть предусмотрены. Особенно трудно предусмотреть время и уровень воздействия экстремальных факторов среды, а также комбинацию воздействующих факторов. Важной характеристикой, которую можно получить при анализе надежности биосистемы, являются прогноз поведения данного объекта в неизвестных заранее условиях среды на основе знания структуры системы обеспечения надежности и классификация действующих факторов по реакции на них систем надежности. Здесь проявляется действие принципа фундаментальности характеристики надежности биосистемы, состоящее в данном случае в том, что место возникновения отказа, тип отказа, способы его устранения и реализации определяются не только первично воздействующим фактором, а в первую очередь структурой, устройством системы, т. е. свойствами, сформированными и закрепленными в процессе эволюции.

ПРИНЦИП ИЕРАРХИЧНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Любая биологическая система по своей структуре является системой иерархической [3]. Что же означает иерархичность биосистемы в плане ее надежности? Рассматривая простейшую иерархическую систему из n уровней, нетрудно показать, что система с иерархическим принципом организации структуры заметно надежнее, чем другие типы структур (автономного и прочего типа). Рассматривая граф иерархической системы снизу (рис. 2), можно проследить судьбу отказа, возникшего на нижнем уровне иерархии.

Если вероятность отказа элементов нижнего уровня иерархии составляет величину P_1 , то можно определить надежность элементов второго уровня иерархии.

Пусть элементы первого уровня – a_1, a_2, a_3 некоторым образом формируют элемент второго уровня иерархии – b_1 . В самом худшем случае последова-

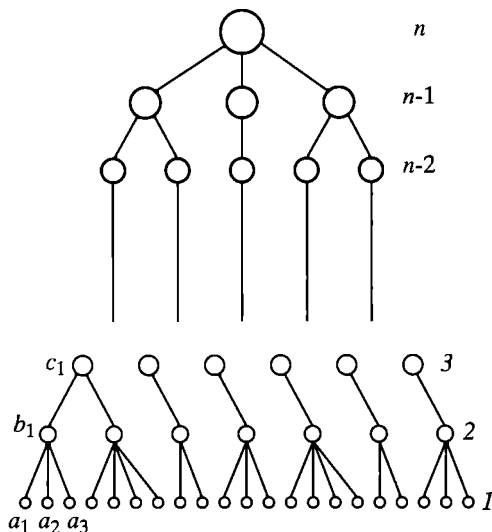


Рис. 2. Схема иерархической структуры системы из n уровней

структура системы допускала необходимое резервирование и восстановление элементов. Исходя из иерархического принципа, можно сделать вывод о том, что чем элементарнее, ниже уровень иерархии, на котором происходят первичные отказы, тем выше надежность иерархической системы. При повреждениях, возникающих в элементах высоко лежащих уровней иерархии, надежность системы заметно снижается вследствие утраты преимуществ иерархической организации. Это важное преимущество иерархических систем широко используется в структурах биологических объектов. Следует отметить, что факторы среды оказывают воздействие на биосистему на элементарных нижних уровнях иерархии (на молекулярном и атомном), так как рецепторами, воспринимающими энергию внешнего воздействия, являются атомы и молекулы, т.е. чем выше уровень иерархии, где находится рецептор на данное внешнее воздействие, тем ниже надежность системы при всех прочих равных условиях.

Изотропность элементов одного уровня иерархии, выполняющих одинаковую функцию, обеспечивается действием и широким использованием в биосистемах матричного принципа. Матричный принцип представляет собой построение структур, несущих большой объем информации, осуществляется он с помощью расположения элементарных единиц данной структуры на матрице и дальнейшего их синтеза [4].

Принцип иерархичности в осуществлении репродуктивной функции подробно проанализирован Н.В. Лучником [4] и сформулирован в виде эстафетного принципа, по которому «воспроизведение сложных образований, построенных из большого числа идентичных (или сходных) структур, осуществляется путем передачи репродуктивной функции лишь одной из новообразованных структур. Этот принцип касается связи между различными уровнями организации живых организмов, другими словами, формулирует закон, по которому соответствующие структуры строятся из структур низшего порядка. Сложные организмы строятся иерархически, причем после-

дельного соединения элементов a , при образовании элемента b_1 , когда отказ любого из элементов a однозначно вызывает отказ элемента b_1 , надежность элементов второго уровня $P_2 = P_1$. При всех других схемах образования элемента b_1 из элементов a надежность элемента b будет выше надежности элемента первого уровня a . Проведя подобный анализ для всех уровней иерархической системы, можно видеть, что чем большее число уровней и элементов на этих уровнях образуют систему, тем выше ее надежность. Отсюда следует, что при заданной надежности системы, чем сложнее, иерархичнее организована система, тем ниже требования к надежности элементов нижележащих уровней ее иерархии. При этом важно, чтобы

Иерархическая схема репродуктивной функции [4]

Структурный уровень	Число единиц предыдущего	Способность к воспроизведению	Структурный уровень	Число единиц предыдущего	Способность к воспроизведению
Нуклеотид	–	–	Хромосома	2	Да
Полинуклеотид	Много	Нет	Геном	Много	Нет
ДНК	2	Да	Клетка	2	Да
Фибрилла	Много	?	Организм	Много	Нет
Хромонема	2	?	Пара раз-	2	Да
Хроматида	Много	Нет?	дельнополых организмов		

довательные уровни строятся поочередно то из двух, то из многих элементов предыдущего уровня» [4]. К схеме репродуктивной функции (таблица) [4] вполне применим анализ, который мы провели выше по надежности иерархических систем. Проявление эстафетного принципа может означать, что из множества элементов одного уровня функционирует и может передать свой отказ только один из элементов. Если таким элементом является случайно избранный из двух или множества элементов, то система является более надежной, чем система с заранее выбранным элементом эстафеты, так как вероятность отказа конкретно выбранного элемента составляет P , а вероятность отказа случайно выбранного из M элементов равна P/M , т.е. в M раз меньше. Можно также предположить, что вероятность использования данного элемента в эстафете снижается в случае его отказа на некоторую величину.

ПРИНЦИП ФУНДАМЕНТАЛЬНОСТИ НАДЕЖНОСТИ БИОСИСТЕМ

Каждый биологический объект или система занимает определенное место в иерархии ниже- и вышележащих уровней биологической организации. Каждый из уровней биоиерархии состоит из элементов – подсистем, включающих в себя элементы нижележащих уровней (рис. 3). Каждый биологический объект является элементом соответствующего уровня иерархии со свойственными ему функциями. Сравнение надежности биологических объектов следует, видимо, проводить между элементами одного уровня иерархии по соответствующей мере. На каждом из уровней иерархии определяются их основные функции, отказы функций и элементов.

В соответствии с характером основных функций биологического объекта, исследуемого на конкретном уровне биоиерархии, определяется соответствующая мера надежности. Поскольку элементам различных уровней биоиерархии свойственны разные основные функции, то и меры надежности различны. При сравнении двух экосистем можно предположить, что более надежной является та, которая имеет большую размерность пространства варьируемых факторов. Такое свойство экосистемы может обеспечить ей более надежное и эффективное функционирование в случайно изменяющихся условиях внешней среды и во времени. В качестве безразмерной численной меры надежности экосистемы можно предложить отношение размерности данной экосистемы к общему числу экологических факторов, свойственных

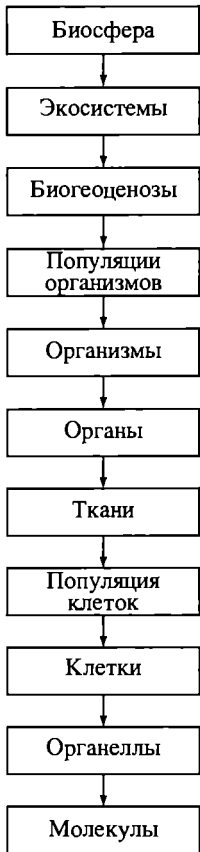


Рис. 3. Иерархическая структура биологических систем от молекул до биосферы

биосфере. На уровне биогеоценозов можно оценивать их надежность по количеству видов, находящихся в состоянии высокоэффективного функционирования к общему числу видов в биогеоценозе. Надежность популяции организмов можно определить через отношение объема оптимальной зоны экологической ниши к объему всей экологической ниши, определяющей пределы выносливости вида.

Таким образом, можно получить оценку надежности элемента на каждом уровне биоиерархии, последовательно умножая соответствующие количественные меры надежности, свойственные элементам всех вышележащих уровней иерархии. Этот метод позволяет сделать априорную оценку надежности организмов различных видов, принадлежащих различным популяциям, биогеоценозам и экосистемам. Наличие характеристики надежности биологического объекта дает возможность прогнозировать надежность данной системы в самых разнообразных случайно возникающих условиях среды, не имея данных о структуре самой системы, только на основании оценок надежности элементов вышележащих уровней биоиерархии.

Из всего сказанного вытекает принцип фундаментальности свойства надежности биологических систем. Надежность биосистемы в условиях нормальных и экстремальных воздействий определяется свойствами системы: надежностью элементов, типом и характером организации структуры системы, функционированием заложенных в ней систем обеспечения надежности, сформированных в свою очередь в ходе эволюции организма и зависящих от положения системы в общей биологической иерархии, которая определяет и формирует фундаментальные свойства биосистемы.

Надежность биологических систем проявляется в условиях нормального функционирования и обеспечивает его. Можно полагать, что данные условия среды стали нормальными благодаря системам обеспечения надежности, которые были сформированы на предшествующих этапах эволюции данного биологического объекта. Кроме нормальных условий функционирования на систему могут оказывать и оказывают воздействие различные экстремальные факторы среды. В биологии это явление получило название устойчивости биологических объектов к различным внешним экстремальным воздействиям. Результат любого экстремального внешнего воздействия можно представить как повышение частоты и интенсивности отказов во всех или отдельных элементах системы. «Устойчивостью» будем называть форму проявления надежности в конкретных условиях и ситуациях. Понятие «надежности» носит фундаментальный характер, а понятие «устойчивости» – прикладной. С надежностью биологических систем непосредственно связано свойство адаптации. В данной работе мы не будем обсуждать проблему адаптации, поскольку этот вопрос требует специального и детального рассмотрения.

ИСПЫТАНИЕ НАДЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

При исследовании надежности биологических систем особые требования предъявляются к методам и схемам испытания биологических объектов. Если мы ограничимся задачей сравнения надежности двух биологических объектов в конкретных условиях среды, то подобная задача сравнительно легко решается. Проводятся испытания надежности двух объектов и фиксируются отказы системы. В результате такого сравнительного испытания могут быть получены необходимые параметры надежности объектов, среди которых выделяются наиболее устойчивые в данных конкретных условиях испытания. Основное условие к испытанию – с помощью соответствующих схем и методов провести анализ структуры самой системы и анализ системы обеспечения ее надежности. Для целей подобного фундаментального подхода к изучению биологического объекта необходимы специальные «анализирующие» схемы и методы испытания, которые позволяют получать глубокие сведения о работе системы и о функционировании ее систем надежности. Эти вопросы будут обсуждаться в специальной работе [5].

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАДЕЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Допустим, что нам удалось за счет подбора схемы испытания оценить основные характеристики систем надежности, т.е. оценить надежность элементов системы, определить возможное количество и типы систем восстановления элементов, оценить характеристики и принципы работы различных систем резервирования, их кратности, скорости включения, режимы работы, взаимодействие, число каналов восстановления и пр. Все это получить довольно трудно, но если нам это удалось, это еще не означает, что задача исследования надежности биосистемы решена. Известно из теории [6, 7], что система заданной надежности из заданного числа элементов с заданными характеристиками и пр. может быть построена множеством способов. Неоднозначность – важное обстоятельство, которое может возникнуть при исследовании надежности биосистем. Другое важное обстоятельство, это то, что биологические системы сложны, а уровень экспериментальной возможности не позволит провести все необходимые схемы испытания. Такие особенности биосистем требуют самого широкого применения метода моделирования системы надежности биологического объекта. Методы моделирования могут быть различными, начиная с логического моделирования путем построения блок-схем функционирования систем обеспечения надежности организма и кончая математическим моделированием. Математическое моделирование может количественно описать весьма сложные системы.

Остановимся на том обстоятельстве, что задача математического моделирования в случае биологических систем существенно отличается от того, что применяется по отношению к техническим системам. Здесь математическое моделирование решает прямую задачу – определение параметров надежности той или иной системы. В биологии задача обратная. В математическое моделирование биосистем входит: построение математических моделей процессов или объекта с использованием данных, полученных в разнообразных специальных анализирующих испытаниях надежности биологических объектов, с использованием знаний о биологических особенностях объекта.

Построив такую модель первого приближения, можно рассчитать оценку параметров надежности объектов и сравнить ее с теми оценками, которые получены в соответствующих испытаниях. Если наблюдается хорошее соответствие, необходимо провести специальные испытания, позволяющие оценить параметры, которые были введены в модель априорно на основании теоретических предположений о структуре системы и особенностях ее функционирования. Хорошее совпадение значений этих параметров говорит в пользу правильности постулатов самой модели, т.е. может быть разработано несколько моделей, адекватно описывающих систему и ее надежность. Окончательная дискриминация моделей может быть проведена в ходе специального исследования. При этом проверяются расчетным путем состояние и надежность системы при различных экстремальных воздействиях, т.е. составляется теоретический прогноз на различных моделях устойчивости системы в особых экстремальных условиях. Эксперимент позволяет сравнить расчетные значения параметров с экспериментальными и тем самым произвести дискриминацию моделей. Варьируя типы и уровни внешнего воздействия и снова проводя сравнения теоретических и экспериментальных значений параметров, можно добиться желаемого соответствия между моделью и исследуемым объектом. Такая циклическая процедура моделирования и экспериментирования может, вероятно, позволить строить вполне адекватные и эвристические модели биологических объектов и их систем надежности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Нейман Дж.* Вероятностная логика и синтез надежных организмов из ненадежных компонент // Автоматы. М.: Изд-во иностр. лит., 1966. С. 243–248.
2. *Козлов Б., Ушаков И.* Справочник по расчету надежности аппаратуры радиоэлектроники и автоматики. М.: Сов. радио, 1975. 472 с.
3. *Коган А.Б., Наумов Н.П., Режабек В.Г., Чораян О.Г.* Биологическая кибернетика. М.: Высш. школа, 1972. 382 с.
4. *Лучник Н.В.* Биофизика цитогенетических поражений и генетический код. Л.: Медицина, 1968. 296 с.
5. *Кутлахмедов Ю.А.* Методы испытания надежности биологических систем // Надежность клеток и тканей. Киев: Наукова думка, 1980. С. 26–33.
6. *Базовский И.* Надежность. Теория и практика. М.: Мир, 1965. 374 с.
7. Системы надежности клетки / Под ред. Д.М. Гродзинского. Киев: Наукова думка, 1977. 168 с.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМ НАДЕЖНОСТИ КЛЕТОК И ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМОВ

Предварительные замечания. Как известно, по форме организации генетического материала живые организмы делятся на две большие группы – прокариоты, или доядерные, и эукариоты, или истинно ядерные. Большинство эукариот имеют хорошо развитый хромосомный аппарат, регулярный половой процесс и смену фаз жизненного цикла. Такие эукариоты, в свою очередь, делятся на гаплонтов и диплонтоты: у гаплонтов вегетативная фаза жизненного цикла представлена гаплоидными клетками, а у диплонтоты – диплоидными (рис. 1).

Первоначально в ходе эволюции эукариотов возникли, по-видимому, одноклеточные гаплонты; диплонт, вероятнее всего, произошел от гаплонтов в более поздние сроки. Все высшие растения и многоклеточные животные – диплонт. Именно диплоидность вегетативной фазы послужила тем фундаментом, на котором основывается прогрессивная эволюция эукариотов.

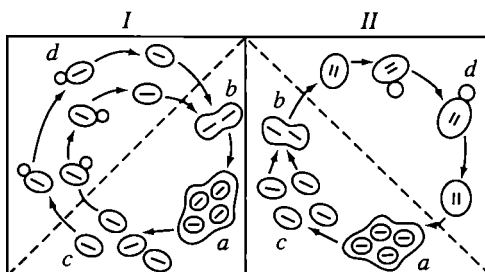


Рис. 1. Схема жизненных циклов гаплонтов и диплонта;

I – гаплонты, II – диплонт; a – аска, b – зигота, c – споры, d – вегетативные клетки

В дальнейшем, опираясь на результаты радиобиологических экспериментов, выполненных в нашей лаборатории¹, будут обсуждаться следующие вопросы: 1) как смогла осуществиться трансформация одноклеточных гаплонтов в диплонт и 2) какие особенности диплонта могли сыграть решающую роль в обеспечении прогрессивной эволюции?

РОЛЬ РЕПАРАЦИИ В ОБЕСПЕЧЕНИИ НАДЕЖНОСТИ КЛЕТКИ

Объекты и методики. Исходным материалом для проведения наших экспериментов служили предположения, что, во-первых, устойчивость клетки к воздействиям, повреждающим генетический аппарат, должна иметь существенную селективную ценность, во-вторых, что тестом на такую устойчивость может служить радиорезистентность.

В опытах использовали гаплоидные и диплоидные дрожжи разных видов; диплонт – *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces ellipsoideus*, гаплонт – *Pichia pinus*² и *Pichia guilliermondii*. Характеристики штаммов этих дрожжей, а также методы получения диплоидных культур дрожжей-гаплонтов описаны ранее [1, 2].

До и после облучения дрожжи культивировали на твердой питательной среде (сусло-агар или YEPD) при температуре 30 °С. Для облучения использовали культуры клеток, находящиеся в стационарной фазе роста.

Источником γ -лучей служили ⁶⁰Co (установка «Гаммаселл-220», мощность дозы 1 крад/мин) или ¹³⁷Cs (установка «Колос», мощность дозы 0,87 крад/мин). Облученные и необлученные клетки дрожжей высевали на питательную среду и подсчитывали число вырастающих колоний; на основании этих данных определяли «выживаемость» – процент клеток, не инактивированных облучением. В некоторых опытах отдельные колонии, вырос-

¹ Эксперименты были выполнены в лабораториях, которыми руководил В.И. Корогодин в НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск) и Всесоюзном НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва), где в основном были проведены исследования по восстановлению и хромосомной нестабильности клеток.

² *Pichia methanolica*. Реидентифицирован (И.И. Толсторуков // Генетика. 1994. Т. 30, № 5. С. 635–640).

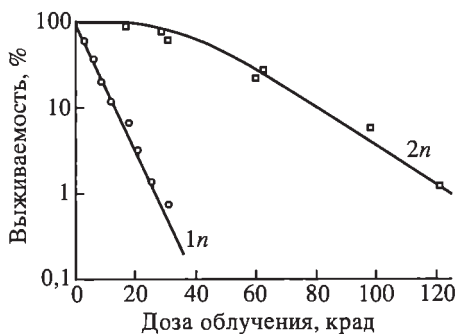


Рис. 2. Кривые выживания гаплоидных (1n) и диплоидных (2n) клеток дрожжей *S. cerevisiae* «дикого типа»

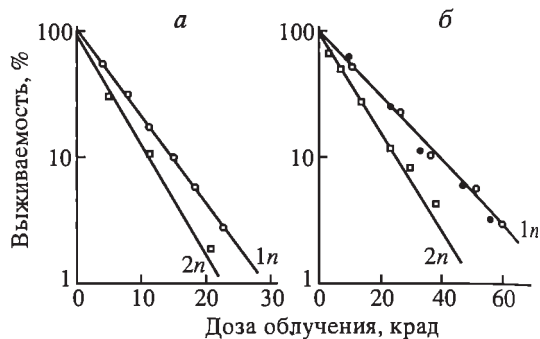


Рис. 3. Кривые выживания гаплоидных (1n) и диплоидных (2n) клеток дрожжей *P. pinus* (а) и *P. guilliermondii* (б) «дикого типа»

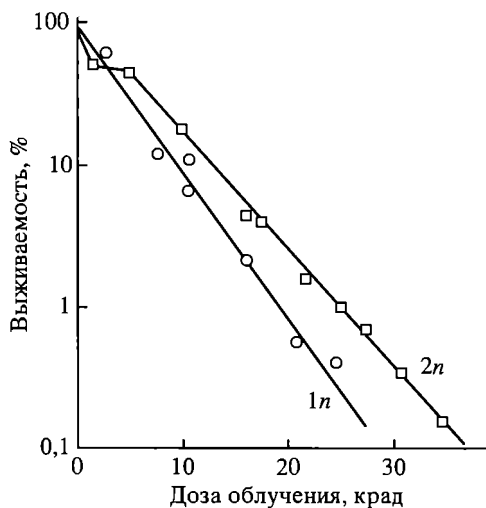
тающие из облученных или необлученных клеток, суспендировали в воде и вновь рассеивали на питательную среду; по морфологическим особенностям колоний, вырастающих в таких рассевах, судили о генетической гетерогенности клеток, составляющих исходные колонии.

Результаты экспериментов. На рис. 2 приведены кривые выживания гаплоидных и диплоидных дрожжей-диплонттов *S. cerevisiae*. Как и следовало ожидать, у этих дрожжей диплоидные клетки значительно радиорезистентнее гаплоидных. Традиционно это объясняется гибелью гаплоидных клеток и происходит за счет рецессивных и доминантных летальных мутаций, а диплоидных – только за счет доминантных. При этом на единицу дозы на один геном возникает рецессивных леталей значительно больше, чем доминантных [3]. «Дублирование кода наследственной информации», не допускающее проявления рецессивных леталей, обеспечивает, якобы, большую устойчивость диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными к повреждениям генетического аппарата. Селективная ценность этого свойства несомненна. Именно поэтому можно предположить, что у *S. cerevisiae* (и других диплонттов) в природных условиях доминирует диплоидная вегетативная фаза жизненного цикла.

Если диплоидные клетки и более устойчивы к повреждениям генетического аппарата, чем гаплоидные, то это только благодаря «дублированию кода наследственной информации», и это их свойство имеет селективную ценность, почему же тогда в природе существует много видов дрожжей-гаплонттов? На рис. 3 приведены кривые выживания гаплоидных и диплоидных клеток дрожжей-гаплонттов, откуда видно, что у них радиорезистентные не диплоидные, а гаплоидные клетки. Так, у *P. guilliermondii* гаплоидные клетки почти в два раза устойчивее к облучению, чем диплоидные.

Если устойчивость генетического аппарата к повреждениям имеет селективную ценность, большая радиорезистентность гаплоидных клеток по сравнению с диплоидными у дрожжей-гаплонттов хорошо согласуется с тем, что в природных условиях у них доминирует гаплоидная вегетативная фаза. Кривые выживания дают основание по-иному трактовать традиционное объяснение большей радиорезистентности диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными у дрожжей-диплонттов.

Рис. 4. Кривые выживания гаплоидных ($1n$) и диплоидных ($2n$) клеток дрожжей *S. cerevisiae*, несущих мутацию *rad51*



Действительно, вряд ли возможно, чтобы у дрожжей разных видов резко различалось соотношение доминантных и рецессивных леталей, возникающих при облучении. У гаплонтов вклад рецессивных леталей в лучевую инактивацию гаплоидных клеток весьма мал; ведущая роль в лучевом поражении и гаплоидных, и диплоидных клеток здесь принадлежит однотипным повреждениям (см. рис. 3). Математический анализ кривых выживания показал, что у га-

плоидных и диплоидных дрожжей-гаплонтов такие повреждения возникают примерно с одинаковой частотой на единицу дозы облучения на один геном. У диплоидных клеток при одной и той же дозе облучения таких повреждений возникает примерно в два раза больше, чем у гаплоидных; и хотя вероятность гибели клетки, получившей одно такое повреждение, у диплоидных клеток меньше, чем у гаплоидных (в чем в данном случае и проявляется «дублирование кода наследственной информации»!), диплоидные клетки дрожжей-гаплонтов менее радиорезистентны, чем гаплоидные [2].

У дрожжей-диплонтгов гибель гаплоидных и диплоидных клеток также должна обуславливаться однотипными повреждениями, которые должны возникать примерно с одинаковой вероятностью на единицу дозы на один геном. Почему же тогда диплоидные клетки дрожжей-диплонтгов более радиорезистентны, чем гаплоидные?

Роль репарации в радиорезистентности гаплонтов и диплонтгов. Большая радиорезистентность диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными у дрожжей-диплонтгов обусловлена, скорее всего, их свойством восстанавливаться от летальных лучевых повреждений.

Давно известно, что диплоидные клетки дрожжей-диплонтгов, находящиеся в G_1 -фазе клеточного цикла, могут восстанавливаться от летальных лучевых повреждений при выдерживании в непитательной среде, а гаплоидные не могут восстанавливаться в этих же условиях [4, 5]. Процессы восстановления идут и при посеве клеток на питательную среду. Известно, что свойство восстановления от летальных лучевых повреждений контролируется у дрожжей большим числом генов [6]. Мутации таких генов мало влияют на радиорезистентность гаплоидных клеток, но сильно снижают радиорезистентность диплоидных клеток, причем в некоторых случаях диплоидные клетки дрожжей-диплонтгов, гомозиготные по таким мутациям, более чувствительны к облучению, чем гаплоидные [7–9]. Сравнивая кривые выживания, приведенные на рис. 2 и рис. 4, можно увидеть, что мутация в гене *RAD51* почти не повлияла на радиорезистентность гаплоидных клеток *S. cerevisiae*, но резко снизила радиорезистентность диплоидных клеток, гомозиготных

по этой мутации. Дрожжи-диплонты, у которых в результате таких мутаций ослаблен или «выключен» процесс восстановления (см. рис. 4), реагируют на облучение примерно так же, как дрожжи-гаплонты (см. рис. 3).

Следовательно, диплоидные клетки дрожжей-диплонтов более радиорезистентны, чем гаплоидные, благодаря эффективно идущим (после облучения) процессам восстановления. Для осуществления этого типа восстановления требуется не только набор ферментов, синтез которых контролируется большим числом генов, но и наличие в клетках не менее двух наборов хромосом. Необходимость двух наборов хромосом для осуществления такого восстановления у дрожжей подтверждается тем, что гаплоидные клетки *S. cerevisiae* могут проявлять это свойство при инкубации в непитательной среде, только находясь в S- или G₂-фазах клеточного цикла [10]. Не исключено, что другие формы восстановления, например восстановление ДНК от одиночных разрывов, могут в равной мере осуществляться у гаплоидных и у диплоидных дрожжевых клеток. Форма восстановления, связанного с наличием двух наборов хромосом, может проявляться в ликвидации повреждений, например, двойных разрывов ДНК, приводящих к хромосомным aberrациям. Недавно было установлено, что гаплоидные и диплоидные клетки *S. cerevisiae* «дикого типа», находящиеся в логарифмической фазе роста (большинство клеток в S- и G₂-фазах цикла), могут восстанавливаться от двойных разрывов ДНК, а клетки, несущие мутацию *rad52*, лишены этого свойства [27–29].

Тот факт, что биохимические системы восстановления, о которых идет речь, эффективно работают у дрожжей лишь при наличии в клетках гомологичных хромосом, может означать, что процесс восстановления сходен с процессом рекомбинации и нуждается, по меньшей мере, в конъюгации хромосом-гомологов. Эти соображения позволяют предположить, что у дрожжей-гаплонтов отсутствуют биохимические системы, необходимые для осуществления такого восстановления. Возможно, поэтому диплоидные клетки таких дрожжей не могут восстанавливаться от летальных лучевых повреждений и оказываются менее радиорезистентными, чем гаплоидные клетки.

Репарация и возникновение диплонтов. По существующим ныне представлениям, системы восстановления, ликвидирующие летальные лучевые повреждения, могут также ликвидировать повреждения генетического аппарата, возникающие под влиянием других агентов, в том числе и возникающих спонтанно. Мы можем предложить следующую схему эволюции жизненного цикла у одноклеточных эукариотов.

Первичные одноклеточные эукариоты, по-видимому, были гаплонтами, лишенными репарационных систем, о которых шла речь выше. Именно поэтому гаплоидные клетки у них имели селективное преимущество перед диплоидными. Постепенно у таких гаплонтов возникали отдельные ферменты, комплекс которых может осуществлять восстановление генетического аппарата от повреждений, используя двойной набор хромосом. Каждый из этих ферментов вначале нес иную функцию, важную для клетки, но не связанную с восстановлением. Именно поэтому гены, контролирующие синтез таких ферментов, постепенно накапливались в клетках гаплонтов.

Когда же число таких ферментов достигло достаточной полноты, оказалось, что совокупность их может проявлять новое свойство – выполнять

функцию восстановления, непосильную для каждого из этих ферментов в отдельности. Это новое свойство такого набора ферментов (который теперь можно назвать «системой восстановления») проявилось в том, что диплоидные клетки гаплонтов, возникающие в результате копуляции гаплоидных клеток разного типа спаривания, более устойчивы к повреждениям генетического аппарата, чем гаплоидные клетки, и получили по сравнению с ними селективное преимущество. Постепенно это привело к смене доминирования клеток разной пloidности в жизненном цикле: редукционное деление (мейоз) диплоидных клеток все более отодвигалось во времени от момента возникновения зиготы (в результате копуляции гаплоидных клеток); зигота постепенно приобретала свойства более длительное время размножаться путем прямого деления (митоз); диплоидная вегетативная фаза жизненного цикла постепенно вытеснила гаплоидную, на долю которой в конце концов осталась лишь функция гамет.

Принцип поризма. Согласно нашей точке зрения, переход от гаплонтов к диплонтам в мире одноклеточных эукариот осуществился благодаря предшествовавшему ему развитию системы ферментов, способной восстанавливать клетки от повреждений генетического аппарата, используя наличие в ней двух наборов хромосом; именно это обусловило селективное преимущество диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными.

Существенно допущение, что отдельные элементы системы восстановления – отдельные ферменты – возникали вначале независимо один от другого (благодаря мутациям тех или иных генов) и закреплялись в популяциях естественным отбором благодаря выполнению функций, не связанных с восстановлением. Лишь когда набор таких ферментов оказался достаточно полным, – благодаря их постепенному накоплению в одних и тех же клетках мутационным путем и (или) путем рекомбинаций, выявилось их новое свойство, приобретающее решающее значение для дальнейшего развития обладающих им организмов. Возможно, что эти первоначальные функции, выполняемые каждым из ферментов системы восстановления в отдельности, до сих пор сохранились за многими из них, хотя бы в реликтовой форме, и могут быть выявлены при изучении плейотропного эффекта мутаций генов, контролирующих восстановление.

Отдельные ферменты из набора системы восстановления обладают, по видимому, лишь ограниченной селективной ценностью, и наличие каждого из них в отдельности вряд ли могло привести к серьезным перестройкам организации клетки. Когда же сложилась система восстановления, это повлекло за собой переход клетки на новый уровень организации с новыми возможностями: ведь именно диплонты, а не гаплонты послужили основой прогрессивной эволюции.

Постепенное накопление в клетке отдельных ферментов, лишь совокупность которых может обеспечить восстановление, – это пример того, как природа, решая частные, относительно простые задачи, постоянно возникающие перед живыми организмами в ходе «борьбы за существование», может в некоторых случаях решить задачу более общую и сложную, эволюционная значимость которой полностью раскрывается лишь в дальнейшем.

Явлениям, описанным выше, может быть, принадлежит решающая роль в развитии органического мира. Решение той или иной частной задачи или

какое-либо из различных решений одной из таких задач вдруг может приобрести кардинальное значение для дальнейшей судьбы того или иного таксона, как бы переводя стрелки и меняя направление путей, по которым пойдет его дальнейшее развитие. Последствия таких решений выявляются далеко не сразу, и первоначально они предназначены не для реализации таких последствий. Но именно такие ситуации, при ретроспективном рассмотрении, могут казаться необъяснимыми с ординарных позиций и придают видимость телегенеза (или номогенеза) тем или иным этапам эволюции.

Можно сказать, что в подобных ситуациях проявляется «принцип поризма» – принцип, название которого мы заимствовали у античных математиков, обозначавших термином «поризм» ситуации, когда промежуточный этап решения какой-либо задачи приобретал новый смысл и самостоятельное значение, далеко выходящее за решение задачи, его породившей [11].

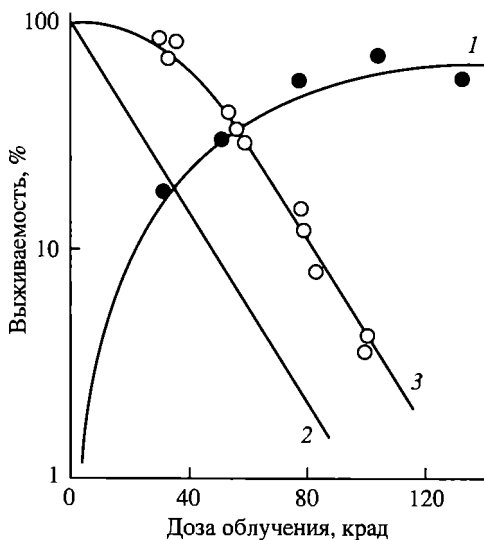
ПЛОИДНОСТЬ И МУТАГЕНЕЗ

Методические подходы. Посмотрим теперь, какие же особенности, отличающие диплоиды от гаплоидов, могли оказаться решающими в обеспечении их преимуществ в том направлении эволюции, которое принято называть прогрессивным и которое привело в конце концов к многообразию мира высших эукариотов – многоклеточных организмов. Особенности эти должны относиться, прежде всего, к формам изменчивости наследственного аппарата и, в первую очередь, к формам мутационного процесса. Чтобы выявить эти особенности, по традиции, основанной Меллером [12] и Надсоном [13], обратимся к результатам опытов из области радиационной генетики. Выясним прежде всего, будут ли различаться частоты и формы проявления наследственной изменчивости, вызываемой ионизирующим излучением, у гаплоидных и диплоидных дрожжей. Эти опыты выполнялись в основном на дрожжах-диплонтах *S. ellipsoideus* и *S. cerevisiae* [14–18].

Если облучать ионизирующими излучениями гаплоидные клетки дрожжей и высевать их на питательную среду, то колонии, вырастающие из выживающих клеток, не будут отличаться от колоний, вырастающих из необлученных клеток. И в опыте (после облучения), и в контроле такие колонии вырастают одновременно и весьма гомогенны по размерам и форме [5]. Измененные (мутантные) колонии возникают после облучения так же редко, как в контроле – с частотой 10^{-2} – 10^{-3} [17]. Это и понятно, если изменения колоний обязаны тем же повреждениям, которые вызывают и летальный эффект: каждое такое повреждение для гаплоидной клетки абсолютно летально, и колонии вырастают лишь из тех облученных клеток, которые не содержат ни одного повреждения; поэтому такие колонии не отличаются от контрольных [18].

Совершенно иная картина наблюдается в опытах с облученными диплоидными клетками. В этом случае колонии, вырастающие из облученных клеток, появляются в разные сроки, многие из них – значительно позже, чем в контроле; по размерам такие колонии тоже сильно варьируют [1, 5]. Если рассевать отдельные колонии, выросшие из выживших облученных диплоидных клеток, то можно обнаружить, что многие из них содержат значительно больше, чем в контроле, мутантных клеток – клеток, дающих начало колониям иных, чем в контроле, форм и размеров [15, 16].

Рис. 5. Кривые зависимости выживаемости (3) и выхода стабильных клонов (2), а также относительного содержания нестабильных клонов (1) от дозы облучения



Будем называть «мутантными» колонии, которые содержат достоверно больше, чем в контроле, клеток с измененной наследственностью, дающих начало новым морфологическим вариантам. Очевидно, что «мутантные» колонии возникают из клеток, получивших при облучении какие-то повреждения, а «немутантные» — из неповрежденных клеток. С дозой облучения изменяется выход неповрежденных клеток и возрастает относительное содержание поврежденных клеток, дающих начало «мутантным» колониям, среди всех клеток, выживших после облучения (рис. 5). Даже при относительно низких дозах облучения выход таких клеток (дающих начало мутантным колониям) приобретает массовый характер — он достигает 50% и больше; в контроле выход таких клеток обычно не превышает 0,1% [16].

Математический анализ результатов таких опытов [18] позволил дать им следующее объяснение. Мы уже упоминали, что вероятность летального последствия отдельных лучевых повреждений для диплоидных клеток ниже, чем для гаплоидных: в этом сказывается «защитный» эффект «дублирования кода наследственной информации». Поэтому у диплоидных клеток после облучения выживают и те клетки, которые не получили ни одного повреждения, и те, которые получили одно или несколько повреждений, но не столь много, чтобы вызвать инактивацию клетки. Такие поврежденные клетки и дают начало «мутантным» колониям.

Феномен наследственной нестабильности. Рассмотрим теперь более внимательно, что собой представляют «мутантные» колонии, которые в массовом количестве можно индуцировать ионизирующими излучениями у диплоидных дрожжевых клеток. Для этого каждую такую колонию будем рассеивать, а вырастающие колонии вновь рассеивать и так будем поступать неоднократно, регистрируя в каждом рассеивании соотношение колоний разных форм и размеров.

Такие опыты показали, что большинство «мутантных» колоний содержат клетки с наследственной нестабильностью [15]. Это выражается в том, что в рассеиваниях таких колоний вновь и вновь возникают наследственно измененные формы клеток. Лучевые повреждения индуцируют в облученной клетке нестабильность наследственного аппарата, и эта нестабильность сохраняется на протяжении сотен клеточных генераций. Нестабильность клонов, формирующихся из таких клеток, может сохраняться очень долго: хотя в клонах с той или иной частотой и возникают стабильные мутантные клетки, полного угасания нестабильности нам не удалось обнаружить даже в опытах, продолжавшихся более четырех лет. Из одного нестабильного клона, воз-

никающего из одной облученной клетки, можно выделить десятки новых, стабильных рас дрожжей, резко отличающихся друг от друга и от исходной расы [14, 15].

Особенности мутагенеза диплоидных клеток. Таким образом, коренное отличие мутагенеза, вызываемого облучением у диплоидных клеток, от мутагенеза у гаплоидных клеток состоит в том, что только у диплоидных клеток однократное воздействие мутагеном может приводить к массовому появлению нестабильных клонов – клонов, в которых чрезвычайно интенсивно и на протяжении сотен клеточных делений разыгрываются процессы образования все новых и новых наследственно измененных форм (в том числе отличающихся достаточно высокой стабильностью).

Лучевые повреждения, индуцирующие наследственную нестабильность у диплоидных дрожжей, не являются генными мутациями. Известно, что генные мутации, вызванные облучением, возникают у диплоидных дрожжей с меньшей частотой, чем у гаплоидных, а выход их, даже при высоких дозах облучения, редко превышает 10^{-5} – 10^{-4} [19, 20]. Наследственные изменения, приводящие к появлению новых рас в недрах нестабильных клонов, также не являются мутациями генов: частота генных мутаций у клеток нестабильных клонов такая же, как у клеток стабильных клонов или в контроле, т.е. порядка 10^{-7} – 10^{-6} [21]. Эти изменения не обусловлены и выщеплением (благодаря рекомбинации) предшествовавших мутантных генов, находившихся в гетерозиготном состоянии [22].

Обнаруженное нами явление генетической нестабильности не идентично «реплицирующейся нестабильности» генов, описанной Ауэрбах [23] на дрожифиле и позже подробно изученной на *Schizosaccharomyces pombe* [24, 25]: реплицирующаяся нестабильность затрагивает только один ген и отличается высокой сайт-специфичностью, а в нашем случае в нестабильном клоне возникают самые разнообразные мутанты.

Логичнее всего допустить, что и первичные повреждения, индуцирующие появление у диплоидных дрожжей нестабильных клонов, и генетические изменения, проявляющиеся в возникновении в таких клонах новых рас, представляют собой различные хромосомные перестройки, в том числе делеции, транслокации и дупликации [18]. Возможно, что закономерности мутирования генов у гаплоидных и диплоидных клеток идентичны: в ответ на один акт взаимодействия мутагена с наследственной структурой возникает не более одной мутации, такие мутации стабильны и образуются с низкими частотами. Закономерности же мутирования хромосом у гаплоидных и диплоидных клеток резко различаются: для гаплоидных клеток подавляющее большинство хромосомных мутаций абсолютно летально и приводит к гибели их носителей; в диплоидных клетках с высокой частотой могут возникать нелетальные хромосомные мутации (благодаря «дублированию кода наследственной информации»), вызывающие длящееся на протяжении многих клеточных генераций состояние хромосомной нестабильности.

Можно думать, что геном живых организмов, в том числе эукариотов, может находиться как в стабильных, так и в нестабильных состояниях, это обуславливается особенностями структурной организации хромосом, причем число стабильных состояний ограничено. Возможно, будучи выведенным из одного из стабильных состояний (например, в результате какой-либо

хромосомной мутации), геном как бы вступает в «мутационный период» – в период «слепого поиска», продолжающийся в смене клеточных поколений до тех пор, пока не произойдет реверсия к исходному стабильному состоянию или пока не будет «найден» новое состояние наследственной стабильности; новые стабильные расы, формирующиеся в нестабильных клонах, и есть, по-видимому, результат реализации таких новых стабильных состояний генома. Можно предполагать, что нестабильность генома можно вызвать не только облучением, но и другими воздействиями, кроме того, она может возникать и спонтанно, только со значительно меньшей частотой. Это явление присуще не только дрожжевым клеткам, но и другим эукариотам. Наконец, в некоторых случаях нестабильное состояние генома совместимо с жизнеспособностью и гаплоидных клеток, однако насколько позволяют судить результаты наших опытов, у диплоидных клеток, по крайней мере при действии ионизирующих излучений, нестабильное состояние генома возникает со значительно более высокой частотой, чем у гаплоидных клеток.

Диплоидность как основа прогрессивной эволюции. По нашему мнению, коренным отличием мутационного процесса у диплоидных эукариот по сравнению с гаплоидными является более высокая частота возникновения жизнеспособных хромосомных перестроек (мутаций), причем большая роль в их возникновении принадлежит нестабильным состояниям генома, индуцируемым мутагенами или возникающим спонтанно.

Каково же возможное эволюционное значение этого феномена?

Напомним, что двумя основными формами наследственной изменчивости являются генные и хромосомные мутации. Мутации генов могут приводить к изменениям (в том числе инактивации) имеющихся генов, т.е. к изменениям *качественных* характеристик генома, но не могут изменять *количество* генетического материала в клетке. Увеличение (или уменьшение) *количества* генетического материала, изменение *числа* генов могут осуществляться лишь в результате мутирования хромосом. *Только хромосомные мутации могут приводить к изменению количества генетического материала в геноме*, – а, как известно, в основе эволюции таксонов, в том числе в основе прогрессивной эволюции, лежит именно *количественное* изменение геномов. Сначала хромосомные мутации, например, tandemные дупликации, резко изменяют количество генов в клетке, а затем уже мутации генов делают геном все более пригодным для выполнения своих функций, как бы отшлифовывая его.

Эти соображения позволяют в качестве гипотезы высказать следующее положение: если ведущими элементарными событиями микроэволюции служат генные мутации, то ведущими элементарными событиями макроэволюции являются мутации хромосом, создающие генетический базис для формирования новых видов и более крупных таксономических единиц.

Если изложенные выше положения хотя бы в первом приближении отражают действительное положение вещей, то роль диплоидной вегетативной фазы жизненного цикла в эволюции эукариотов становится почти очевидной: только диплоидное состояние могло обеспечить достаточно эффективный перебор различных стабильных форм генома, чтобы открыть широкие возможности для прогрессивного развития, в основе которого лежало увеличение количества генетического материала, увеличение числа генов в одном геноме.

Мы не будем приводить многочисленные практические и теоретические данные, подкрепляющие нашу точку зрения, которые обобщены в монографии Оно [26]. Заметим лишь, что если диплоидное состояние клеток эукариот сыграло ту роль в эволюции, о которой шла речь выше, то мы встречаемся здесь еще с одним примером проявления «принципа поризма». Переход от гаплонтов к диплонтам, как одна из форм решения задачи повышения надежности клетки, оказался в то же время решением другой, более грандиозной задачи обеспечения возможности прогрессивной эволюции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодин В.И. Некоторые закономерности роста макроколоний после облучения дрожжевых клеток гамма-лучами радиокобальта // Биофизика. 1957. Т. 2, № 3. С. 178–186.
2. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. и др. Роль плоидности в радиочувствительности клеток (Эксперименты на дрожжевых организмах разных видов и генотипов) // Радиобиология. 1977. Т. 17. Вып. 5. С. 700–710.
3. Mortimer R.K. Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae* // Radiat. Res. 1958. Vol. 9, N 2. P. 312–326.
4. Корогодин В.И. Некоторые закономерности пострадационных изменений покоящихся дрожжевых клеток // Биофизика. 1958. Т. 3, № 6. С. 703–710.
5. Корогодин В.И. Проблемы пострадационного восстановления. М.: Атомиздат, 1966. 380 с.
6. Game J.C., Mortimer R.K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast // Mutat. Res. 1974. Vol. 24, N 3. P. 281–292.
7. Nakai S., Matsumoto S. Two types of radiation-sensitive mutant in yeast // Mutat. Res. 1967. Vol. 4, N 2. P. 129–136.
8. Захаров И.А., Сулова И.Г., Федорова И.В. Генетический контроль радиочувствительности у дрожжей. Сообщ. 6. Влияние мутации xg_s на чувствительность к ультрафиолетовым и рентгеновым лучам и индуцированную митотическую рекомбинацию // Генетика. 1970. Т. 6. Вып. 5. С. 76–83.
9. Ho K.S.Y., Mortimer R.K. Induction of dominant lethality by X-rays in an Radiosensitive strain of yeast // Mutat. Res. 1973. Vol. 20, N 1. P. 45–51.
10. Langguth E.N. Erholungsvorgänge in haploiden Hefezellen nach Röntgenbestrahlung // Biophysik. 1968. Vol. 5, N 1. S. 32–41.
11. Грязнов Б.С. О взаимоотношении проблем и теорий // Природа. 1977. № 4. С. 60–64.
12. Меллер Г. Избранные работы по генетике. М.; Л.: Сельхозгиз, 1937. С. 423.
13. Надсон Г.А. Избранные труды: В 2-х тт. М.: Наука, 1967. Т. 2. 228 с.
14. Корогодин В.И., Близник К.М. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 1. Радиорасы диплоидных дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus (vini)* // Радиобиология. 1972. Т. 12. Вып. 2. С. 163–170.
15. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 2. Пути расообразования // Там же. 1972. Т. 12. Вып. 3. С. 416–424.
16. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г., Кабакова Н.М. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 3. Количественные закономерности лучевого расообразования у диплоидных дрожжей // Там же. Вып. 6. С. 857–863.
17. Близник К.М., Кабакова Н.М., Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 9. Особенности расообразования у гаплоидных дрожжей // Там же. 1976. Т. 16. Вып. 6. С. 924–927.
18. Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 11. Факты и гипотезы // Радиобиология. 1977. Т. 17. Вып. 4. С. 492–499.
19. Арман И.П., Ардашиников С.Н. Зависимость выхода обратных биохимических мутаций у дрожжей от их плоидности при действии разных видов излучений // Докл. АН СССР, 1964. Т. 154. Вып. 1. С. 212–215.

20. Арман И.П. Частота возникновения прототрофных мутаций у дрожжей разной ploидности при действии излучений // Радиобиология. 1964. Т. 4. Вып. 5. С. 731–737.
21. Корогодина Ю.В., Корогодин В.И. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 6. Оценка мутабельности клонов, вырастающих из облученных клеток // Там же. 1974. Т. 14. Вып. 4. С. 494–499.
22. Корогодин В.И., Близник К.М., Капальцевич Ю.Г., Кондратьева В.И. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. Сообщ. 8. Изучение роли гетерозиготности диплоидных дрожжей в формировании радиорас // Там же. 1976. Т. 16. Вып. 3. С. 395–401.
23. Auerbach Ch. The induction by mustard gas of chromosomal instabilities in *Drosophila melanogaster* // Proc. Roy. Soc. 1947. Vol. 62, N 2. P. 307–320.
24. Nasim A. The induction of replicating instabilities by mutagenesis in *Schizosaccharomyces pombe* // Mutat. Res. 1967. Vol. 4, N 6. P. 753–763.
25. Куренная О.Н. Индуцированная реплицирующаяся нестабильность в делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1974. 54 с.
26. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973. 228 с.
27. Ho K.S.Y., Mortimer R.K. X-ray induced dominant lethality and chromosome breakage and repair in a radiosensitive strain of yeast // Molecular mechanisms for repair of DNA. Pt B / Eds P. Hanawalt, R.B. Setlow. N.Y.: Plenum Press, 1975. P. 545–547.
28. Resnick M.A. The repair of double-strand breaks in chromosomal DNA of yeast // Ibid. P. 549–555.
29. Resnick M.A., Martin P. The repair of double-strand breaks in nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control // Mol. Gen. Genet. 1976. Vol. 143. P. 119–129.

РАДИОТАКСОНЫ И НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА

*Памяти
Михаила Ивановича Шальнова*

Мерой надежности генома (генетического аппарата) живых клеток по отношению к повреждениям, вызываемым каким-либо агентом, может служить величина, обратная частоте возникновения элементарных дискретных генетических повреждений на геном на единицу дозы этого агента. Для сопоставления по такому показателю надежности геномов разных биологических объектов необходимо использовать повреждающий агент и вид регистрируемой реакции, отвечающие следующим требованиям. Повреждающий агент должен допускать точную количественную дозировку, при действии на разные биологические объекты вызывать в их генетическом аппарате идентичные или сходные (по молекулярной природе) элементарные повреждения. Регистрируемая реакция должна адекватно отражать возникновение в геномах разных объектов таких повреждений, по степени или частоте проявления быть однозначно связанной со средним числом таких повреждений на геном.

Согласно принципу попадания [1], требованиям, предъявляемым к повреждающему агенту, лучше всего удовлетворяют ионизирующие излучения с низкой линейной передачей энергии (ЛПЭ) – γ - или жесткие рентгеновы лучи, а требованиям, предъявляемым к регистрируемой реакции – инактивация (или «репродуктивная гибель») облученных клеток, т.е. утрата ими свойства «бесконечного размножения». Действительно, дозиметрия излу-

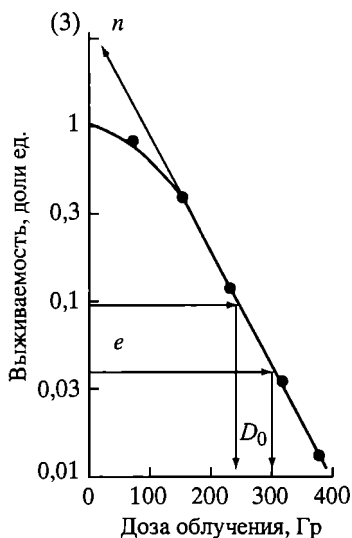


Рис. 1. Пример кривой выживания (диплоидные дрожжи, облучение γ -лучами ^{60}Co). Стрелками показан способ определения n и D_0

чений с низкой ЛПЭ очень хорошо разработана; инактивация облученных клеток независимо от их таксономической принадлежности обуславливается в основном повреждениями генетического аппарата [2], прежде всего разрывами молекул ДНК [3, 4]; частота инактивации клеток есть функция среднего числа таких повреждений на геном [4, 5].

Интересующую нас реакцию клеток на действие ионизирующих излучений обычно изображают графически: по оси абсцисс откладывают дозу облучения, а по оси ординат (в логарифмическом масштабе) — долю (или процент) выживших клеток; по совокупности экс-

периментальных точек строят «кривую выживания». Пример такой кривой приведен на рис. 1.

Кривые выживания клеток можно описывать разными эмпирическими формулами, в том числе формулой

$$S(D) = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n, \quad (1)$$

где S — выживаемость, D — доза облучения, D_0 — величина дозы, уменьшающей S на прямолинейном отрезке кривой в e раз (e — основание натуральных логарифмов); n — экстраполяционное число, определяемое так, как показано на рис. 1. Для $S(D)$ разных биологических объектов значения эмпирических коэффициентов n и D_0 могут широко варьировать.

В терминах принципа попадания зависимость $S(D)$ можно описывать так, как предлагают К. Гюнтер и В. Шульц [4] и Ю.Г. Капульцевич [5]. В основу представлений этих авторов положено допущение, что среднее число элементарных повреждений генома клетки (при действии излучений с низкой ЛПЭ) прямо пропорционально D ; распределение клеток по числу повреждений подчиняется закону Пуассона; вероятность выживания облученной клетки есть функция числа возникших в ней повреждений. В таком случае $S(D)$ будет определяться двумя параметрами: вероятностью α возникновения одного повреждения на единицу дозы облучения (которая, вообще говоря, может зависеть от величины D) и вероятностью a инактивации самой облученной клетки или ее потомков на одно повреждение (которая может зависеть от числа повреждений в клетке) [5]. Очевидно, что параметр α отражает чувствительность генома к возникновению повреждений, а параметр a — реакцию клетки на уже возникшие повреждения. Следовательно, в качестве меры надежности генома можно использовать величину, обратную α , т.е. α^{-1} .

В тех случаях, когда a не зависит от числа повреждений в клетке и сохраняется постоянной на протяжении нескольких клеточных делений, а α не зависит от величины D (а это, по-видимому, весьма общая ситуация), численные значения этих параметров можно оценить, пользуясь коэффици-

ентами n и D_0 эмпирической формулы (1). Действительно, при таком «независимом варианте вероятностной модели» имеем [5]: если $a \geq 0,5$, то $n=1$ и $D_0 = \alpha^{-1}$; если $a < 0,5$, то $n > 1$ и $D_0 > \alpha^{-1}$. Причем различие между D_0 и α^{-1} тем ярче выражено, чем больше n . Однако при $n \leq 10$ (а это встречается наиболее часто) различия между α и D_0^{-1} невелики. Поэтому в качестве оценки надежности генома вполне можно использовать $D_0 \approx \alpha^{-1}$; напомним, что значение D_0 легко рассчитывается по результатам радиобиологических экспериментов (см. рис. 1).

Вероятность возникновения одного повреждения на геном на единицу дозы облучения можно задать соотношением

$$\alpha = kvM, \quad (2)$$

где v – средний размер «элементарной мишени», «попадание» в которую может привести к возникновению одного элементарного повреждения; M – число таких мишеней в клетке; k – коэффициент пропорциональности. Так как элементарные мишени обычно представляют собой некоторые реальные участки генома [1, 2], т.е. участки хромосом или молекул ДНК, можно полагать, что для большинства биологических объектов $vM \approx C$, где C – количество ДНК, содержащейся в геноме клетки. Это простое допущение позволяет сформулировать вопрос: какова зависимость надежности генома D_0 от C для разных биологических объектов? Смысловое содержание этого вопроса следующее.

Как известно, для представителей разных таксонов величина C варьирует в очень широких пределах, более чем в 10^6 раз, от 10^{-6} пг у мелких вирусов до 10 пг у некоторых высших растений; в геноме клеток человека содержится около 3 пг ДНК. В общем случае с повышением уровня организации биологических объектов C увеличивается. Этот факт лежит в основе утверждения, согласно которому необходимой предпосылкой прогрессивной биологической эволюции являлось увеличение количества генетической информации на геном, т.е. увеличение C [6]. Если коэффициент пропорциональности k соотношения (2) мало изменяется от объекта к объекту, не означает ли это, что за увеличение размера генома в ходе биологической эволюции живым организмам приходилось расплачиваться катастрофическим уменьшением его надежности?

Чтобы ответить на этот вопрос, следует проанализировать зависимость D_0 от C для большого числа объектов, относящихся к разным таксонам. Для этого следует располагать значениями пар этих величин для самых разных живых организмов – вирусов, бактерий, водорослей, грибов, высших растений, членистоногих, позвоночных. В пионерских работах Х.А. Каплана и Л.Е. Мозеса [7], А. Сперроу с сотр. [8, 9], а затем и в работах других авторов такие данные были получены для биологических объектов большого числа видов. Обобщен этот материал в монографии Г. Дертингера и Х. Юнга [10] и в статьях А.В. Савича и М.И. Шальнова [11, 12]. Настоящее сообщение можно рассматривать как попытку развития представлений, сформулированных этими исследователями.

Из (2) следует, что при $k = \text{const}$ величина D_0 должна возрастать прямо пропорционально C . Следовательно, можно ожидать, что при переходе от мелких вирусов к клеткам человека D_0 будет уменьшаться примерно в

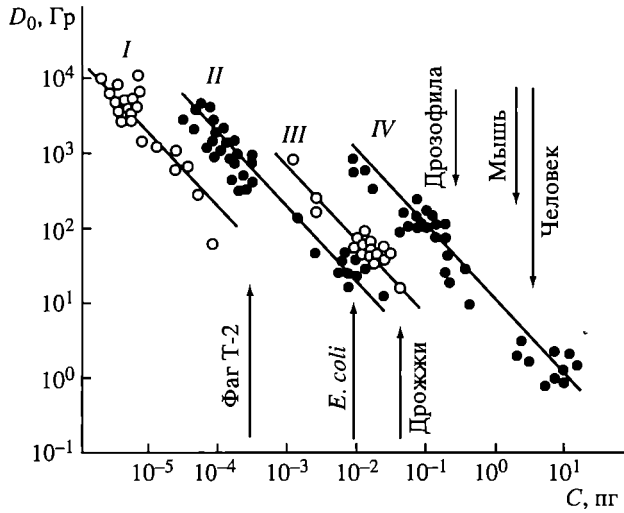


Рис. 2. Зависимость надежности генома (D_0) от содержания ДНК на клетку (C) для разных биологических объектов

10^6 раз. В действительности наблюдается более интересная форма зависимости D_0 от C .

Связь между D_0 и C для разных биологических объектов показана на рис. 2 (данные разных авторов заимствованы из работ [11, 12]). Видно, что при увеличении C от минимальных значений, характерных для мелких вирусов, D_0 действительно уменьшается, но только до некоторого предела. С дальнейшим увеличением C величина D_0 внезапно возрастает, затем опять уменьшается, опять возрастает и т.д. Большинство изученных в этом отношении объектов образуют несколько хорошо разграниченных между собою групп или *радиотаксонов* (термин, предложенный А. Сперроу). В пределах

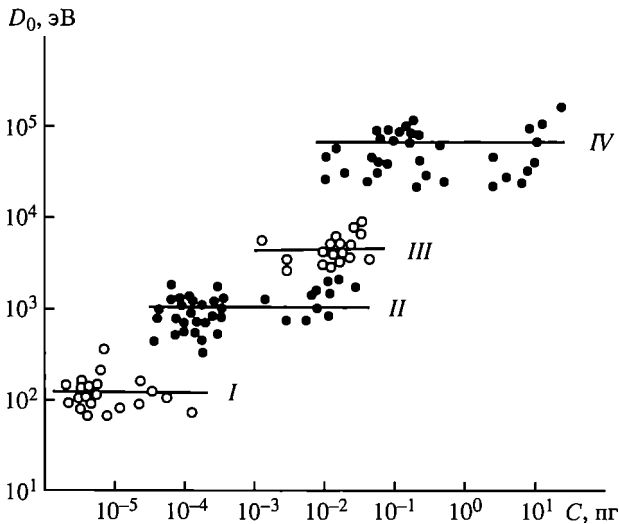


Рис. 3. Зависимость удельной надежности генома (D_0C) от содержания ДНК на клетку (C) для разных биологических объектов

каждого радиотаксона значения D_0 с увеличением C уменьшаются. Кривые, описывающие зависимость D_0 от C для разных радиотаксонов, при изображении в логарифмическом масштабе представляют собой отрезки прямых, сдвинутые параллельно друг другу по оси абсцисс. Это позволяет разным радиотаксонам присвоить порядковую нумерацию; номера радиотаксонов будем изображать римскими цифрами.

Данные, приведенные на рис. 2, изображены на рис. 3 по-другому. Здесь по оси ординат отложено не D_0 , а произведение $D_0C = K$, которое можно назвать *удельной надежностью генома*. Если D_0 выражать в эВ/пг, а C – в пг, то K будет выражено в эВ. Следовательно, *удельная надежность генома $K = D_0C$ имеет размерность эВ и по величине равна количеству энергии излучения, поглощение которой в ДНК клетки необходимо и достаточно для вызывания одного элементарного повреждения*. Очевидно, что $K = k^{-1}$, где k – коэффициент пропорциональности соотношения (2).

Зависимость K от C для организмов, относящихся к разным радиотаксонам, описывается отрезками прямых, параллельными оси абсцисс. Начало и конец каждого отрезка соответствуют минимальному и максимальному значениям C для организмов, образующих данный радиотаксон. Ордината каждого отрезка равна величине K для этих организмов. Следовательно, **каждый радиотаксон объединяет группу организмов, имеющих одинаковую (или близкую) удельную надежность генома**. С увеличением порядкового номера радиотаксона увеличивается и величина K для составляющих его организмов; поэтому удельную надежность генома можно обозначать символом K_i , где i – порядковый номер соответствующего радиотаксона.

Г. Дертингер и Х. Юнг [10], а также А.В. Савич и М.И. Шальнов [11, 12], уже обращали внимание на то, что разные биологические объекты распределены по радиотаксонам *не случайно*. Действительно, к радиотаксону I принадлежат главным образом те вирусы, у которых геном представляет собой одну однонитевую молекулу РНК или ДНК; к радиотаксону II относятся объекты, у которых геном представлен двунитевой молекулой ДНК (крупные вирусы и многие бактерии); радиотаксон III объединяет некоторые бактерии и, что для нас особенно интересно, одноклеточные эукариоты-гаплонты, у которых вегетативная фаза жизненного цикла представлена *гаплоидными* клетками (водоросли, некоторые грибы); в радиотаксон IV входят *только* эукариоты-диплонты, как одноклеточные (диплоидные дрожжи), так и многоклеточные (высшие растения, членистоногие, млекопитающие)¹.

Однонитевые молекулы нуклеиновых кислот (I); двунитевые молекулы ДНК (II); двунитевые молекулы ДНК, которые в комплексе с молекулами белка образуют истинные хромосомы, содержащиеся в геноме в одном наборе (III); удвоенные наборы хромосом (IV) – таковы четыре основных уровня

¹ В работах [11, 12] выделено не четыре, а шесть радиотаксонов. Выделенные этими авторами радиотаксоны IV и V, к которым относятся организмы с одинаковой структурной организацией генома, я объединил в один, а радиотаксон VI, к которому относятся некоторые полиплоидные растения, я не рассматриваю из-за нерепрезентативности выборки (три экспериментальные точки). Я не рассматриваю также *Protozoa*, у которых эволюция генома шла по пути гиперплоидизации, многоядерности и функциональной специализации ядер, что чрезвычайно затрудняет применение к этим одноклеточным организмам метода оценки надежности генома, использованного в данном сообщении.

структурной организации генетического аппарата известных нам организмов. Следовательно, **распределение биологических объектов по радиотаксонам хорошо соответствует их распределению по уровням структурной организации генома.** А так как каждому радиотаксону присуще свое значение K_p , то можно сделать вывод, что каждому уровню структурной организации генома i присуще свое значение удельной надежности K_p , причем с повышением уровня структурной организации генома его удельная надежность увеличивается.

Совокупность организмов, имеющих одинаковый уровень структурной организации генома, будем называть *кариотаксоном*. Ввиду того, что K для организмов, относящихся к одному кариотаксону, варьирует незначительно около среднего, равного K_i (см. рис. 3), величину K_i будем называть *константой надежности генома* организмов i -го кариотаксона. Значения K_i с доверительными интервалами приведены в таблице. Мы видим, что для организмов разных кариотаксонов K_i могут различаться в 10, 100 и даже 600 раз.

Характеристики надежности генома организмов, относящихся к разным кариотаксонам

Номер кариотаксона, i	Число наблюдений, N	$K_i \cdot 100$ эВ		$K_i G_1$	$K_i G_2$	F_i
		среднее	доверительные границы для $P = 0,05$			
I	21	1,2	0,9÷1,6	1,12±2,00	—	1,12±2,00
II	40	10,7	10÷12	12,5±15,0	0,43±0,52	0,97±1,17
III	18	45,8	40÷50	50,0±62,5	1,72±2,15	1,72±2,15
IV	33	610,5	480÷750	600÷937	20,6±32,3	20,6±32,3

Примечание: K_i – константа надежности генома; G_1 – выход одиночных разрывов ДНК; G_2 – выход двойных разрывов ДНК; F_i – оценка выхода первичных повреждений ДНК при облучении клеток в дозе D_0 .

Посмотрим теперь, что могут представлять собой факторы, обуславливающие столь ярко выраженные различия констант надежности генома организмов разных кариотаксонов. Подходы к выяснению природы этих факторов были намечены в работах ряда авторов [3, 5, 10–15].

Первичные повреждения генетического аппарата, обуславливающие лучевую инактивацию клеток, не все еще выявлены. Чтобы представить себе сложность этой задачи, достаточно сравнить между собой две монографии [13, 14], ей посвященные, выход в свет которых разделен интервалом в 15 лет. За этот период значительно усовершенствованы методики, используемые для изучения повреждений ДНК при облучении *in vitro* и *in vivo*, и это позволило сделать вывод (имеющий для нас принципиальное значение), что **первичная радиочувствительность ДНК разных биологических объектов, от вирусов до клеток млекопитающих, при облучении *in vitro* и *in vivo* одинакова и не коррелирует с радиочувствительностью этих объектов [14].**

Первичными событиями, ответственными за формирование элементарных повреждений генома, могут быть одонитевые и двунитевые (одиночные и двойные) разрывы молекул ДНК. По оценкам К. Гюнтера и В. Шульца [4]

Рис. 4. Выход первичных повреждений ДНК на геном при облучении клеток в дозе D_0 для организмов, относящихся к разным кариотаксонам

при действии излучений с низкой ЛПЭ выход одиночных разрывов ДНК $G_1 \cong 1,25 \cdot 10^{-2} \text{ эВ}^{-1}$, а выход двойных разрывов $G_2 \cong 0,043 \cdot 10^{-2} \text{ эВ}^{-1}$. Эти значения хорошо согласуются с результатами, полученными на разных биологических объектах. Так, по литературным данным, приведенным в работе [16], для клеток дрожжей $G_2 \cong 0,056 \cdot 10^{-2} \text{ эВ}^{-1}$, а для клеток млекопитающих $G_2 \cong (0,032 \div 0,053) \cdot 10^{-2} \text{ эВ}^{-1}$.

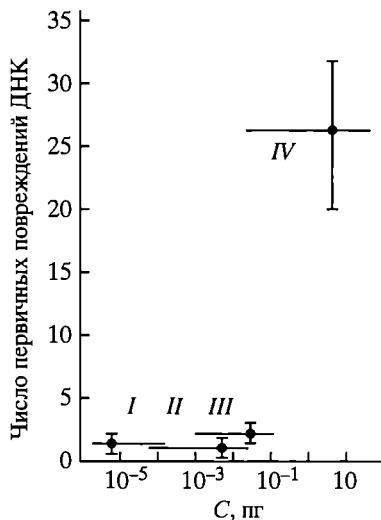
Очевидно, что произведения $K_i G_1$ и $K_i G_2$ дадут выход одиночных и двойных разрывов на одно элементарное повреждение генома для организмов i -го кариотаксона; значения этих величин приведены в таблице.

Гибель клеток кариотаксона I могут вызывать только одиночные разрывы. В случае такого типичного представителя кариотаксона II, как *Escherichia coli*, подсчитано, что одиночный разрыв ДНК может приводить клетку к гибели с вероятностью 0,043, тогда как двойной разрыв практически всегда является летальным [4]. Роль одиночных разрывов в инактивации клеток, относящихся к кариотаксонам III и IV, ничтожно мала, и ею можно пренебречь.

Эти соображения позволяют оценить выход «биологически значимых» нарушений ДНК на одно элементарное повреждение генома для клеток организмов разных кариотаксонов; обозначим его F_i . Полученные величины приведены в таблице и на рис. 4; в случае кариотаксона II по аналогии с *E. coli* принято: $F_{II} \approx 0,043 \cdot K_{II} G_1 + K_{II} G_2$.

Мы видим, что $F_I \approx F_{II} \approx F_{III} \approx 1 \div 2$. Следовательно, для клеток кариотаксонов I и II одно элементарное повреждение генома формируется в результате одного-двух одиночных или двойных разрывов ДНК, а для клеток кариотаксона III на одно элементарное повреждение приходится один или два двойных разрыва. Это хорошо согласуется с результатами работы М.А. Резника [17], который установил, что гибель облученных гаплоидных дрожжей (типичных представителей кариотаксона III) происходит за счет одного-двух двойных разрывов. Для клеток организмов кариотаксона IV на одно элементарное повреждение генома, по нашим расчетам, приходится 20–30 двойных разрывов ДНК ($F_{IV} = 20\text{--}32$). Это также согласуется с результатами работ других авторов, согласно которым для инактивации клеток млекопитающих *in vitro* требуется 30–40 двойных разрывов [3, 18].

Все это позволяет с большой долей уверенности утверждать, что удельная надежность генома организмов I, II и III кариотаксонов обуславливается в основном физико-химическими факторами: при переходе от однонитового строения нуклеиновых кислот (кариотаксон I) к двунитовому (кариотаксон II), а затем к ДНК белковым комплексам, представленным в форме единичного набора хромосом (кариотаксон III), биологическая значимость одиночных



разрывов быстро убывает; отчасти это может быть связано и с эффективной репарацией одиночных разрывов, свойственной многим представителям II и III кариотаксонов [3]. Двуступенчатое повышение надежности генома в ряду этих организмов получает, таким образом, простое объяснение.

Сложнее обстоит дело с идентификацией факторов, обуславливающих надежность генома организмов кариотаксона IV. Рекордное повышение надежности генома при переходе от гаплоидных клеток эукариот (кариотаксон III) к диплоидным (кариотаксон IV) объяснить физико-химическими факторами нельзя: структурная организация хромосом у тех и других идентична. Может быть, различия в значениях K_{III} и K_{IV} обуславливаются разной природой элементарных повреждений, ответственных за лучевую инактивацию гаплоидных и диплоидных клеток? Некоторые авторы [11, 12] считают, что гаплоидная клетка может погибнуть в результате разлома одной хромосомы, для чего достаточно одного двойного разрыва ДНК, а диплоидная клетка погибает преимущественно за счет несимметричных обменов или интерстициальных делений, частота образования которых примерно пропорциональна квадрату частоты образования двойных разрывов. Эта гипотеза, конечно, хорошо объясняла бы высокую надежность генома диплоидных клеток, если бы ее можно было считать достаточно обоснованной. Однако имеются данные [5, 19], позволяющие считать, что ведущая роль в лучевой инактивации и гаплоидных, и диплоидных клеток эукариот принадлежит идентичным элементарным повреждениям. В случае справедливости второй гипотезы высокую надежность генома организмов кариотаксона IV можно объяснить только свойственной им «диплоид-специфической» репарацией от лучевых повреждений. Выбор между этими двумя возможностями требует привлечения дополнительной аргументации и будет сделан в другом сообщении.

Посмотрим теперь, какой биологический смысл могут иметь константы надежности генома K_i . Оценку надежности геномов разных объектов мы проводили, пользуясь результатами радиобиологических экспериментов. Ионизирующие излучения при облучении клеток взаимодействуют с элементарными мишенями по случайному закону, а молекулярные повреждения, вызываемые в геноме ионизирующими излучениями, неспецифичны – такие повреждения возникают и «спонтанно», и под влиянием различных неконтролируемых воздействий [1–3]. Поэтому облучение клеток ионизирующими излучениями можно рассматривать как моделирование спонтанных «помех» экзогенной и/или эндогенной природы, вызывающих случайные повреждения генома, а надежность генома по отношению к ионизирующим излучениям – как проявление его помехоустойчивости, или надежности, по отношению к ненаправленным (стохастическим) повреждающим воздействиям.

Совершенно ясно, что надежность, или помехоустойчивость, генома является одним из важнейших факторов жизнеспособности биологических объектов. Слишком высокая частота спонтанных отказов в работе генетического аппарата должна приводить к плачевным последствиям. Можно думать, что для каждой группы организмов существует своя нижняя граница надежности генома, переход через которую неизбежно повлечет за собой деградацию и вымирание. Для организмов, относящихся к одному и тому

же кариотаксону, очень грубой оценкой нижней границы надежности генома может служить присущее некоторым из них минимальное значение D_0 .

Если D_i – минимальное допустимое значение надежности генома для организмов i -го кариотаксона, то можно написать соотношение:

$$C_i \leq K_i D_i^{-1}, \quad (3)$$

ограничивающее *сверху* максимальное количество ДНК на геном, которое может быть им присуще. Величина C_i , выступает здесь как функция двух переменных, одна из которых (K_i) обуславливается особенностями структурной организации генома, а вторая (D_i) – биологическими и экологическими особенностями организмов. Можно думать, что по мере приближения C к C_i и вызванного этим повышения чувствительности клеток к различным повреждающим воздействиям (в основном неспецифической природы) фактор надежности должен приобретать все большую селективную ценность, и, следовательно, наследственные изменения, увеличивающие надежность генома, должны все жестче отбираться и фиксироваться в популяции.

Такие изменения могут быть двух типов: назовем их «геномными идиоадаптациями» и «геномными ароморфозами». Геномные идиоадаптации, когда повышение надежности генома невелико и не обуславливается изменением уровня его структурной организации, вряд ли могли иметь существенную эволюционную ценность. Геномные же ароморфозы, когда вследствие повышения уровня структурной организации генетического аппарата его надежность увеличивается во много раз (см. таблицу), должны были открывать новые пути прогрессивной биологической эволюции, в первую очередь благодаря возможности дальнейшего увеличения содержания ДНК в клетках и связанных с этим последствий.

Таким образом, константы надежности генома K_i – это те ограничения количества наследственной информации на геном, которые обуславливаются его внутренней природой, особенностями его структурной организации. Чтобы повысить содержание ДНК на геном от 10^{-5} – 10^{-4} пг, характерное для простейших одноклеточных, до 1–10 пг, присущего высшим представителям живого мира, природе пришлось трижды преодолевать эти ограничения, чему и соответствуют четыре основных уровня структурной организации генома. Можно думать, что каждый последующий уровень формировался первоначально как приспособление, повышающее надежность генома, а уже потом выявлял присущие ему эволюционные потенции.

Особый интерес представляет для нас переход от III кариотаксона к IV, сопровождавшийся 10–15-кратным увеличением константы надежности генома. В эволюционном отношении этот переход представлял собой переход от эукариот-гаплонтов к диплонтам, т.е. от организмов, у которых вегетативная фаза жизненного цикла представлена гаплоидными клетками, к организмам, у которых вегетативная фаза жизненного цикла представлена диплоидными клетками. Возникновение диплонтов было важнейшим событием в развитии живой природы, ибо вся дальнейшая прогрессивная эволюция, приведшая к появлению высших многоклеточных организмов, в том числе и человека, базировалась на вегетативной диплофазе (все мы – диплонты!).

Автор чрезвычайно признателен профессору Х. Абелю, а также Е.А. Красавину и Г. Эрцгребер за обсуждение рукописи и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Timofeev-Ressovsky N.W., Zimmer K.G.* Biophysik. I. Das Treffer-Prinzip in der Biologie. Leipzig: S. Herzl Verlag, 1947.
2. *Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И.* Применение принципа попадания в радиобиологии. М.: Атомиздат, 1968.
3. *Жестянников В.Д.* Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979.
4. *Gunther K., Schulz W.* // *Studia biophys.* 1972. Vol. 34, N 3. P. 165–188.
5. *Капальцевич Ю.Г.* Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.
6. *Оно С.* Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973.
7. *Kaplan H.S., Moses L.E.* // *Science.* 1964. Vol. 145. P. 21.
8. *Sparrow A.H., Underbrink A.G., Sparrow R.C.* // *Radiat. Res.* 1967. Vol. 32. P. 915.
9. *Sparrow A.H., Rogers A.F., Schwemmer S.S.* // *Radiat. Bot.* 1968. Vol. 8. P. 149–186.
10. *Dertinger H., Yung H.* Molecular Strahlenbiologie. Berlin etc.: Springer-Verlag, 1969.
11. *Савич А.В., Шальнов М.И.* // Системы надежности клетки. Киев: Наукова думка, 1977. С. 46–55.
12. *Шальнов М.И.* // Радиобиология. 1977. Т. 17. Вып. 5. С. 652–671.
13. *Амираглова М.И., Дуженкова Н.А., Савич А.В., Шальнов М.И.* Первичные радиобиологические процессы. М.: Атомиздат, 1979.
14. *Рябченко Н.И.* Репарация и ДНК. М.: Атомиздат, 1979.
15. *Barendsen G.W.* // 4th Symp. on Microdosimetry. Verbana Palanza, 1973. Euratom EUR 5122 d-e-f, 1974. P. 353.
16. *Hartwig M.* // *Studia biophys.* 1977. Vol. 61, N 3. P. 223–230.
17. *Resnick M.A.* // *J. Theoret. Biol.* 1978. Vol. 71. P. 339.
18. *Kampf G., Tolkendorf E.* // *Studia biophys.* 1980. Vol. 78, N 1. P. 1–10.
19. *Корогодин В.И., Гудкова Н.К., Близник К.М.* // Радиобиология. 1978. Т. 18. Вып. 4. С. 516–528.

RADIOTAXONS AND RELIABILITY OF A GENOME

V.I. Korogodin

Radiosensitivity of cells (D_0) is considered with regard to the structural organization of their nuclear apparatus (genome). The following terms are introduced: «karyotaxon», organisms with identical structural organization of the genome, and «the specific genome stability» $K = D_0C$, where C is the quantity of DNA in the genome; K is the amount of energy (eV) the sorption of which in DNA is necessary and sufficient for one elementary damage to occur. It was shown that, within every “i-th” karyotaxon, $K_i = \text{const}$ and with an increase in the level of genome structural organization K_i increases by a factor of about 600, from 100 eV for small viruses up to 61000 eV for diploid eukaryotic cells (including man). Potential mechanisms of this phenomenon and its significance in evolution are discussed.

КАРИОТАКСОНЫ, НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА И ПРОГРЕССИВНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ

Наследственность, ее изменчивость и естественный отбор – вот тот фундамент, на котором строится здание будущей теории эволюции. Именно *будущей* – как отмечал Н.В. Тимофеев-Ресовский; посылки, содержащиеся в этой триаде, недостаточны, чтобы объяснить такой важнейший общебиологический феномен, как *прогрессивное* развитие жизни [1]. Но дело не только в недостаточности посылок. В этой же работе Н. В. Тимофеев-Ресовский подчеркивал, что в теоретической биологии – а теория эволюции является

главным ее разделом – еще не сформулированы определения ряда важнейших понятий и, прежде всего, понятия «биологический прогресс». Хотя интуитивно мы хорошо понимаем, что обычно называют этим термином, строго определения прогрессивной биологической эволюции еще нет.

Сказанное справедливо также по отношению к ряду «ключевых событий» (так их можно называть), которые в ходе эволюции тех или иных групп организмов как бы внезапно, непредвиденно открывали новые пути для дальнейшего их развития. Те ключевые события, которые повышали общий уровень организации живых существ, А.Н. Северцов называл ароморфозами. К таким событиям относятся изменения структурной организации генетического аппарата живых организмов, возникновение сексуальности с последующей дифференциацией полов и ряд других. Но дело в том, что повышение общего уровня организации, вызванное такими событиями, и, тем более, его эволюционное значение обычно выявлялось лишь спустя много поколений. Иными словами, преимущества, к которым приводили эти ключевые события, были их следствием, а не причиной, и не могли объяснить осуществление самих событий. Однако, несмотря на семантические и логические трудности, связанные с определением базовых понятий теоретической биологии, прогрессивная биологическая эволюция – столь же очевидный факт, как и существование на нашей планете высших растений, млекопитающих и человека. Столь же несомненна связь – по крайней мере в большинстве случаев – прогрессивного развития с уже упоминавшимися и другими ключевыми событиями. И дело здесь не столько в поисках нового фактического материала, сколько в необходимости конкретизации форм этой связи и выявления причин, порождающих ключевые события. По-видимому, такая конкретизация приведет со временем к решению тех логических затруднений, о которых писал Н.В. Тимофеев-Ресовский.

В этой работе я хочу рассмотреть причины, которые в ходе эволюции могли приводить к повышению уровней структурной организации генетического аппарата клеток – генома, а также возможные эволюционные последствия таких событий. Исходным пунктом для рассмотрения этих вопросов нам послужит понятие «надежность генома» – так можно называть свойство, обуславливающее устойчивость генетического аппарата к неблагоприятным воздействиям. Если изменчивость генома поставляет материал для естественного отбора, то его надежность, уменьшая диапазон изменчивости, играет как бы стабилизирующую роль. Означает ли это, что надежность генома противостоит эволюции? Отнюдь нет: ниже будет показано, что в ряде случаев повышение надежности генома (вернее, те способы, которыми оно достигалось) вполне могли быть теми ключевыми событиями, которые открывали перед эволюцией новые пути.

МУТАГЕНЕЗ И НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА

Как известно, у подавляющего большинства организмов наследственная, или генетическая, информация записана в молекулах дезоксирибонуклеиновой кислоты – ДНК. (У некоторых «мелких» вирусов носителями наследственной информации служат молекулы РНК.) Копирование генетического аппарата при размножении клеток и организмов не всегда абсолютно точное.

С той или иной частотой в ходе копирования генома генетические структуры изменяются – возникают *мутации*.

Различают три основных вида мутаций – генные, хромосомные и геномные. Мутации генов (элементарных единиц наследственности) образуются в результате перестановки, выпадения или вставки отдельных нуклеотидов, слагающих молекулы ДНК. В случае мутаций хромосом (ядерных органелл, объединяющих всю совокупность генов) изменяются положения их участков (инверсии, симметричные обмены) или возникают различные аномалии (асимметричные обмены, делеции, фрагменты, кольца). Геномные мутации – это изменение числа хромосом в геноме.

Последствия разных мутаций для живых клеток и организмов различны. Так, мутации генов для клеток редко бывают смертельны: вызываемые ими изменения структур отдельных белков или регуляции их синтеза в большинстве случаев совместимы с жизнеспособностью; не приводят генные мутации и к заметным изменениям количества ДНК в геноме. Мутации хромосом, напротив, часто вызывают гибель клеток, а также уменьшение или увеличение содержания в клетках ДНК. Геномные мутации или летальны, или сильно изменяют количество ДНК в клетках.

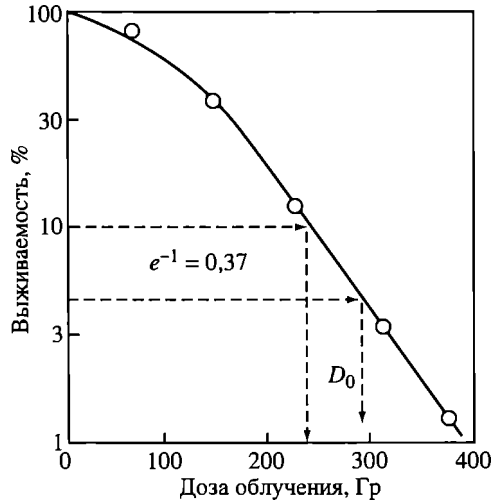
Прогрессивное развитие организмов от первичных одноклеточных до высших растений и животных сопровождалось увеличением в геноме количества ДНК: ведь чтобы обеспечить репродукцию генетического материала в более разнообразных и сложных условиях, необходимо большое количество наследственной информации. Вот почему крайние представители царства жизни по содержанию ДНК в геноме отличаются в миллионы и десятки миллионов раз. По-видимому, в ходе эволюции именно хромосомные и геномные мутации были одним из главных источников увеличения в клетках генетической информации, тогда как генным мутациям принадлежала ведущая роль в подгонке, шлифовке генотипов к изменяющимся условиям обитания.

Если принять, что частота возникновения мутаций на единицу количества ДНК постоянна, то можно ожидать, что с увеличением содержания в клетках ДНК вероятность появления мутантных генов и хромосом на одно деление клетки будет возрастать. Как это скажется на судьбе клеток, организмов и популяций? Большое количество мутаций может ускорить эволюцию, но в то же время повысит частоту летальных событий. Поэтому генетики давно пришли к выводу, что мутационный процесс должен так контролироваться естественным отбором, чтобы частота мутирования у разных организмов сохранялась в некотором оптимальном интервале [2].

Отрицательная роль слишком высокой мутабельности должна проявляться быстрее и ярче, чем отрицательные последствия излишне низкой частоты мутирования. Значит, контроль за мутабельностью со стороны естественного отбора направлен прежде всего на то, чтобы предотвратить ее повышение сверх некоторых предельно допустимых значений, пусть даже ценой снижения частоты мутирования ниже оптимального уровня, другими словами, здесь важно, чтобы надежность генома не была слишком низкой – а сколь она окажется высокой, уже менее существенно. Поэтому *надежностью* генома будем называть его устойчивость к действию разных факторов (эндогенной или экзогенной природы), вызывающих хромосомные и геномные мутации – основной источник летальных генетических изменений.

Рис. 1. Выживание клеток при облучении γ -лучами

Показан способ расчета величины дозы облучения (D_0), отражающей радиорезистентность клеток. Величина D_0 равна дозе облучения, уменьшающей выживаемость клеток в e раз (e – основание натуральных логарифмов)



Инструментом, позволяющим определять надежность генома, может служить ионизирующее излучение. В опытах с действием на клетки ионизирующих излучений (γ -квантов или рентгеновских лучей) можно точно количественно охарактеризовать чувствительность клеток разных организмов и мутабельность их хромосом (рис. 1), что не всегда удается при использовании других мутагенов [3]. Анализ результатов радиобиологических экспериментов позволил нам ввести меру надежности генома и оценить надежность генома организмов, относящихся к разным таксономическим группам.

НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА И КАРИОТАКСОНЫ

Гибель клеток при действии ионизирующих излучений обусловлена главным образом хромосомными мутациями, вызванными в основном разрывами молекул ДНК. Располагая кривыми выживания каких-либо клеток, можно рассчитать величину такой дозы облучения D_0 (измеряемой в греях), когда в каждой клетке в среднем возникает по одному летальному повреждению. Чем больше доза облучения, тем выше устойчивость клеток к облучению, т.е. их радиорезистентность, поэтому величина D_0 может служить мерой радиорезистентности клеток. В зависимости от радиорезистентности живые организмы можно разделить на четыре группы, называемые *радиотаксонами*¹.

Уже давно обратили внимание на тот факт, что каждый радиотаксон объединяет организмы со сходной структурной организацией генетического аппарата [5]. По уровню структурной организации генетического аппарата

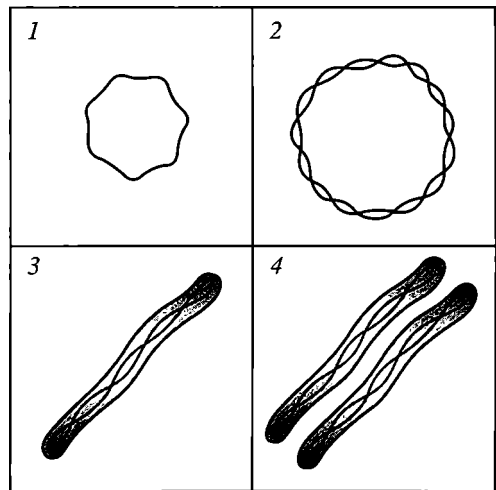


Рис. 2. Схема строения основных форм структурной организации генетического аппарата клеток

1 – одиночные кольцевые молекулы РНК или ДНК (1-й кариотаксон); 2 – двуиитевые кольцевые молекулы ДНК (2-й кариотаксон); 3 – двуиитевые молекулы ДНК, организованные в хромосомы (3-й кариотаксон); 4 – удвоенные наборы хромосом (4-й кариотаксон)

¹ Термин «радиотаксон» был предложен английским радиобиологом А.Г. Сперроу [4].

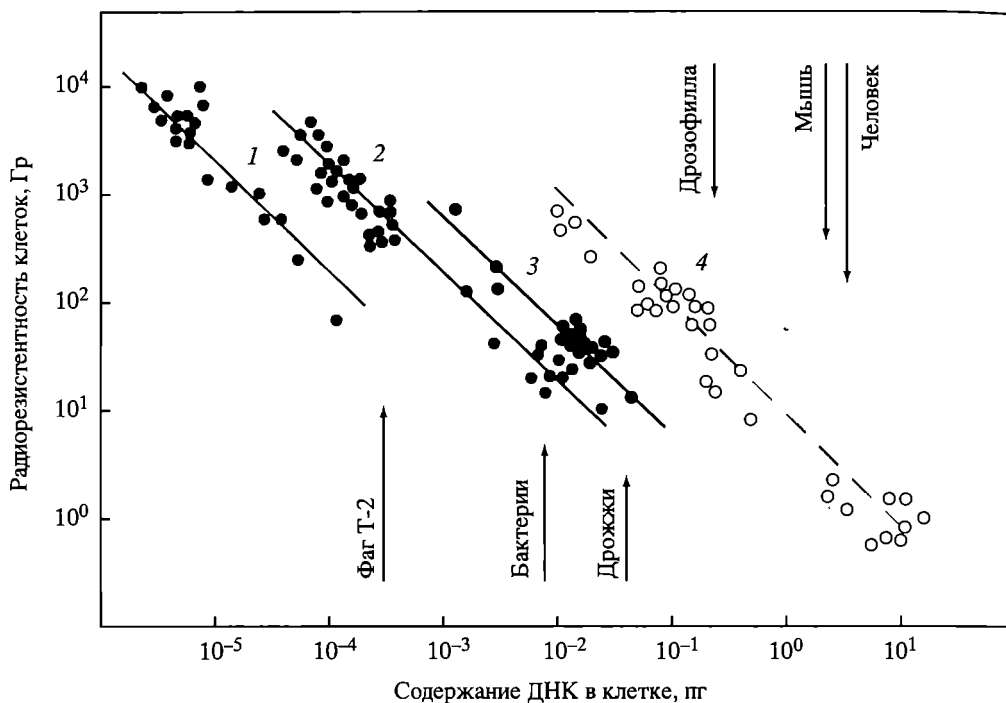


Рис. 3. Зависимость радиорезистентности, измеряемой дозой облучения (D_0), от содержания ДНК в клетках микроорганизмов, растений и животных

Для групп клеток (радиотаксонов), которым соответствует каждая из прямых, радиорезистентность уменьшается пропорционально увеличению содержания ДНК. 1-4 – номера радиотаксонов

большинство живых организмов также можно разделить на четыре группы, или кариотаксона (рис. 2). К 1-му кариотаксону относятся организмы, у которых геном представляет собой одностороннюю кольцевую молекулу РНК или ДНК (некоторые «мелкие» вирусы); 2-й кариотаксон составляют организмы с двунитевой кольцевой молекулой ДНК (остальные вирусы, а также бактерии и синезеленые водоросли); 3-й кариотаксон включает в себя эукариоты-гаплонты, у которых двунитевые молекулы ДНК организованы в хромосомы, а вегетативно размножающиеся клетки содержат по одному набору таких хромосом (многие грибы и водоросли); наконец, к 4-му кариотаксону относятся эукариоты-диплонты, у которых вегетативно размножающиеся клетки содержат по два идентичных набора хромосом (некоторые грибы и водоросли, а также все высшие растения и животные, включая человека). (Я не рассматриваю здесь структурную организацию генома гиперплоидных и многоядерных простейших, а полиплоидные растения отношу к 4-му кариотаксону, так как жизненный цикл у них такой же, что и у типичных эукариот-диплонтов.)

Изучение зависимости радиочувствительности таких клеток от содержания в них ДНК показало, что каждый радиотаксон объединяет организмы, относящиеся преимущественно к одному и тому же кариотаксону (рис. 3).

Чем больше требуется энергии излучения, чтобы повредить генетический аппарат, тем он устойчивее, надежнее, поэтому надежность генома можно выражать в количестве энергии (обычно в электрон-вольтах), вызывающей в нем в среднем одно повреждение. Для оценки величины надежности

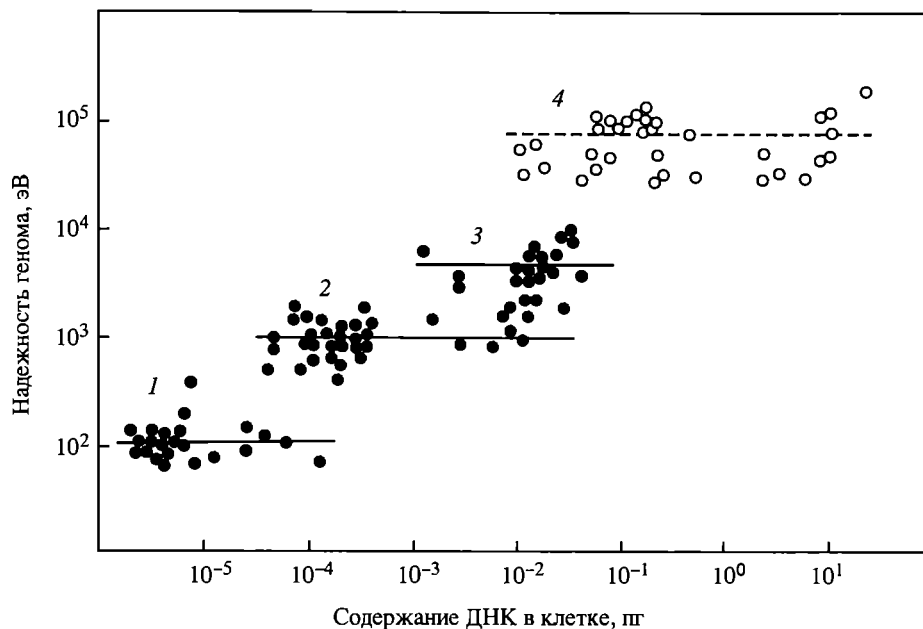


Рис. 4. Зависимость надежности генома от содержания ДНК для организмов, относящихся к разным кариотаксонам

Для организмов, относящихся к одному и тому же кариотаксону, надежность генома колеблется около некоторого среднего значения, а при переходе от одного кариотаксона к другому быстро возрастает, 1-4 – номера кариотаксонов

генома можно использовать произведение D_0C , где C – содержание ДНК в клетке [6]. Среднее значение K этой величины для организмов, относящихся к одному кариотаксону, обозначает надежность генома организмов данного кариотаксона (рис. 4). При переходе от 1-го кариотаксона к 4-му надежность генома увеличивается почти в 600 раз (таблица).

С усложнением структурной организации генома содержание ядерной ДНК в клетках организмов от 1-го и до 4-го кариотаксона увеличивается на 4-6 порядков. Если бы надежность генома не зависела от уровня его структурной организации, то с увеличением содержания ДНК устойчивость клеток к мутагенам катастрофически бы уменьшалась: так, в случае действия ионизирующих излучений для клеток человека D_0 была бы близка к 0,01 Гр, что в сотни раз меньше, чем в действительности. Этого, однако, не происходит: сенсibiliзирующий эффект увеличения содержания ДНК компенсируется ступенчатыми повышениями надежности генома при переходе от одного кариотаксона к другому.

Содержание ДНК и надежность генома у организмов разных кариотаксонов

Кариотаксон	Содержание ДНК на геном, пг	Надежность генома, · 100 эВ
1	$10^{-6} - 10^{-4}$	1,2
2	$3 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$	10,7
3	$10^{-3} - 10^{-1}$	45,8
4	$10^{-2} - 10^2$	610,5

Можно полагать, что в природных условиях уровень мутабельности у разных организмов обуславливается тремя основными факторами: величиной мутагенного фона, надежностью генома и содержанием в нем ДНК. Если принять, что мутагенный фон в разных регионах Земли во все времена был примерно одинаков, остаются два последних фактора. Из определения надежности генома следует, что устойчивость клеток к мутагенным воздействиям, например к ионизирующим излучениям, равна $D_0 = K/C$. Так как слишком высокая мутабельность должна неблагоприятно сказываться на судьбе популяции, то величина D_0 не может быть меньше некоторого критического значения. В таком случае максимальное количество ДНК, которое может содержаться в геноме организмов, относящихся к данному кариотаксону (т.е. при данном значении его надежности K), не может превышать некоторой пороговой величины. Такое максимально допустимое содержание ДНК будет определяться прежде всего надежностью генома и может увеличиваться только с увеличением его надежности: клетка не в состоянии содержать больше наследственной информации, чем допускает прочность ее носителя.

По мере увеличения, в ходе эволюции, количества ДНК в геноме у организмов данного кариотаксона, по мере его приближения к значению, когда уровень мутабельности угрожающе возростал, надежность генома приобретала, по-видимому, все большую селективную ценность. Можно думать, что в зоне «критической мутабельности» естественный отбор подхватывал и закреплял любые изменения в организации генома, повышающие его надежность. «Геномные ароморфозы», когда происходило резкое повышение его надежности, существенно сдвигали вверх границы предельно допустимого содержания ДНК и тем самым открывали новые возможности для последующего увеличения количества генетической информации. В ходе эволюции такие события происходили по меньшей мере три раза; особенно возросла надежность генома при переходе от эукариот-гаплонтов к эукариотам-диплонтам.

Конечно, нельзя считать, что эволюция шла по прямому пути от вирусоподобных организмов до высших растений и млекопитающих, а биологический прогресс был связан только с монотонным увеличением количества генетической информации. Организация генома предков современных прокариот еще дискутируется, а в ходе прогрессивной эволюции отдельных таксонов, по-видимому, количество ДНК на геном не только увеличивалось, но и уменьшалось [7]. Это, однако, не противоречит выводу, который можно сделать из сказанного выше: *надежность генома – существенный фактор, лимитирующий сверху содержание в нем ДНК, а повышение надежности генома при переходе от одного кариотаксона к другому – необходимая предпосылка дальнейшего увеличения количества генетической информации.* Такова возможная роль надежности генома в прогрессивной биологической эволюции.

ДИПЛОИД-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕПАРАЦИЯ И ЕЕ РОЛЬ В НАДЕЖНОСТИ ГЕНОМА

Высказанное выше положение, думаю, можно рассматривать как гипотезу, заслуживающую определенного внимания. Ведь хорошее соответствие кариотаксонов радиотаксонам не может быть простой случайностью – скорее всего, оно отражает общебиологическую закономерность.

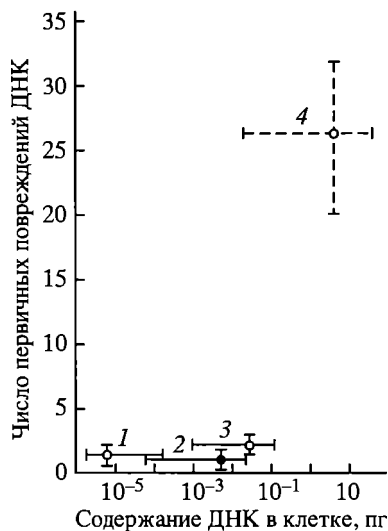
Рис. 5. Число первичных повреждений ДНК на геном при облучении дозой D_0 клеток организмов, относящихся к разным кариотаксонам (1–4)

Поэтому вопрос о том, каковы механизмы, обеспечивающие повышение надежности генома с усложнением его структурной организации, также представляет большой интерес. При обсуждении этого вопроса мы опять обратимся к радиобиологии, сознавая, однако, что такой подход не столько даст нам окончательный ответ, сколько наметит пути дальнейших исследований.

Весьма обширные данные о возникновении одиночных и двойных разрывов ДНК при ее облучении в растворах и живых клетках позволяют считать, что надежность генома у представителей 1-го и 2-го кариотаксонов имеет физико-химическую природу: чтобы получить одиночный разрыв в молекуле ДНК или РНК, вызывающий повреждение одонитевой молекулы нуклеиновой кислоты, необходима доза около 100 эВ, а для образования двойного разрыва (что приводит к повреждению двуниевой ДНК) нужно около 1000 эВ. Эти данные соответствуют значениям надежности генома этих организмов. У представителей 3-го кариотаксона более высокая надежность генома (около 5000 эВ) может быть обусловлена наличием белкового матрикса хромосом, благодаря чему для их повреждения требуется больше энергии, чем для образования двойного разрыва в «голой» молекуле ДНК. Вот почему определение надежности генома по радиационно-химическим выходам первичных повреждений ДНК для первых трех кариотаксонов дает величины, близкие к единице, — роль физико-химического фактора в обеспечении их надежности ведущая.

Совершенно другая ситуация в случае 4-го кариотаксона: здесь на одно биологически значимое повреждение приходится до 30–40 двойных разрывов ДНК (рис. 5). Так как строение хромосом у организмов 3-го и 4-го кариотаксонов идентично, то резкое повышение надежности генома (в 10–20 раз!) при переходе от гаплоидных к диплоидным клеткам эукариот физико-химическими факторами объяснить нельзя. Чем же обуславливается этот феномен?

При действии ионизирующих излучений более высокая надежность генома организмов 4-го кариотаксона проявляется в том, что диплоидные клетки эукариот значительно устойчивее к облучению, чем гаплоидные. Это хорошо видно на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, природных диплоидов, у которых можно искусственно получать вегетативно размножающиеся гаплоидные клетки. Этот факт известен давно. Вначале его объясняли тем, что большинство облученных гаплоидных клеток погибает якобы за счет генных рецессивных летальных мутаций, которые «безвредны» для диплоидных клеток. Позже было обнаружено, что такие мутации при облучении возникают крайне редко, а лучевую гибель как гаплоидных,



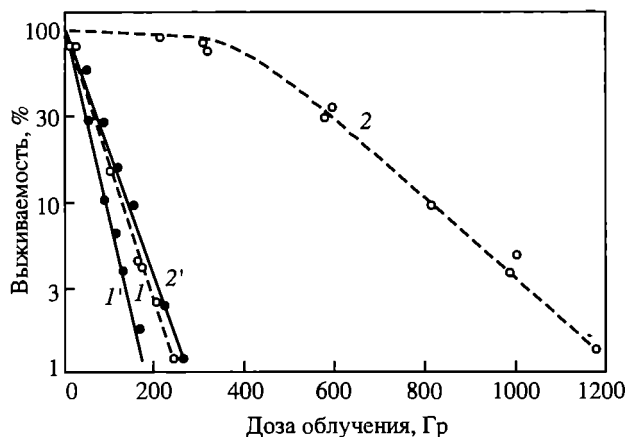


Рис. 6. Выживаемость гаплоидных и диплоидных клеток дрожжей-сахаромицетов при действии ионизирующих излучений (1 и 2 соответственно) и тех же клеток, несущих мутацию (1', 2'), которая блокирует диплоид – специфическую репарацию ДНК. Видно, что такие мутации мало сказываются на радиорезистентности гаплоидных клеток (1, 1'), но резко уменьшают устойчивость диплоидных клеток (2, 2')

так и диплоидных клеток дрожжей вызывают в основном однотипные повреждения, скорее всего, хромосомные мутации [8]. Но в диплоидных клетках содержится в два раза больше ДНК, чем в гаплоидных, и значит такие повреждения у них должны возникать в два раза чаще. Почему же диплоидные клетки дрожжей-сахаромицетов устойчивее к облучению, чем гаплоидные?

Еще в конце 50-х годов было установлено, что диплоидные клетки дрожжей-сахаромицетов, в отличие от гаплоидных, эффективно восстанавливаются от летальных лучевых повреждений. В ходе этого восстановления ликвидируются (репарируются) разрывы молекул ДНК [9]. Это позволяет считать, что высокая надежность генома у диплоидных клеток этих дрожжей (4-й кариотаксон) по сравнению с гаплоидными клетками этих же дрожжей (3-й кариотаксон) обуславливается диплоид-специфической репарацией, т.е. исправлением поврежденных участков ДНК, требующим для своего осуществления двух наборов хромосом. Этот вывод хорошо подтверждается тем фактом, что у дрожжей-сахаромицетов мутации генов, контролирующих диплоид-специфическую репарацию ДНК, мало сказываются на радиорезистентности гаплоидных клеток, но резко уменьшают устойчивость к облучению клеток диплоидных (рис. 6). Репарация ДНК присуща и другим организмам, относящимся к 4-му кариотаксону, — дрозофиле, мыши, человеку. Во всех этих случаях мутации генов, нарушающие репарацию, увеличивают чувствительность к мутагенным воздействиям. Вероятно, диплоид-специфическая репарация ДНК обуславливает высокую надежность генома не только у диплоидных клеток дрожжей-сахаромицетов, но и у других представителей 4-го кариотаксона.

Репарация ДНК – процесс, в котором участвует большое число ферментов, синтез которых контролируется разными генами. Для диплоид-специфической репарации необходим не только полный комплект этих ферментов, но и двойной набор хромосом: неповрежденные участки одной из

гомологичных хромосом служат как бы образцом для починки (с помощью ферментов) поврежденных участков другой. Если какое-либо из этих условий не соблюдается, диплоид-специфическая репарация не идет. Это означает, что в случае дефекта системы репарации диплоидные клетки эукариот будут относиться не к 4-му, а к 3-му радиотаксону и, следовательно, будут более чувствительны к мутагенам, чем гаплоидные, в ядрах которых содержится в два раза меньше ДНК.

Если предположение о селективной ценности надежности генома справедливо, то при отсутствии или дефекте репарационной системы гаплоидные клетки эукариот должны иметь селективное преимущество перед диплоидными, у которых чаще возникают летальные повреждения генетического аппарата. В таком случае можно ожидать, что существующие в природных условиях эукариоты-гаплонты дефектны по системе репарации.

Для проверки этого предположения были использованы природные дрожжи-гаплонты *Pichia guilliermondii* и *Pichia pinus* [10]².

Половой процесс присущ и дрожжам-диплонтам, и гаплонтам, только у первых зигота дает начало вегетативно размножающимся диплоидным клеткам, а у вторых вслед за копуляцией клеток-гамет происходит редукционное деление зиготы и прорастание вегетативно размножающихся половых клеток – аскоспор. Путем подбора состава питательной среды у дрожжей-гаплонтов были получены стабильные при длительном культивировании диплоидные клетки. Опыты показали, что у этих дрожжей диплоидные клетки почти в два раза чувствительнее к облучению, чем гаплоидные, т.е. и те и другие относятся к 3-му радиотаксону. Было также установлено, что диплоидные клетки дрожжей-гаплонтов не могут восстанавливаться от лучевых повреждений [11]. Все это очень хорошо подтверждает предположение, что высокая надежность организмов 4-го кариотаксона обусловлена диплоид-специфической репарацией и имеет селективную ценность.

Диплоид-специфическая репарация у дрожжей, как и у других организмов, происходит при участии большого числа ферментов. Многие из этих ферментов необходимы и для других процессов жизнедеятельности. Отдельные ферменты репарационной системы первоначально возникали, скорее всего, независимо друг от друга, выполняя при этом различные функции. Только после того, как образовался полный набор ферментов, они смогли осуществлять совершенно новую функцию – восстанавливать от поврежденных ДНК и хромосомы при наличии неповрежденных гомологов, т.е. в диплофазе жизненного цикла клеток. У гаплоидных клеток наличие полного набора репарационных ферментов мало сказывалось на их жизнеспособности, зато у диплоидных резко увеличивало надежность генома. Можно думать, что по крайней мере у некоторых одноклеточных эукариот это сыграло решающую роль в переходе диплоидной зиготы к вегетативному размножению с последующей редукцией гаплофазы, т.е. к диплоидной форме вегетативной фазы жизненного цикла. Таков один из возможных путей возникновения в ходе эволюции эукариот-диплонтот.

²*Pichia methanolicola*. Реидентифицирован (Толсторуков И.И. // Генетика. 1994. Т. 30, № 5. С. 635–640).

КАСКАДНЫЙ МУТАГЕНЕЗ У ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК

Обратим теперь внимание на следующие хорошо известные факты. И 1-й, и 2-й кариотаксоны представлены только одноклеточными организмами. В 3-й кариотаксон, наряду с одноклеточными, входят и многоклеточные организмы-гаплонты (некоторые водоросли), но это тупики эволюции, не давшие начала высшим формам жизни. Все высшие растения и животные относятся к 4-му кариотаксону, который объединяет подавляющее большинство эукариот-диплонтот, от дрожжей до человека.

Это означает, что именно диплоидное состояние клеток в вегетативной фазе жизненного цикла послужило основой для расцвета прогрессивной эволюции. Действительно, решающее значение в переходе к высшим многоклеточным принадлежало морфофизиологической дифференциации гамет на мужские и женские с последующим формированием оогамии (когда мужские гаметы представляют собой сперматозоиды, а женские – яйцеклетки); оогамия, в свою очередь, явилась предпосылкой для возникновения эмбриогенеза. При редукционном делении зиготы, как это происходит у гаплонтов, это исключено.

Каждый очередной шаг эукариот-диплонтот по пути прогрессивной эволюции был связан с увеличением генетической информации. Возможность этого, как мы видели, была создана диплоид-специфической репарацией, резко увеличившей надежность генома. Но для эволюции диплонтот характерна еще одна особенность – высокий темп наращивания количества ДНК. Если для увеличения содержания ДНК в клетках, как уже отмечалось, большое значение имеют хромосомные и геномные мутации, то следует ожидать, что и в этом отношении диплонтот обладают каким-то преимуществом перед гаплонтами. Посмотрим, так ли это, опять обратившись к результатам радиобиологических экспериментов.

Для гаплоидных клеток зависимость выживаемости от дозы облучения описывается экспоненциальной кривой, а для диплоидных, как правило, – кривой с «плечом». Мы уже отмечали, что в обоих случаях летальны хромосомные мутации, а различная радиочувствительность клеток обусловлена диплоид-специфической репарацией. Особенности же форм кривых выживания гаплоидных и диплоидных клеток отражают тот факт, что для первых абсолютно летальна практически любая хромосомная мутация, а для вторых единичные мутации лишь частично снижают жизнеспособность, и для того чтобы диплоидная клетка погибла, в ней должно возникнуть два или больше таких повреждений [12]. Это не связано с эффектом восстановления, а обусловлено тем, что повреждение одной из гомологичных хромосом обычно частично компенсируется его отсутствием у второй. Но самое замечательное здесь то, что диплоидные клетки с такими повреждениями, если они выживают, дают начало нестабильным клонам, т.е. семействам клеток, у которых мутации возникают во много раз чаще, чем у клеток, не несущих подобных повреждений. Это явление было впервые обнаружено Г.А. Надсоном и Г.С. Филипповым, а затем, много лет спустя, подробно изучалось в нашей лаборатории [13].

Облученные гаплоидные клетки на агаризованной питательной среде дают одинаковые по размерам и форме колонии – такие же, как и необлученные (рис. 7). Из облученных диплоидных клеток, напротив, вырастают колонии разных форм и размеров. Такие нестандартные колонии, образующиеся из отдель-

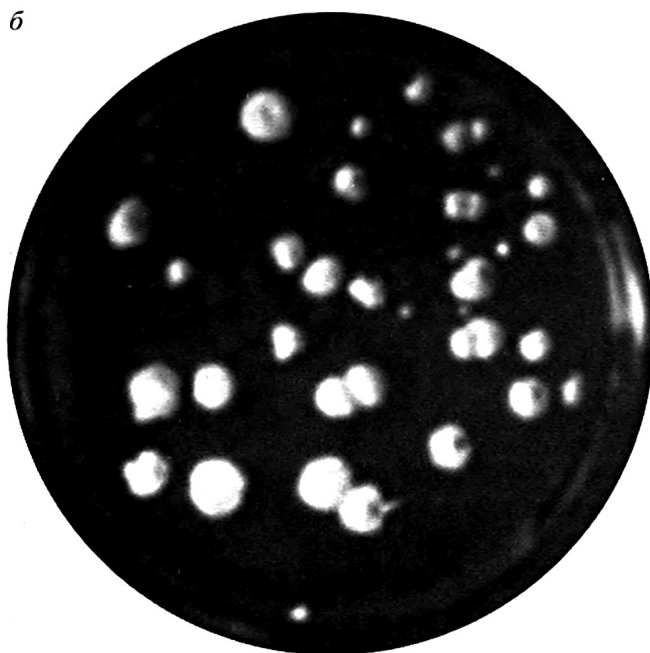


Рис. 7. Колонии облученных гаплоидных (*a*) и диплоидных (*б*) клеток дрожжей-сахаромицетов. Разные формы и размеры колоний у диплоидов свидетельствуют об образовании нестабильных мутантов

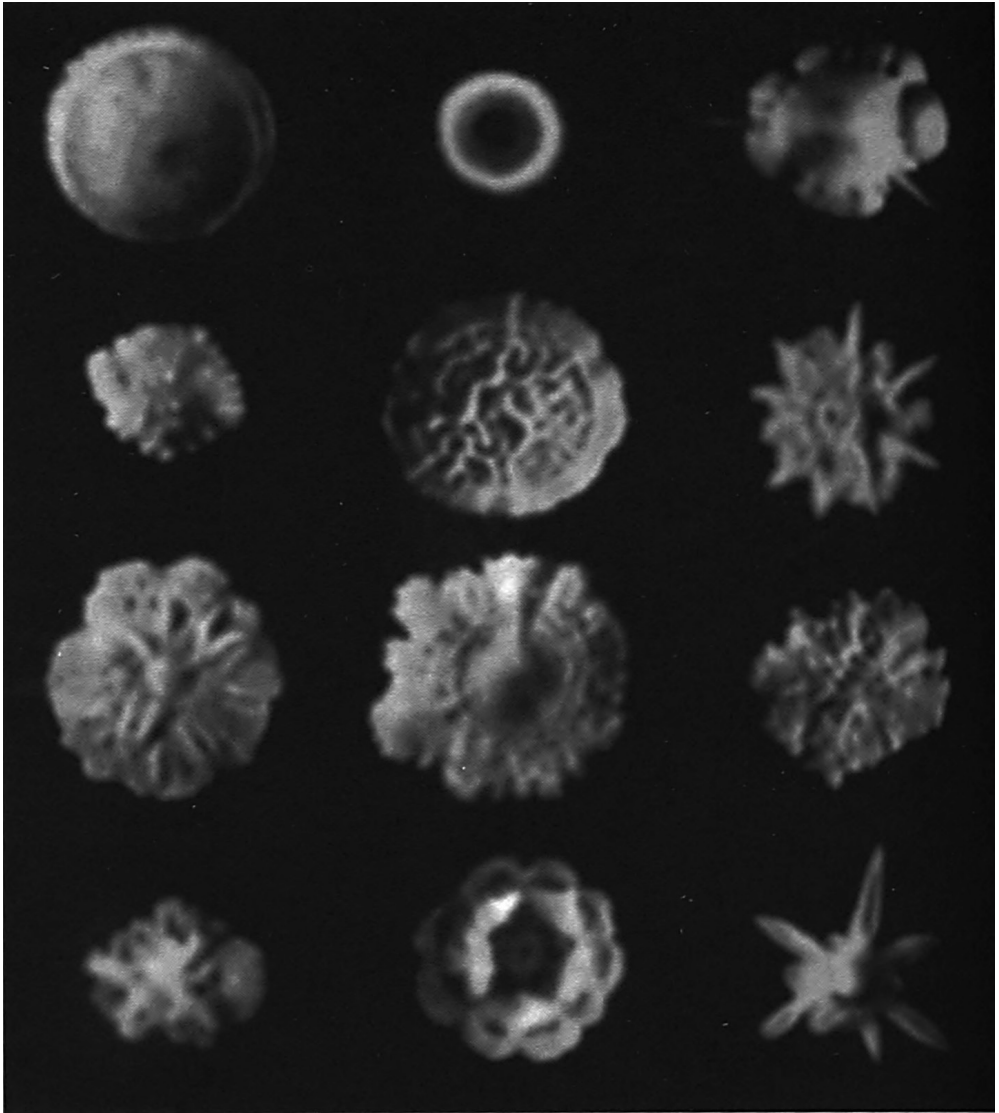


Рис. 8. Наглядная иллюстрация каскадного мутагенеза: после однократного облучения исходной клетки (вверху слева) из одного нестабильного клона образуется несколько новых рас диплоидных дрожжей

ных частично поврежденных диплоидных клеток, содержат, как правило, большое число разных морфологических мутантов, одни из которых стабильны, а другие при последующих пересевах дают начало все новым и новым формам.

Облученные диплоидные клетки образуют нестабильные клоны очень часто – выход их может достигать 50%! Процесс новообразования мутантов в нестабильных клонах может продолжаться очень долго, на протяжении сотен клеточных делений. В результате такого *каскадного мутагенеза* из одной исходной клетки после однократного облучения можно получить множество новых рас (рис. 8).

Каскадный мутагенез у диплоидных клеток вызывают не только ионизирующие излучения, но и другие повреждающие хромосомы воздействия –

ультрафиолетовый свет, химические соединения, повышенная температура. Изредка нестабильные клоны возникают и спонтанно.

Вероятно, в основе каскадного мутагенеза лежит хромосомная нестабильность всего генома. Пусковым событием здесь служит, скорее всего, мутация одной из хромосом, возникающая непосредственно при действии мутагена, что приводит генетический аппарат как бы в возбужденное состояние; начинается «слепой поиск», в ходе которого образуются самые разные хромосомные и геномные мутации, все новые перестройки генетического аппарата, продолжающиеся до тех пор, пока не сформируются стабильные комбинации. Число стабильных состояний для каждого генома, по-видимому, не так уж велико, что и позволяет часто наблюдать возникновение сходных вариантов. В эксперименте из чистой исходной культуры дрожжей можно получить такие же по внешнему виду расы, какие характерны для разных штаммов, видов и родов дрожжей природного происхождения. Здесь наблюдается прямая аналогия с законом гомологических рядов в наследственной изменчивости [14].

Можно думать, что в ходе каскадного мутагенеза часто возникают хромосомные перестройки, приводящие к дупликациям – удвоениям относительно крупных участков отдельных хромосом. Об этом свидетельствует следующее. У гаплоидных клеток, как уже отмечалось, получить нестабильные клоны нельзя. Такие клоны, однако, весьма часто встречаются среди аскоспорового потомства нестабильных диплоидных клеток. Известно, что дупликации хромосом могут вызывать генетическую нестабильность даже у гаплоидных организмов. Можно думать, что, возникнув в диплоидной клетке и пройдя через мейоз (редукционное деление) при образовании аскоспор, такие дупликации и служат причиной нестабильности гаплоидных дрожжей, получаемых из аскоспор нестабильных диплоидных клеток.

Хотя опыты, результаты которых описаны выше, проводились только на дрожжевых организмах, на основании ряда косвенных данных можно предположить, что каскадный мутагенез свойствен диплоидным клеткам и других эукариот. Следовательно, хромосомная нестабильность, легко индуцируемая у диплоидных клеток, может вносить существенный вклад в эволюцию геномов организмов 4-го кариотаксона по пути увеличения содержания генетической информации.

НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА И ПРОГРЕССИВНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ

Таким образом, анализ результатов радиобиологических экспериментов позволяет сформулировать следующую точку зрения на возможную роль повышения надежности генома в прогрессивной биологической эволюции.

По мере накопления в клетках ДНК все большую селективную ценность приобретала надежность генетического аппарата. Задача повышения надежности генома могла иметь разные решения; одни из них оказывались тупиковыми, так как препятствовали его дальнейшему совершенствованию, а другие открывали новые пути для прогрессивной эволюции. Примерами первых могут служить многоядерность и полигеномность у некоторых простейших, примером вторых – диплоид-специфическая репарация.

Диплоид-специфическая репарация стала возможной, скорее всего, у гаплоидных предков современных эукариот-диплонтот в результате удачного

сочетания функций нескольких ферментов, первоначально выполнявших другие функции; судя по множественному эффекту мутаций генов, контролирующих синтез репарационных ферментов, эти функции выполняются ими до сих пор. Переход к вегетативной диплофазе, реализовавшей эту возможность, был, таким образом, «непредвидимым» следствием совместной деятельности этих ферментов. Диплоидное состояние генома не только открыло пути для дальнейшего увеличения содержания в них ДНК, но и «создало» весьма эффективный механизм осуществления этого процесса – каскадный мутагенез, а также послужило основой для морфофункциональной дифференциации гамет. В последующем все это привело к возникновению оогамии и высших многоклеточных растений и животных.

Конечно, я далек от мысли, что это – единственный механизм прогрессивной эволюции генома. Другие механизмы, ему сопутствующие и, может быть, не менее эффективные, еще предстоит установить. Но одна особенность рассмотренного выше механизма, которую я уже отмечал, должна быть присуща им всем. Это – выявление в новых ситуациях новых свойств и функций у тех черт строения живых организмов, которые первоначально создавались естественным отбором в качестве одного из возможных решений совершенно других, злободневных, задач. Здесь явная аналогия с феноменом, который античные математики называли поризмом: когда метод решения какой-либо частной математической задачи оказывался значительно важнее для дальнейшего развития науки, чем та задача, которую с его помощью удалось решить [15]. Думаю, это сходство биологической эволюции и развития человеческого знания отражает наиболее общие закономерности динамики информации, лежащей в их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимофеев-Ресовский Н.В. Генетика, эволюция и теоретическая биология // Природа. 1980. № 9. С. 62.
2. Шапиро Н.И. // Зоол. журн. 1938. Т. 17. С. 592; Берг Р.Л., Тимофеев-Ресовский Н.В. // Проблемы кибернетики. 1964. Вып. 5. С. 183.
3. Тимофеев-Рессовский Н.В. Experimentelle Mutationforschung in der Vererbungslehre. Dresden, Leipzig, 1937.
4. Sparrow A.H., Underbrink A.G., Sparrow R.C. // Rad. Res. 1967. Vol. 32. P. 915.
5. Kaplan H.C., Moses L.E. // Science. 1964. Vol. 145. P. 21; Савич А.В., Шальнов М.И. // Системы надежности клеток. Киев, 1977. С. 46.
6. Корогодин В.И. // Радиобиология. 1982. Т. 22. С. 147.
7. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. М., 1982; Шальнов М.И. // Радиобиология. 1977. Т. 17. С. 652.
8. Корогодин В.И., Гудкова Н.К., Близник К.М. // Радиобиология. 1978. Т. 18. С. 516.
9. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. М., 1966; Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V. // Mol. Biol. Rep. 1977. Vol. 3. P. 437.
10. Корогодин В.И. // Радиобиология. 1977. Т. 17. С. 700.
11. Глазунов А.В., Лобачевский П.Н. // Радиобиология. 1983. Т. 23. С. 409.
12. Капulyцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М., 1978.
13. Надсон Г.А., Филиппов Г.С. // Вест. рентгенол. радиол. 1932. № 10. С. 275; Корогодин В.И., Близник К.М. // Радиобиология. 1972. Т. 12. С. 163; Корогодин В.И., Близник К.М., Капulyцевич Ю.Г. // Там же. 1972. Т. 12. С. 416; 1977. Т. 17. С. 492; Толсторуков И.И., Близник К.М., Корогодин В.И. // Генетика. 1982. Т. 18. С. 1276.
14. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Саратов, 1922.
15. Грязнов Б.С. О взаимоотношении проблем и теорий // Природа. 1977. № 4. С. 60.

В 40-е гг. XX в. мутирование гена рассматривалось как химическая перестройка гена-макромолекулы, требующая большой энергии активации [1]. Одним из первых, кто выступил с другой точкой зрения, был М.Е. Лобашев. В 1947 г. он предложил паранекротическую гипотезу, которая связывала появление мутаций с ошибками процесса репарации и условиями среды обитания организмов [2]. В 70-е гг. XX в. изучение механизмов репликации показало, что источником мутаций могут быть ошибки копирования, связанные с различного рода дисбалансами в синтезе ДНК или метаболизме предшественников. Началом изучения феноменологии дисбаланса было описание «бестиминовой гибели», или «тиминового стресса» [3]. Среди этих исследований следует упомянуть работы С.Е. Бреслера, М.И. Мосевичко и Л.Г. Вячеславова [4]. В 1975 г. Бреслер сформулировал гипотезу ошибок репликативного и репаративного синтеза под влиянием тиминового голодания. Большой вклад в изучение влияния дисбаланса пула нуклеотидов на мутагенез внесли американские генетики Р. Хейнс [5], Б. Кунц, Б. Барклай и др. Все авторы отметили генную специфичность этого явления.

В.И. Корогодина много лет размышлял о возможности влияния условий культивирования на мутабельность генов. Он обсуждал гипотезы с генетиками Москвы и Ленинграда И.И. Толсторуковым, Т.А. Дутовой, Д.А. Гордениным, Ю.И. Павловым, В.В. Алениным, В.Г. Королевым и др. Эксперименты Владимир Иванович поставил в Дубне в Объединенном институте ядерных исследований. В них приняли участие сотрудники института В.Л. Корогодина (Ильина) и Ч. Файси, а также коллеги из Ереванского Физического института К. Восканян, Н. Симонян, Джанполадян Н.Л., Абетян Н.О. Позже такие исследования были начаты в группе А.И. Чепурного (ОИЯИ).

Корогодина использовал адениновую систему биосинтеза, для которой известно, что избыток аденина в среде культивирования репрессирует работу системы. В опытах можно было определить частоту ревертирования в гене *ADE2* и прямые мутации в генах-супрессорах, оценить транскрипционную активность *ADE2* гена. Опыты показали, что на среде с дефицитом аденина происходит более активная транскрипция аденинового гена и частота мутирования повышается на 2–3 порядка, в то время как в генах-супрессорах она повышается, но не столь значительно [6].

Впервые предположение о ключевой роли в повышении частоты мутирования транскрипционной активности гена было сделано В.И. Корогодиным в 1987 г. [6], а затем им была сформулирована гипотеза о влиянии функциональной активности гена на мутабельность [7]. Он указал несколько важных следствий этой гипотезы. Во всех случаях, когда изменение условий среды сопровождается изменением активности генов, может наблюдаться «генная

специфичность» мутагенеза. Поэтому частоту мутирования генов следует задавать не одной величиной, а распределением на пространстве режимов; эти эффекты играют существенную роль в эволюции и в дифференцировке тканей в онтогенезе и иммунной системе.

В конце 80-х годов на западе интенсивно изучали мутагенез у микроорганизмов. В 1988 г. Кэрнс, Овербах и Миллер опубликовали в журнале «Nature» статью, в которой доложили, что селекция по лактозе приводит к гипермутагенезу в одном из генов лактозного оперона клеток *LAC⁻ Escherichia coli* [8]. Они назвали феномен «адаптивным мутагенезом». Эта публикация вызвала большой резонанс и огромное число публикаций [9, 10]. Особенно значительны и важны обширные исследования С. Розенберг, П. Фостер и Д. Росса, которые вместе с коллегами показали, что адаптивный мутагенез складывается из двух независимых механизмов: появления вторичных точковых мутаций и амплификации генов; обе реакции индуцируются транскрипционным фактором RpoS, являющимся общим ответом на стресс [11, 12, 13]. Связь мутагенеза с транскрипцией подтверждена у дрожжей-сахаромицетов [14, 15]. Исследования Ю.И. Павлова и его коллег показали [16], что гипермутагенез связан как с транскрипционной активностью генов [7], так и с ошибками репликации [4]. Открытия в области генетики мобильных элементов также свидетельствуют о том, что клетка как целостная система в ходе отбора может адаптивно перестраивать свой геном. Она способна ответить на изменение среды активным генетическим поиском [17]. Во всех случаях «функциональная активность» тех или иных компонентов клетки приводит к повышению их мутабельности (например, [18]). Механизм адаптивного мутагенеза имеет большое прикладное значение, особенно в медицине. Исследования его продолжают, в основном, на западе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физика. М.: Атомиздат, 1972. 88 с.
2. Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. ЛГУ. 1947. № 8. С. 10–29.
3. Cohen S.S., Barner H.D. The death of bacteria as a function of unbalanced growth // *Pediat.* 1955. Vol. 16. P. 704–708.
4. Haynes R.H., Kunz B.A. DNA repair and mutagenesis in yeast. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance* / Eds J.N. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. P. 371–414.
5. Bresler S.E., Mosevitsky M.I., Vyacheslavov L.J. Mutation as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency // *Mutat. Res.* 1973. Vol. 19. P. 281–293.
6. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде // *Генетика.* 1987. Т. 13, № 4. С. 637–642.
7. Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajsci Cs. Mutability of genes depends on their functional state – a hypothesis // *Biol. Zenl. bl.* 1990. Vol. 109. P. 447–451.
8. Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // *Nature.* 1988. Vol. 335. P. 142–145.
9. Drake J.W. Spontaneous mutation // *Annu. Rev. Genet.* 1991. Vol. 25. P. 125–146.
10. Foster P.L. Adaptive mutation: the uses of adversity // *Annu. Rev. Microbiol.* 1993. Vol. 47. P. 467–504.
11. Lombardo M.J., Aponyi I., Rosenberg S.M. General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* // *Genetics.* 2004. Vol. 166, N 2. P. 669–680.
12. Foster P.L. Stress-induced mutagenesis in bacteria // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2007. Vol. 42, N 5. P. 373–397.

13. Roth J.R., Kugelberg E., Reams A.B. et al. Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy // *Annu. Rev. Microbiol.* 2006. Vol. 60. P. 477–501.
14. Morey N.J., Greene C.N., Jinks-Robertson S. Genetic analysis of transcription associated mutation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 2000. Vol. 154. P. 109–120.
15. Kim N., Amy L., Abdulovic A.L. et al. Transcription-associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication // *DNA repair* 2007. Vol. 6. P. 1285–1296.
16. Achilli A., Matmati N., Casalone E. et al. The exceptionally high rate of spontaneous mutations in the polymerase delta proofreading exonuclease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain starved for adenine // *BMC Genetics*. 2004. Vol. 5, N 34. P. 1471–2156.
17. Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. СПб., 2000. 262 с.
18. Дутова Т.А., Мордкович Н.Н., Цыганков Ю.Д. Использование адаптивного мутагенеза для идентификации ранних генов биосинтеза пуринов *de novo* метилотрофных дрожжей *Pichia methanolica* МН4 // *Генетика*. 2009. Т. 45, № 10. С. 1361–1368.

DEPENDENCE OF SPONTANEOUS REVERSION FREQUENCIES IN HAPLOID YEASTS OF DIFFERENT GENOTYPES ON THE CONCENTRATION OF ADENINE IN THE MEDIUM AND ON THE AGE OF THE CULTURE

The main causes of spontaneous mutability of genes and chromosomes are apparently the ‘unbalanced’ synthesis of nucleic acids [Bresler et al., 1973; Barclay et al., 1982; Haynes, 1985] and imbalance in the rates of DNA and protein synthesis [Fradkin, 1983]. In both cases amplification of the imbalance is accompanied by an increase in the frequency of mutations, which is usually interpreted as ‘errors of synthesis’ of genetic structures. The quantitative features of this phenomenon, however, have been studied so little, that its existence is not yet reflected in the methods used for investigation of the mutational process.

Thus, to establish the frequency of reversion in auxotrophic microorganisms the method proposed by Ryan [Ryan et al., 1955] is usually used: cells of the auxotrophic strain are grown on a medium limited in the corresponding metabolite, where only revertant cells can form large colonies, and the yield of such prototrophic colonies is counted. This method is based on the implicit assumptions that (a) mutations take place at the time of cell division only, and (b) the degree of limitation of the nutrient medium does not influence the frequency of reversion.

Adenine auxotroph strains and adenine-limited media are often used in studies on yeasts for determination of the frequency of reversion [Zakharov et al., 1984]. The possibility that variation of the adenine content may seriously influence the balance of nucleic acid synthesis and, as a consequence, the mutation frequency, is neglected in these studies. However, the assumption that the concentration of adenine in the medium does not affect the mutational process in yeasts cannot be viewed as well-grounded: in the only work devoted to this problem [Schuller and von Borstel, 1974], yeasts auxotrophic both for adenine and lysine were used, and a medium so strongly limited in lysine that differences in adenine concentration ranging from 2.5 to 500 mg/l did not change the yield or biomass of auxotrophic cells and, therefore, could not essentially affect the balance of metabolic proces-

ses. In reality, as will be shown below, in cases when the growth-limiting factor is adenine, the frequency of spontaneous reversion of adenine auxotrophs may be changed by a factor of 10^3 – 10^4 , by varying the adenine concentration and the age of the culture.

MATERIALS AND METHODS

Haploid strains with different mutabilities of the Peterhof line of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, received from Prof. I.A. Zakharov, were used: 8PG-59 (*a ade2-192 rad2*) and p192 (*a ade2-192*). Characteristics of these strains have been described in various publications [Zakharov et al., 1968; Arman et al., 1971; Zhelezniakova et al., 1975]. The composition of the media and the methods of cultivation have been dealt with by Zakharov et al. [1984].

These strains do not grow on adenine-free media, while on media containing adenine they form red-coloured colonies. Strain 8PG-59 needs lower concentrations of adenine and reaches the stationary phase earlier than strain p192 (our unpublished data). Revertants of these yeasts (occurring due to locus mutations in the *ADE2* gene or to mutations in suppressor genes) form white or pink colonies and can grow on adenine-free media.

Yeasts were cultivated on complete nutrient medium. For the experiments, the yeasts were plated in petri dishes on agarized minimal medium with 0.1, 1, 10 or 100 mg/1 adenine. (No toxic effect was observed with these concentrations.) The plating density was 100–200 cells per dish. For every version of the experiments, 10–20 petri dishes were used. The experiments were repeated several times.

The original auxotrophic cells form red colonies when growing on the minimal medium with 0.1, 1 and 10 mg/1 adenine, whereas on medium containing 100 mg/1 adenine the colonies are white. The size of colonies increases with increasing adenine concentration. Some of the colonies contain no revertants at all; others contain so-called 'hidden revertants', that is, separate cells or microcolonies, which cannot be seen with the naked eye. On the surface of colonies of the third type, easily distinguishable colonies of revertants – 'papillae' appear.

The frequency of reversion was determined after different periods of incubation at 30 °C. First, the total number, N , of colonies in the petri dish was counted; then the cells were washed from the dish and the number, T , of cells in a petri dish was determined using a Goryaiev's counting chamber. The average number, n , of auxotrophic cells in a colony was calculated to be $n = T/N$. Simultaneously the number, N_p , of colonies with papillae was determined, and also the proportion, q , of colonies with hidden revertants among the colonies without papillae. To find the colonies with hidden revertants, a technique described by Zakharov (1966) was used. Several tens of colonies without papillae were smeared (each separately) on agarized adenine-free minimal medium; if some of them contained revertants, then in 4–5 days one or more large white prototrophic colonies formed in the area of the smear [Ilyina et al., 1985]. Preliminary experiments showed that pre-existing revertants give visible colonies simultaneously, and earlier than revertants occurring at the time of restreaking the colonies; they can, therefore, be easily distinguished.

Although the existence of the class of colonies with hidden revertants was already described by Ryan [Ryan et al., 1955], such colonies are usually neglected when reversion frequency is determined. Then an estimate of the frequency of reversion is given by the formula $r = (1/n) \ln[N/(N - N_p)]$. If colonies with hidden revertants are also taken into account, then the frequency of reversion should be estimated according to the formula $R = [1/n] \ln[N/(1 - q)(N - N_p)]$, where q is the proportion, determined by the above technique, of colonies without papillae containing hidden revertants. Obviously, the number of 'zero-class' colonies, containing neither visible nor hidden revertants, equals $N_0 = (1 - q)(N - N_p)$. Here the reversion frequency is given as the ratio of the number of reversion events to the number of cells in the population at the given moment of time.

RESULTS

The growth curves of yeasts of strain 8PG-59 on media with different adenine content are shown in Fig. 1a. It can be seen that for all 3 adenine concentrations the logarithmic phase of growth ends on the 7th day and thereafter the stationary phase sets in. (Strain p192, as it was already mentioned, reaches the stationary phase later.) For both strains the number of cells in a petri dish in the stationary phase was proportional to the concentration of adenine (Fig. 1b); therefore in our experiments adenine served as the growth-limiting factor.

The values of the reversion frequency, r , determined by the standard method (i.e. without taking into account the hidden revertants) are shown in Table 1 for both strains, two periods of cultivation and two adenine concentrations. It can be seen that the value of the reversion frequency increases with increasing age of the culture and decreasing adenine concentration. (Data – not shown – for other concentrations and ages support this conclusion.) What does this mean?

Let us assume that the reversion frequency really does not depend on the age of the culture, nor on the concentration of adenine in the medium, and revertants

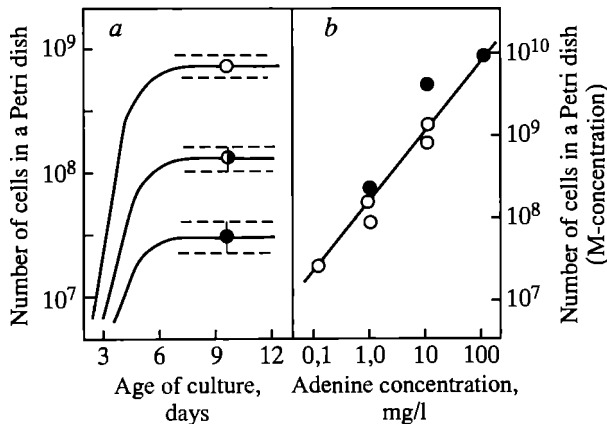


Fig. 1. Effect of adenine concentration in the solid nutrient medium on the dynamics of growth of yeast cultures, (a) Growth curves of strain 8PG-59 on media with 10 (O), 1 (●) and 0.1 (●) mg/l adenine. Each curve is derived from 3 Expts. Error bars and broken lines correspond to the 95% confidence limits of the M-concentration. (b) Dependence of the number of cells of yeasts of the strains 8PG-59 (O) and p192 (●) in the stationary phase of growth, in a petri dish, on the adenine content of the medium

**Effect of the concentration of adenine in the medium
and of the AGE of the culture on the reversion frequency, estimated
by two methods**

Strain	Adenine concentration (mg/l)	Age of cultures (days)	$n \times 10^6$	N	N_p	M	M_h	q	$r \times 10^{-8}$	$R \times 10^{-8}$
p192	100	16	60	581	0	107	1	0.01	—	0.016
		27	61	426	15	241	42	0.17	0.06	0.37
	10	16	25	278	7	112	8	0.07	0.10	0.40
		27	34	129	12	115	26	0.23	0.29	1.04
8PG-59	10	7	8.7	821	0	75	3	0.04	—	0.47
		14	14	628	30	74	13	0.18	0.35	1.73
	1	7	1.0	608	0	48	6	0.13	—	13.4
		14	1.7	419	367	50	49	0.98	123	353

n, number of cells in a colony; *N*, number of colonies; *N_p*, number of colonies with papillae; *M*, number of smeared colonies without papillae; *M_h*, number of colonies with hidden revertants; *q*, proportion of colonies without papillae containing hidden revertants: $q = M_h/M$; *r*, reversion frequency, estimated from the number of colonies without papillae; *R*, reversion frequency, with a correction due to colonies with hidden revertants.

are formed only in the logarithmic phase of growth. Then the values of *r*, given in Table 1, based on the yield of colonies of class *N_p* can only be explained by assuming that duration of cultivation and decrease of adenine content in the medium enhance the more complete expression of the revertants occurring in the auxotrophic colonies during the logarithmic phase of growth. In this case the maximal values of the estimates of the reversion frequencies (for each strain) should be regarded as the true ones, whereas smaller values are artefacts resulting from the incomplete appearance of some of the revertants. Then the proportion, *q*, of colonies with hidden revertants should decrease with increasing age of the cultures and with decreasing adenine concentration, and in the estimates *R* of the reversion frequency in which the yield of colonies with hidden revertants is taken into account the differences should vanish.

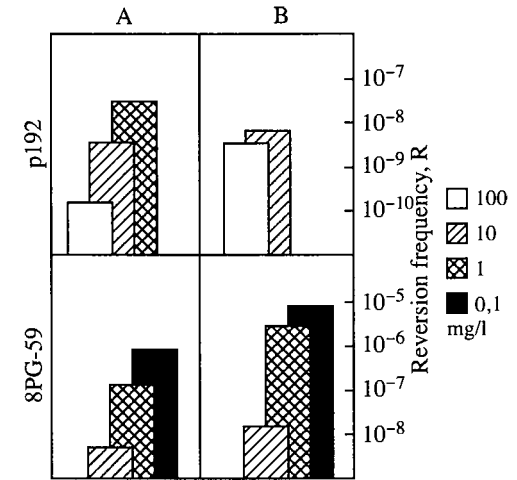
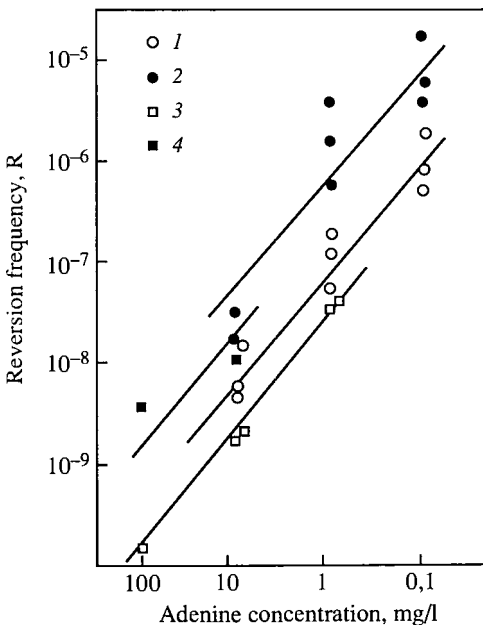
The results of determination of *q* are given in the same Table 1. It can be seen that the proportion of colonies with hidden revertants, *q*, does not decrease; on the contrary, it even increases with time and with increasing adenine concentration, and taking into account the hidden revertants does not diminish the differences in the reversion frequencies *R* between cultures of different ages on media with different adenine content. This allows us to treat the increase of reversion frequency with decreasing adenine concentration and increasing age of culture as a real fact. From Table 1 it also follows that taking into account the hidden revertants results in higher reversion frequencies (*R*) than the standard method (*r*). In the following only this more correct method of estimation of the reversion frequency will be used.

In the determination of *R*, practically every reversion which occurred in the culture up to the moment of observation is taken into account. From these data one can find the values of *R* for different time intervals as the ratio of the number of reversions which took place in this interval to the number of cells at the end

Fig. 2. Reversion frequencies for yeasts of strains p192 and 8PG-59 in the logarithmic and early stationary (A) and late stationary (B) phases of growth in media containing 100, 10, 1 and 0.1 mg/l adenine. Periods A and B correspond to 0–7 and 7–17 days for strain 8PG-59, and to 0–16 and 16–27 days for strain p192

of the interval. These results are shown in Fig. 2 for both strains of yeasts, for different conditions of cultivation and two observation intervals: logarithmic and early stationary (A) and late stationary (B) phases of growth. It is evident that in yeasts, in the conditions used in our experiments, reversions take place not only during the logarithmic phase of growth, but also during the stationary phase, and with a very high frequency.

Let us now consider how the reversion frequency depends on the concentration of adenine in the medium. In Fig. 3 the results of some experiments with both strains of yeast are shown. Light symbols denote results obtained in the early stationary phase, whereas solid symbols correspond to the late stationary phase. It can be seen that reversion frequency, depending on the growth conditions and duration of cultivation, may vary by a factor of 10^3 – 10^4 ; minimal values of R (of the order of 10^{-10} – 10^{-9}) are characteristic of young cultures on adenine-rich media, while maximal values (of the order of 10^{-6} – 10^{-5}) are characteristic of old cultures on media limited in adenine. In all cases the reversion frequency increases in inverse ratio to the adenine concentration in the medium, yielding a straight line in the double-logarithmic plot. This form of relationship is observed for both strains of yeast and for any period of observation, irrespective of the huge differences in the absolute values of R .



DISCUSSION

In our experiments reported here, we have established that in haploid adenine auxotrophic yeasts the reversion frequency increases both with age of culture and with decreasing adenine concentration in the medium. Let us assume that these two phenomena are interrelated, i.e., that the ‘effect of ageing’ is due to exhaustion of adenine in

Fig. 3. Dependence of reversion frequency of yeasts on the adenine concentration in the medium for cultures of different ages: strain 8PG-59, age 7 (1) and 17 (2) days; strain p192, age – 16 (3) and 27 (4) days, resp

the medium. Then one would expect that the effect of the initial adenine concentration on the mutability of yeasts is most pronounced in young cultures and is lessened for old cultures after establishment of the stationary phase of growth, since proportionality of the M-concentration of cells to the concentration of adenine in the medium (Fig. 1b) means that by the time of reaching the stationary phase all cultures should be equally limited in adenine. In fact, however, a pronounced dependence of mutability on the initial concentration of adenine in the medium is observed for young as well as for old cultures, and the nature of this dependence does not change with the age of the cultures (Fig. 3). One has the impression that during ageing of the culture the 'mutational pace' set by the original adenine concentration in the medium is realized.

In previous works [Ilyina et al., 1985; Ilyina and Korogodin, 1985] it was shown that these results are due neither to preferential death of auxotrophic cells at low adenine concentrations, nor to preferential death of prototrophic cells at high adenine concentrations. Therefore, the registered increase of the frequency of reversion during the stationary phase of growth of yeasts can be caused by 3 factors: (a) a delay in the phenotypic appearance of mutations occurring in the cells at the logarithmic phase; (b) a huge increase of the mutation frequency in the small number of cells dividing in the stationary phase; (c) occurrence and phenotypic appearance of mutations in non-dividing cells. The data which we have do not allow a definite choice among these possibilities. The third explanation seems most probable, as it corresponds intuitively to the situation depicted in Fig. 2, when the yield of reversions in the late stationary phase is higher than in the previous period. This phenomenon is genetically dependent: some authors did not observe it at all [von Borstel et al., 1971]; others, when studying the dynamics of appearance of reversions in a number of yeast strains, did observe the increase of the number of reversions during the stationary phase for some of them, and did not for other strains [Dutova et al., 1978]. For bacteria, mutations in the stationary phase were demonstrated by Ryan [1959].

As shown in Fig. 3, the reversion frequency in repair-defective yeasts (strain 8PG-59) is higher for all observation periods and all conditions of cultivation than that of yeasts with a normal repair system (strain p192). This allows us to assume that mutagenesis in the stationary phase of yeasts is related to 'error of repair' of spontaneously occurring DNA damage. The material for such repair is the nucleotide pool of the cells. Assuming that in adenine auxotrophic yeasts, in the stationary phase, the relative adenine content in the nucleotide pool used for repair is proportional to the initial adenine concentration in the medium, the dependence of reversion frequency on the adenine concentration in the medium may be explained in terms of the hypothesis of 'imbalance of DNA repair synthesis'. Indeed, in the case of adenine auxotrophic cells when just adenine is the growth-limiting factor the reciprocal of its concentration in the medium, may serve as a measure of the imbalance of the pool of nucleotides (precursors of DNA). Then the data shown in Fig. 3 may be interpreted as proportionality between the reversion frequency and the degree of imbalance of adenine in relation to other nucleotides.

A prototype for this hypothesis is the hypothesis of 'imbalance of DNA replication', widely discussed in the literature [Bresler et al., 1973; Barclay et al., 1982; Haynes, 1985]. This hypothesis can be used to explain the dependence of reversion frequency of yeasts during logarithmic and early stationary phases of

growth on the concentration of adenine in the medium. The general conclusion is that frequency of spontaneous mutations of some genes of some cells should be characterized not by a single number, but rather by a distribution over the conditions of cultivation maintaining the viability of the given cells.

REFERENCES

- Arman I.P., Dutova T.A., Devin A.B. Spontaneous reversion frequency of radiosensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetika*. 1971. Vol. 7. P. 186–188.
- Barclay B.J., Kunz B.A., Little J.G., Haynes R.H. Genetic and biochemical consequences of thymidylate stress // *Canad. J. Biochem.* 1982. Vol. 60. P. 172–194.
- Bresler S.E., Mosevitsky M.I., Vyacheslavov L.G. Mutations as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency // *Mutat. Res.* 1973. Vol. 19. P. 281–293.
- Dutova T.A., Mishina I.N., Arman I.P. Spontaneous mutagenesis and repair. II. Kinetics of the appearance of revertants in yeast // *Genetika*. 1978. Vol. 14. P. 1185–1194.
- Fradkin G.E. Viability, radiosensitivity, mutability of cells and metabolic instability of DNA. Moscow: Energoatomizdat, 1983.
- Haynes R.H. Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance // *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance / Ed. F.J. de Serres*. N.Y.: Plenum press, 1985. P. 1–23.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I. Reality proof of the increase of reversion frequency in haploid yeast with the decrease of adenine in the medium // *Genetika*. 1987. Vol. 23. P. 630–636.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cs. Effect of adenine concentration in the medium on the frequency of reversion in haploid yeasts // *Ibid.* P. 637–642.
- Ryan F.J. Bacterial mutation in a stationary state and the question of cell turnover // *J. Gen. Microbiol.* 1959. Vol. 21. P. 530–549.
- Ryan F.J., Schwartz M., Fried Ph. The direct enumeration of spontaneous and induced mutations in bacteria // *J. Bacteriol.* 1955. Vol. 69. P. 552–557.
- Schuller R.C., Von Borstel R.C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration // *Mutat. Res.* 1974. Vol. 24. P. 17–23.
- Von Borstel R.C., Cain K.T., Steinberg C.M. Inheritance of spontaneous mutability in yeast // *Genetics*. 1971. Vol. 69. P. 17–27.
- Zakharov I.A. Spontaneous mutagenesis in *Chlorella*: Resistance to β -alanine // *Experimental mutagenesis in microorganisms and its practical application*. Moscow: Nauka, 1966. P. 140.
- Zakharov I.A., Kozhina T.N., Fedorova I.V. Increased spontaneous mutability of UV-sensitive mutants of yeast // *Dokl. Akad. Nauk (SSSR)* 1968. Vol. 181. P. 470–472.
- Zakharov I.A., Kozhin S.A., Kozhina T.N., Fedorova I.V. Methods in the genetics of the yeast *Saccharomyces*. Leningrad: Nauka, 1984.
- Zhelezniakova N.Yu., Kovaltzova S.V., Suslova N.G., Fedorova I.V. Radiosensitivity of double mutant haploids of yeast // *Genetika*. 1975. Vol. 11. P. 89–96.

ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ ОБРАЗОВАНИЯ РЕВЕРСОВ РАЗНЫХ ТИПОВ У АУКСОТРОФНЫХ ПО АДЕНИНУ ДРОЖЖЕЙ ОТ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНИНА В СРЕДЕ

На ауксотрофных по аденину (мутация *ade2-192*) гаплоидных дрожжах двух разных штаммов было показано [1, 2], что уменьшение содержания в среде этого метаболита приводит к увеличению выхода реверсов. Было показано также [3], что феномен этот не связан с селекцией, а обусловлен различиями в частотах мутирования генов при разном содержании аденина в среде.

Реверсы клеток генотипа *ade2*, как известно [4], имеют смешанную природу и могут образовываться за счет мутаций трех групп: локусных мутаций (истинные обратные мутации и внутригенные супрессоры), супрессорных мутаций узкого спектра действия (влияющих только на синтез аденина) и супрессорных мутаций широкого спектра действия (т.е. влияющих на синтез как аденина, так и других метаболитов, в том числе лизина). В данной работе приводятся результаты опытов, позволяющие оценить частоты возникновения реверсов первых двух групп (тип А) и третьей группы (тип В).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали гаплоидные дрожжи сахаромицеты, штамм 769-Р192-15В-п4 (*a ade2-192 lys5-3*), любезно предоставленный Д.А. Гордениным (ЛГУ). Для определения частоты ревертирования и получения реверсов использовали методику посева на лавсановые ядерные фильтры [3]. Дрожжи, выращенные на полной среде, рассеивали по 150–300 клеток в чашки Петри на фильтры, покрывающие агаризованную минимальную среду [5] с добавлением 30 мг/л лизина и 100, 10 или 1 мг/л аденина. Культуры инкубировали при 30 °С в течение 20 сут (к концу этого срока дрожжи находились в поздней стационарной фазе роста). На средах с 1 и 10 мг/л аденина ауксотрофные клетки образовывали обычные для этих мутантов розовые колонии, а на среде с 100 мг/л аденина – колонии белого цвета, которые приобретали розовую окраску только после их перенесения на лишенную аденина среду.

Фильтры с выросшими на них колониями переносили в другие чашки Петри, на селективную среду, лишенную аденина, но содержащую 30 мг/л лизина. Инкубация на этой среде дает клеткам-ревертантам преимущественную возможность образовывать видимые глазом колонии – «бородавки». Такие бородавки регистрировали при их первом одновременном появлении; бородавки, выроставшие в более поздние сроки, образовывались из реверсов, которые возникали уже после перенесения фильтров на селективную среду [3]. Было также установлено, что эта методика выявления реверсов дает такие же результаты, как и использовавшаяся ранее [1]. Методика фильтров, однако, менее трудоемка и позволяет оперировать с большими выборками.

Частоту ревертирования оценивали по стандартной формуле

$$R = \frac{1}{m} \ln \frac{N}{N_0},$$

где m – среднее число ауксотрофных клеток в колонии, N – общее число колоний, а N_0 – число колоний, не содержащих реверсов.

После того как колонии реверсов (бородавки) достигали размера порядка 0,5 мм и более, с верхней части каждой из них платиновой иглой отбирали пробы. Эти пробы реверсов наносили штрихами на поверхность двух сред: лишенной только аденина (лизин 30 мг/л) и лишенной как аденина, так и лизина. На первой среде росли все реверсы по аденину, независимо от их потребности в лизине, а на второй – только реверсы, прототрофные по обоим метаболитам. Использование таких сред – стандартный прием, широко практикующийся для дифференциации реверсов по их принадлежности к указанным двум типам, т.е. А и В [6, 7].

Зависимость частоты возникновения реверсов разных типов у гаплоидных дрожжей от содержания аденина в среде: 1 – выход всех реверсов (классы А и В); 2 – выход реверсов, прототрофных по аденину и по лизину (класс В); 3 – выход реверсов, прототрофных только по аденину (класс А)



По нашим наблюдениям, все реверсы типа А (прототрофные только по аденину) образовывали колонии белого цвета, характерные для дрожжей генотипа *ade2*, а большинство реверсов типа В (прототрофные по обоим метаболитам) – в той или иной мере окрашенные колонии, от бледно-розовых до темно-вишневых.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Размеры выборок и результаты учета выхода реверсов типа А и В, полученные в двух независимых опытах (среда с 100 мг/л аденина использовалась лишь в одном из них), приведены в таблице. Результаты обоих опытов достоверно не различались ($p > 0,5$), и их данные можно было объединить. Оценки относительного выхода реверсов типов А и В на средах с разным содержанием аденина показали, что при 100 мг/л аденина выход реверсов типа А равнялся 2,0%, а при 10 и 1 мг/л аденина – соответственно 24,8 и 41,2%. На долю реверсов типа В приходилось соответственно 98, 75 и 69%. Различия между выходами реверсов разных типов на среде с 100 мг/л аденина и на средах с 10 и 1 мг/л аденина высоко достоверны ($p < 0,001$).

На рисунке показана зависимость частот возникновения реверсов разных типов от содержания аденина в среде. Видно, что при переходе от 100 к 10 и далее к 1 мг/л аденина частота возникновения реверсов типа В возрастает в 3,9 и 1,1 раза, а реверсов типа А – в 43,8 и 3,3 раза.

Таким образом, можно считать установленным, что содержание аденина в питательной среде влияет не только на абсолютные значения частоты воз-

Влияние содержания аденина в среде на выход реверсов разных типов у гаплоидных дрожжей, ауксотрофных по аденину и лизину

Аденин, мг/л	Номер опыта	$m, 10^5$	N	N_0	Число реверсов разных типов			Частота возникновения реверсов, 10^{-8}		
					В	А	А, %	А и В	В	А
1	1	3,4	1001	990	6	5	41,2	2,72	1,55	1,17
	2	2,6	3798	3775	14	9				
10	1	27,8	1287	1206	67	14	24,8	1,72	1,36	0,35
	2	36,4	5275	5074	145	56				
100	2	90,1	7596	7254	237	5	2,0	0,36	0,35	0,008

никновения реверсов по этому метаболиту [1–3], но также на соотношение реверсов разных типов. При резкой нехватке аденина реверсы типов А и В возникают примерно с одинаковыми частотами, а при избытке аденина реверсы типа А возникают в десятки раз реже, чем реверсы типа В.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось выше, все реверсы типа В образуются в результате мутирования генов-супрессоров широкого спектра действия, а реверсы типа А – в результате локусных мутаций в гене *ADE2* и мутаций в генах-супрессорах узкого спектра действия. По некоторым оценкам [4, 6], вклад межгенных супрессоров в возникновение реверсов типа А невелик – лишь несколько процентов. Это позволяет считать, что основное количество реверсов типа А обуславливается локусными мутациями. На этом мы и будем основываться в дальнейшем обсуждении.

На других штаммах дрожжей ранее было установлено [1–3], что частоты возникновения всех реверсов (смешанная группа) увеличиваются с уменьшением содержания аденина в среде. Как показано на рисунке (кривая 1), такая закономерность характерна и для штамма, использованного в этой работе, хотя эффект здесь менее выражен. Видно также, что форма кривой 1 обуславливается главным образом формой кривой 2, отражающей зависимость от содержания аденина частоты мутирования генов-супрессоров. Частота же возникновения реверсов типа А, отражающая в основном выход локусных мутаций, изменяется подобным образом лишь в интервале 1–10 мг/л аденина, а в интервале 10–100 мг/л уменьшается более чем в 40 раз (кривая 3). Если монотонное возрастание частоты возникновения реверсов типа В с уменьшением содержания аденина в среде можно объяснить мутагенным эффектом возрастающего дисбаланса нуклеотидов [8], то в случае реверсов типа А такого объяснения, по-видимому, недостаточно.

Эти результаты, однако, хорошо согласуются с предположением, что мутабельность генов зависит от их функциональной активности.

Известно, что избыток аденина вызывает репрессию гена *ADE4* [9]. Можно предположить, что избыточное содержание аденина в среде (100 мг/л) подавляет активность и других генов, контролирующих его синтез, в том числе и гена *ADE2*, тогда как при недостатке аденина (10 и особенно 1 мг/л) эти гены активно работают. (При этом продукт транскрипции гена *ADE2* является дефектным, как это бывает с продуктами многих мутантных генов, см. [10].) Известно, что при избытке аденина в среде уменьшается активность некоторых ферментов цепи его биосинтеза, в том числе и фермента АИР-карбоксилазы, кодируемой геном *ADE2* [11], хотя причины уменьшения активности этого фермента не совсем ясны. (Кроме ингибирования фермента или репрессии гена возможны также усиленное протеолитическое расщепление его молекул из-за недостатка субстрата, необходимого для их стабилизации [11], или белок-белковые взаимодействия [12].)

Если принять допущение, что избыток аденина подавляет активность гена *ADE2*, то полученные нами данные можно трактовать следующим образом. Наклон кривой 2 на рисунке отражает мутагенный эффект лимита по аденину только для активно работающих генов, так как гены-супрессоры широко-

го спектра действия, мутации которых обуславливают появление реверсов класса В, должны активно работать как при недостатке, так и при избытке в среде аденина. Резкое повышение выхода реверсов типа А (возникающих в основном за счет локусных мутаций) при переходе от избытка (100 мг/л) к недостатку (10 и 1 мг/л) в среде аденина (кривая 3) может свидетельствовать о том, что активно работающие гены мутируют в десятки раз чаще, чем не работающие. Тогда форма кривой 3 обуславливается тем, что уменьшение содержания аденина от 100 до 10 мг/л влияет на мутабельность гена *ADE2* как за счет его активации, так и за счет появления дисбаланса нуклеотидов, а дальнейшее уменьшение содержания аденина (от 10 до 1 мг/л) – в основном за счет усиления нуклеотидного дисбаланса.

В пользу представления о более высокой спонтанной мутабельности активно работающих генов по сравнению с мутабельностью генов, находящихся в репрессированном состоянии, могут косвенно свидетельствовать данные по индуцированному мутагенезу. Это результаты работ, в которых было показано влияние функционального состояния некоторых генов *Escherichia coli* [13, 14] и *Salmonella typhimurium* [15] на частоты возникновения мутаций при действии УФ-света и химических мутагенов. Частоты мутирования дерепрессированных генов были в 2–8 раз выше, чем у тех же генов, находящихся в репрессированном состоянии. (К сожалению, спонтанную мутабельность репрессированных и дерепрессированных генов эти авторы специально не изучали.) Имеются также данные, что у *E. coli* плазмиды, содержащие триптофановый оперон, значительно менее стабильны в дерепрессированном состоянии, чем в репрессированном [16]. Повышенная мутабельность активно работающих генов по сравнению с неработающими может быть связана с их конформационными различиями; так, известно, что у эукариот в зависимости от интенсивности транскрипции происходит постепенное удаление гистонов, что приводит к деконденсации цепей ДНК [17]. Возможны, конечно, и другие причины, влияющие на различия в мутабельности работающих и не работающих генов.

Однако, чем бы ни были обусловлены различия в спонтанной мутабельности работающих и не работающих генов, если дальнейшие исследования покажут, что описанный нами феномен относится не только к гену *ADE2* дрожжей, но имеет место и для других генов, а также для других организмов, это будет означать, что как в эксперименте, так и в природных условиях значительно чаще мутируют те гены, которые работают в данных конкретных ситуациях. Мутационные спектры, следовательно, будут отражать функциональное состояние генома организмов при разных условиях их обитания. Как уже отмечали Герман и Дворкин [13], обнаружение зависимости мутабельности генов от их функциональной активности может иметь существенное значение не только для уточнения механизмов мутагенеза, но и для общей теории эволюции.

И еще одно следствие из приведенных выше фактов. Обычно частоту спонтанного мутирования генов задают одним единственным числом. Как мы видели, это справедливо лишь по отношению к данным конкретным условиям: в общем случае мутабельность каждого гена может быть описана только распределением по пространству режимов. Различия в зависимостях частот возникновения реверсов разных типов от содержания аденина в сре-

де позволяют утверждать, что для разных генов такие распределения могут перекрываться, но не будут совпадать.

Авторы благодарят Д.А. Горденина за предоставление штамма дрожжей и ценные замечания, Р. Кишвареди и К. Восканян – за помощь в проведении экспериментов, В.В. Велькова, М.М. Огиевецкую, И.И. Толсторукова и А.И. Чепурного – за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. Влияние содержания аденина в питательной среде на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей // Генетика. 1985. Т. 21, № 10. С. 1643.
2. Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cs. Dependence of spontaneous mutation frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture // Mutat. Res. 1986. Vol. 174. P. 189.
3. Ильина В.Л., Корогодин В.И. Доказательство реальности повышения частоты ревертирования у гаплоидных дрожжей при уменьшении содержания аденина в среде // Генетика. Т. 23, № 4. С. 630–636.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине // Вестн. ЛГУ. Сер. биол. наук. 1964. Т 9. Вып. 2. С. 112.
5. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей сахаромицетов. Л.: Наука, 1984. 143 с.
6. Schuller R.C., von Borstel R.C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration // Mutat. Res. 1974. Vol. 24. P. 17.
7. Quah S.K., von Borstel R.C., Hastings P.J. The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics, 1980. Vol. 96. P. 819.
8. Haynes R.H. Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance // Genetic consequences of nucleotide pool imbalance / Ed. F.J. de Serres. N. Y.: Plenum Publ. Corp., 1985. P. 1.
9. Gross T.S., Woods R.A. Regulation of *de novo* purine nucleotide synthesis by enzyme repression in *Saccharomyces cerevisiae* // Heredity. 1972. Vol. 28. P. 275.
10. Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику. М.: Высш. школа, 1983. С. 31.
11. Фундули А.Х. Изучение механизма регуляции пути биосинтеза пуринов *de novo* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ЛГУ, 1981.
12. Дрейлиня Д.Э. Изучение активности АИР-карбоксилазы и ФРПФ-амидотрансферазы у штаммов дрожжей, несущих мутации, затрагивающие биосинтез пуринов *de novo*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ЛГУ, 1984.
13. Herman R.K., Dworkin N.B. Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1971. Vol. 106. P. 543.
14. Brock R.D. Differential mutation of the β -galactosidase gene of *Escherichia coli* // Mutat. Res. 1971. Vol. 11. P. 181.
15. Savic D.J., Kanazir D.T. The effect of histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *Salmonella typhimurium* // Molec. Gen. Genet. 1972. Vol. 118. P. 45.
16. Kim S.H., Ryu D.D.Y. Instability kinetics of *trp* operon plasmid *ColE1-trp* in recombinant *Escherichia coli* MV12[pVH5] and MV12trpR[pVH5] // Biotechnol. Bioeng. 1984. N 26. P. 497–502.
17. Преображенская О.В., Карпов В.Л., Нагорская Т.В., Мирзабеков А.Д. Структура хроматина, активного в транскрипции // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18, № 1. С. 8.

DEPENDENCE OF THE FREQUENCY OF REVERTANTS OF DIFFERENT TYPES ON ADENINE CONTENT OF THE MEDIUM IN THE YEASTS AUXOTROPHIC FOR ADENINE

V.L. Ilyina, V.I. Korogodin, Cs. Fajszki

For haploid yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex Hansen), strain 769-pl92-15B-n4 (*a ade2-192 lys5-3*), it was shown that the reversion frequencies to adenine prototrophy are $0,36 \cdot 10^{-8}$; $1,7 \cdot 10^{-8}$ and $2,7 \cdot 10^{-8}$, when the medium contains 100, 10 and 1 mg/1 adenine, respectively. Two types of revertants were taken into account: those prototrophic both for adenine and lysine, i.e. suppressor mutations, and those prototrophic for adenine only, most of them being locus revertants. It was established that the relative yield of locus revertants (among all of them) at 100, 10 and 1 mg/1 adenine does not exceed 2, 25 and 41%, respectively. It is assumed that excess adenine (100 mg/1) suppresses the activity of the genes controlling its synthesis, including the mutant *ADE2* gene. A hypothesis is forwarded, according to which the genes being in the «active» state mutate significantly more frequently than «not working» genes.

MUTABILITY OF GENES DEPENDS ON THEIR FUNCTIONAL STATE – A HYPOTHESIS

The “main dogma of genetics” – the nonadaptive character of gene mutations – has been discussed from different points of view for many years, sometimes even obtaining political flavour. Scientific data on this topic are, however, fragmentary and ambiguous.

Here, we report the summary of experiments on spontaneous reversion of adenine auxotrophic yeast at different adenine concentrations in the medium. Part of the results, concerning one strain, is published in Ilyina et al., 1987.

The following haploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* were used: pl92 (*a ade2-192*), DK769-172 (*a ade2-192 lys5-3*), 769-pl92-15B-P4 (*a ade2-192 lys5-3*). Two types of reversions to adenine prototrophy were observed: those due to mutations in gene *ADE2* (locus revertants) and those due to mutations in suppressor genes (suppressors, which served as control). In yeast, the system of adenine biosynthesis is controlled by the end-product at the level of gene repression [Gross and Woods, 1972; Alenin et al., 1987]. Varying the adenine content of the nutrient medium, one can control the state of the adenine system, including gene *ADE2* [Alenin et al., 1987]. When the defective *ADE2* gene is working, red pigment (the product of polymerization of a precursor of adenine) accumulates; therefore the colour of the colonies shows the functional state of the adenine biosynthesis system.

Yeast cultures of three different physiological states were used: a) cultures in the logarithmic phase of growth (when at 1–500 mg/1 of adenine the cells proliferate with an equal rate, and the colonies are white); b) cultures in the stationary phase (when on media containing less than 20 mg/1 of adenine, the cell «yield» in the Petri dish is limited by the exhaustion of adenine and the colonies become red); c) cultures on media with more than 20 mg/1 of adenine, the yield is limited by

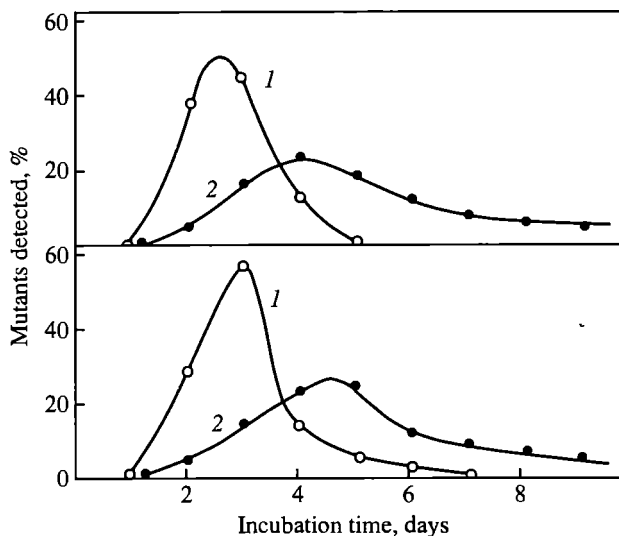


Fig. 1. Dynamics of appearance of mutants in which mutation occurred before (1) and after (2) the transfer of the filters to the selective medium. Top-locus, bottom-suppressor mutations

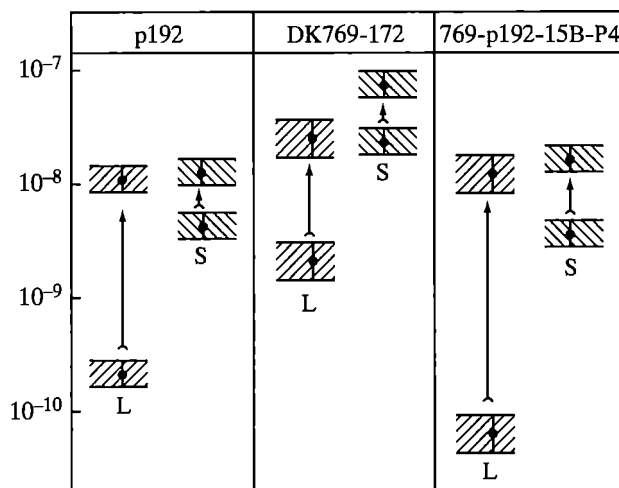


Fig. 2. Changes in the mutation rates of gene *ADE2* (L) and suppressor genes (S) during transition from repression (lower points) to depression (upper points) for three different yeast strains. Averaged over independent experiments. The standard error of the mean is given as a shaded zone

during residual growth on a selective medium without adenine (after transfer of the colonies, they rapidly become red, no matter on what medium and in which growth phase they were before).

The following method was used [Ilyina and Korogodin, 1987; Korogodin et al., 1989]. The cells were plated by an inoculator on a nuclear filter laid on the surface of the agarized nutrient medium, containing 1–500 mg/1 adenine. After cultivation for the necessary time (1–24 days) the filters together with the colonies

Dependence of the rate of locus and suppressor reversions on the state of the system of adenine biosynthesis. Strain pl92

Growth phase of the culture	Concentration of adenine in the medium, mg/l	State of adenine synthesis system	Reversion rate, 10 ⁻⁹	
			Locus	Suppressor
Logarithmic phase	1	Repressed	0.41 ± 0.23	8.4 ± 1.3
	10	Repressed	0.38 ± 0.15	4.2 ± 0.7
	100	Repressed	0.2 ± 0.04	5.5 ± 0.9
Stationary phase	1	Derepressed	5.5 ± 0.8	13.0 ± 3.0
	10	Derepressed	2.5 ± 0.3	5.9 ± 1.1
	100	Repressed	0.14 ± 0.05	2.3 ± 0.5
Residual growth	1*	Derepressed	6.1 ± 0.9	13.0 ± 1.0
	10*	Derepressed	17.0 ± 5.0	23.0 ± 4.0
	100*	Derepressed	20.0 ± 4.0	19.0 ± 3.0

* Adenine concentration before transferring the cells to the selective medium.

grown on them were transferred to the selective medium (without adenine), where colonies of revertants of both types (locus and suppressors) were registered and identified. Special methods [Korogodina et al., 1988a, b; Korogodin et al., 1989] allowed one to distinguish the revertants which occurred before the transfer of the filters on the selective medium from those occurring later, i.e. during residual growth. Dynamics of appearance of both types is shown in Fig. 1.

After excluding such possible artifacts as incomplete registration of some revertants due to suppression by cells of the original strain, cell death, or occurrence of secondary mutations, which give the locus revertant the phenotype of suppressors, we got the possibility of estimating the number of mutations formed on any medium for any given time interval, with an accuracy of a few percents. Relating the number of mutations to the increase in cell number during the cultivation period, we calculated the mutation rates of the genes involved.

The mutation rates under various cultivation conditions are shown for one of the strains in the Table. It can be seen, that the transition of the adenine biosynthesis system from the repressed state to the derepressed one is accompanied by an abrupt increase in the spontaneous mutation rate of the *ADE2* gene. The mutation rate of the suppressor genes also increased, but to a significantly lesser extent. This effect, although different in magnitude for the three strains tested, was clearly expressed in every experiment. The changes in the mutation rates, averaged over the independent experiments, are presented in Fig. 2 for all three strains. Mutability of gene *ADE2* increases 15–150-fold, whereas that of the suppressor genes only 2.5–4.5-fold.

This slight increase in the mutation rate of the suppressor genes, as we earlier stated [Ilyina et al., 1987], agrees with the hypothesis of mutagenic effect of nucleotide pool imbalances [Haynes, 1985]. The sharp increase in the mutation rate in gene *ADE2*, however, requires another interpretation owing to the following fact. Results similar to ours were obtained by Chepurnoy et al. [1989] using the leucine biosynthesis system repressible by the endproduct. As the above authors showed, a decrease in the content of leucine in the medium (from 30 to 0.3 mg/l), while probably producing no imbalance of the nucleotide pools, leads to an abrupt increase in mutability of gene *LEU2* to a slight increase in mutability of suppressor genes and has no effect on mutability of gene *LYSL*. To explain the above facts

one can propose the hypothesis that the spontaneous mutation frequency of a gene depends on its functional state.

The active genes are known to resume a more open configuration [Weisbrod, 1982], several proteins are removed from them (histones and others) [Preobrazhenskaya et al., 1984], and they thus might become more subject to effects of endogenous mutagenic factors. In bacteria the functional state of genes greatly influences their sensitivity to UV irradiation [Kolsch and Starlinger, 1965a], photoreactivation [Kolsch and Starlinger, 1965b], and mutability induced by UV [Lipschutz et al., 1965; Savic and Kanazir, 1972] and by chemical compounds [Brock, 1971; Herman and Dworkin, 1971]. Also, the activity of genes affects the frequency of mitotic recombination in yeast [Clavilier et al., 1960], the rate of reparation of pyrimidine dimers in mammalian cells [Madhani et al., 1986; Mellon et al., 1986, 1987], and the stability of plasmids [Kim and Ryu, 1984]. Spontaneous mutability fits quite naturally into this line.

Recently Cairns et al. [1988] reported an increase in spontaneous mutability of genes of the lactose operon in *Escherichia coli* if there is lactose in the medium, which seems to belong to a phenomenon of the same sort.

The difference in the mutation rate of the lactose gene is less than ten-fold, which agrees with published data on the rise of induced mutation rate of prokaryotic genes by transition from repression to derepression [Lipschutz et al., 1965; Savic and Kanazir, 1972; Brock, 1971; Herman and Dworkin, 1971]. The significantly higher effect on the mutation rate in eukaryotic genes, shown by us, may be ascribed to the substantially different structural organization of their chromosomes.

The hypothesis that the mutation rates of genes depend on their functional state may evidently be treated as a special case of the more general statement that the functional state of genes affects various genetic events in which DNA takes part: occurrence of point and structural mutations, realization of repair and recombination, as well as gene conversion, gene amplification and interaction with mobile elements.

The hypothesis of the dependence of spontaneous mutability of the gene on its functional state may have several important consequences.

In every instance when a change in the environment of the organism is accompanied by changes in the activity of some genes, "genic specificity" of mutagenesis may be observed – i.e., these conditions exert unequal effects on the mutation rates of genes with different activation patterns. An example of genic specificity is mutagenesis under nucleotide pool imbalance in bacteria [Bresler et al., 1973] and in yeast [Eckardt et al., 1983; Brendel, 1985]. In other words, the mutational spectrum of the cell (the relative mutation rates of the different genes), indicating the functional state of its genetic apparatus, might depend on the cultivation conditions.

General validity of these concepts allows the assumption of their essential role not only in the evolution of living organisms (as mentioned by Herman and Dworkin [1971]), but also in tissue differentiation in ontogenesis and in the immune system.

Another consequence of our hypothesis is that the mutation rate of a given gene should not be thought of as a single value, but as a distribution over the space of regimes.

In conclusion, we emphasize that the phenomenon described and the hypothesis used to interpret it have nothing in common with the «adaptive mutagenesis»

of Hinshelwood [Dean and Hinshelwood, 1953]. In our case one can speak of «directed mutagenesis» only in the sense that the genes, actively working under the given conditions, mutate more often, and therefore they yield more abundant material to the natural selection than the genes which are repressed under these conditions.

Note added in proof

Analyzing the experiments of Cairns et al. [1988], Davis [1989] arrived at the supposition of a similar mechanism: “transcription induced by the substrate introduces a bias in the random process of mutation, because the resulting single-stranded regions of DNA are more mutable”. (See: *Davis B.D.* Transcriptional bias: A non-Lamarckian mechanism for substrate-induced mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 5005–5009.)

REFERENCES

- Alenin V.V., Domkin V.D., Kovalyeva A.A., Smirnov M.N.* Regulation of expression of *ADE2* and *ADE1* genes coding for the structure of two yeast *Saccharomyces cerevisiae* purine biosynthesis enzymes by exogenous adenine // *Biopolimery i kletka*. 1987. Vol. 3. P. 325–326.
- Brendel M.* Mutation induction by excess deoxyribonucleotides // Genetic consequences of nucleotide pool imbalance / Ed. F.J. de Serres., N.Y.: Plenum press, 1985. P. 425–434.
- Bresler S., Mosevitsky M., Vyacheslavov L.* Mutations as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency // *Mutat. Res.* 1973. Vol. 19. P. 281–293.
- Brock R.D.* Differential mutation of the β -galactosidase gene of *Escherichia coli* // *Ibid* 1971. Vol. 11. P. 181–186.
- Cairns J., Overbaugh J., Miller S.* The origin of mutants // *Nature*. 1988. Vol. 333. P. 142–145.
- Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N., Bruntskova H.* Spontaneous mutations of *LEU2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetika*. 1989. Vol. 25. P. 1952–1959.
- Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P.* Sur la conversion du gene ad chez la levure // *C.r. Soc. biol.* 1960. Vol. 154. P. 1970–1974.
- Dean A.C.R., Hinshelwood C.N.* Observations on adaptation in bacteria // *Adaptation in microorganisms*. Cambridge, 1953. P. 42–71. Russ. ed.: Moscow: Inostrannaya literatura, 1956.
- Eckardt F., Kunz B.A., Haynes R.H.* Variation of mutation and recombination frequencies over a range of thymidylate concentrations in a diploid thymidylate auxotroph // *Cur. Genet.* 1983. Vol. 7. P. 399–402.
- Gross T.S., Woods R.A.* Regulation of *de novo* purine nucleotide synthesis by enzyme repression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Heredity*. 1972. Vol. 28. P. 275.
- Haynes R.H.* Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance // Genetic consequences of nucleotide pool imbalance / Ed. F.J. de Serres. N.Y.: Plenum press, 1985. P. 1–23.
- Herman R.K., Dworkin N.B.* Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1971. Vol. 106. P. 543–550.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I.* Evidence for real increase of reversion frequency in the haploid yeast auxotrophic for adenine, with decrease of adenine in the medium // *Genetika*. 1987. Vol. 23. P. 630–636.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Dependence of the frequency of revertants of different types on adenine content of the medium in the yeasts auxotrophic for adenine // *Ibid*. 1987. Vol. 23. P. 637–642.
- Kim S.H., Ryu D.* Instability kinetics of *trp* operon plasmid *ColE1-trp* in recombinant *Escherichia coli* MV12[pVH5] and MV12trpR[pVH5] // *Biotechnol. Bioeng.* 1984. Vol. 26. P. 497–502.
- Kolsch E., Starlinger P.* A difference in UV-sensitivity between genes in the repressed and genes in the derepressed state // *Ztschr. Vererbungsl.* 1965a. Bd. 96. P. 297–303.
- Kolsch E., Starlinger P.* A difference in the photoreactivation of UV-damage between genes in the repressed and genes in the derepressed state // *Ibid*. 1965b. Bd. 304–306.
- Korogodin V.I., Abetyan N.O., Brunckova H.* et al. Spontaneous mutagenesis and cell cultivation conditions // *Ontogenesis, evolution, biosphere*. Moscow: Nauka, 1989. P. 59–71.

- Korogodina V.L., Koltovaya N.A., Lyubimova K.A.* et al. Estimation of the contribution of double mutants to the observed spectrum of revertants occurring in auxotrophic yeasts. Dubna, 1988a. (JINR Commun. P19-88-835).
- Korogodina V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cs.* Dynamics of appearance of locus and suppressor revertants in adenine auxotrophic yeasts incubated on selective medium. Dubna, 1988b (JINR Commun. P19-88-766).
- Lipschutz R., Falk R., Avigad C.* Mutation rates of the induced and repressed locus of alkaline phosphatase in *Escherichia coli* // *Isr. J. Med. Sci.* 1965. Vol. 1. P. 323–324.
- Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C.* Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: c-abl and c-mos // *Cell.* 1986. Vol. 45. P. 417–423.
- Mellon J., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C.* Preferential DNA repair of an active gene in human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 8878–8882.
- Mellon J., Spivak G., Hanawalt P.C.* Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene // *Cell.* 1987. Vol. 51. P. 241–249.
- Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Nagorskaya T.V., Mirzabekov A.D.* Structure of transcriptionally active chromatin // *Molekulyarnaya biologiya.* 1984. Vol. 18. P. 8–20.
- Savic D.J., Kanazir D.T.* The effect of histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *Salmonella typhimurium* // *Mol. Gen. Genet.* 1972. Vol. 118. P. 45–50.
- Weisbrod S.* Active chromatin // *Nature.* 1982. Vol. 297. P. 289–295.

ON THE DEPENDENCE OF SPONTANEOUS MUTATION RATES ON THE FUNCTIONAL STATE OF GENES

INTRODUCTION

The hypothesis that the environment essentially affects the mutation process, and every deviation from the optimal conditions results in enhanced mutagenesis, was formulated in general form (as the physiological conception of the mutation process) more than 40 years ago [Kerkis, 1940; Lobashov, 1947]. However, its experimental elaboration began much later. Coughlin and Adelberg [1956] and Weinberg and Latham [1956] performed some of the first experiments, and showed a sharp increase of mutation rates in bacteria under thymine starvation. Since the 1970s a systematic study of the effect of nucleotide pool imbalance on different biological processes, including mutation of various genes, has been conducted in a number of laboratories [Bresler et al., 1973; Kunz, 1982; de Serres, 1985]. As a rule, nucleotide pool imbalance increases the mutation rates in widely divergent species.

These studies, however, did not change the point of view that all these influences were thought to be random in their action and to affect all genes equally.

Some years ago we showed [Ilyina et al., 1985, 1986] that the reversion rate in adenine auxotrophic yeasts increases with decreasing adenine content of the medium. In one strain it was shown [Ilyina et al., 1987] that the reversion rates reflecting mutations in different genes (in gene *ADE2* or in the suppressor genes) are differently influenced by the concentration of adenine in the medium. We then assumed that active genes mutate more often than repressed ones.

The results of the further study of this phenomenon on several strains of yeast are reported in this paper. These results confirm that different genes respond dif-

terently to the changes in the concentration of the nutrients in the medium. There appears to be a correlation between the derepression of the genes and the increase in their mutation rate.

MATERIALS AND METHODS

STRAINS

The following haploid auxotrophic strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were used: p192 (*a ade2-192*), from the Peterhof line, received from I. A. Zakharov (Gatchina); 769-p192-15B-P4 (*a ade2-192 lys5-3*), from the Peterhof line, received from D.A. Gordenin (Leningrad); DK769-172 (*a ade2-192 lys5-3*), constructed by A.B. Devin (Moscow), by crossing the strain 769-p 192-15B-P4 with the prototrophic strain 172 received from R.K. Mortimer (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, USA); NA3-24 (*a leu2-1 lys1-1*), constructed by crossing Mortimer's strains IL125-2B and X2104-4C. Mutation *ade2-192* is missense, whereas *leu2-1* and *lys1-1* are ochre nonsense mutations.

MEDIA

Complete nutrient medium and minimal salt medium are described in Zakharov et al. (1984). As selective medium the same minimal medium was used, without addition of the limiting metabolite(s). For genetic analysis the media described by Devin [1975] were used.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeasts grown on complete nutrient medium were suspended in water and plated by an inoculator with 220 pins on a lavsan nuclear filter [Floroff, 1984] covering the nutrient agar in the Petri dish. Each inoculum contained about 100 cells. The agar was filled with minimal salt medium enriched with definite amounts of adenine, leucine or lysine, as appropriate. Thus in every Petri dish about 220 macrocolonies emerged. After growing the cells at 30 °C for a given time interval, a few tens of colonies were scraped off the filters, resuspended in a definite amount of water and counted in a cell counter. The remaining colonies were transferred, together with the filters, to selective medium. The emerging revertants, which are clearly seen on such media as colonies of secondary growth (papillae), were periodically scored.

DIFFERENTIATION AND IDENTIFICATION OF THE REVERTANTS

The dynamics of appearance of revertants on selective media is characterized, usually, by a curve with two peaks: the first population corresponds to the revertants originating before the transfer of the cultures on the selective medium, whereas the second one corresponds to those originating after the transfer, during residual growth [Ilyina and Korogodin, 1987; Chepurnoy and Mikhova-Tsenova, 1988]. Revertants of these two groups may also be distinguished by another method [Korogodin et al., 1989]. For this, the colonies grown on the nuclear filter, immediately before their transfer to the selective medium, should be rubbed with a glass stick (each colony separately). If such a colony contains a microcolony (or

two or more cells) of revertants, then several similar secondary colonies develop against the background of the smear, whereas the revertant arising during residual growth (i.e. after rubbing the colonies) usually forms a single secondary colony. Using both methods we could differentiate with high reliability revertants formed on the media with different contents of the limiting metabolite, from revertants arising on the selective medium without these metabolites.

The revertants which formed colonies on the selective medium were isolated and differentiated as locus (L) and suppressor (S) revertants. This was checked by phenotypic and genetic analysis [Ilyina et al., 1987; Chepurnoy and Mikhova-Tsenova, 1988; Korogodin et al., 1989]. Phenotypic analysis consisted of the determination of the biochemical requirements of the revertants (suppressor-revertants of the double auxotrophic strains become prototrophic for both metabolites, while locus revertants, as a rule, become prototrophic for only one of them). In the case of Ade⁺ revertants, the colour of the colonies could also be used to differentiate locus and suppressor revertants (in our strains the locus revertants form white colonies on the medium without adenine, whereas the suppressors form pink ones) [Korogodina et al., 1988a]. Genetic analysis consisted of crossing the revertants with a prototrophic strain and subsequent mass analysis of ascospore clones. Appearance of red colonies is evidence of suppressor reversion. The results of genetic analysis coincide with the phenotypic characteristics.

Mutation rate was calculated from the proportion of colonies without revertants:

$$R = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N - M},$$

where N – the number of colonies; M – the number of colonies with revertants of the given type; n – the number of cells in a colony (or the increment of the number of cells in the colony during residual growth).

RESULTS

GROWTH CURVES OF YEAST ON MEDIA WITH LIMITING METABOLITES

Figure 1 shows the growth curves of adenine and leucine auxotrophic yeasts on media with different amounts of these metabolites.

In the case of adenine auxotrophic strains (Fig. 1a) the proliferation rate of cells in the logarithmic growth phase does not depend on the content of adenine in the medium (in the range from 1 to 100 mg l⁻¹), which affects only the colony size in the stationary phase of growth, i.e. the M -concentration. Analysis of the dependence of M -concentration on adenine content demonstrates that for these strains adenine at 20 mg l⁻¹ or less is a growth-limiting factor, whereas at more than 20 mg l⁻¹ adenine is in excess in the medium, and the culture stops growing due to the exhaustion of some other components of the medium. Colonies of the auxotrophic strains during the logarithmic phase of growth are white, by transition to the stationary phase they turn red when adenine is exhausted but they remain white when adenine is in excess. After transfer to the selective medium the colonies quickly become red independently of how long and on what medium they were cultivated previously.

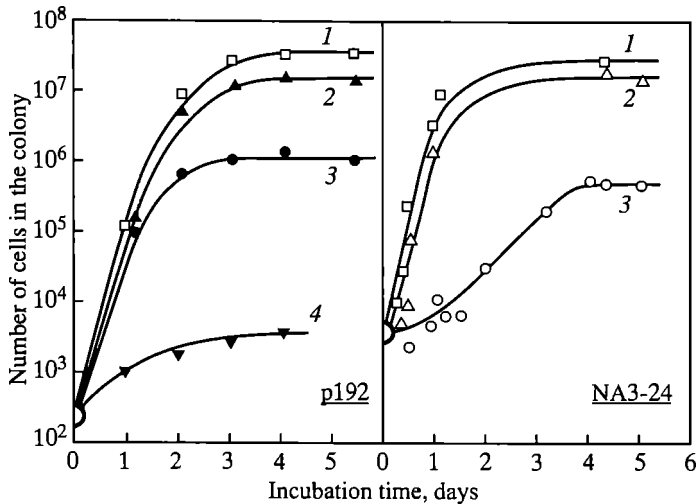


Fig. 1. Growth curves of adenine and leucine auxotrophic yeasts on media with different amounts of these metabolites

Left panel: strain p192. 1, 100 mg l⁻¹ adenine; 2, 10 mg l⁻¹ adenine; 3, 1 mg l⁻¹ adenine; 4, without adenine, i.e. residual growth. Right panel: strain NA3-24. 1, 300 mg l⁻¹ leucine; 2, 30 mg l⁻¹ leucine; 3, 3 mg l⁻¹ leucine

In the case of the leucine auxotrophic strain (Fig. 1b) the content of leucine in the medium affects both the growth rate of the cultures and the value of the M-concentration.

RATES OF ADENINE REVERSIONS IN THE DIFFERENT GROWTH PHASES OF THE CULTURES

In Table 1 the data on the rate of occurrence of locus (R_L) and suppressor (R_S) revertants in two yeast strains are given for cultures 24–40 h old, i.e. in the logarithmic phase of growth. Evidently, these values do not depend on the adenine content in the medium and are equal to 2.5×10^{-9} and 2.9×10^{-8} for strain DK769-172, and 0.28×10^{-9} and 0.58×10^{-8} for strain p192, respectively.

At transition to the stationary growth phase, i.e. for the cultures from 4 to 21 days of age, the pattern changes. As shown in Table 2, when adenine is in excess (100 and 500 mg l⁻¹), the mutation rates of gene *ADE2* and of the suppressor genes are about the same as in the logarithmic growth phase (cf. Table 1), but at limiting adenine concentrations (1, 5 and 10 mg l⁻¹) they increase, this being particularly pronounced for the locus mutations. This regularly holds for all three adenine auxotrophic strains, notwithstanding some differences in the absolute values of the rates.

Finally, Table 3 shows the reversion rates during residual growth on the medium without adenine. In this case the locus and suppressor reversion rates depend neither on the concentration of adenine (from 1 to 500 mg l⁻¹) during preliminary cultivation, nor on its duration (from 1 to 13 days), and are equal to 32×10^{-9} and 8.6×10^{-8} for strain DK769-172, and 17×10^{-9} and 1.8×10^{-8} , respectively, for strain p192. Note that the locus reversion rates are much higher on the medium without adenine than in the logarithmic phase, whereas for suppressor reversion the difference is less.

Rates (R) of occurrence of locus and suppressor revertants in adenine auxotrophic yeasts grown with different amounts of adenine in the medium. Logarithmic phase of growth. Data from independent experiments

Strain	Adenine conc. (mg/l)	Age of culture (h)	No. of colonies (N)	No. of cells in a colony ($n \times 10^6$)	Mutation rate			
					Locus		Suppressor	
					M	$R_L \times 10^{-9}$	M	$R_S \times 10^{-8}$
p192	1	30	20 111	0.36±0.01	3	0.41	61	0.84
	0	30	19 448	0.82±0.09	6	0.38	67	0.42
	100*	30	24 973	0.57±0.08	3	0.21	74	0.52
		40	3388	2.31±0.22	2	0.26	56	0.72
	40	3509	4.32±0.34	2	0.13	60	0.40	
		Mean R			0.28 ± 0.05		0.58 ± 0.09	
DK769-172	1	24	623	0.72±0.06	2	4.5	26	5.9
		30	547	0.73±0.13	1	2.5	12	3.0
	5**	24	1362	1.11±0.21	3	2.0	44	3.0
		30	2817	2.92±0.31	15	1.8	134	1.7
	100**	24	1250	0.88±0.14	3	2.7	32	2.9
		30	1353	3.61±0.43	4	0.82	78	1.6
	500**	24	1505	0.71±0.06	5	4.7	38	3.6
		30	1918	4.31±0.33	9	1.1	140	1.8
			Mean R			2.52±0.50		2.94±0.50

* The experiments differ in the amount of medium in the Petri dish.

** The experiments differ in the lysine content of the medium.

Now we can average the data obtained for each strain under different circumstances. For this purpose we group the mutation rates corresponding either to the presence of adenine in the medium (logarithmic growth phase and stationary phase with excess adenine, colonies are white), or to its exhaustion or absence

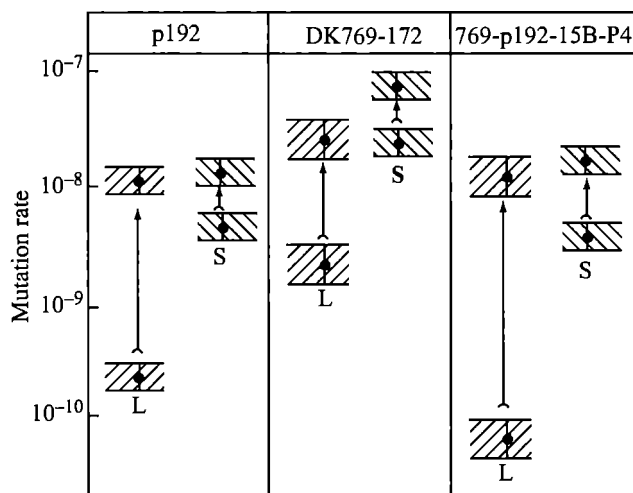


Fig. 2. Rate of occurrence of locus (L) and suppressor (S) mutations leading to adenine independence in different strains of yeast with (lower points) and without (upper points) adenine in the nutrient medium. The width of the stripes corresponds to the error of the mean

Table 2

Rates (R) of occurrence of locus and suppressor revertants in adenine auxotrophic yeasts grown with different amounts of adenine in the medium. Transition to the stationary phase of growth. Data from independent experiments

Strain	Adenine conc. (mg/l)	Age of culture (days)	No. of colonies (N)	No. of cells in a colony ($n \times 10^6$)	Mutation rate			
					Locus		Suppressor	
					M	$R_L \times 10^{-9}$	M	$R_S \times 10^{-8}$
p192	1	4	3094	0.49±0.05	8	5.3	30	1.99
			5083	0.57±0.01	10	3.5	20	0.69
		10	5525	0.61±0.03	25	7.4	31	0.92
		16	5083	0.62±0.04	18	5.7	0	1.59
			Mean R			5.47±0.82		1.30±0.30
	10	4	5304	1.8±0.2	18	1.9	42	0.44
			5083	1.6±0.1	18	2.2	33	0.41
		10	5304	1.6±0.2	21	2.5	55	0.65
		16	5525	1.6±0.1	30	3.4	77	0.88
			Mean R			2.50±0.33		0.59±0.11
	100*	4	7072	1.6±0.2	1	0.088	21	0.19
			2360	7.0±0.6	4	0.24	46	0.28
		2540	22.1±3.2	5	0.089	—	—	
		Mean R			0.14±0.05		0.23±0.05	
DK769-172	5	13	844	5.3±0.3	25	5.7	109	2.6
			1689	6.1±0.3	112	11.2	403	4.5
			Mean R			8.46±2.79		3.54±0.93
	500	13	1068	44.1±4.2	12	0.26	321	0.81
			2032	44.3±3.2	33	0.37	369	0.45
			Mean R			0.31±0.06		0.63±0.18
769-p192-15B-P4	1**	13	231	1.8±0.1	11	27.1	14	3.5
			182	3.2±0.2	10	17.7	12	2.1
		21	3798	0.25±0.03	9	9.5	14	1.5
		Mean R			18.1 ±5.1		2.36±0.59	
	10**	13	404	5.6±0.2	17	7.8	33	1.5
			244	17.3±3.1	12	2.9	33	0.8
21		5064	3.6±0.2	50	2.8	129	0.7	
	Mean R			4.45±1.61		1.0 ±0.25		
100	21	7596	9.0±1.3	5	0.073	255	0.38	

* The experiments differ in the amount of medium in the Petri dish.

** The experiments differ in the lysine content of the medium.

(stationary phase of growth with limiting adenine and residual growth on selective medium, red colonies). The mean values and their errors for each group of data for each of the three strains are given in Figure 2. One can see that rate of occurrence of locus revertants, that is mutation rate of gene *ADE2*, increases 15-fold (for strain DK769-172) to 150-fold for strain 769-p192-15B-P4) by exhaustion of adenine in the medium, while the rate of occurrence of suppressor revertants, corresponding to the mutation rate in the suppressor genes, increases only 2.5 to 4.5-fold.

RATES OF LEUCINE REVERSION WITH VARYING LEUCINE CONCENTRATION IN THE MEDIUM

Figure 3 shows data on the rates of occurrence of revertants of different types in strain NA3-24 in the logarithmic phase of growth at different leucine concentrations in the medium. We see that when leucine concentration changes from 300 to 0.3 mg l⁻¹, the rate of leucine locus reversions increases from 0.9×10^{-8} to

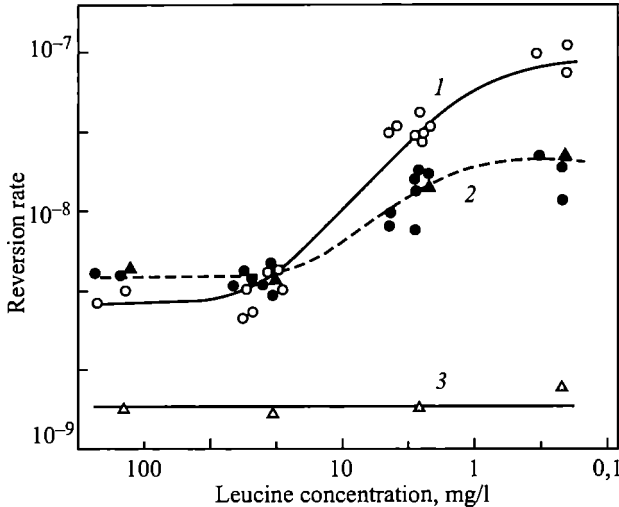


Fig. 3. Rate of occurrence of revertants of different types in the logarithmic phase of growth of cultures as a function of the leucine content in the medium (strain NA3-24)

1, locus revertants to leucine prototrophy; 2, suppressor revertants isolated on medium without lysine but with leucine (closed circles), or without leucine but with lysine (closed triangles); 3, locus revertants to lysine prototroph. Different symbols denote the results of independent experiments

30×10^{-8} , i.e. more than 30-fold, while that of the suppressor reversions increases from 1.3×10^{-8} to 6.8×10^{-8} , i.e. about five-fold. The results for the suppressor revertants isolated on the selective media without leucine (but with lysine) and without lysine (but with leucine) coincide. The rate of reversion to lysine prototrophy, determined in the same experiments, did not depend on the leucine content in the medium and averaged 1.8×10^{-8} .

CONTROL EXPERIMENTS FOR MUTATION RATE DETERMINATION

The observed large increase of reversion rates at low concentration of the limiting metabolites might be an artefact due to one of the following causes: (1) selective death and lysis of the auxotrophic cells at low concentrations of the limiting metabolite, which could lead to the underestimation of the number (n) of such cells; (2) different growth rates of the auxotrophic and prototrophic cells, or selective pressure by the auxotrophic cells on the revertants, increasing with increasing adenine or leucine concentration in the medium, which could lead to the incomplete appearance of the revertants occurring under these conditions, i.e. to the underestimation of the number (M) of the colonies with revertants.

The different behaviour of L and S type revertants also might be due to artifacts, namely to (3) selective differences between these revertants, or (4) the occurrence of secondary mutations, giving suppressor phenotype to the originally locus revertants.

We tried to eliminate these sources of artifact, or at least to estimate their contribution to the effect.

Table 3

Rates (R) of occurrence of locus and suppressor revertants in adenine auxotrophic yeasts during residual growth on medium without adenine, after various periods of preliminary cultivation on different media. Data from independent experiments

Strain	Preliminary cultivation		No. of colonies (N)	Residual growth of the number of cells in a colony ($n \times 10^6$)	Mutation rate			
	Adenine conc. (mg/l)	Age of the culture			Locus		Suppressor	
					(M)	($R_L \times 10^{-9}$)	(M)	($R_S \times 10^{-8}$)
pl92	1	40 h	19 890	0.33±0.11	46	7.0	89	1.4
		4 days	3094	0.32±0.09	5	5.1	11	1.1
	10	40 h	18 564	1.1±0.3	241	12.0	390	1.9
		4 days	5304	0.9±0.4	103	22.0	129	2.7
	100	40 h	3388	1.3±0.1	77	18.0	105	2.4
			3509	2.2±0.3	84	11.0	67	0.88
			24 310	1.1±0.3	178	6.7	556	2.1
		4 days	7072	1.2±0.3	215	26.0	180	2.1
		7 days	2360	2.0±0.4	144	31.0	—	—
			2540	2.0±0.2	133	27.0	—	—
		Mean R		16.5±3.0		1.84±0.23		
DK769-172	1	24 h	623	0.76±0.12	8	17.0	27	5.8
		30 h	547	0.88±0.11	8	17.0	24	5.1
	5	24 h	1362	0.33±0.08	55	125.0	108	25.0
		30 h	2817	1.1±0.2	95	31.0	217	7.3
	100	13 days	844	0.90±0.08	9	12.0	34	4.6
			1689	2.0±0.3	26	7.8	82	2.5
		24 h	1250	0.64±0.11	20	25.0	104	13.6
		30 h	1353	2.7±0.3	45	13.0	141	4.1
	500	24 h	1505	3.8±1.2	43	7.6	202	3.8
		30 h	1918	1.1±0.2	127	62.0	338	17.6
	13 days	1068	1.1±0.1	34	29.0	65	5.7	
		Mean R		31.5±10.5		8.64±2.14		

(1) If the effect were due to death of the auxotrophic cells at low concentration of the limiting metabolite, in the stationary phase or during residual growth (cf. Tables 1–3), then it would be easy to calculate that at exhaustion of adenine in the medium more than 90% of these cells should have disappeared. And then, to yield the growth curves and colony sizes observed in the experiment (cf. Fig. 1), the growth rate of the auxotrophs would be much higher at low concentrations than at normal concentration, which is nonsense [Ilyina et al., 1985].

(2) The study of the possible selective pressure of the auxotrophic cells to the revertant cells gave the following results. For colonies consisting of up to 10^6 auxotrophic cells there seems to be no selection effect against the revertants. This was checked by periodically (every 6h) rubbing the colonies growing on the minimal medium with a glass stick, thus permitting only the presence of microcolonies. The number of papillae was, however, the same as without rubbing [Ilyina and Korogodin, 1987].

(3) The differences in the measured rates of appearance of locus and suppressor revertants also cannot be linked with their selective differences. The growth rate of locus revertants is indeed higher than that of the suppressors. This, however, makes no big difference as we detect all revertant clones, forming papillae. It

was shown in artificial mixtures of individual cells of locus and suppressor revertants with a large number (1×10^4) of auxotrophic cells, by growing such artificial colonies on different media, that in not too large colonies (for strain NA3-24 up to 8×10^6 , while for the Ade⁻ strains up to 10^6) each revertant can form papillae [Ilyina and Korogodin, 1987; Chepurnoy and Mikhova-Tsenova, 1988; Korogodina et al., 1988b]. For larger colonies it was necessary to rub the colonies before their transfer to the selective medium, and then one attained complete appearance of revertants.

(4) Concerning the possibility that a locus revertant (e.g. in gene *ADE2*) undergoes a second mutation (in gene *LYS5* or in a suppressor gene) and the phenotype becomes as those of suppressors, we have shown that—as expected—the secondary mutation rate equals the primary one, about 10^{-8} , and in all practical cases it may render an error of only a few per cent in the number of mutations [Korogodina et al., 1988a].

Therefore, the experimental results presented above reflect quite reliably the differences in the mutation rates of different genes under different cultivation conditions of yeast, and they are not the consequences of possible artifacts.

SPONTANEOUS MUTABILITY AND THE DURATION OF CELL CYCLE

As we have seen above, in contrast with adenine, whose concentration in the medium practically affects, in the logarithmic growth phase, neither the proliferation rate, nor the rate of occurrence of reversions in yeasts with mutation *ade2-192* (Table 1), decreasing the leucine content in the medium below a definite level greatly hinders both the proliferation and the reversion rate of leucine auxotrophic cells (Fig. 1b and 3).

At first sight, the results of our experiments can be explained by assuming that the longer is the cell cycle the higher is the rate of spontaneous mutations per cell per generation. This point of view returns us to the questions discussed already in the 1930s [Timofeoff-Ressovsky et al., 1935] and particularly studied by Novick and Szilard [1950] and some other authors [Fox, 1955; Kubitschek and Bendigkeit, 1964]. This assumption, however, does not conform to the fact that the increase in mutability is expressed differently for different genes (locus and suppressor) related to the limiting metabolite, while for gene *LYS1*, neutral to the conditions involved, there is no effect at all. The results of the following specially planned experiments compel us to definitively reject this hypothesis.

If the rate of reversion e.g. at the leucine locus is related to the length of cell cycle, then it is reasonable to assume that in the presynthetic period there is an accumulation of premutational lesions in the cells, which will be fixed as mutations during DNA replication, or that mutations occur in the presynthetic period with a constant frequency per time unit. The longer is the G1-phase, the more such lesions (or mutations) should be accumulated in the cells and then it would make no difference in what medium the S-phase took place—whether with a high or a low concentration of the limiting metabolite. These considerations were checked in the following way. A culture of strain NA3-24 synchronized by the method of Williamson and Scopes (1962), was incubated on the medium with 3 mg l^{-1} leucine, and after different time intervals in the G1-phase it was transferred to the medium with 30 mg l^{-1} of this metabolite, where the cells soon entered S-phase

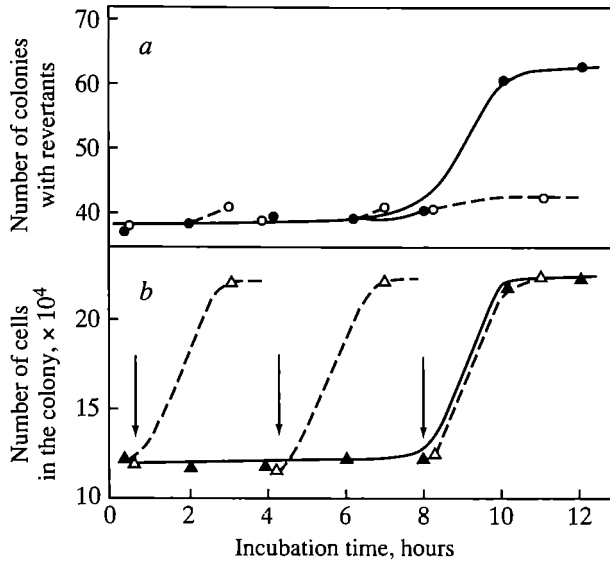


Fig. 4. Dependence of (a) the number of colonies with revertants (among 2200 colonies), and (b) the number of cells in a colony (buds are counted as separate cells) on the duration of incubation of leucine auxotrophic yeasts on different media

Closed symbols, 3 mg l⁻¹ leucine; open symbols, 30 mg l⁻¹. The arrows show the transfer of the cultures from the first medium to the second one

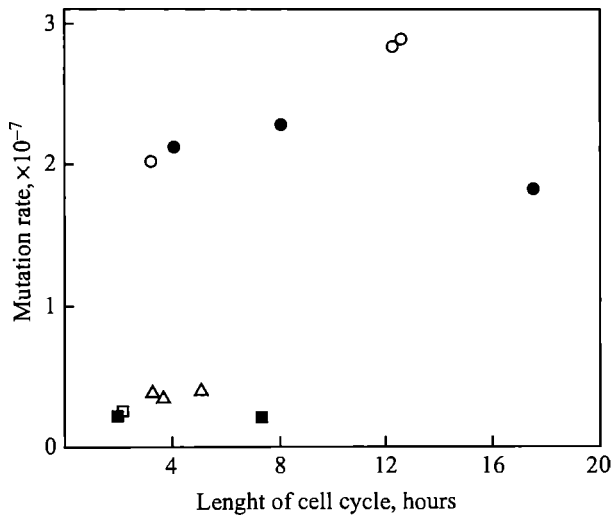


Fig. 5. Dependence of the rate of occurrence of revertants to leucine prototrophy on the length of the cell cycle during incubation of synchronized cultures of strain NA3-24 on media with 3 mg l⁻¹ (circles) and 30 mg l⁻¹ (triangles and squares) of leucine. Different symbols denote the results of independent experiments

and in 2–3 h they budded. The total number of revertants in the culture was determined both before and after budding. The results are given in Figure 4. Evidently, the duration of preliminary cultivation on the poor medium has no effect on the result. Therefore, it is the cultivation conditions immediately before or during DNA replication rather than the length of the cell cycle itself that determine the mutational status of the cells.

The above conclusion is supported by another independent experiment. Synchronized cultures of the same strain were grown on media with different leucine content (3 and 30 mg l⁻¹) and the total number of cells and the number of prototrophic revertants were determined. The length of the cell cycle not only depended on the concentration of leucine, but also varied in different experiments, and even in the course of the growth of the synchronized cultures. This enabled us to calculate the rate of occurrence of revertants on different media at different cells cycle lengths. The results are shown in Figure 5. It is obvious that mutation rate is affected not by the length of the cell cycle, but only by the amount of the limiting metabolite in the medium.

DISCUSSION

On the basis of the experimental data presented it can be accepted as a reliably proven fact that spontaneous mutation rate may vary almost 100-fold with the change in concentration of some metabolites in the medium but this variation is not uniform for different genes. In fact, a similar phenomenon was also observed in the case of the nucleotide pool imbalance: mutability was enhanced to a different degree for different genes in prokaryotes [Bresler et al., 1973] as well as in eukaryotes [Eckardt et al., 1983; Brendel, 1985]. This phenomenon, however, was not investigated specially.

Now we shall discuss in what way cultivation conditions can influence mutation rates of different genes.

SPONTANEOUS MUTABILITY AND THE HYPOTHESIS OF NUCLEOTIDE POOL IMBALANCE

When we discovered that the rate of occurrence of adenine revertants increases with decreasing adenine content in the medium [Ilyina et al., 1985, 1986], we supposed that this phenomenon might be interpreted in terms of the hypothesis of nucleotide pool imbalance in its simplest form [Bresler et al., 1973; Haynes, 1985]. This hypothesis also agrees with the fact that mutability of genes is determined by the conditions during DNA replication alone (cf. Fig. 4). But the differences in the changes of mutation rates of various genes in cells of the same population are, as we noted [Ilyina et al., 1987], not so simple to explain.

Let us try another way to interpret the results demonstrated in Tables 1-3 and Figure 2.

It is well known that when the adenine biosynthesis pathway is working in yeast with mutations *ade1* or *ade2*, a red pigment (the product of polymerization of a precursor of adenine) is accumulated in the cells and the colonies become red. This also holds true for our strains carrying mutation *ade2-192*. We have observed that the colonies of these strains obtain a colour either on media devoid of adenine or after its exhaustion in media that originally contained it in limiting amounts.

The presence of adenine in the medium (1 mg l⁻¹ and more) may therefore repress the genes which control its biosynthesis, while the absence of adenine leads to the derepression of these genes, including the defective *ADE2* gene. It is a well-established fact that adenine biosynthesis is regulated at the transcription level [Gross, Woods, 1972; Alenin et al., 1987]. Thus one can assume that fast reddening of the colonies of yeast with *ade2-192* mutation on adenineless medium indicates an increase in adenine biosynthesis at the transcription level.

In our experiments, as already mentioned, the red color of the colonies of adenine auxotrophic yeasts was always accompanied by an increase in the rate of occurrence of locus mutations (Fig. 2). This permitted us to suppose that the increase of the mutation rate of gene *ADE2-192* with decreasing adenine content in the medium is due to the higher sensitivity of the derepressed genes to the mutagenic effect of the nucleotide pool imbalance, than of the genes in the repressed state [Ilyina et al., 1987].

However plausible this hypothesis seems, it should evidently be revised in favour of a more general hypothesis. In the case of leucine deprivation one can hardly speak about nucleotide pool imbalance. However, the dependence of the yield of locus and suppressor reversions to leucine prototrophy on the content of this amino acid in the medium (Fig. 3) is of the same character as the dependence of the yield of adenine revertants on the presence of this nucleotide in the medium (Fig. 2). Considering this, it may be that 'imbalance mutagenesis' is a special case of a more general mechanism of the effect of the functional state of genes on their mutability, and the genic specificity of the imbalance mutagenesis may be largely due to the regulatory effects of the nucleotide pool imbalance on the functional state of various genes.

HYPOTHESIS OF THE EFFECT OF FUNCTIONAL STAGE OF GENES ON THEIR MUTABILITY

Repression by end product at the level of transcription has been shown not only for the *ADE2* gene [Gross, Woods, 1972; Alenin et al., 1987], but also for the genes controlling leucine synthesis [Andreadis et al., 1984]. Whether and how the functional state of the suppressor genes depends on the amount of limiting metabolites in the medium and generally on the metabolic status of the cells, we do not know. The above is, nevertheless, sufficient to assume that mutability of genes like *ADE2* and *LEU2* is enhanced at the transition from the repressed to derepressed state (Fig. 2 and 3). What can be the basis for this?

It is known that derepression of eukaryotic genes is correlated with substantial changes in their conformation [Preobrazhenskaya et al., 1984]. The 'active conformation' is conserved during DNA replication too [Weisbrod, Weintraub, 1979; Gazit et al., 1980]. Derepressed genes become more accessible to the action of various enzymes than genes in the repressed state [Bakayev et al., 1979; Weisbrod, Weintraub, 1979; Gazit et al., 1980, 1982; Lancilotti et al., 1987]; the processes of photoreactivation [Kolsch, Starlinger, 1965b] and, in mammalian cells, dark repair [Madhani et al., 1986; Mellon et al., 1986, 1987], run more actively on them. Yet, there are other data on the higher 'lability' of derepressed genes. In bacteria, derepressed genes are more heavily injured by UV light than those in the repressed state [Kolsch, Starlinger, 1965a], and the mutation rate un-

der the action of some chemical mutagens [Lipschutz et al., 1965; Brock, 1971; Herman and Dworkin, 1971] and UV light [Savic, Kanazir, 1972] is higher in the derepressed genes than in the repressed ones. In yeast, derepression is accompanied by an enhanced conversion rate [Clavilier et al., 1960]. Unfortunately, in the literature there is practically no information on the effect of the functional state of genes on their spontaneous mutability. In only one paper [Savic, Kanazir, 1972] there are tables from which one can calculate that spontaneous mutability of the genes of the histidine operon of *Salmonella typhimurium* in the derepressed state is 0.7–1.8 times higher than in the state of repression. Probably, the recently published paper of Cairns et al. [1988], should also be considered from this point of view. The authors repeated the experiments of Luria and Delbrück [1943] under conditions of non-lethal selection and found that in a gene of the lactose operon of *Escherichia coli* mutations occur after transfer of the cells to the selective medium as well. They interpreted this result as the existence of adaptive mutagenesis. There are, however, serious methodical objections against this interpretation [Partridge, Morgan, 1988]. On the other hand, Davis [1989] proposed a concrete mechanism, consonant with our ideas, for the explanation of these results: single-stranded regions of DNA which occur during transcription are more vulnerable than double-stranded DNA.

All that was said above allows the hypothesis of the dependence of the mutation rate of the genes on their functional state to be considered as a special case of the more general statement about the effect of the functional state of genetic structures on very different genetically significant events in which DNA takes part: occurrence of gene and chromosome mutations realization of repair and recombination, gene conversion. This makes quite probable the assumption of the higher sensitivity of derepressed genes, in comparison to the repressed ones, to different endogenous mutagenic influences, whose ensemble constitutes the mutagenic background called 'spontaneous mutagenesis'. The fact that differences in the functional state of genes change their mutability ten- or 100-fold in eukaryotic cells, but only several times in prokaryotic cells, may be interpreted on the basis of the different structural organization of the genetic apparatus of these groups of organisms.

This concept may be called 'the functional view of the mutation process'.

A great advantage of the hypothesis of the effect of the functional state of genes on their mutability is its openness to experimental verification in various organisms, well studied from a genetical point of view.

CONCLUSION

If future investigations were to sustain the above-formulated hypothesis, then, besides the necessity to elucidate the molecular mechanisms of the effect of the functional state of the genes on their mutability, this will have at least three consequences.

First, it will mean a natural solution for the old controversy about the influence of external conditions on the mutation process: if the genes that mutate most frequently are 'working' more actively, then the mutational spectrum of the cells (defined as the relative mutability of the various genes) should reflect the functional state of their genetic machinery under the given external conditions.

Secondly, such a dependence of the mutational spectra of cells on their functional state may play a substantial role in cell and tissue differentiation in ontogenesis and, maybe, in forming the immune answer to exogenous and endogenous antigens.

Thirdly, this peculiarity of mutagenesis (and, maybe, of other genetic events), as already noted by Herman and Dworkin [1971], may be of interest for the general theory of evolution. Indeed, if the genes which are 'working' more intensively under the given circumstances mutate much more often than the 'passive' genes, then they constitute a more labile raw material for natural selection, thus creating a certain 'directedness' of the evolution process.

REFERENCES

- Alenin V.V., Domkin V.D., Kovalyeva A.A., Smirnov M.N. Regulation of expression of *ADE2* and *ADE1* genes coding for the structure of two yeast *Saccharomyces cerevisiae* purine biosynthesis enzymes by exogenous adenine. *Biopolimery i kletka*. 1987. Vol. 3. P. 325–326.
- Andreadis A., Hsu Y.-P., Hermodson M. et al. Yeast *LEU2*: Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 8059–8062.
- Bakayev V.V., Schmatchenko V.V., Georgiev G.P. Sub-nucleosome particles containing high mobility group proteins HMG-E and HMG-G originate from transcriptionally active protein // *Nucl. Acids Res.* 1979. Vol. 7. P. 1525–1540.
- Brendel M. Mutation induction by excess deoxyribonucleotides // *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance* / Ed. F.J. de Serres. N.Y.: Plenum press, 1985. P. 425–434.
- Bresler S., Mosevitsky M., Vyacheslavov L. Mutations as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency // *Mutat. Res.* 1973. Vol. 19. P. 281–293.
- Brock R.D. Differential mutation of the beta-galactosidase gene of *Escherichia coli* // *Ibid.* 1971. Vol. 11. P. 181–186.
- Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // *Nature*. 1988. Vol. 335. P. 142–145.
- Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N. Regularities in appearance of mutants on selective media. *Genetika*. 1988. Vol. 24. P. 1572–1578.
- Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P. Sur la conversion du gene *ad3* chez la levure // *C. r. Soc. biol.* 1960. Vol. 154. P. 1970–1974.
- Coughlin A., Adelberg E.A. Bacterial mutation induced by thymine starvation // *Nature*. 1956. Vol. 178. P. 531–532.
- Davis B.D. Transcriptional bias: A non-Lamarckian mechanism for substrate-induced mutations // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1989. Vol. 86. P. 5005–5009.
- De Serres F.J. (ed.) *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance*. N.Y.: Plenum press, 1985.
- Devin A.B. The reparation hypothesis and the effect of coffeeine on the induction of full mutations in yeast // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1975. Vol. 223. P. 992–994.
- Eckardt F., Kunz B.A., Haynes R.H. Variation of mutation and recombination frequencies over a range of thymidylate concentrations in a diploid thymidylate auxotroph // *Curr. Genet.* 1983. Vol. 7. P. 399–402.
- Floroff G.N. Synthesis of superheavy elements and applications of the methods of nuclear physics in the related areas // *Vestn. Akad. Nauk SSSR.* 1984. N 4. P. 35–48.
- Fox M.S. Mutation rates of bacteria in steady-state populations // *J. Gen. Physiol.* 1955. Vol. 39. P. 267–278.
- Gazit B., Cedar H., Lerer I., Voss R. Active genes are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase // *Science*. 1982. Vol. 217. P. 648–650.
- Gazit B., Panet A., Cedar H. Reconstitution of a deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. Vol. 11. P. 1787–1790.
- Gross T.S., Woods R.A. Regulation of *de novo* purine nucleotide synthesis by enzyme repression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Heredity*. 1972. Vol. 28. P. 275.
- Haynes R.H. Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance // *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance* / Ed. F.J. de Serres. N.Y.: Plenum press, 1985. P. 1–23.

- Herman R.K., Dworkin N.B.* Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1971. Vol. 106. P. 543–550.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I.* Evidence for real increase of reversion frequencies in the haploid yeast auxotrophic for adenine, with decrease of adenine in the medium // Genetika. 1987. Vol. 23. P. 630–636.
- Ilyina V.L., Korogodin V. I., Fajsz Cs.* Effect of adenine concentration in the medium on the frequency of reversions in haploid yeasts // Ibid. 1985. Vol. 21. P. 1643–1649.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture // Mutat. Res. 1986. Vol. 174. P. 189–194.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Dependence of the frequency of revertants of different types on adenine content of the medium in the yeasts auxotrophic for adenine // Genetika. 1987. Vol. 23. P. 637–642.
- Kerkis Yu.Ya.* Physiological changes in the cell as the cause of mutational process. Uspekhi Sovr. Biol. 1940. Vol. 12. P. 143–159.
- Kölsch E., Starlinger P.* A difference in UV-sensitivity between genes in the repressed and genes in the de-repressed state // Ztschr. Vererbungsl. 1965a. Vol. 96. P. 297–303.
- Kölsch E., Starlinger P.* A difference in the photoreactivation of UV-damage between genes in the repressed and genes in the de-repressed state // Ibid. 1965b. Bd. 96. S. 304–306.
- Korogodin V.I., Abetyan N.O., Brunckova H.* et al. Spontaneous mutagenesis and cell cultivation conditions // Ontogenesis, evolution, biosphere. Moscow: Nauka, 1989. P. 59–71.
- Korogodina V.L., Koltovaya N.A., Lyubimova K.A.* et al. Estimation of the contribution of double mutants to the observed spectrum of revertants, occurring in auxotrophic yeasts. Dubna, 1988a. (JINR Commun.; P19-88-835).
- Korogodina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Dynamics of appearance of locus and suppressor revertants in adenine auxotrophic yeasts incubated on selective medium. Dubna, 1988b. (JINR Commun.; P19-88-766).
- Kubitschek H.E., Bendigkeit H.E.* Mutation in continuous cultures. I. Dependence of mutational response upon growth limiting factors // Mutat. Res. 1964. Vol. 1. P. 113–120.
- Kunz B.A.* Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances // Environ. Mutagenesis. 1982. Vol. 4. P. 695–725.
- Lancillotti F., Lopez M.C., Arias P., Alonso C.* Z-DNA in transcriptionally active chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1987. Vol. 84. P. 1560–1564.
- Lipschutz R., Falk R., Avigad C.* Mutation rates of the induced and repressed locus of alkaline phosphatase in *Escherichia coli* // Isr. J. Med. Sci. 1965. Vol. 1. P. 323–324.
- Lobashov M.E.* Physiological (paraneurotic) hypothesis of the mutation process // Vestn. Leningr. Universiteta. 1947. N 8. P. 10–29.
- Luria S.E., Delbrück M.* Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. 1943. Vol. 29. P. 491–511.
- Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C.* Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: c-abl and c-mos // Cell. 1986. Vol. 45. P. 417–423.
- Mellon I., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C.* Preferential DNA repair of an active gene in human cells // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986. Vol. 83. P. 8878–8882.
- Mellon I., Spivak G., Hanawalt P.C.* Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene // Cell. 1987. Vol. 51. P. 241–249.
- Novick A., Szilard L.* Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1950. Vol. 36. P. 708–719.
- Partridge L., Morgan M.* Is bacterial evolution random or selective? (Correspondence) // Nature. 1988. Vol. 336. P. 22.
- Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Nagorskaya T.C., Mirzabekov A.D.* Structure of transcriptionally active chromatin // Molekulyarnaya Biologia. 1984. Vol. 18. P. 8–20.
- Savic D.J., Kanazir D.T.* The effect of a histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *Salmonella typhimurium* // Mol. Gen. Genet. 1972. Vol. 118. P. 45–50.
- Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbrück M.* Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Göttingen. Math.-phys. Kl. 1935. Bd. 6, N 1. P. 189–245.
- Weinberg R., Latham A.B.* Apparent mutagenic effect of thymine deficiency for a thymine-requiring strain of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1956. Vol. 72. P. 570–572.

- Weisbrod S., Weintraub H. Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin protein // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 630–634.
- Williamson D.H., Scopes A.W. A rapid method for synchronizing division in the yeast *Saccharomyces* // Nature. 1962. Vol. 193. P. 256–257.
- Zakharov I.A., Kozhin S.A., Kozhina S.A., Fyodorova I.V. Manual of methods in the genetics of yeast *Saccharomyces*. Leningrad: Nauka, 1984.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КОНЦЕПЦИЯ МУТАГЕНЕЗА

Каковы закономерности мутагенеза – процесса изменения мутирования генов, совокупность которых слагает наследственный аппарат организмов? Ответить на этот вопрос ученые стремятся уже десятки лет. Было много попыток, в разной степени удачных, но каждая из них отражала лишь отдельные стороны этого грандиозного, постоянно совершающегося в природе процесса, без которого не было бы самой биологической эволюции.

Хотя теория эволюции насчитывает около полутора веков, в ней еще много неясного. Однако специалисты в области популяционной генетики и макроэволюции быстро накапливают знания о закономерностях, которым подчинено эволюционное движение организмов, а возможные варианты макроэволюции широко обсуждаются в литературе. Иначе обстоит дело с мутагенезом. То, что растениям и животным свойственна наследственная изменчивость, знали, конечно, еще первые животноводы и земледельцы. Давно известны и две главные формы такой изменчивости: рекомбинационная, возникающая в результате скрещивания, и мутационная, не связанная с гибридизацией. Однако закономерности мутационного процесса еще только начинают вырисовываться. Термин «мутация» для обозначения внезапно возникающих новых форм растений и животных предложил в конце прошлого века голландский ботаник и эволюционист Г. де Фриз. Он заимствовал этот термин у палеонтологов, называвших мутациями (от лат. *mutatio* – изменение) резкие смены представителей ископаемой флоры и фауны в последовательных слоях геологических отложений. Мутанты появляются, считал де Фриз, в результате резких изменений «наследственных зачатков». Время от времени тот или иной вид вступает в «мутационный период» и порождает множество новых форм, дающих начало новым разновидностям и видам. Но какова природа наследственных зачатков и что вызывает их изменения, было неизвестно.

Вторичное открытие законов Г. Менделя (1900) и выход в свет книги де Фриза (1901) стимулировали поиски мутантов. Вскоре были описаны десятки мутантов у разных живых организмов: от бактерий до млекопитающих. Однако ни в одном из этих случаев не было уверенности, что это – действительно мутанты, а не расщепившиеся гибриды, т.е. продукты когда-то произошедшего скрещивания.

Столь же ненадежными оказались и первые попытки ответить на вопросы, что собой представляют мутации и почему они происходят. Так, еще Ч. Дарвин упоминает о представлениях, согласно которым «в известные эпохи зачатки существующих видов могли подвергаться химическому действию

некоторых специфических, их окружающих молекул и давать начало новым формам» [1], а в конце прошлого века Н.Ф. Гамалея описал свои наблюдения над влиянием химических веществ, взаимодействующих с «живым нуклеином», на наследственную изменчивость бактерий. В начале века английский генетик В. Бэтсон выступил с «теорией присутствия – отсутствия», согласно которой мутации – результат разрушений, исчезновения отдельных зачатков – генов. Среди некоторых микробиологов вплоть до середины века бытовала «адаптационная концепция» мутагенеза, согласно которой гены мутируют под влиянием внешней среды так, чтобы обеспечить лучшую приспособленность к ней организмов. Однако эксперименты, как будто подтверждающие эти представления, оказались результатами методических погрешностей.

Для строгого исследования мутагенеза требовались хорошо изученные в генетическом отношении объекты и тонкая техника экспериментов, позволяющая отличить истинных мутантов от рекомбинантов. Сделать это удалось лишь после того, как Т.Г. Морган ввел в генетику новый, чрезвычайно удобный объект – плодовую мушку дрозофилу, показал (вместе со своими учениками), что наследственные факторы – гены – линейно расположены в хромосомах, и создал хромосомную теорию наследственности.

К 20-м годам в школе Моргана уже были идентифицированы многие гены дрозофилы, получены генетически чистые линии, разработаны методики для количественного учета новых мутаций.

ПЕРВЫЕ ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

Первые опыты Г. Меллера и Е. Альтенбурга (1919) по определению частот мутирования у дрозофилы показали, что спонтанно мутации возникают очень редко – с частотами 10^{-5} – 10^{-6} (один мутантный ген на 10^5 – 10^6 мух). При этом чем выше температура среды, тем больше частота мутирования.

Эти опыты послужили началом обширной программы по выяснению природы генов и их изменчивости. Сам Меллер не придавал особого значения обнаруженному им «температурному мутагенезу» – по той причине, что, во-первых, трудно «дозировать» воздействие температуры на мутагенез, а во-вторых, невозможно установить, связано ли увеличение частоты с действием повышенной температуры непосредственно на сами гены или на физиологические процессы у дрозофилы, что лишь опосредованно влияет на генетический аппарат. Поэтому для основных исследований Меллер избрал ионизирующие излучения, природа взаимодействия которых с веществом уже была хорошо известна, которые можно было бы точно дозировать и для которых легче избежать артефактов, связанных с использованием повышенных температур.

Результаты опытов по радиационному мутагенезу Меллер доложил на Генетическом конгрессе в Берлине, в 1927 г. [2]. Главные выводы были следующие. Ионизирующие излучения могут во много раз повышать частоту мутирования генов. Облучение вызывает такие же мутации (судя по проявлению), как и возникающие спонтанно. Это позволяло думать, что облучение лишь ускоряет мутационный процесс, и потому радиационный мутагенез может служить моделью для изучения спонтанной изменчивости генов. С этой поры излучения прочно входят в арсенал методов, применяемых в исследованиях по мутагенезу.

Спустя десять лет итоги исследований по радиационному мутагенезу подвели Н.В. Тимофеев-Ресовский, К.Г. Циммер и М. Дельбрук [3], сформулировав так называемую термодинамическую концепцию мутационного процесса. Анализ собственных и полученных в других лабораториях результатов по зависимости частоты возникновения генных мутаций от дозы облучения, длины волны излучения, распределения дозы во времени, а также от ряда сопутствующих факторов, в частности температуры, показал, что при облучении мутации генов происходят как одноэтапные события, вызываемые поглощением одного кванта излучения. Сопоставление частот индуцированных облучением мутаций со спонтанными частотами, а также влиянием на мутагенез повышенных температур привело авторов к выводу, что мутации генов представляют собой конформационные преобразования молекул, требующие значительной энергии активации. В опытах с облучением эта энергия поставляется ионизацией (и, возможно, возбуждением), а в обычных условиях – тепловым движением молекул. Сам ген, согласно этим воззрениям, – нечто вроде белковой макромолекулы, способной принимать различные конформации. Тем самым как будто решались вопросы и о природе радиационного, температурного и спонтанного мутагенеза. Различия в частотах спонтанного мутирования разных генов объяснялись разной энергией активации, требующейся для их конформационных переходов. Казалось, и феномен множественного аллелизма (когда один ген может принимать несколько мутантных форм), и существование «обратных мутаций» (переход мутантного гена в исходную, «дикую» форму) нашли свое объяснение. Эта работа произвела большое впечатление в научных кругах, что ярко отражено в книге Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» (1946).

Но последующее развитие генетики и выяснение молекулярного строения генов показали, что ни сам ген, ни природа его изменчивости не имеют ничего общего с белковыми молекулами и их конформационными преобразованиями. Научное значение этой работы свелось в основном к строгому описанию количественных закономерностей радиационного мутагенеза, что в дальнейшем послужило основой принципа попадания и мишени. Что же касается спонтанного мутагенеза, то эта работа выявила лишь одну (правда, важную) его особенность – частота возникновения спонтанных мутаций намного выше, чем следовало бы ожидать, если бы это мутирование было связано природному радиационному фону.

КОНЦЕПЦИЯ ДИСБАЛАНСА

Согласно термодинамической концепции мутационного процесса, повышение температуры должно увеличивать частоту генных мутаций, а понижение – уменьшать. Однако уже в конце 30-х годов было установлено, что у дрозофилы частота мутирования генов увеличивается как при повышении, так и при понижении температуры по сравнению с оптимальной. Исходя из этого Ю.Я. Керкис предложил «физиологическую концепцию» мутагенеза, впоследствии дополнительно развитую М.Е. Лобашовым [4].

Эта концепция основывалась на допущении, что спонтанные мутации возникают в результате разного рода физиологических и биохимических процессов в клетках и отражают степень неупорядоченности этих процессов. А

если это так, то возрастание такой неупорядоченности, сопровождающее отклонение условий обитания от оптимальных, должно усиливать спонтанный мутагенез.

Несколько натурфилософский характер этих представлений компенсировался их эвристичностью. Действительно, из физиологической концепции следовало, что наивысшая мутабельность должна приходиться на границы ареала обитания видов, что могло иметь эволюционное значение. Разного рода внешние воздействия, например отклонение температуры от оптимальной, должны повышать мутабельность вследствие нарушения физиологического гомеостаза клеток и организмов. Правда, большие затруднения при проверке этой концепции связаны с определением степени оптимальности условий для данного организма, особенно при одновременном изменении нескольких параметров. И, тем не менее, идеи, заложенные в физиологической концепции, получили в последующем экспериментальную разработку. В 60-е годы выявились два направления. Во-первых, это изучение мутационных эффектов стресса – состояния организмов и клеток, очевидно связанного с физиологическим дискомфортом. В нашей стране это направление развивается в Институте цитологии и генетики СО АН СССР и непосредственно связано с именем Ю.Я. Керкиса, работавшего там в последние годы жизни. Во-вторых, это изучение генетических последствий дисбаланса пулов нуклеотидов или скоростей синтеза ДНК и белка, идущее сейчас в ряде лабораторий, но связанное с физиологической концепцией лишь логически.

В период, разделяющий появление физиологической концепции и начало экспериментальной разработки дисбаланса, в генетике произошел ряд событий, равных по значению только открытию генов и созданию хромосомной теории наследственности. Это открытие полового процесса у грибов и бактерий, разработка методов их генетического анализа и определения частот мутирования их генов; выяснение генетической роли ДНК и ее структуры; расшифровка кода генетической информации; выяснение механизмов синтеза белка; конкретизация на молекулярном уровне понятия «ген» и путей передачи наследственной информации от генов к признакам и от родителей к потомкам; открытие репарации ДНК от повреждений и взаимосвязи трех основных генетических процессов – репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Короче говоря, за этот период родилась и созрела новая научная дисциплина – молекулярная генетика. Весь облик генетики коренным образом изменился. От поиска закономерностей генетических явлений перешли к изучению их молекулярной природы.

Выяснение строения генов и расшифровка их функций в жизни клеток позволили установить молекулярные события, лежащие в основе мутаций. Это – замена, вставка или выпадение в гене одного или нескольких нуклеотидов. Каждый ген, мутируя, может порождать множество аллелей, различающихся числом или последовательностью нуклеотидов. Обратные мутации – такие изменения ранее мутировавшего гена, которые приводят к частичному или полному восстановлению его исходных функций. Конкретизировано классическое утверждение о том, что мутации возникают в результате конвариантной редупликации генетических структур, или, как часто говорят, «ошибок репликации» ДНК. Подтвердилось и представление Меллера, согласно которому искусственные мутагены вызывают лишь такие

мутации, которые возникают спонтанно, только со значительно меньшей частотой. Однако второе допущение Меллера о том, что искусственные мутагены лишь ускоряют природный мутагенез, вряд ли можно считать правильным: частоты мутаций разных генов при воздействии мутагенов меняются не пропорционально частотам их спонтанного мутирования. Все это теперь хорошо известно и вошло в учебники.

Но изучение молекулярной природы гена и его изменчивости не вскрыло закономерностей спонтанного мутагенеза. Прорыв в эту область наметился лишь в конце 50-х годов, когда был обнаружен феномен «бестиминовой гибели» бактерий.

Клетки, неспособные самостоятельно синтезировать тимин (один из нуклеотидов, из которых строятся молекулы ДНК) в результате мутации гена, контролирующего его синтез, могут размножаться лишь в питательной среде, содержащей этот нуклеотид. В бестиминовой среде бактерии не размножаются и постепенно погибают. Если же в среде тимин присутствует в очень малом количестве, то клетки могут несколько раз поделиться, причем в культуре возникает множество самых разных мутантов, намного больше, чем у таких же бактерий в сбалансированной по тимину среде. Такой «валовой мутагенез» у дефектных по тимину бактерий изучали С.Е. Бреслер с сотрудниками (1970). Это явление логично было объяснить дисбалансом нуклеотидов: если в клетках нарушено необходимое для нормальной репликации ДНК соотношение концентраций нуклеотидов (аденин, гуанин, тимин, цитозин), то возрастает вероятность ошибок репликации, на место недостающего нуклеотида подставляется другой или образуется пробел, частота мутаций возрастает.

В ходе обстоятельного изучения дисбаланса нуклеотидов на модельных системах (репликация ДНК фагов *in vitro*) и живых клетках (бактерий, дрожжей, высших растений и животных) выяснилось, что мутагенный эффект наблюдается как при недостатке, так и при избытке отдельных нуклеотидов: дисбаланс приводит к увеличению частоты не только генных мутаций, но и мутаций хромосом или рекомбинаций [5].

Другой пример дисбаланса – нарушение оптимального соотношения скоростей синтеза ДНК и белка. Если у бактерий избирательно снизить скорость синтеза ДНК, например налидиксовой кислотой, частота генных мутаций возрастает. По мнению Г.Е. Фрадкина [6], обнаружившего и тщательно изучившего это явление, в его основе лежит нарушение процессов репарации ДНК: репарационные ферменты не успевают ликвидировать разрывы ДНК, возникающие в ходе ее репликации, что и вызывает разного рода мутации.

Близок к мутагенным эффектам дисбаланса и мутагенез, вызываемый в клетках стрессовыми ситуациями. Известно, что стресс на клеточном уровне нарушает физиологические и биохимические процессы, в том числе и синтез ДНК. Р.И. Салганик, изучающий с группой сотрудников «стрессовый мутагенез» у бактерий, обсуждает ряд молекулярных механизмов, повышающих при стрессе частоту рекомбинаций, суть которых, в конечном счете, сводится к различного рода проявлениям дискоординации нормально протекающих в клетках генетических процессов [7].

Логически стройная и весьма правдоподобная с точки зрения молекулярных механизмов дисбалансная концепция мутагенеза имеет один серьез-

ный недостаток: с ее позиций трудно объяснить, почему увеличение частот мутаций при дисбалансе по-разному выражено для разных генов одной и той же клеточной популяции. Ведь у разных генов механизмы редупликации абсолютно идентичны, а соотношения четырех нуклеотидов сходны. Значит, дисбаланс нуклеотидов должен в равной мере повышать частоты мутирования разных генов. Но это не наблюдается ни у бактерий, ни у дрожжей – объектов, достаточно хорошо изученных в этом отношении. Чем же объяснить эти различия?

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КОНЦЕПЦИЯ

Вряд ли можно сомневаться, что дисбаланс нуклеотидов, как и дисбаланс скоростей синтеза ДНК и белка, усугубляют ошибки репликации ДНК, но определяет ли этот механизм все особенности «дисбалансного мутагеназа» и, прежде всего, его генную специфичность? Ведь дисбаланс не ограничивается влиянием только на ход репликации ДНК, он сказывается на множестве клеточных процессов, в том числе и на регуляции активности многих генов. В литературе же еще четверть века назад начали появляться сообщения о влиянии функционального состояния генов на различные генетические события.

Напомним, что гены всех без исключения организмов могут находиться в трех функциональных состояниях: неактивном (репрессия), когда обе цепи ДНК образуют двойную спираль, как бы защищенную от внешних воздействий, особенно у эукариот, молекулами специальных белков, так что ген «молчит»; активном (дерепрессия), когда белковая «защита» снята, цепи ДНК раскручены и на одной из них идет синтез молекул информационной РНК; и в состоянии репликации, когда двойная спираль ДНК раскручивается и на обеих цепях идет синтез ДНК-копий. Регулировать функциональное состояние тех или иных генов удается, меняя условия культивирования клеток. Еще в 60-е годы обнаружилось, что если синхронизировать деление бактерий и в разные сроки кратковременно облучать их ультрафиолетовыми лучами, то по мере репликации ДНК мутационный спектр меняется – чаще мутируются то одни, то другие гены. Измененная мутабельность как бы скользит по молекуле ДНК, совпадая с точкой репликации. Явление это, указывающее на связь индуцированной мутабельности гена с его функциональным состоянием, использовали для картирования хромосом некоторых бактерий.

Несколько раньше на клетках дрожжей выяснилось, что гены в активном состоянии чаще вступают в рекомбинацию, чем репрессивные. А в опытах на бактериях установили, что активные гены гораздо чаще мутируют при действии УФ-света и химических мутагенов, чем неактивные, и что процессы фотореактивации после УФ-облучения значительно эффективнее идут на активных генах. Наконец, уже в 80-х годах обнаружили, что темновая репарация повреждений ДНК у клеток млекопитающих в культуре также значительно эффективнее осуществляется на работающем гене, чем на гене, находящемся в состоянии покоя [8].

Заинтересовавшись этими фактами, мы провели серию экспериментов, чтобы выяснить, как влияет функциональное состояние гена на его мутабельность в условиях дисбаланса нуклеотидов.

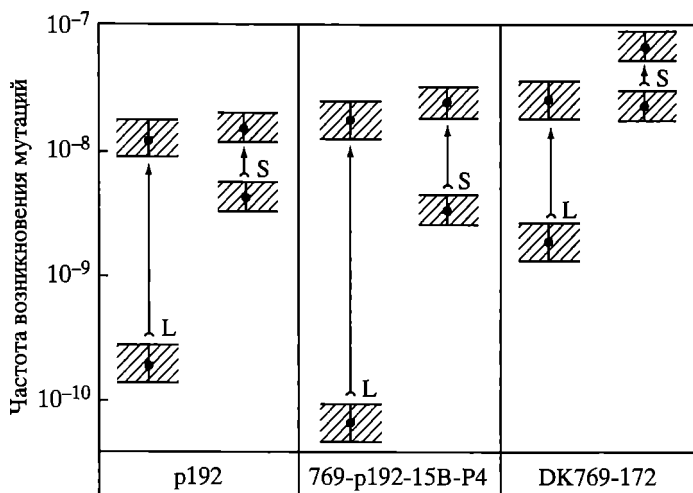


Рис. 1. Частота возникновения мутаций в гене, контролирующем синтез аденина L, и в генах-супрессорах S у разных штаммов дрожжей-сахаромицетов, не способных синтезировать аденин

Внизу – частота мутаций генов при избытке аденина в среде, сверху – при его отсутствии. Стрелки указывают на изменение частоты мутаций при переходе гена, контролирующего синтез аденина, из неактивного состояния в активное

В наших опытах использовались гаплоидные клетки дрожжей-сахаромицетов – низших эукариот, у которых генетический аппарат организован примерно так же, как у высших растений и животных. Для создания дисбаланса пулов нуклеотидов мы взяли мутанты с дефектом одного из генов, контролирующих синтез аденина, неспособные обеспечивать себя этим нуклеотидом. Такие клетки хорошо размножаются в среде, содержащей аденин, и быстро прекращают делиться без него. Разработав специальную технику эксперимента, мы определяли частоту возникновения реверсов (т.е. клеток, у которых восстанавливалась способность самостоятельно синтезировать аденин) в одной и той же культуре дрожжей при сбалансированном пуле нуклеотидов и при остром дефиците по аденину.

Отметим, что реверсы могут возникать за счет мутаций двух типов: «обратных» мутаций первоначально нарушенного гена (локусные мутации) и «прямых» мутаций в генах-супрессорах (супрессорные мутации). Регуляция активности этих генов обеспечивается разными механизмами. Так, в среде с аденином гены, контролирующие его синтез, подавлены, и только истощение аденина активирует их. Гены-супрессоры, обычно контролирующие синтез транспортной или рибосомальной РНК, вероятно, активны постоянно, независимо от того, есть в среде аденин или нет. Переноса клетки из среды с аденином в среду без аденина и определяя в обоих случаях частоты локусных супрессорных мутаций, мы смогли изучить влияние дисбаланса нуклеотидов на частоту мутаций генов, находящихся в разных функциональных состояниях.

На среде без аденина (клетки здесь могли несколько раз поделиться за счет «остаточного роста»), где все интересующие нас гены находились в ак-

тивном состоянии, частота их мутаций была примерно одинаковой (10^{-8} на клетку на деление). Однако в среде с аденином, где гены-супрессоры «работают», а гены, контролирующие синтез этого нуклеотида, «выключены», частота мутирования генов-супрессоров уменьшалась всего в несколько раз, а аденинового гена – очень сильно (рис. 1). В целой серии опытов на дрожжах разных штаммов мы получили сходные результаты. Если в присутствии аденина гены, контролирующие его синтез, мутируют в десятки и сотни раз реже, чем гены-супрессоры, то в его отсутствие частота мутаций в обеих группах выравнивается. Дисбаланс по аденину резко повышает частоту мутаций в генах, контролирующих его синтез (от 15 до 150 раз для разных штаммов), и лишь незначительно (в 2–4 раза) – в генах-супрессорах.

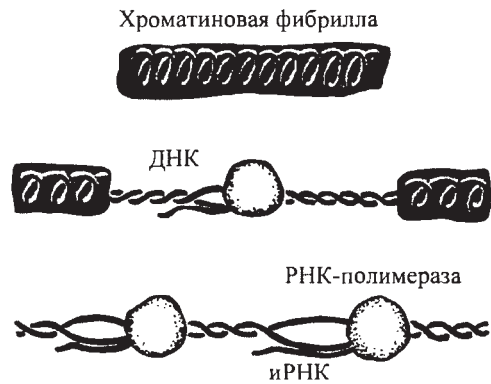
Очевидно, что такую генную специфичность дисбалансного мутагенеза объяснить одним только дисбалансом нуклеотидов невозможно. И сначала мы попытались объяснить это тем, что активные гены намного чувствительнее к дисбалансу, чем молчащие [9]. Но каковы роли в общем эффекте функционального состояния генов и дисбаланса нуклеотидов?

Чтобы ответить на этот вопрос, А.И. Чепурной и Н. Михова-Ценова (1988) провели аналогичные эксперименты на штаммах дрожжей, способных самостоятельно синтезировать все нуклеотиды, но содержащих мутации, блокирующие синтез двух аминокислот – лейцина и лизина. Гены, контролирующие синтез лейцина, активны лишь при исчерпании в среде этой аминокислоты, что, однако, никак не сказывается на функциональном состоянии генов, контролирующих синтез лизина. Выращивая такие клетки в среде с лейцином (когда гены, контролирующие его синтез, подавлены) или в среде с его дефицитом (когда гены, контролирующие его синтез, активны), эти авторы определяли частоты возникновения мутаций в лейциновом гене, лизиновом гене и генах-супрессорах. По мере обеднения среды лейцином частота мутаций лейцинового гена повышалась в десятки раз, генов-супрессоров – в несколько раз, а гена, контролирующего синтез лизина, не менялась. Но дефицит по лейцину не может вызывать дисбаланс нуклеотидов! Следовательно, мутабельность генов связана в основном с их функциональным состоянием.

Напомним, что в опытах как с аденином, так и с лейцином определялась спонтанная мутабельность генов – без искусственных мутагенов. Единственным меняющимся параметром было содержание в среде аденина или лейцина, что регулировало генную активность. Это позволило предположить, что частота спонтанных мутаций в значительной мере обусловлена функциональным состоянием генов: активные мутируют намного чаще, чем находящиеся в состоянии репрессии. Эту систему представлений мы и назвали функциональной концепцией мутагенеза, так же, по-видимому, можно объяснить результаты, полученные недавно американскими исследователями на бактериях [10].

Чем же обусловлено изменение спонтанной мутабельности генов, переходящих из неактивного состояния в активное? Скорее всего, тем же, что и другие упоминавшиеся выше события, частота которых связана с функциональной активностью генов, – подверженность действию физических и химических мутагенов, репарированность ДНК и т.п. Конформация генов в активном состоянии резко меняется (рис. 2), ген как бы раскрывается и

Рис. 2. Схема изменений конформаций гена при его активации. Неактивные гены представляют собой компактные фибриллы (30 нм в диаметре), где спирализованная ДНК накручена на гистоновые октамеры. При умеренной активации гена молекулы РНК-полимеразы вытесняют гистоновые октамеры на участке транскрипции, вследствие чего фибрилла в этой области разворачивается до 10 нм в диаметре. При интенсивной транскрипции удаляются все гистоны, молекула ДНК вытягивается и на ее деспирализованых участках синтезируется информационная РНК



становится доступнее действию разных ферментов и внутриклеточных метаболитов, совокупный эффект которых и создает спонтанный мутационный фон. В этом отношении спонтанный мутагенез, видимо, мало отличается от других генетически значимых событий с участием ДНК: репарации и рекомбинации.

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На примере генных мутаций мы проследили основные этапы развития представлений о мутационном процессе – от ранних натурфилософских построений до современных попыток понять механизмы и закономерности этого важнейшего свойства живых организмов.

Мы видели, как первые исследования мутагенеза на дрозофиле (а позже – и на других объектах) показали очень низкие частоты мутаций отдельных генов, а также важную закономерность мутационного процесса, проявляющуюся в различии частот мутаций разных генов у одних и тех же организмов. Физиологическая концепция подчеркивала, хотя и в общем виде, большую роль, которая принадлежит в мутационном процессе метаболизму клеток, его отклонениям от гомеостаза. Концепция дисбаланса стремилась конкретизировать понятие «физиологического дискомфорта», связывая мутабельность генов с нарушением нормальных условий синтеза ДНК, но, к сожалению, не могла объяснить различия в частотах мутирования разных генов и зависимость «мутационных спектров» от условий культивирования клеток. Наконец, функциональная концепция отражает роль функционального состояния генов в их ответах на эндогенный и экзогенный мутагенный фон, что, по-видимому, служит одной из причин различных мутационных спектров клеток при разных условиях их культивирования.

Попытаемся теперь наметить основные закономерности природного мутационного процесса. Можно думать, что ведущая роль здесь принадлежит структурной организации и функциональному состоянию генетического аппарата клеток. Роль же факторов внешней среды в мутагенезе тройкая. Некоторые из них могут сами служить мутагенами (как, например, природный радиационный фон), вызывая дискретные генетические изменения. Другие способны влиять на стабильность физиологических и биохимических процессов, вызывая дисбаланс и, тем самым, повышая эндогенный мутагенный фон. Наконец, условия среды обитания определяют функциональное состоя-

ние клеток, подавляя одни и активируя другие гены и, следовательно, заметно меняя их восприимчивость к действию мутагенов разной природы. И хотя молекулярные события, приводящие к разного рода мутациям, а также молекулярные изменения генетических структур, эти мутации представляющие, во всех случаях одинаковы, частоты разных мутаций в разных ситуациях могут сильно различаться.

Если наша гипотеза о связи мутабельности генов с их функциональным состоянием со временем подтвердится на разных объектах и, таким образом, приобретет статус всеобщности, старый вопрос о влиянии внешних условий на мутационный процесс будет решен. Естественно, что в этом случае мутагенез клеток надо будет характеризовать не одним числом, а распределением частот мутаций разных генов на пространстве режимов. Трудности экспериментального нахождения такого распределения полностью окупятся его эвристичностью.

Три следствия из этих представлений, достойные дальнейшей разработки, можно наметить уже сейчас.

Если гены мутируют тем чаще, чем интенсивнее они работают, то мутационный спектр клеток должен отражать функциональное состояние их генетического аппарата при данных внешних условиях. В таком случае ряд вопросов молекулярной генетики, связанных с регуляцией генов в живых клетках, можно будет изучать, используя в качестве маркеров частоты мутаций разных генов. Не исключено, что некоторые физические или химические факторы, усиливающие выраженность влияния функционального состояния генов на их мутабельность, смогут выступать здесь в роли своеобразного микроскопа.

Кроме того, как отмечалось выше, активные гены не только обладают повышенной мутабельностью, но и эффективнее участвуют в разных генетических процессах – репарации, рекомбинации. Возможно, функциональное состояние генома влияет и на такие события, как взаимодействие генов с мобильными генетическими элементами, транспозиция и амплификация генов. Это может иметь важное значение для дифференцировки клеток и тканей, синтеза иммуноглобулинов и других процессов, в совокупности представляющих собой онтогенез многоклеточных организмов.

И, наконец, как отмечали еще в 1971 г. Р.К. Герман и Н. Дворкин, одни из первых авторов, описавших влияние функционального состояния генов на их мутабельность, явление это может существенно отразиться на нашем понимании эволюции. Представление о независимости мутагенеза от условия обитания должно будет уступить место признанию определенной «направленности» наследственной изменчивости, в том смысле, что гены, интенсивнее работающие в данных условиях, чаще мутируют и, тем самым, представляют собой более мобильный материал для естественного отбора, нежели стабильные, консервативные, в данных условиях не используемые. Для популяции это может означать большее разнообразие белков, контролируемых активными генами, что должно обеспечивать большую пластичность популяции и устойчивость при варьирующих внешних условиях¹.

¹Эту мысль подсказал авторам Н.М. Колчанов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дарвин Ч. Собр. соч. / Пер. К.А. Тимирязева. М., 1907. С. 63. Т. 1.
2. Меллер Г.Дж. Избранные работы по генетике. М.; Л., 1937. С. 178–205.
3. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbrück M. // Nachr. Ges. Wiss. Göttingen. Math. Phys. Kl. 1935. Bd. 6. S. 189–245.
4. Керкис Ю.Я. // Усп. совр. биол. 1940. Т. 12. № 1. С. 143–159; Лобаиов М.Е. // Вест. ЛГУ. 1947. № 8. С. 10–29.
5. Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. N.Y., 1985.
6. Фрадкин Г.Е. Жизнеспособность, радиочувствительность, мутабельность клеток и метаболическая ДНК. М., 1983.
7. Салганик Р.И. // Генетика. 1987. Т. 23, № 6. С. 1050–1063.
8. Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P. // C.R. Soc. Biol. (Paris). 1960. Vol. 154. P. 1970–1974; Lipschutz R., Falk R., Avigad C. // Israel J. Medical Sci. 1964. Vol. 1. P. 323–324; Herman R.K., Dworkin N.B. // J. Bacteriol. 1971. Vol. 106. P. 543–550; Kölsch E., Starlinger P. // Z. Vererbungsl. 1965. Vol. 96. P. 304–306; Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C. // Cell. 1986. Vol. 45. P. 417–423.
9. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. // Генетика. 1987. Т. 23, № 4. С. 637–642.
10. Cairns J., Overbaugh J., Miller S. // Nature. 1988. Vol. 335. P. 142–145.

CHARACTERISTICS OF SPONTANEOUS MUTAGENESIS IN HAPLOID YEAST

INTRODUCTION

Earlier it was reported that the reversion rate in adenine-auxotrophic [Iljina, Korogodin, 1987; Iljina et al., 1985; 1987] and leucine auxotrophic [Chepurnov et al., 1989] haploid yeast increases with decreasing concentration of the above metabolites in the medium. In Ade^- yeast the appearance of Ade^+ revertants in the exponential phase of growth was constant as the adenine concentration varied from 1 to 100 mg l⁻¹. After transfer to medium without adenine, or during the stationary phase of growth with a low initial concentration of adenine (when the medium is depleted of this metabolite) the reversion rate increased by a factor of 15–150 in the case of intragenic suppressors (locus revertants, 'L') and by a factor of 2–3 in the case of intergenic suppressors (suppressor revertants, 'S'). In Leu^- yeast the rate of both types of reversion decreased with leucine concentration, increasing from 3 to 300 mg l⁻¹ during exponential phase of growth. Previously we ascribed this difference to different effects produced by the metabolites in question on the growth of yeast cultures. However, a desire to know the Leu^+ reversion rate during residual growth of Leu^- yeast on a selective medium (i.e. without leucine) led to a number of experiments.

The results were as follows. The Ade^- yeast which had been incubated for several generations in the selective medium exhibited a sharp increase in mutability of the *ADE-2* locus on the medium without adenine. The Leu^- yeast showed little or no growth on the selective medium without leucine and revertants did not appear under such conditions. The reasons which influence the appearance of revertants of various types are connected with the competitiveness of the revertants. Some types of revertants cannot appear even on the medium with normal leucine

concentration, where the median population size of auxotrophic cells in colonies is greater, let alone on the media with low leucine concentrations.

Such facts can produce the erroneous impression that mutation rates of various genes depend on cultivation conditions. This is true not only for yeast, but also for bacterial cells (the first descriptions of dependence on cultivation conditions were for bacteria [Coughlin, Adelberg, 1956; Cairns 1988]).

MATERIALS AND METHODS

STRAINS

The strains used were the same as in the previous paper [Korogodin et al., 1991]: haploid *Saccharomyces cerevisiae* strain P-192 (*MATa ade2-192*) from Prof. I.A. Zakharov (PINP) and strain NA3-24 (*MATa leu2-1 lys1-1*) from A.I. Chepurnoy (JINR). Mutation *ade2-192* seems to be missense while the mutations *leu2-1* and *lys1-1* are nonsense mutations. Revertants appearing after transferring the growing cultures to the selective medium were analyzed.

MEDIA

Complete nutrient medium and minimal salt medium are described in Zakharov et al. [1984]. In experiments with strain P-192, 1, 10 or 100 mg l⁻¹ of adenine were added to the minimal medium. In experiments with strain NA3-24, 3, 30 or 300 mg l⁻¹ leucine and 30 mg l⁻¹ of lysine were added to the minimal medium. For the selective medium the same minimal medium was used, without addition of the limiting metabolite(s). For genetic analysis, the media described by Devin [1975] were used. The addition of 1 mg l⁻¹ of adenine or 3 mg l⁻¹ of leucine was limiting; 10 mg l⁻¹ of adenine or 30 mg l⁻¹ of leucine were optimal and 100 mg l⁻¹ of adenine or 300 mg l⁻¹ of leucine were surplus concentrations in the exponential and stationary phases [Korogodin et al., 1991].

CULTIVATION

Yeasts grown on complete nutrient medium were suspended in water and plated by an inoculator with 220 pins on a lavsan nuclear filter [Floroff, 1984] covering the nutrient agar in the Petri dish. Each inoculum contained about 100 cells. The agar was filled with minimal salt medium enriched with defined amounts of adenine, leucine or lysine, as appropriate. Thus, in every Petri dish, about 220 macrocolonies emerged. After growing the cells at 30 °C for a given time interval, a few tens of colonies were scraped off the filters, resuspended in a defined amount of water and counted in a cell counter. The remaining colonies were transferred, together with the filters, to the selective medium. The emerging revertants, which are clearly seen on such media as colonies of secondary growth (papillae), were periodically scored.

Some experiments had alternate versions: without crushing initial colonies before transferring them to the selective medium and with crushing each colony separately; in the latter case 'multiple' and 'singular' colonies of revertants grow on smears of initial colonies. Revertants which have appeared and have divided on the initial minimal medium produce 'multiple' colonies. Revertants which have

arisen on the initial minimal medium and have not divided and also revertants, which have arisen after transferring the cultures to the selective medium produce 'singular' colonies [Korogodin et al., 1989].

Incubation on the selective medium went on until revertant colonies stopped appearing completely, which was not more than 21 days. During incubation on the selective medium, the appearing revertant colonies were registered daily; revertants were differentiated into intragenic (L) and intergenic (S) suppressors.

DIFFERENTIATION OF REVERTANTS

In the case of the Ade⁺ revertants the colour of the colonies could also be used to differentiate locus (L) and suppressor (S) revertants (in our strains the locus revertants form white colonies on the medium without adenine whereas suppressors form pink ones; [Korogodin et al., 1989]). It was found that the gene-screening check of this correlation gave a coincidence coefficient of 98% [Korogodina et al., 1988].

The analysis of Leu⁻ revertants was based on the requirement for metabolites. The revertants were transferred to: (1) a minimal medium with lysine but without leucine; (2) a minimal medium with leucine but without lysine; (3) a minimal medium without either lysine or leucine. Revertants growing on medium (1) only were considered intragenic suppressors (L) and those growing on all three media were considered intergenic suppressors (S).

MUTATION RATE

Mutation rate R is calculated according to the formula:

$$R = \frac{1}{m_t - m_0} \log \frac{N}{N_0}, \quad (1)$$

where m_t – median number of auxotrophic cells in the colony at time t ; m_0 – the number of such cells just after inoculation into initial plates; N – the number of the recorded colonies; N_0 – the number of colonies where no growth of revertants occurred.

STATISTICS

In various versions of the experiment with strain P-192, we have used from 30 to 100 plates to get about 100 revertant colonies for each version. In experiments with strain NA3-24 about 20 plates were used for each group. 220 colonies were inoculated on each plate. Recorded results for NA3-24 revertants were normalized to 20 plates, and these data are given below. We used standard statistical methods [Bailey, 1967].

MATHEMATICAL PROCESSING

The data were processed using a PC AT/286 computer. The calculations allowed us to trace the appearance of revertants with time (before or after transfer to the selective medium) and to find out the specific growth features of different revertants on media with or without limiting metabolites.

We considered the reversion process to be related to DNA replication [Korogodin et al., 1991]. The formula to find the number of revertants appearing in a population of multiplying cells was:

$$M_t = r \cdot n \cdot 2^{t/\tau_0}, \quad (2)$$

where M_t is the number of revertants at time t , r is their rate of appearance, n is the original number of cells of the initial strain (in this case $n = 1$), τ_0 is the cell cycle duration for initial cells.

A derivative of (2) is formula (3), used to determine the appearance time t_i of the i -th revertant (from the moment of plating auxotrophic cells onto the nutrient medium):

$$t_i = \frac{\ln(i/r)\tau_0}{\ln 2} - t_0, \quad (3)$$

where t_0 is the time for one cell to multiply to the number of cells plated.

In some cases, for comparison of the characteristics of the various revertants, we used a formal index, 'conventional division time' (CDT). This is the mean duration of the revertant cell division from the moment of appearance till the moment of detection. It was found that one can detect a revertant colony of 6×10^5 cells by the naked eye. CDT was calculated from the experimental revertant appearance curve, by formulae (2) and (3) and by the Monte Carlo method.

Different appearance times of revertants on selective media can be caused by: (1) different appearance times of revertants based on their rates of multiplication on the initial and selective medium; (2) appearance of revertants only on the initial medium with different rates of multiplication; (3) different appearance times of revertants and different rates of multiplication on the initial and selective media. Formulae (2) and (3) and the Monte Carlo method allow these situations to be simulated and compared with the experimental data.

RESULTS

APPEARANCE DYNAMICS OF REVERTANTS

At first we shall examine the effect of disrupting the colonies before their transfer to the selective medium on the appearance of NA3-24 revertants (P-192 data were published earlier; we could not find any difference in the appearance of revertants—see Korogodin et al., 1989). The experimental results are given in Table 1. We see that colony disruption (to separate the cells) does not significantly affect the appearance of revertants, at least after pre-growing yeast on media with 3 and 30 mg l^{-1} of leucine.

Table 1

Effect of disrupting initial colonies on appearance of NA3-24 revertant colonies (registered 21 days after transfer to the selective medium)

Leucine content (mg l^{-1})	Mutation rates (L + S) ($\times 10^{-7}$)	
	Non-disrupted colonies	Disrupted colonies
3	8.6 \pm 1.1	7.9 \pm 1.3
30	4.9 \pm 0.8	4.3 \pm 0.7

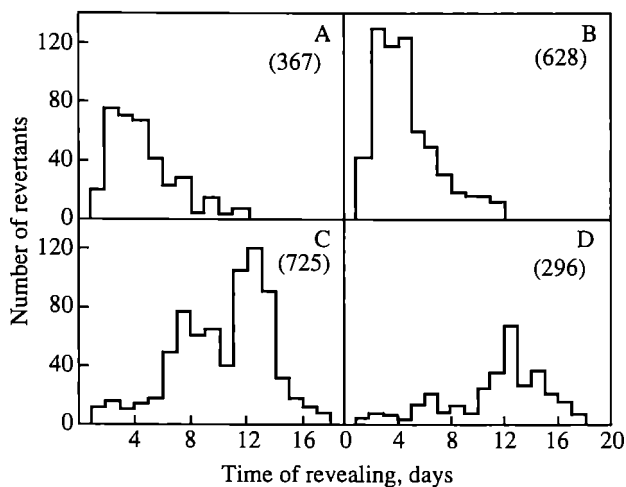


Fig. 1. Appearance of locus (A, C) and suppressor (B, D) revertants in strains P-192 (A, B) and NA3-24 (C, D) on the selective media after a 30-h incubation on a medium with 10 mg l^{-1} of adenine (A, B) and after a 48-h incubation on a medium with 3 mg l^{-1} of leucine (C, D). The cultivation conditions are such that approximately the same total number of revertants (numbers in parentheses) appears in both strains

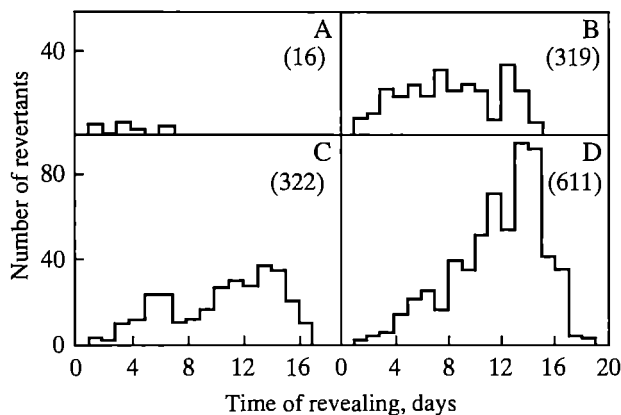


Fig. 2. Appearance of multiple (A, C) and single (B, D) locus revertants in strains P-192 (A, B) and NA3-24 (C, D) on the selective media under the same cultivation conditions as in Figure 1. In parentheses are the numbers of revertants

Figure 1 shows histograms detailing the appearance of P-192 and NA3-24 revertants on selective media. We can see the following distinctions: (1) the appearance of revertants in strain P-192 is finished on the 12th day, but in NA3-24 on the 18th day; (2) L-revertants make up about 40% of all revertants in P-192 and about 70% in NA3-24; (3) the appearance maximum for revertants of both types is in the first half of the incubation time (i.e. during the first 6 days) for strain P-192 and in the second half (i.e. the last 9 days) for NA3-24. Distinctions between the

strains become even greater when we compare yield dynamics of multiple and single L-revertants (Fig. 2). The yield of multiple revertants is 5% for strain P-192 and 35% for NA3-24.

The data in Figure 2 question the reliability of multiplicity of singleness as a criterion for recording the time at which revertants appear. Indeed, in most cases, multiple colonies of revertants indicate that initial revertants have already appeared and managed to divide before colony disruption. Imitation of multiple revertants by several single ones independently appearing on the same smears of primary colonies may work only if the proportion of initial colonies with single revertants exceeds 20%, which was hardly ever observed in the experiments. As to single colonies, their number is the sum of those appearing on the selective medium (i.e. after colony disruption) and those appearing on the initial medium (before disruption) but failing to divide. Single revertants may arise from potentially multiple revertants consisting of 2-4 cells, if the cells merged into a single colony after disruption. However, the number of colonies like that seems to be small. So, the number of single revertants appearing on the initial medium can scarcely be more than 2-fold greater than the number of multiple ones. The data (Fig. 2) on the appearance time of most (over 90%) single P-192 revertants are beyond question, for their number is 20 times larger than that of multiple revertants and they are formed during the residual growth of the culture on the selective medium without adenine. As to the appearance time of single NA3-24 revertants, which are only twice as numerous as multiple ones, this issue demands special analysis.

APPEARANCE TIME OF SINGLE NA3-24 REVERTANT COLONIES

With P-192 and other Ade⁻ strains described earlier [Korogodin et al., 1989; 1990; 1991], where the number of single L-revertant colonies exceeded that of multiple ones by an order and a half or two orders of magnitude, it is perfectly clear that the great majority of those colonies grow from revertants arising after disruption, i.e. on the selective medium.

Strain NA3-24, where single L-revertants are about twice as numerous as multiple ones (Fig. 2), is a different case. To examine the appearance time of single revertants in this strain we employed several independent approaches. Curves of accumulated rates for multiple and single L-revertants were compared; growth curves for L-revertants on a medium with leucine and on the selective medium were determined; and the yield of multiple and single L-revertants with different cell cycle durations was simulated mathematically. The fourth approach was to analyze the multiple revertants which arose on the initial medium and appeared on the selective medium at different times.

Let us consider curves of accumulated rates of appearance of L-revertants after cells were grown on non-selective media with 3, 30, 300 mg l⁻¹ of leucine during the exponential phase of growth (Fig. 3). We see that in all these cases the curves for multiple and single revertants are very similar and attain 100% at the same time. Similar data were obtained for cultures incubated on leucine media until stationary phase was reached. This means that the appearance time of multiple and single revertants on the selective medium is approximately the same, ranging from 2 to 20 days of incubation. Taking into account the fact that all multiple revertants came into being before transfer to the selective medium,

Fig. 3. Curves of accumulated frequencies for appearance of multiple- (1) and single- (2) locus revertants in strain NA3-24 after incubation during exponential phase of growth on media with different concentrations of leucine (numbers in parentheses are mg l^{-1})

one can assume that at least the majority of single revertants were formed at the same time.

On the basis of equations (2) and (3), we used the Monte Carlo method to calculate the number of multiple and single revertants (on the assumption that single revertants are also those that failed to divide before our disruption of the initial colonies). As shown in Table 2, the calculated results are in good agreement with the experimental data.

The results obtained allow us to conclude that the great majority of both multiple and single revertants appeared during cultivation of auxotrophic cells of NA3-24 yeast in medium with leucine before transferring to the selective medium. This would be expected if reversion in strain NA3-24 is associated with the S-phase of the cell cycle and the residual growth on the selective medium is small. The former assumption was specifically checked with cells of this strain and turned out to be in good agreement with the experimental results [Chepurnoy et al., 1989; Korogodin et al., 1991]. The results of 14 independent experiments, fixing the number of cell divisions at various incubation times and on initial media, are also in good agreement with the latter assumption. NA3-24 yeasts on the medium with 3 mg l^{-1} of leucine, where the yield of L-revertant is the largest, have residual growth within the experimental error: the final number of cells in a colony divided by the initial one is 1.07 ± 0.05 .

All this is very important for the analysis of the mutation reversion process in strain NA3-24. The fact that both multiple and single revertants in this strain

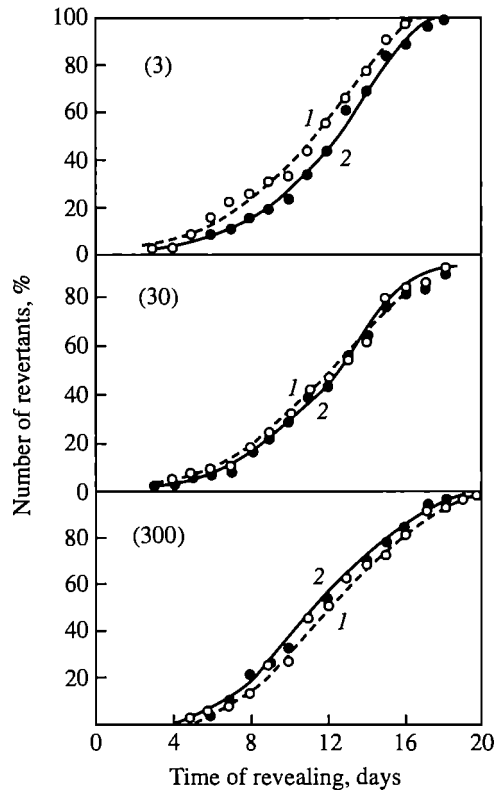


Table 2

Mathematical simulation results (A) compared with the experimental data (B) on the number of multiple and single L-revertants appearing on a medium with 3 and 30 mg l^{-1} of leucine in the exponential phase of growth. Strain NA3-24

Medium	3 mg l^{-1} of leucine		30 mg l^{-1} of leucine	
	A	B	A	B
Index				
Culture age (h)	53.98	54.00	22.02	22.00
Number of multiple revertants	325	325	356	356
Number of single revertants	595	595	491	472

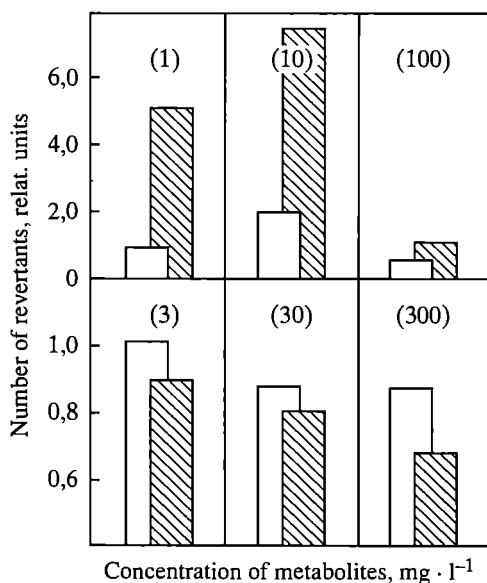
are formed only on the initial medium (i.e. on a medium with leucine) means that calculation of reversion rates must involve the sum of revertants of both types rather than each group independently, as in the case of strain P-192 and the like. Hence two questions arise: (1) what causes the difference in the yield of revertants (especially L-type) in this strain during the exponential phase of growth on media with different leucine concentrations (remember that there is no such difference for Ade⁻ strains)? and (2) why does the appearance of these revertants on the selective medium take so long, up to 20 days? We shall try to answer both questions.

DEPENDENCE OF THE LEU⁻ YEAST REVERTANT YIELD ON THE LEUCINE CONTENT OF THE MEDIUM

The yield of NA3-24 L- and S-revertants following transfer to the selective medium in the exponential and stationary phases of growth as a function of the leucine concentration in the medium is shown in Table 3. The data on single and multiple revertants are combined. The rate of registered L- and S-revertants is seen to decrease with increasing leucine concentration. This phenomenon was first described by Chepurnoy et al. [1989]. The authors ascribed this phenomenon to the effects produced by different leucine concentrations on *LEU2* mutation rate.

The data in Table 3 from cultures transferred to the selective medium in the exponential and stationary phases of growth are noteworthy. For all three initial concentrations of leucine in the medium, the reversion rates in the stationary phase are smaller than in the exponential one. But the most important finding is that this is accompanied by a significant decrease in the absolute number of L-revertants colonies.

The NA3-24 data (Table 3) and P-192 data [Korogodin et al., 1991] are compared in Figure 4. Exactly opposite situations are observed in these strains. Transition to the stationary phase in P-192 is attended by a sharp increase in



the number of revertants appearing at initial adenine concentrations of 1 and 10 mg l⁻¹ while, at adenine excess (100 mg l⁻¹), the number of revertants appearing in both phases is approximately the same. On the other hand, in NA3-24, many fewer revertants appeared during the stationary phase than during the exponential one at any of the three leucine concentrations (3, 30, 300 mg l⁻¹).

Fig. 4. The number (relative units) of locus revertants appearing on selective media after incubation during exponential (open bars) and stationary (hatched bars) phases of growth on media with different concentrations of adenine or leucine (numbers in parentheses are mg l⁻¹). The top row is strain P-192, the bottom row is NA3-24

Appearance rates and absolute number of NA3-24 locus (L) and suppressor (S) revertants formed during exponential and stationary phases of growth on media with different leucine concentrations

Leucine (mg l ⁻¹)	Growth phase in the initial medium	Number of cells in initial colony	Revertants (type)	Mutation rates ($\times 10^{-8}$)	Number of colony of revertants		Appear. coef.†
					Regist.	Expect.*	
3	Exp. (54 h)	3.3×10^5	L	63.5	921	921	1.00
			S	15.3	223	223	1.00
	Stat. (96 h)	5.5×10^5	L	34.2	822	1537	0.53
			S	8.5	206	371	0.56
30	Exp. (22 h)	9.7×10^5	L	19.4	828	2710	0.31
			S	5.1	216	656	0.58
	Stat. (96 h)	2.3×10^6	L	7.3	734	6425	0.11
			S	3.4	342	1554	0.22
300	Exp. (22 h)	1.3×10^6	L	14.1	803	3631	0.22
			S	4.6	261	879	0.30
	Stat. (96 h)	2.1×10^6	L	6.7	616	5867	0.10
			S	3.9	355	1419	0.25

* Rates of L- and S-revertants appearance in all groups are assumed to be equal to the rates in the exponential phase in the medium with 3 mg l⁻¹ leucine.

† Ratio of the registered number of revertants to the expected one.

It is natural to associate these results with different causes. In the first case, it was an increase in mutability of the *ADE2* gene after the medium ran out of adenine. It took place on the media at initial adenine concentrations of 1 and 10 mg l⁻¹ during the stationary phase. In the second case it was a decrease of revertant appearance with the increase of cell numbers in the initial auxotrophic colonies. It took place on the selective media after the preliminary incubation of NA3-24 at initial leucine concentrations of 3, 30 and 300 mg l⁻¹. The latter conclusion can be checked by independent processing of our experimental results. Table 3 was used to plot the number of revertants appearing versus the number of cells in initial auxotrophic colonies in Figure 5. By convention, the number of revertants appearing after the exponential phase at 3 mg l⁻¹ of leucine was taken to be 100. The number of revertants appearing is seen to decrease monotonically with the increasing number of cells in the initial, non-selectively grown, colonies—irrespective of whether this was attended by an increase (in different groups) or a decrease (in transition to the stationary phase) in the leucine content of the medium. The minimum appearance of revertants is 10% of the initial number.

Thus, the increase in the yield of revertants with decreasing leucine concentration in the medium observed in the exponential phase of growth can be considered to result from an increase in the growth rate of revertants appearing upon subsequent incubation on the selective medium, rather than from an increase in their rate of appearance. This is clearly seen in Figure 6, where appearance of revertants after incubation on media with different leucine concentrations is normalized to the same number (10^6) of initial auxotrophic cells in the colonies. The results are expressed in terms of the revertant number distribution over the CDT. It should be recalled that CDT means the duration of revertant cell

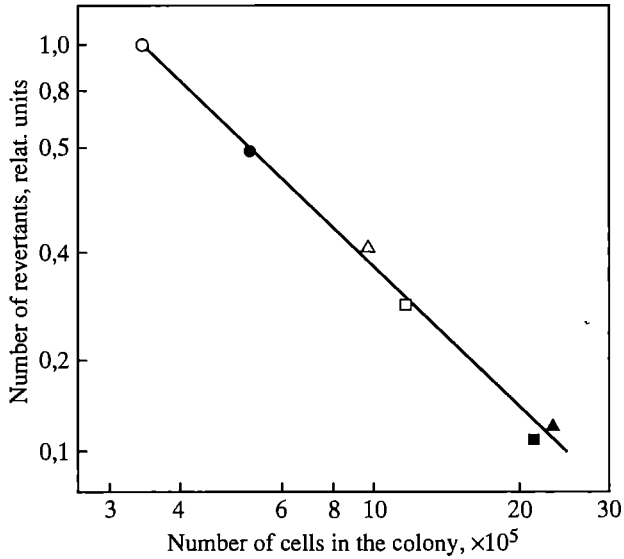


Fig. 5. NA3-24 locus revertants appearing on the selective medium after pre-incubation during the exponential phase of growth (open symbols) and the stationary phase (filled symbols) on media with different concentrations of leucine. Circles, triangles and squares are 3, 30 and 300 mg l⁻¹ of leucine respectively

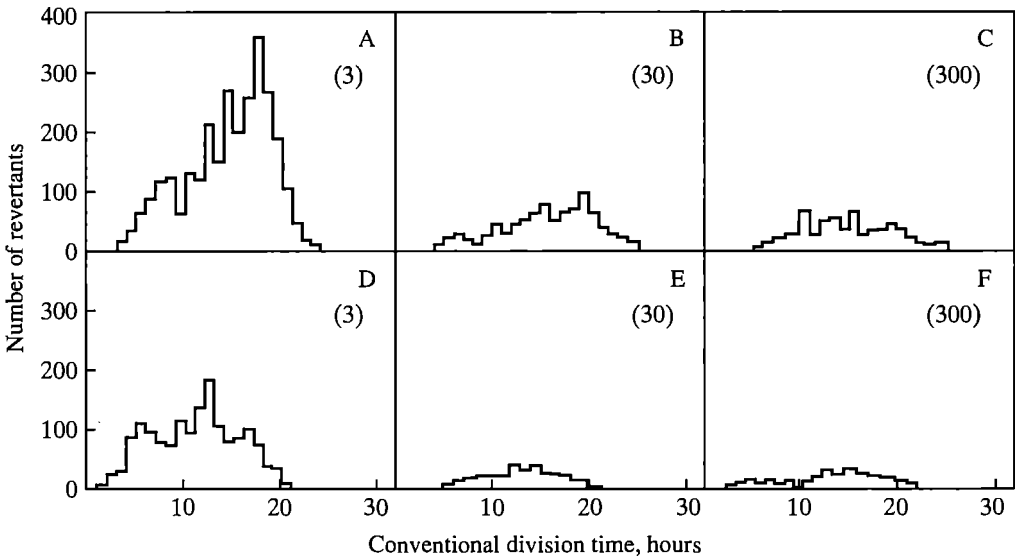


Fig. 6. CDT distribution of revertants which appeared after the exponential (top row) and stationary (bottom row) phases of growth on media with different concentrations of leucine (numbers in parentheses are mg l⁻¹). Normalization to 10⁶ cells in an auxotrophic colony

division from the moment of appearance till the moment of detection. It is clear that there is an inverse relationship between leucine concentration and reversion frequency, and that revertants appear late (i.e. mainly at long CDTs). What causes the differences in the appearance time of revertants?

CAUSES OF DIFFERENCES IN TIME OF REVERTANT APPEARANCE ON SELECTIVE MEDIUM

The causes of differences in time of revertant appearance on the selective medium are best analyzed with strain NA3-24 grown on a medium with 3 mg l^{-1} of leucine because, in this case, revertant formation time is no longer than 54 h (the end of the exponential phase) and the appearance time is as long as 20 days. We use the above leucine concentration because it allows the maximum appearance of revertants (Fig. 5).

Let us consider two possible causes of the prolonged delay of revertant appearances: either a uniform or a non-uniform distribution of exponential-phase revertants over different CDT values. Figure 7 presents our results of a simulation of the former situation (uniform distribution). The curve in Figure 7A shows accumulation of revertants in a growing yeast population. Figure 7B shows the random (i.e. roughly uniform) distribution of revertants in CDT. The appearance curve in Figure 7C corresponds to this distribution. Comparison of Figure 7B, C with Figure 6A and Figure 1C, where the experimental results are shown, indicates little similarity in the appearance curves. Thus, we can reject the simplest assumption that the newly formed revertants are randomly (uniformly) distributed in CDT. So, it remains to suppose that the distribution of revertants in CDT is non-random and must be conditioned by other regularities.

For a more detailed study of revertants growing at different rates, 128 revertants (randomly chosen from among those appearing on the selective medium within 20 days) were plated on the medium with 3 mg l^{-1} of leucine. Appearance time of colonies, their morphology and their tendency to form secondary colonies (or sectors) were registered for each revertant. The results were as follows: all 128 revertants can be classified by their colony morphology into three groups: (1) large, uniform, light-creamy colonies with a slightly darker top; (2) medium and small light colonies; (3) colonies of different size and colour from small and brown to large and light. In subsequent re-plating, colonies of the first two groups kept their features while colonies of the third group either reproduced their phenotype or produced heterogeneous colonies again.

The curves in Figure 8 show the distribution of the appearance times of the colonies in the three groups. We see that the appearance maximum was reached

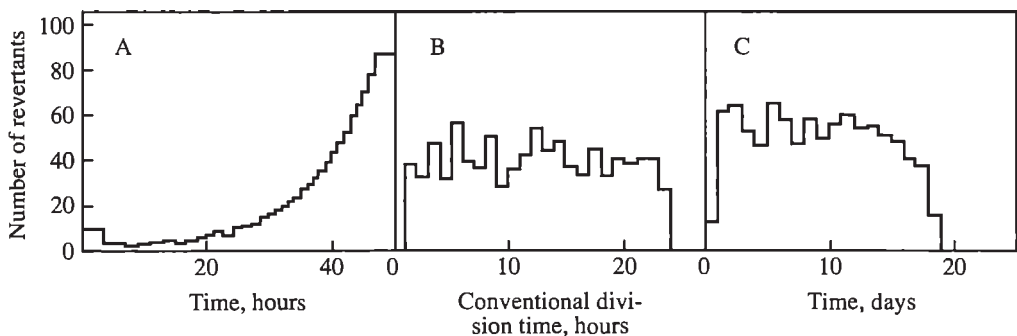


Fig. 7. Accumulation of revertants in a growing culture (A), CDT values for these revertants (B) and their appearance dynamics (C) for strain NA3-24 after 46 h of growth on a medium with 3 mg l^{-1} of leucine. The reversion rate is taken to be 6×10^{-7} . Simulation results

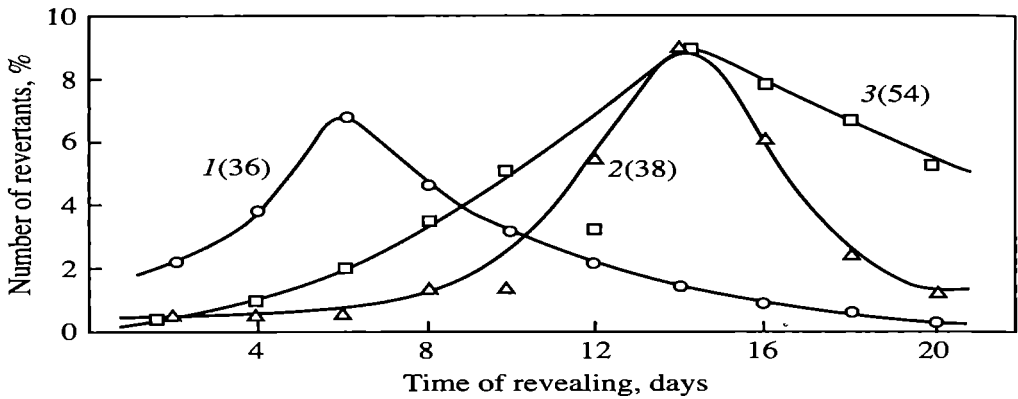


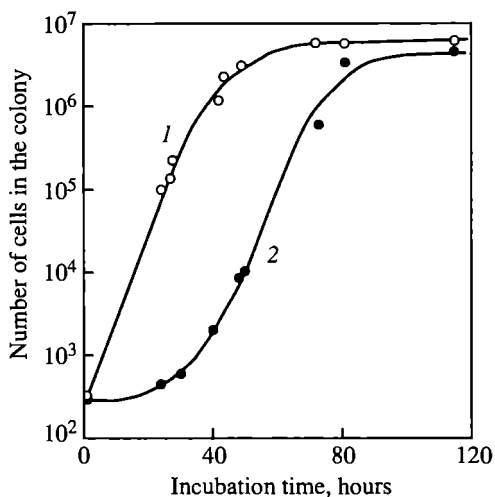
Fig. 8. Appearance of NA3-24 locus revertants of different groups on the selective medium (see text), as follows from the analysis of 128 randomly selected revertants appearing in 20 days after a 46-h incubation on a medium with 3 mg l^{-1} of leucine. Curves 1-3 correspond to revertants of groups 1, 2, 3. In parentheses are the numbers of revertants in each group

on the 5th-7th day for the first group and on the 13th-15th day for others. So, the revertants of the first group mainly appear in the early period (5-7 days of incubation on the selective medium). The distribution 'tail' for the first group extending to the end of the observation time is noteworthy. The main cause of this tail may be fast-growing secondary colonies entering this group, especially at later times. Such secondary colonies are formed in small primary colonies of the 3rd group and imitate the 1st group in their colony phenotype.

Twenty-seven revertants, with different appearance times, were randomly chosen from among the total 128 colonies forming the data in Figure 8, and additionally analyzed. We determined their growth kinetics on the medium with 3 mg l^{-1} of leucine and on the medium without leucine, the morphology of colonies on both types of media, and the appearance time of colonies after plating individual revertant cells and after mixing 1-5 revertant cells in a patch containing 10^4 initial autotrophic cells. In the latter case, the suspension with revertants and auxotrophic cells in the ratio 1:10⁴ was inoculated onto a nutrient medium. These patches were made on the selective medium and on a medium with leucine where they were disrupted, either immediately or 24-48 h later, and then transferred to the selective medium.

On determining the curves of revertant growth on the full and selective media we found two things: first, growth curves of all revertants have a lag phase of from 8 to 30 h for the selective medium and have no lag on the medium with leucine; slopes of the exponential phase sections of the growth curves differ only slightly for the two media. Results of one of 27 revertants (which appeared on the selective medium on the 15th day of incubation) are shown in Figure 9. The performed case corresponds to the growth curve of the revertant. The other 26 revertants gave similar growth curves to those shown in Figure 9. Secondly, neither the lag phase nor the multiplication rate of revertant cells correlated with their appearance time. The lag phase found on the selective medium might only mean that the revertant cells are less competitive under these conditions, which was also indicated by their low efficiency of colony formation and by the brown colour of many colonies.

Fig. 9. Growth curves for one of the NA3-24 revertants on a medium with 3 mg l^{-1} of leucine (1) and on the leucine-free selective medium (2). Data are from a typical experiment



Finally, an analysis of the multiple revertants appearing on the selective medium at different times was performed. We mixed initial auxotrophic cells with a very small number of multiply revertant cells, five of which appeared early (3–5 days) after transfer to the selective medium and the other five appeared late (after 17–20 days). Early-appearing colonies of five revertants belonged to the 1st group in phenotype, late-appearing ones belonged to the 3rd

group (see Fig. 8). The suspension, with revertants and auxotrophic cells in the ratio $1:10^4$, was inoculated onto the nutrient medium with 3 mg l^{-1} of leucine. The results showed that appearance time of these revertants plated together with auxotrophic cells is indeed longer as compared with revertants, especially those of the third group, plated alone. The difference in revertant appearance time of the two groups is as large as 1–2 weeks, and the colonies are very different in morphology, and comply with the morphological characteristics of the groups from which they were drawn. All this strongly suggests that different appearance times of these revertants results from genetic distinctions manifesting themselves in their competitiveness, rather than from different reversion times of auxotrophic cells.

The fact that there is no strict correlation in appearance time for revertants registered immediately after their appearance and in subsequent experiments can have the following explanation. First, this time greatly depends on the location of revertant cells in the colonies of initial auxotrophic cells. Secondly, more highly competitive secondary mutants, especially frequent among revertants of the 3rd group (the most numerous one); inevitably break up the order of appearance. Thus, different appearance times of NA3-24 yeast L-revertants result mainly from the genetic heterogeneity of the revertants and a higher secondary mutation rate of those which were least competitive from the very beginning (and thus had the longest appearance time). However, this does not apply to all auxotrophic strains of yeast. For example, P-192 revertants, especially of L-type, are more competitive than initial auxotrophic cells, have high morphological homogeneity and relatively short appearance times of only 2–4 days after the moment of formation.

DISCUSSION

We would like to discuss the above material from three points of view. First, we will discuss the effect produced by different concentrations of essential metabolites on the mutation rate of genes that control their synthesis. While the sharp increase in mutability of the *ADE2* locus in a medium without adenine has been demonstrated [Iljina, Korogodin, 1987; Korogodin et al., 1990], the

similar conclusion drawn earlier for leucine [Korogodin et al., 1991] has to be rejected. Our results are in good agreement with facts and notions about the role of nucleotide imbalance in mutation processes, described by Haynes [1985] and Kunz [1982]. A decrease in the yield of leucine revertants with increasing leucine content of the medium results mainly from a decrease in the appearance of less competitive revertants, which becomes especially pronounced with an increasing number of cells in the initial auxotrophic colonies. A vivid example is furnished by Figure 6; it is clearly seen that an increase in the size of the initial colonies is first followed by the disappearance of those distribution curve maxima that correspond to the majority of mutants characterized by low competitiveness and late appearance (compared Fig. 6, Table 3).

Secondly, the latter phenomenon might have the same cause as the extended appearance time of NA3-24 revertants on the selective medium. This cause is the heterogeneity of the revertants as regards to their competitiveness. As the leucine content of the medium (and the size of the initial colonies) increases, the lag times of most revertants might grow so long that they fail to appear at all because of depletion and/or drying of the medium in plates, but start to appear as soon as they are transferred to a fresh selective medium.

Thirdly, and finally, a possible cause of the heterogeneity of the revertants in this strain needs to be discussed. There are likely to be a number of mutation events which result in intragenic suppression [Jones, Fink, 1982; Kohlhaw, 1983; Sherman, 1982]. Through only partly restoring synthesis of leucine, most of these mutations reduce the competitiveness of the respective revertants. This gives rise to great morphological heterogeneity amongst these revertants. Additional mutations in these cells may neutralize the negative effect of primary mutations responsible for reversion and thus contribute to partial or full repair of the initial phenotype. In our case, it manifests itself in the diversity of colonies growing in re-plated small primary colonies of late-appearing revertants. It allows the contention that appearance time (or its derivative, CDT) is an early indicator of those *leu2-1* sites whose mutation produces a suppressing effect (L-suppressors). It is interesting to note that in the exponential phase of growth, the appearance rate of NA3-24 L-revertants is about 6.3×10^{-7} per cell per division, while for strain P-192 it is 6.6×10^{-10} , i.e. three orders of magnitude smaller. However, the mutation rates of intergenic suppressors (S-revertants) are similar in the two cases, being 1.5×10^{-7} for NA3-24 and $(0.1-0.6) \times 10^{-7}$ for strains from the *ade2⁻* group [Korogodin et al., 1990].

Acknowledgements

The authors wish to thank T.A. Dutova and O. Tarunina for criticizing and discussing the manuscript.

REFERENCES

- Bailey N.T.J. The mathematical approach to biology and medicine. L. etc.: Wiley, 1967.
Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // Nature. 1988. Vol. 335. P. 142-145.
Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N., Bruntskova H. Spontaneous mutations of *LEU2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetika. 1989. Vol. 25. P. 1952-1959.
Coughlin C.A., Adelberg E.A. Bacterial mutation induced by thymine starvation // Nature. 1956. Vol. 178. P. 531-532.

- Devin A.B.* The repair hypothesis and the effect of caffeine on the induction of full mutations in yeast // Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 1975. Vol. 223. P. 992–994.
- Floroff G.N.* Synthesis of super-heavy elements and applications of the methods of nuclear physics in the related areas // Vestn. Akad. Nauk SSSR. 1984. Vol. 4. P. 35–48.
- Haynes R.H.* Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance // Genetic consequences of nucleotide pool imbalance / Ed. F.J. de Seres. N.Y.: Plenum Press, 1985. P. 1–23.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I.* Practical proof of the increase of reversion frequency in haploid yeast with the decrease of adenine in the medium // Genetika. 1987. Vol. 23. P. 630–636.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Effect of adenine concentration in the medium on the frequency of reversions in haploid yeast // Ibid. 1985. Vol. 21. P. 1643–1649.
- Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.* Dependence of the rate of occurrence of revertants of different types on the adenine content of the medium in adenine auxotrophic yeasts // Ibid. 1987. Vol. 23. P. 637–642.
- Jones E.W., Fink G.R.* Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast // The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression / Ed. J.N. Strathern et al. Cold Spring Harbor (N.Y.), 1982. P. 230–239.
- Kohlhaw G.B.* Regulation of leucine biosynthesis in lower eukaryotes // Amino acids biosynthesis and genetic regulation / Ed. K.M. Herrmann, R.L. Somerville. L. etc.: Addison-Wesley, 1983. P. 285–300.
- Korogodin V.I., Abetyan N.O., Brunckova H.* et al. Spontaneous mutagenesis and cell cultivation conditions // Ontogenesis, evolution, biosphere. Moscow: Nauka, 1989. P. 59–71.
- Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajsz Cs.* Mutability of genes depends on their functional state – a hypothesis // Biol. Z. bl. 1990. Bd. 109. S. 447–551.
- Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajsz Cs.* et al. On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes // Yeast. 1991. Vol. 7. P. 105–117.
- Korogodina V.L., Koltovaya N.A., Lyubimova K.A.* et al. Estimation of the contribution of double mutants to the observed spectrum of revertants, occurring in auxotrophic yeast. Dubna, 1988 (JINR Commun.; P19-88-835).
- Kunz B.A.* Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances // Environ. Mutagenesis. 1982. Vol. 4. P. 695–725.
- Sherman F.* Suppression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression / Ed. J.N. Strathern et al. Cold Spring Harbor (N.Y.), 1982. P. 463–485.
- Zakharov I.A., Kozhin S.A., Kozhina S.A., Fyodorova I.V.* Manual and methods in the genetics of yeast *Saccharomyces*. Leningrad: Nauka, 1984.

К главе 1

ПОСТРАДАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОК

Формы инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией. Статья впервые опубликована в журнале Биофизика (1958. Т. 3, № 2. С. 206–214), представлена 16.07 1957 биолого-почвенным факультетом Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Показаны три периода торможения почкования и три формы инактивации: без предшествующего почкования, после одного почкования и после четырех-семи циклов размножения. По характеру динамики радиационного последствия у дрожжевых клеток отвергается существующая гипотеза объяснения отдаленной гибели облученных одноклеточных организмов мутационными изменениями и высказывается предположение, что причиной отдаленной гибели являются процессы радиационного последствия.

Некоторые закономерности пострадиационных изменений покоящихся дрожжевых клеток. Статья впервые опубликована в журнале Биофизика (1958. Т. 3, № 6. С. 703–710), представлена 18.06.1956 биолого-почвенным факультетом Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Предложена методика, основанная на пребывании облученных дрожжевых клеток в митотическом покое, позволяющая показать восстановление клеток от радиационных повреждений. Показано, что пребывание в митотическом покое увеличивает число выживших клеток.

К вопросу об обратимости различных форм радиационного поражения у диплоидных дрожжевых клеток. Статья впервые опубликована в журнале Цитология (1959. Т. 1, № 3. С. 306–315), представлена 28.01 1959 кафедрой биофизики Московского университета; лабораторией радиобиологии Института физиологии им. И.П. Павлова АН СССР, Ленинград; лабораторией биофизики Института биологии Уральского филиала АН СССР, Свердловск. Работа выполнена летом 1958 г. на станции Миассово. Была проведена проверка выводов об истинности восстановления облученных клеток в жидкой непитательной среде. Сделан вывод, что пострадиационный митотический покой сопровождается уменьшением последствий облучения, связанных с задержкой первого почкования и снижением летального эффекта облучения. Высказывается рабочая гипотеза, согласно которой первичные радиобиологические повреждения могут иметь потенциальную форму и обратимый характер. Возможность их реализации зависит от дозы, физиологического состояния клеток и условий среды.

Большая часть математической обработки была выполнена Н.В. Лучником.

* Составитель В.Л. Корогодина.

Восстановление жизнеспособности облученных дрожжевых клеток. Статья впервые опубликована в журнале Природа (1959. № 10. С. 82–85), представлена Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова. В статье приведены данные, показывающие, что при выдерживании в митотическом покое диплоидных дрожжевых клеток наблюдается резкое повышение выживаемости (в 200–1000 раз) даже при сверхвысоких дозах облучения (120–150 кР), вызывающих 99,99% гибель клеток.

О сроках реализации потенциальных лучевых повреждений у диплоидных дрожжевых клеток. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1964. Т. 4, № 1 С. 83–91), представлена 23.10.1962 Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Работа посвящена анализу сроков реализации потенциальных повреждений. На основании опытов В.И. Корогодина приходит к выводу, что потенциальные повреждения, вызывающие гибель облученных клеток, реализуются во время удвоения хромосом.

Сравнительное изучение световой и темновой реактивации дрожжевых клеток разной ploидности, пораженных ультрафиолетовым излучением. Статья впервые опубликована в Журнале общей биологии (1962. Т. 23, № 4. С. 302–307), представлена 3.03.1962 кафедрой биофизики МГУ и Всесоюзным научно-исследовательским институтом фитопатологии. В работе подробно исследуется чувствительность к УФ-излучению дрожжевых клеток разной ploидности (от гаплоидов до гексаплоидов). Авторы установили, что реактивация наблюдается у всех штаммов, кроме гаплоидного, а у дрожжей с двумя и более геномами интенсивность процессов реактивации не зависит от степени ploидности.

Восстановление жизнеспособности дрожжевых клеток разной ploидности, пораженных альфа-частицами. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1963. Т. 3, № 1 С. 39–44), представлена 30.03.1962 Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск); Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова; Институтом биологической физики АН СССР (Москва). Авторы изучали восстановление способности бесконечного размножения у дрожжевых клеток разной ploидности, облученных α -частицами. Эффект восстановления обнаружен у всех штаммов с двумя и более наборами хромосом. Показано, что хотя α -частицы оказывают более сильное поражающее действие, чем рентгеновы или γ -лучи, при данной степени поражения способность клеток к восстановлению не зависит от качества излучения. Высказано предположение, что биологические системы клеток, поражение которых вызывает инактивацию, и системы, определяющие способность клеток к восстановлению, не идентичны.

Роль ploидности в радиочувствительности клеток (эксперименты на дрожжевых организмах разных видов и генотипов). Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1977 Т. 17, № 5. С. 700–710), представлена 13.06.1977 Всесоюзным НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва); Всесоюзным НИИ медицинской радиологии (Обнинск). В то время доминировала гипотеза о различиях в радиочувствительности гаплоидов и диплоидов, предложенная Р.К. Мортимером. Соглас-

но гипотезе Мортимера, лучевая инактивация гаплоидных клеток вызывается рецессивными мутациями, а диплоидных — доминантными. В работе Корогодина и соавт. было установлено: первое — в основе лучевого поражения гаплоидных и диплоидных клеток лежат однотипные повреждения, и вероятность их формирования определяется эффективностью работы репарационных систем; второе — условием эффективной работы репарационных систем является наличие в клетке не менее двух наборов хромосом; третье — большая радиорезистентность диплоидных клеток по сравнению с гаплоидными у дрожжей диплоидов обуславливается эффективной работой репарационных систем.

Статистические модели пострадиационного восстановления клеток. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1964. Т. 4, № 3. С. 349–356), представлена 11.11.1963. Всесоюзным НИИ медицинской радиологии (Обнинск). Работа посвящена теоретическому обоснованию применения принципа попадания для анализа пострадиационного восстановления клеток. Рассмотрено несколько статистических моделей восстановления. Следствиями из этих моделей являются различные типы зависимостей изменения форм инактивации и эффективной дозы от продолжительности восстановления. Выбор между ними позволяет провести анализ экспериментальных данных.

Кинетические закономерности пострадиационного восстановления клеток. Статья впервые опубликована в журнале Медицинская радиология (1965. № 8. С. 17–24), представлена 25.01.1965 Отделом общей радиобиологии и радиационной генетики (заведующий — доктор биологических наук Н.В. Тимофеев-Ресовский) Института медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В работе проанализирована динамика восстановления дрожжевых клеток с точки зрения статистической модели пострадиационного восстановления клеток. Сделан вывод о восстановлении как о процессе элиминации последствий отдельных попаданий и его адекватности уменьшению эффективности дозы облучения. Показано, что помимо обратимых «потенциальных повреждений» всегда существует необратимый компонент. Высказано предположение, что в экспериментах по восстановлению выявляется активность биохимических систем, которые направлены на ликвидацию премутагенных изменений у необлученных клеток.

Восстановление клеток от повреждений, вызываемых ионизирующими излучениями: некоторые сравнительные аспекты. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1967 Т. 7, № 5. С. 728–743), представлена Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В статье рассмотрены четыре формы пострадиационного восстановления: от повреждений, вызывающих задержку первого деления; от повреждений, вызывающих точечные мутации или рецессивные летали; от так называемых сублетальных или «подпороговых» повреждений; и от летальных повреждений. В.И. Корогодиным сделан вывод, что разные формы восстановления обусловлены разными механизмами восстановления, проанализированы возможные механизмы восстановления жизнеспособности облученных дрожжевых клеток. Автор подчеркивает, что противопоставление некоторыми авторами (З. Бак, П. Александер [Основы радиобиологии. М.. Изд-во

иностр. лит., 1963], Б.Н. Тарусов [Первичные процессы лучевого поражения. М.: Госатомиздат, 1962], А.М. Кузин [Радиотоксины, их природа и роль в биологическом действии радиации высокой энергии. М.: Атомиздат, 1966. С. 5] факта восстановления от повреждений «теории мишени» и «принципу попадания» неправомерно. Он пишет, что «оба этих направления – структурно-метаболическое и количественное – должны быть тесно связанными и взаимодополняющими». Рассмотрены общебиологические аспекты проблемы восстановления, указано на значение репарационных процессов в нормальной жизнедеятельности клеток и предложены пути разработки этого направления исследований.

Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 1. Кривые выживания и эффект дорастания. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 2. С. 267–271), представлена 30.09.1971 Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В работе выясняется возможность использования представлений принципа попадания и теории мишени не только для описания кривых выживания, но и других форм проявления лучевого поражения клеток, в частности, «эффекта дорастания» (достижения макроскопического размера колоний облученными клетками позже, чем в контроле). Проанализированы кривые дорастания для разных гаплоидных и диплоидных штаммов. Сделан вывод, что эффект дорастания имеет комплексную природу: задержка первого деления клеток; появление нежизнеспособных потомков у некоторых из облученных клеток; формирование некоторыми облученными клетками медленно размножающихся клонов, что может быть связано с изменением их наследственности.

Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 2. Формы инактивации и пострадиационная модификация лучевого поражения. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 3. С. 408–415), представлена 30.09.1971 Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В работе показано, что классический принцип попадания – «в разных клетках гомогенной популяции возникает разное количество однотипных повреждений», – применимый для описания кривых выживания и эффекта дорастания, не объясняет формирования облученными клетками разных классов микроколоний с 5–40 и 2–4 клетками, а также одиночных клеток («формы инактивации») и модификацию лучевого поражения пострадиационным культивированием. Сделан вывод о лучевых поражениях разного качества, ведущих к инактивации клеток, и о модификации поражения.

Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 3. Характеристика колоний, вырастающих из облученных дрожжевых клеток. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 4. С. 554–560), представлена 30.09.1971 Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В работе показано, что колонии, вырастающие из облученных клеток дрожжей, содержат клетки, имеющие разную реакцию на облучение и температуру. Авторы приходят к заключению, что эти клетки должны иметь разное число повреждений, и делают вывод о неоднозначной связи разных реакций клеток на облучение с определенным числом повреждений соответствующих мишеней.

Оценка параметров вероятностной модели радиационной инактивации клеток по экспериментальным кривым выживания. Статья впервые опубликована в журнале Радиобиология (1985. Т. 25, № 1 С. 29–32), представлена 5.03.1984 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна). В.И. Корогодин организовал в этом институте Сектор биологических исследований (СБИ ОИЯИ), куда пригласил для работы выпускников МИФИ. Эта работа одна из первых, выпущенных в СБИ. В ней разработан простой метод оценки радиочувствительности по экспериментальным кривым выживания.

Cellular repair processes: survival of irradiated yeast, bacteria and phages under different postradiation conditions. Статья впервые опубликована в журнале *Advances in Biological and Medical Physics* (1968. Vol. 12. P 253–274). В конце 60-х годов XX века дискутировался вопрос о пострадиационном восстановлении клеток. В связи с этим обсуждались эксперименты по модификации эффектов облучения условиями пострадиационного культивирования. Модификация эффектов на разных средах можно было объяснить двояко: зависимостью репарационных процессов от среды культивирования и действием среды культивирования в качестве селективного фактора. В статье представлены собственные экспериментальные данные по зависимости выживаемости дрожжей, бактерий и фагов от условий пострадиационного культивирования. Проверка этих двух гипотез проведена на дрожжевых организмах, культивируемых в воде, где однозначно демонстрируется эффект восстановления клеток от летальных повреждений.

Radiosensitivity of haplont yeast cells irradiated with sparsely and densely ionizing radiations. Статья впервые опубликована в журнале *Mutation Research* (1996. V 357 P 67–74), представлена 12.01 1996 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна), Научно-исследовательским институтом генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва), Институтом медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Статья является завершением серии публикаций о влиянии плоидности клеток на их способность восстанавливаться от радиационных повреждений. Показано, что у дрожжей-гаплонтов отсутствует liquid-holding recovery. Облучение α -частицами показало, что радиочувствительность диплоидной формы не отличается от гаплоидной и значительно меньше, чем у диплоидов, обладающих диплоид-специфической системой репарации. В статье отмечается связь относительной биологической эффективности (ОБЭ) с процессами восстановления: ОБЭ больше для клеток, способных к пострадиационному восстановлению.

Факторы, определяющие различия в биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Статья опубликована в журнале Радиобиология (1982. Т. 22, № 6. С. 727–738), впервые в виде препринта ОИЯИ (1982. P19-82-71). Сообщение представлено 10.11 1981 Объединенным институтом ядерных исследований. Интерес к тому, как изменяется радиочувствительность клеток в зависимости от качества излучений, у В.И. Корогодина существовал давно. Работая в Институте медицинской радиологии АМН СССР в Обнинске, Корогодин совместно с коллегами исследовал различия в чувствительности бактерий к гамма- и

альфа-облучению [Корогодина В.И., Мясник М.Н., Петин В.Г., Морозов И.И. Различия в чувствительности разных штаммов *E. coli* к гамма- и альфа-облучению // Радиобиология. 1969. Т. 9, № 5. С. 724–727]. В Объединенном институте ядерных исследований он организовал исследования на про- и эукариотах. Первые две работы по изучению действия ионизирующего облучения на клетки, выполненные в ОИЯИ, были опубликованы практически одновременно. Данная первая статья (совместно с Е.А. Красавиным) была посвящена анализу факторов, определяющих различия в радиочувствительности клеток при воздействии излучениями разного качества, и наметила перспективу исследований. Другая статья «Оценка параметров вероятностной модели радиационной инактивации клеток по экспериментальным кривым выживания» (Радиобиология. Т. 25, № 1 С. 29–32 – см. данные Труды) была первым экспериментальным исследованием по радиобиологии молодых ученых К.Г. Амиртаева, П.Н. Лобачевского, выполненным под руководством В.И. Корогодина. Впоследствии это направление исследований вел в основном Е.А. Красавин.

К главе 2

КАСКАДНЫЙ МУТАГЕНЕЗ, ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КЛЕТОК

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

1. Радиорасы диплоидных дрожжей. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 2. С. 163–170), представлена 30.09 1971 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). По рассказам В.И. Корогодина, однажды чашки с колониями дрожжей долго стояли, не проанализированные в срок. За это время проявились морфологические формы колоний. Морфология колоний сразу напомнила ему описания салтантов, которые были сделаны ранее Г.А. Надсоном, микроорганизмов, полученных с помощью рентгеновых лучей. Первая статья из серии по расообразованию у дрожжей содержит подробное описание работ Г.А. Надсона, Г.С. Филиппова и посвящена феноменологии радиорас дрожжей. Авторы отмечают, что диапазон изменчивости полученных радиорас очень широк и сравним с диапазоном природных представителей разных видов и родов, «а это и есть проявление в мире микроорганизмов закона гомологических рядов наследственной изменчивости, сформулированного Вавиловым».

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

2. Пути расообразования. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 3. С. 416–424), представлена 20.11 1971 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Статья посвящена нестабильности радиорас дрожжей. Авторы приходят к выводу, что формирование новых рас у облученных диплоидных дрожжей может продолжаться на протяжении многих клеточных генераций. Выщепляющиеся радиорасы могут иметь разную степень стабильности и разное происхождение. Анализ собственных и литературных данных приводит авторов к выводу, что внешние природные факторы могут влиять на расообразование так же, как и в лабораторных

условиях, что свидетельствует «о роли “очагов расообразования” в спонтанной изменчивости микроорганизмов».

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

3. Количественные закономерности лучевого расообразования у диплоидных дрожжей. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1972. Т. 12, № 6. С. 857–863), представлена 14.01 1972 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). В.И. Корогодина и его коллеги опубликовали в предыдущих номерах журнала серию статей «Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток», где описывают количественные закономерности эффектов радиации: летального, dorастания и форм инактивации. Серия заканчивается характеристикой колоний, вырастающих из облученных дрожжевых клеток. В данной статье исследованы количественные закономерности возникновения сальтантов и дано их сопоставление с летальным эффектом. В.И. Корогодина и его коллеги приходят к выводу, что повреждения, вызывающие летальный эффект и появление сальтантов, имеют одну и ту же природу.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

4. Зависимость выхода сальтантов от условий пострадиационного культивирования. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1974. Т. 14, № 2. С. 229–236), представлена НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Авторы показали, что повышенная чувствительность к неоптимальным условиям среды свойственна не только клеткам сальтантов, но и их отдаленным потомкам; условия, модифицирующие выживаемость благодаря их влиянию на репарационные процессы, эффективны только в течение периода, предшествующего делению ядра. Они также впервые показали, что относительная частота клеток с наследуемыми изменениями всегда выше в погибающей части популяции. Авторы тем самым опровергли постулат радиационной генетики, что изменения наследственности, не приводящие к летальному эффекту, с одинаковой частотой возникают в выживающей и погибающей частях популяции.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

5. Оценка вклада дыхательных мутантов в лучевое расообразование. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1974. Т. 14, № 3. С. 369–373), представлена 20.07 1973 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Авторы показали, что до 20% всех возникающих сальтантов приходится на долю дыхательных мутантов.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

6. Оценка мутабельности клонов, вырастающих из облученных клеток. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1974. Т. 14, № 4. С. 494–500), представлена 23.11 1973 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Авторы показали, что нестабильность сальтантов не связана с генными («ядерными») мутациями. Было сделано предположение, что ведущую роль в лучевом расообразовании играет повышенная частота митотической рекомбинации, сохраняющаяся на протяжении многих поколений.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

7. Оценка частоты митотической рекомбинации в клонах, вырастающих

щих из облученных клеток. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1974. Т. 14, № 5. С. 681–685), представлена 20.12.1973 НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Работа посвящена проверке гипотезы о повышенной частоте митотической рекомбинации у клеток нестабильных клонов. В статье показано, что максимальная частота митотической рекомбинации соответствует клеткам, получившим максимальное число нелетальных повреждений. Авторы отметили, что такие повреждения приводят к повышению частоты митотической рекомбинации, а также вызывают в клетках наследуемые при вегетативном размножении изменения, приводящие к повышению митотической рекомбинации у потомков.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

8. Изучение роли гетерозиготности диплоидных дрожжей в формировании радиорас. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1976. Т. 16, № 3. С. 395–401), представлена 23.10.1975 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва), куда В.И. Корогодин, К.М. Близник и Ю.Г. Капульцевич перешли в 1972 г. В этой работе авторы проверили гипотезу о влиянии гетерозиготности, повышающей частоту митотической рекомбинации, на выход нестабильных клонов. Исследователи не получили подтверждения своей гипотезе.

Авторы пришли к важному выводу о повышении выхода нестабильных клонов и сальтантов у дрожжей с большим экстраполяционным числом (плечом) кривой выживания.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

9. Особенности расообразования у гаплоидных дрожжей. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1976. Т. 16, № 6. С. 924–927), представлена 9.04.1976 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) и НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Авторы проверили наличие расообразования у гаплоидных дрожжей. Они показали, что в случае гамма-облучения (плечо кривой выживания отсутствует) эффект дорастания и расообразование не отличаются от контроля. В случае УФ-облучения (у кривой выживания есть плечо) наблюдаются эффекты дорастания и расообразования.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

10. О неслучайности распределения некоторых наследственных изменений по клонам, вырастающим из облученных клеток. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1977 Т. 17, № 1 С. 27–30), представлена 9.04.1976 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) и НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск). Авторы показали, что возникновение новых рас, дыхательных мутантов, нестабильных клонов и повышение частоты митотической рекомбинации происходит с большей вероятностью в одном из типов клонов, вырастающих из облученных клеток.

Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов.

11. Факты и гипотезы. Впервые статья опубликована в журнале Радиобиология (1977 Т. 17, № 4. С. 492–499), представлена 10.11.1976 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва). В статье были

подведены итоги серии исследований расообразования и возникновения нестабильных клонов у дрожжей. Основные закономерности лучевого расообразования: «. изменения, вызывающие мутации, наследуются при митотическом размножении дрожжей или приводят к наследственным изменениям, продолжающим индуцировать нестабильность. Дозовая зависимость выхода стабильных клонов описывается кривой, близкой к экспоненте, а D_0 имеет то же значение, что и кривая выживания; выход нестабильных клонов увеличивается при увеличении n (экстраполяционного числа кривой выживания)». Это позволило авторам предположить, что мутагенные повреждения, вызывающие нестабильность, и летальные повреждения идентичны.

Впервые была сформулирована гипотеза летального и расообразующего влияния ионизирующих излучений на дрожжевые клетки: «. в летальном эффекте и в лучевом расообразовании ведущая роль принадлежит однотипным дискретным лучевым повреждениям (ДЛП). ДЛП формируется в облученных клетках во время первого пострадиационного деления ядра; до того, как ядро поделилось, клетка может восстановиться от части вызванных излучениями изменений. Для гаплоидных клеток ДЛП абсолютно летально; выжившие гаплоидные клетки формируют клоны, не отличающиеся от контрольных. Для обычных диплоидных клеток единичные ДЛП не являются абсолютно летальными. В этом случае ДЛП в процессе митотического размножения передаются потомкам облученных клеток, приводя с некоторой вероятностью или к гибели, или к появлению морфологических вариантов. Вероятность летального действия ДЛП зависит от условий пострадиационного культивирования. Действие отдельных ДЛП суммируется».

Авторы определяют возможную природу изменений, вызываемых в клетках ДЛП, как различные хромосомные aberrации, приводящие к нарушениям митотического деления ядра и клетки. Они определили природу ДЛП как хромосомные aberrации типа утраты отдельных хромосом или крупных фрагментов, а также несимметричные обмены. В 70-х годах XX в. Р.К. Мортимером была высказана гипотеза (*Ho K.S.Y., Mortimer R.K. // Mutat. Res. 1973. Vol. 20. P 45*), согласно которой причиной гибели облученных диплоидных дрожжей также являются хромосомные aberrации. Однако по гипотезе Мортимера такие повреждения являются «доминантными летальными». Согласно выводам В.И. Корогодина и его коллег, одиночные ДЛП могут не приводить к гибели диплоидных клеток дрожжей.

В 90-х годах XX в. одним из приоритетных направлений исследований радиобиологов стали эффекты малых доз облучения. Это область плеча кривой выживания, где наблюдаются наибольшие эффекты дорастания (*Mothersill C., Seymour C.B. Genomic instability, bystander effect and radiation risks: implications for development of protection strategies for man and environment // Radiat. biologija. Radioecologija. 2000. Vol. 40, N 5. P 615–620*) и нестабильности (*Корогодина В.Л. и др. Оценка последствий влияния стрессовых факторов на семена растений, произрастающих в 30-километровой зоне Балаковской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44, № 1 С. 83–90*). Идеи и работы В.И. Корогодина и его коллег имеют особую ценность в изучении этого диапазона воздействий.

Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 1. Спонтанное расщепление. Впервые статья опубликована в журнале Генетика (1979 Т. 15, № 12. С. 2140–2147), представлена 14.07 1978 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва). Авторы анализируют природу спонтанного возникновения нестабильных клонов. Были проверены гипотезы о ведущей роли митотического кроссинговера и нарушения митотического деления ядра и клетки в образовании нестабильных клонов. Показано, что механизм митотического кроссинговера сохраняет стабильность клеток, тогда как нестабильные клоны («доросшие колонии») обладают в высокой степени митотической нестабильностью, которая является не мутационной, а рекомбинационной. Авторы приходят к выводу, что природой митотической нестабильности являются нарушения митотических процессов в клетках-родоначальницах доросших колоний, а регистрируемая нестабильность – хромосомная нестабильность.

Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 2. Расщепление, вызываемое гамма-облучением. Впервые статья опубликована в журнале Генетика (1982. Т. 18, № 8. С. 1276–1282), представлена 27.08.1980 ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва). Авторы показывают, что летальные радиационные повреждения, индуцирующие нестабильность клонов, вызывают в потомстве несущих их клеток нарушения митотических делений и, как следствие, замедленный рост, выщепление летальных секторов и др.

Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms. Впервые статья опубликована в трудах конференции «Proceedings of the Second international N.W Timofeeff-Ressovsky conference, Yerevan, 8–11 September 2005» (Dubna: IINR, 2007 Vol. 1 P 419–447). Статья была написана В.И. Корогодиным в 1996 г., но при жизни ученого не была опубликована в журналах из-за большого объема. В ней подводятся итоги исследований по каскадному мутагенезу, описаны закономерности и возможные механизмы. Обсуждается схема хромосомной нестабильности в клетках дрожжей: сублетальные повреждения, появляющиеся в облученной клетке, приводят с некоторой вероятностью, зависящей от числа повреждений и условий культивирования, к нарушениям при митотическом делении клетки. Эти нарушения ведут к гибели клетки; нарушениям митохондриального аппарата; повышенной частоте рекомбинации и хромосомным абберациям. Дан ретроспективный анализ исследований по расообразованию, начиная с исследований Г.А. Надсона (О действии радия на дрожжевые грибки в связи с проблемой действия радия на живую материю // Вестник ретгенол. радиологии. 1920. Т. 1 С. 45–137), и нестабильности, начиная с Б. Мак Клинтон (*McClintock B.* The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes // *Genetics*. 1938. Vol. 23. P 315–376) и А.А. Прокофьевой-Бельговской (Радиационные повреждения хромосом на ранних стадиях развития *salmo salar* // Цитология. 1961, № 3. С. 437–445).

КАРИОТАКСОНЫ И НАДЕЖНОСТЬ ГЕНОМА КАК КРИТЕРИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

Принципы анализа надежности биологических систем. Впервые статья опубликована в книге «Надежность клеток и тканей»¹ (Киев: Наукова думка, 1980. С. 19–26), представлена Институтом физиологии растений АН УССР и Объединенным институтом ядерных исследований (с 1977 г. В.И. Корогодин работал в ОИЯИ). Авторами определена надежность биологических объектов как устойчивое и эффективное функционирование в варьирующих условиях среды и во времени. Показано, что надежность биологических объектов выше надежности их элементов, существенно зависит от работы их систем восстановления и резервирования, основана на принципе иерархичности. Авторами отмечено, что понятие «надежность» носит фундаментальный характер, тогда как «устойчивость» – прикладной; с надежностью биологических систем связано свойство адаптации.

Некоторые аспекты проблемы надежности клеток и эволюции геномов. Впервые статья опубликована в книге «Надежность клеток и тканей» (Киев: Наукова думка, 1980. С. 124–136), представлена Всесоюзным НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) и НИИ медицинской радиологии АМН СССР (Обнинск), где в основном были выполнены исследования по восстановлению и хромосомной нестабильности клеток. На основании собственных исследований роли репарации в восстановлении и плоидности клеток в мутагенезе авторами статьи сформулированы гипотезы о надежности клеток и эволюции генома. Первая: переходу гаплонтов в диплонты в ходе эволюции предшествовало возникновение репарационных ферментов гаплонтов, использующих диплофазу для репарации ДНК. В этом проявился принцип поризма в биологии: накопление частных адаптаций у гаплонтов привело к возникновению диплоид-специфической системы репарации. Вторая – диплоидное состояние вегетативной фазы цикла способствовало ускорению прогрессивной эволюции благодаря резкому повышению частот возникновения жизнеспособных хромосомных перестроек. Авторы указывают на то, что в основе эволюции таксонов лежит изменение количества генетического материала, к которому могут привести мутации хромосом (например, дубликации), но не генов. Высказана точка зрения, что элементарными генетическими событиями, служащими материалом для микроэволюции, являются мутации генов, а макроэволюции – мутации хромосом. В связи с этим подчеркнута роль хромосомной нестабильности, возникающей у диплоидов с гораздо более высокой частотой, чем у гаплоидов.

Радиотаксоны и надежность генома (Памяти Михаила Ивановича Шальнова). Статья опубликована в журнале Радиобиология (1982. Т. 22, № 2. С. 147–154), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (Корогодин

¹ Книга «Надежность клеток и тканей» была подготовлена по материалам II Всесоюзной конференции «Надежность клеток и тканей», которая состоялась в г. Каневе в июне 1979 г. Владимир Иванович был на конференции и сделал публикуемые здесь доклады. – *Примеч. Ю.А. Кутлахмедова.*

В.И. Препр. ОИЯИ. 1981 P19-81-512). Статья представлена 4.08.1981 Объединенным институтом ядерных исследований. В литературе давно существовал введенный Сперроу (*Sparrow A.H., Underbrink A.G., Sparrow R.C. // Radiat. Res. 1967 Vol. 32. P 915*) термин «радиотаксоны», определяющий группы биологических объектов, в каждой из которых значения радиочувствительности D_0 (доза облучения, снижающая выживаемость клеток в e раз) уменьшаются с увеличением количества ДНК в геноме. Было замечено, что организмы группируются в радиотаксоны неслучайным образом (*Dertinger H., Yung H Molecular Strahlenbiologie. Berlin etc.. Springer-Verlag, 1969; Савич А.В., Шальнов М.И. Молекулярные механизмы обеспечения надежности клеток // Системы надежности клетки. Киев: Наукова думка, 1977 С. 46–55*). Используя величину D_0 в качестве оценки надежности генома, Корогодина ввел понятие удельной надежности генома – количества поглощенной энергии в ДНК, необходимого и достаточного для возникновения одного элементарного повреждения. Он показал, что организмы делятся на группы с примерно равными удельными надежностями генома («кариотаксоны»), которые соответствуют структурной организации их генома. Был сделан вывод, что надежность генома является ценным селективным фактором, поддерживаемым эволюцией; поэтому идиоадаптации играют ограниченную роль в эволюции, но ароморфозы, изменяющие структурную организацию генома, открывают новые пути прогрессивной биологической эволюции.

Кариотаксоны, надежность генома и биологическая эволюция (Памяти моего учителя Н.В. Тимофеева-Ресовского). Статья опубликована в журнале Природа (1985. № 2. С. 3–14), впервые в виде препринта ОИЯИ (*Корогодина В.И. Кариотаксоны, надежность генома и биологическая эволюция // Препр. ОИЯИ. 1983. P 19-83-623*), в журнал представлена Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна). Корогодина развивает идеи связи надежности генома и эволюции, которые были затронуты им в статье «Радиотаксоны и надежность генома (памяти М.И. Шальнова)» (*Радиобиология. 1982. Т. 22, № 2. С. 147–154*). В данной статье рассматривается зависимость надежности генома от его структурной организации. Обсуждается роль надежности как фактора, лимитирующего количество ДНК в геноме. Сделан вывод, что повышение надежности при переходе от одного таксона к другому – необходимая предпосылка дальнейшего увеличения генетической информации. Такова роль надежности генома в прогрессивной эволюции.

К главе 4

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КОНЦЕПЦИЯ МУТАГЕНЕЗА

Серия исследований мутабельности гена в зависимости от его функционального состояния была выполнена В.И. Корогодиным в Объединенном институте ядерных исследований при участии В.Л. Корогодиной (Ильиной) и Ч.Файси. В некоторых из экспериментов приняли участие коллеги из Ереванского Физического института – Н. Симонян, Н.Л. Джанполадян, Н.О. Абетян, К.Ш. Восканян.

Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture. Статья опубликована в журнале *Mutation Research* (1986. Vol. 174. P 189–194), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. Зависимость частоты спонтанного возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей разных генотипов от содержания аденина в среде и от возраста культуры. Препр. ОИЯИ. 1985. P19-85-191). Сообщение представлено Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна), принято в журнал 1 12.1985. В статье приведены данные о зависимости ревертирования клеток ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания этого нуклеотида в среде. Высказано предположение о влиянии на этот процесс дисбаланса пула аденина в среде культивирования, согласно гипотезе «дисбалансного мутагенеза», обсуждавшейся в литературе в 70–80-х годах XX в. (Bresler S.E., Mosevitsky M.I., Vyacheslavov L.J. Mutation as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency // *Mutat. Res.* 1973. Vol. 19. P 281–293, Barclay B.J., Kunz B.A., Little J.G., Naynes R.H. Genetic and biochemical consequences of thymidylate stress // *Can. J. Biochem.* 1982. Vol. 60. P 33–40).

Авторами впервые поставлен вопрос: зависит ли частота мутирования генов от того, в каком состоянии, репрессированном или дерепрессированном, они находятся?

Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде. Статья опубликована в журнале *Генетика* (1987 Т. 13, № 4. С. 637–642), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде / Препр. ОИЯИ. 1985. P19-85-730). Сообщение представлено 23.06.1986 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна) и Институтом биофизики Биологического исследовательского центра АН ВНР (Сегед, Венгрия). В статье была впервые опубликована гипотеза о повышенной мутабельности активно работающих генов по сравнению с неработающими. Эта гипотеза была сделана на основании сравнения частот выявления ревертантов аденинового гена и супрессорного типа на лимитированной по аденину среде культивирования. Частота ревертирования аденинового гена у ауксотрофных по аденину дрожжей при культивировании на лимитированной среде, по сравнению с нормальной по аденину средой, возрастала на два порядка, тогда как частота реверсий супрессорного типа повышалась в 4 раза.

Высказывается предположение, что повышение мутабельности сопряжено с транскрипционной активностью генов. Отмечено, что такой механизм имеет большое значение для эволюции.

Mutability of genes depends on their functional state – a hypothesis. Статья опубликована в журнале *Biol. Zentral bl.* (1990. Vol. 109. P 447–451), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (Корогодина В.И., Корогодина В.Л., Файси Ч. Гипотеза о зависимости мутирования генов от их функционального состояния // Препр. ОИЯИ. 1989. P19-89-129). Сообщение представлено 21 12.1989 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна) и

Институтом биофизики Биологического исследовательского центра АН ВНР (Сегед, Венгрия). Гипотеза является результатом многолетних размышлений и обсуждений с коллегами зависимости мутабельности генов от условий культивирования клеток. Статье предшествовала большая серия экспериментальных работ о влиянии содержания аденина в среде на частоту возникновения реверсов у дрожжей, ауксотрофных по этому метаболиту. Излагается новая точка зрения на главную догму генетики – ненаправленный характер мутагенеза. Высказывается гипотеза: активные, работающие гены мутируют значительно чаще, чем гены, находящиеся в репрессированном состоянии. Следствием является зависимость мутационного спектра клеток (т.е. относительные частоты мутирования разных генов) от условий их культивирования, которая отражает функциональное состояние их аппарата. Отмечается, что эти механизмы не только имеют значения для эволюции, но и играют существенную роль в дифференцировке тканей в онтогенезе и иммунной системе.

Впервые эта гипотеза была высказана в работе (Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде // Генетика. 1987 Т. 13, № 4. С. 637–642). В 1989 г. предположение о подобном механизме было сделано также Дэвисом: «транскрипция, индуцируемая субстратом, вносит “уклон” в случайный процесс мутирования» (Davis B.D., Transcriptional bias: A non-Lamarckian mechanism for substrate-induced mutations // PNAS, USA 86 1989. P 5005–5009).

On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes. Статья опубликована в журнале Yeast (1991 Vol. 7 P 105–117), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (Корогодина В.И., Корогодина В.Л., Файси Ч., Четурной А.И., Михова-Ценова Н., Симонян Н. К вопросу о зависимости частоты спонтанного мутирования от функционального состояния генов // Препр. ОИЯИ. 1989. P19-89-216). Сообщение представлено 22.12.1989 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна) и Институтом биофизики Биологического исследовательского центра АН ВНР (Сегед, Венгрия). На основании представленных данных по спонтанному мутированию некоторых генов у гаплоидных штаммов дрожжей-сахаромицетов, предложена «функциональная концепция мутационного процесса». Высказано предположение «о влиянии функционального состояния генетических структур на самые разные генетически значимые события, совершающиеся с участием ДНК: возникновение генных и хромосомных мутаций, осуществление репарации и рекомбинации, а, возможно, также конверсии генов, их амплификации и взаимодействия с мобильными элементами». Сделано заключение о некоторых следствиях этой концепции: необходимость описания мутабельности клеток на пространстве режимов; возможность изучения регуляторных эффектов по мутабельности генов; значение феномена для изучения дифференцировки клеток и тканей в онтогенезе и общей теории эволюции.

В статье содержится разъяснение, почему обнаруженный авторами феномен не следует называть адаптивным мутагенезом. Этим термином Хиншельвуд назвал повышенную частоту адаптивных мутаций, якобы возник-

кающих у микроорганизмов в результате влияния среды культивирования (*Hinshelwood C.N Chemistry and bacteria // Nature. 1950. Vol. 166. P 1089*). Как выяснилось впоследствии, феномен Хиншельвуда заключался в размножении за счет остаточного роста образующихся с обычной частотой мутантов. Функциональная концепция мутационного процесса вводит представление о направленности мутационного процесса в том смысле, что гены, интенсивно работающие в данных условиях среды, чаще мутируют и тем самым дают материал для естественного отбора. В широкий оборот термин «адаптивный мутагенез» ввел Кэрнс (1988), который опубликовал в журнале *Nature* данные о повышении частоты мутирования в лактозном опероне клеток *Escherichia coli* при перенесении их на селективную среду (*Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // Nature. 1988. Vol. 335. P 142–145*).

Функциональная концепция мутагенеза. Статья опубликована в журнале *Природа* (1990, № 2. С. 5–12), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (*Корогодин В.И., Корогодина В.Л., Файси Ч. Семь концепций мутационного процесса (к истории изучения мутагенеза) // Препр. ОИЯИ. 1989. P19-89-328*). Прослеживаются основные этапы развития представлений о мутационном процессе – от первых натурфилософских построений начала XX в. до современных теорий мутационной нестабильности. Показано, что ни одна из рассмотренных концепций не оказалась абсолютно ошибочной, каждая описывает те или иные стороны мутагенеза. Предложена функциональная концепция мутагенеза, изменяющая представления о роли структурной организации и функционального состояния генетического аппарата клеток, а также факторов внешней среды.

Characteristics of spontaneous mutagenesis in haploid yeasts. Статья опубликована в журнале *Yeast* (1995. Vol. 11 P 701–711), первая публикация в виде препринта ОИЯИ (*Korogodina V.L., Korogodin V.I., Maiorova E.S. Characteristics of spontaneous mutagenesis in haploid yeasts // Prepr. JINR. 1994. E19-94-24*), представлена 18.02.1994 Объединенным институтом ядерных исследований (Дубна). В статье анализируется распределение числа вырастающих колоний ревертантов по срокам их выявления на селективной среде. Приведено экспериментальное обоснование предположения о том, что срок выявления отражает число сайтов, супрессирующих мутацию ауксотрофности исходного штамма. Показано, что максимум выявления колоний со стабильным фенотипом соответствует малым срокам выявления. В более поздние сроки наблюдается пик выявления колоний ревертантов с нестабильным фенотипом.

ОГЛАВЛЕНИЕ

От составителя	5
Предисловие.....	6
Благоговение перед жизнью	10
Краткий очерк научной деятельности	13
Глава 1. Пострадиационное восстановление клеток.....	20
1.1. Доказательство существования эффекта восстановления	23
Формы инактивации дрожжевых клеток ионизирующей радиацией	23
Некоторые закономерности пострадиационных изменений покоящихся дрожжевых клеток	34
К вопросу об обратимости различных форм радиационного поражения у диплоидных дрожжевых клеток	42
Восстановление жизнеспособности облученных дрожжевых клеток	52
О сроках реализации потенциальных лучевых повреждений у диплоидных дрожжевых клеток	55
1.2. Роль пloidности в восстановлении	65
Сравнительное изучение световой и темновой реактивации дрожжевых клеток разной пloidности, пораженных ультрафиолетовым излучением	65
Восстановление жизнеспособности дрожжевых клеток разной пloidности, пораженных альфа-частицами.....	71
Роль пloidности в радиочувствительности клеток (эксперименты на дрожжевых организмах разных видов и генотипов).....	77
1.3. Математическое моделирование восстановления	91
Статистические модели пострадиационного восстановления клеток	91
Кинетические закономерности пострадиационного восстановления клеток	102
Восстановление клеток от повреждений, вызываемых ионизирующими излучениями: некоторые сравнительные аспекты	110
Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 1. Кривые выживания и эффект дорастания	128
Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 2. Формы инактивации и пострадиационная модификация лучевого поражения	133
Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 3. Характеристика колоний, вырастающих из облученных дрожжевых клеток	143
Оценка параметров вероятностной модели радиационной инактивации клеток по экспериментальным кривым выживания	150
1.4. Эффект восстановления и радиочувствительность клеток.....	156
Cellular repair processes: survival of irradiated yeast, bacteria and phages under different postirradiation conditions	156
Radiosensitivity of haplont yeast cells irradiated with sparsely and densely ionizing radiations.....	171
1.5. Зависимость относительной биологической эффективности от линейной передачи энергии излучений.....	181
Факторы, определяющие различия в биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками	181
	431

Глава 2. Каскадный мутагенез, хромосомная нестабильность клеток	196
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 1. Радиорасы диплоидных дрожжей.....	198
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 2. Пути расообразования.....	209
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 3. Количественные закономерности лучевого расообразования у диплоидных дрожжей	219
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 4. Зависимость выхода сальтантов от условий пострадиационного культивирования	226
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 5. Оценка вклада дыхательных мутантов в лучевое расообразование	234
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 6. Оценка мутабельности клонов, вырастающих из облученных клеток.....	239
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 7. Оценка частоты митотической рекомбинации в клонах, вырастающих из облученных клеток	246
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 8. Изучение роли гетерозиготности диплоидных дрожжей в формировании радиорас.....	252
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 9. Особенности расообразования у гаплоидных дрожжей	260
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 10. О неслучайности распределения некоторых наследственных изменений по клонам, вырастающим из облученных клеток.....	262
Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 11. Факты и гипотезы	265
Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей <i>Pichia pinus</i> . 1. Спонтанное расщепление	273
Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей <i>Pichia pinus</i> . 2. Расщепление, вызываемое гамма-облучением	282
Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms	290
Глава 3. Кариотаксоны и надежность генома как критерий биологической эволюции	313
Принципы анализа надежности биологических систем.....	315
Некоторые аспекты проблем надежности клеток и эволюции геномов	322
Радиотаксоны и надежность генома	333
Кариотаксоны, надежность генома и прогрессивная биологическая эволюция.....	342
Глава 4. Функциональная концепция мутагенеза	357
Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture	359
Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде.....	365
Mutability of genes depends on their functional state – a hypothesis	371
On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes.....	376
Функциональная концепция мутагенеза	391
Characteristics of spontaneous mutagenesis in haploid yeasts	401
Комментарии	416

CONTENTS

From the former	5
Introduction	6
Reverence before the Life	10
Scientific biography of V.I. Korogodin	13
1. Postradiation recovery of cells	20
1.1. The evidence of the recovery effect existing	23
Forms of yeast cell inactivation by ionizing irradiation (summary in English).....	23
Some regularities in the post-irradiation alterations of resting yeast cells (abstract in English).....	34
On the question of reversibility of different forms of radiation injury of diploid yeast cells.....	42
Recovery of survival of irradiated yeast cells.....	52
On the term of the potential radiation damage realization in diploid yeast cells.....	55
1.2. The role of ploidy in cell recovery	65
The comparative study of light and dark reactivation of yeast cells of different ploidy damaged by ultraviolet radiation (abstract in English).....	65
The recovery of survival in of yeast cells of different ploidy which were damaged by alpha-particles	71
The role of ploidy in radiosensitivity of cells (experiments with yeasts of different strains and genotypes) (abstract in English).....	77
1.3. Mathematical modeling of recovery.....	91
Statistical models of postradiation recovery of cells.....	91
Kinetic regularities of postradiation recovery of cells	102
Recovery of cells from damages induced by ionizing radiation: some comparative aspects.....	110
Analysis of radiobiological reactions of yeast cells. 1. Survival curves and the delayed appearance of macrocolonies (abstract in English).....	128
Analysis of radiobiological reactions of yeast cells. 2. Inactivation forms and postirradiation modification of radiation damage (abstract in English).....	133
Analysis of radiobiological reactions of yeast cells. 3. Characteristics of macrocolonies formed by irradiated yeast cells (abstract in English).....	143
The estimation of the probability model parameters for radiation inactivation of cells using the experimental survival curves (abstract in English).....	150
1.4. Effect of recovery and radiosensitivity of cells	156
Cellular repair processes: survival of irradiated yeast, bacteria and phages under different postradiation conditions (English).....	156
Radiosensitivity of haplont yeast cells irradiated with sparsely and densely ionizing radiations (English).....	171
1.5. The dependence of the relative biological efficiency on the linear energy transfer of radiation	181
Factors determining differences in biological effectiveness of ionizing radiations possessing different physical characteristics (abstract in English).....	181

2. Cascade mutagenesis. Chromosomal instability of cells	196
Formation of radoraces by yeasts. 1. Radoraces of diploid yeasts of <i>Saccharomyces ellipsoideus (vini)</i> (abstract in English)	198
Formation of radoraces by yeasts. 2. The pattern of race-formation (abstract in English).....	209
Formation of radoraces by yeasts. 3. The quantitative regularities of radorace formation by ionizing radiation in diploid yeasts (abstract in English)	219
Formation of radoraces by yeasts. 4. The dependence of the saltant yield on postirradiation cultivation conditions (abstract in English)	226
Formation of radoraces by yeasts. 5. Evaluation of respiration mutants contribution to radiation race formation (abstract in English).....	234
Formation of radoraces by yeasts. 6. Estimation of the mutability of clones grown from irradiated cells (abstract in English)	239
Formation of radoraces by yeasts. 7. Estimation of the mitotic recombination frequency in clones grown from irradiated cells (abstract in English).....	246
Regularities of radorace formation in yeasts. 8. The study of the role of dioploid yeast heterozygosis in radorace formation (abstract in English)	252
Regularities of radorace formation in yeasts 9. Radorace formation in haploid yeasts (abstract in English)	260
Regularities of radorace formation in yeasts. 10. About non-random distribution of some hereditary changes among the clones grown from irradiated cells (abstract in English) ..	262
Regularities of radorace formation in yeasts. 11. Facts and hypotheses (abstract in English).....	265
Mitotic instability of <i>Pichia pinus</i> diploid yeast cells. 1. Spontaneous segregation (abstract in English)	273
Mitotic instability of <i>Pichia pinus</i> diploid yeast cells. 2. Segregation induced by gamma-irradiation (abstract in English).....	282
Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms (English).....	290
3. Karyotaxons and reliability of genome as criterion of biological evolution	313
The principles of analysis of biological systems' reliability	315
Some aspects of the problem of cells' reliability and genomes' evolution	322
Radiotaxons and reliability of a genome (abstract in English).....	333
The karyotaxons the reliability of genome and a progressive biological evolution.....	342
4. The functional conception of mutagenesis, adaptive mutagenesis	357
Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture (English) ..	359
Dependence of the frequency of revertants of different types on adenine content of the medium in the yeasts auxotrophic for adenine (abstract in English).....	365
Mutability of genes depends on their functional state — a hypothesis (English).....	371
On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes (English).....	376
The functional conception of mutagenesis.....	391
Characteristics of spontaneous mutagenesis in haploid yeasts (English)	401
Annotations	416

V.I. Korogodin

The Phenomenon of Life. The selected works: in 2 v. / V.I. Korogodin; Joint Institute for Nuclear Research, Medical Radiological Scientific Centre, RAMS. – M. : Nauka, 2010. – ISBN 978-5-02-036691-6.

V.1. – 2010. – 434 p. – ISBN 978-5-02-036705-0 (hardcover).

The two-volume edition contains works of the eminent scientist of the 20 th century Vladimir I. Korogodin, who contributed greatly to radiobiology, genetics, radioecology, and theoretical biology. The Selected Works include unpublished and published early papers and a monograph on the basic scientific directions of V.I. Korogodin: recovery of cells from radiation damages; cascade mutagenesis (chromosomal instability of cells); functional concept of mutagenesis (adaptive mutagenesis); genome reliability; radiocapacity and reliability of ecosystems; anaerobic glycolysis and cancer therapy; information as the basis of life; history of radiobiology and methodology of scientific investigation. The scientific works are supplemented with additional materials: dates of life and scientific career, bibliography, annotations and outlines on history of developed scientific ideas, in writing of which leading scientists and Korogodin colleagues participated.

The edition is intended for a wide circle of biologists, physicists, biophysicists, radioecologists, health professionals.

Научное издание

Корогодин Владимир Иванович

ФЕНОМЕН ЖИЗНИ

Избранные труды

В двух томах

Т о м 1

*Утверждено к печати
Ученым советом
Объединенного института
ядерных исследований*

Зав. редакцией *Н.А. Степанова*
Редактор *И.М. Столярова*
Художник *Ю.И. Духовская*
Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*
Технический редактор *О.В. Ардова*
Корректор *А.Б. Васильев*

Подписано к печати 25.01.2010
Формат 70 × 100 ¹/₁₆. Гарнитура Таймс
Печать офсетная
Усл.печ.л. 35,8 + 0,8 вкл. Усл.кр.-отт. 36,6
Уч.-изд.л. 37,0. Тираж 580 экз. (РФФИ – 400 экз.).
Тип. зак. 343

Издательство “Наука”
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90
E-mail: secret@naukaran.ru
www.naukaran.ru

ППП “Типография “Наука”
121099, Москва, Шубинский пер., 6

*По вопросам приобретения книг
государственные организации
просим обращаться также
в Издательство по адресу:
117997 Москва, ул. Профсоюзная, 90
тел. факс (495) 334-98-59
E-mail: initsiat@naukaran.ru
www.naukaran.ru*

ISBN 978-5-02-036705-0 (Т. 1)



9 785020 367050 1