

В. И. КОРОГОДИН

О ВОЗМОЖНОСТЯХ МОДИФИКАЦИИ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ КЛЕТОК В ПОСТРАДИАЦИОННЫЙ ПЕРИОД

Проблема модификации биологических последствий действия ионизирующей радиации и, в частности, уменьшения нежелательных эффектов облучения ставит перед радиобиологами вопрос о соотношении обратимого и необратимого компонентов в лучевом поражении и о возможностях влияния на обратимый компонент в пострadiaционный период.

Летальное действие ионизирующих излучений на клетки и одноклеточные организмы многие радиобиологи вплоть до недавнего времени относили к категории необратимых эффектов облучения. Основанием для такого представления послужили неудавшиеся попытки получить фотореактивацию необлученных ионизирующими излучениями бактериальных клеток, хотя аналогичная техника эксперимента в случае ультрафиолетового облучения давала удовлетворительные результаты [19]. Вот почему обычно полагают, что выздоровление облученных ионизирующей радиацией высших организмов происходит не за счет «выздоровления» их клеток, но вследствие замещения необратимо поврежденных клеточных элементов их органов и тканей путем размножения клеток, не утративших во время облучения своей репродуктивной активности [23].

Однако Г. А. Надсон [11] еще в 1920 г. отмечал возможность выздоровления дрожжевых клеток, облученных препаратом радия, после перенесения их на свежую питательную среду. Правда, опыты Г. А. Надсона, носившие преимущественно качественный характер, не позволяли правильно оценить достоверность наблюдавшегося им эффекта. Только в 1953—1959 гг. разными авторами на весьма разнообразных объектах было убедительно показано, что многие биологические последствия облучения ионизирующей радиацией, в том числе и гибель клеток, могут быть существенно снижены соответствующими воздействиями в пострadiaционный период [2, 5, 10, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 24].

Воздействия, оказывающие модифицирующее влияние в пострadiaционный период, можно разделить на три основные категории:

1. Варьирование химического состава среды, на которой выращиваются микроорганизмы до и после облучения (опыты Стаплтона (Stapleton) и Холлендера (Hollaender) с кишечной палочкой [24], Кимбола (Kimball) с парамециями [18] и др.). Эффект, вызываемый подобным воздействием, связан, по-видимому, с различной степенью реализации первичных радиобиологических нарушений на средах разного хи-

мического состава: очевидно, что биохимические мутации будут полнее проявляться на минимальных, чем на полных средах. Наблюдаемый в таких опытах эффект вряд ли можно отнести за счет истинного пострадиационного восстановления.

2. Модифицирующее влияние температуры и кислородного напряжения (опыты Пратта (Pratt) с кишечной палочкой [22], И. Б. Бычковой—с клетками роговицы лягушек [2], Н. И. Шапиро с сотр.—на клетках корешков ячменя и асцидной карциномы [14] и др.) может быть связано как с изменением интенсивности метаболизма клеток, так и с непосредственным воздействием на судьбу первичных радиобиологических нарушений. Механизм действия этих и подобных им факторов имеет, по видимому, сложную природу и может быть вскрыт лишь при четком экспериментальном разграничении возможных последствий их применения.

3. Снижение летального действия облучения путем временного подавления конструктивного метаболизма облученных клеток. Экспериментально это можно осуществить либо инкубацией облученных клеток в непитательной среде (опыты В. И. Корогодина с дрожжами [5], либо применением химических ингибиторов белкового синтеза, Альпер (Alper) и Гиллеса (Gillies)—с кишечной палочкой [16]). В обоих случаях при последующем перенесении клеток в условия, оптимальные для развития и роста, последствия облучения оказываются тем ниже, чем длительнее облученные клетки пребывали в «покоящемся» состоянии. Подобные методики, как нам кажется, позволяют изучать пострадиационное восстановление первичных радиобиологических нарушений «в чистом виде», ибо подавление конструктивного метаболизма клеток препятствует переходу таких нарушений в нарушения вторичного порядка, выражающиеся в патологических биохимических и физиологических сдвигах [5].

В опытах по изучению закономерностей пострадиационного восстановления клеток, результаты которых послужили основой настоящего сообщения, мы также пользовались методикой покоящихся культур. Объектом служили дрожжевые организмы разной ploидности; большинство опытов проведено на диплоидных дрожжах *Saccharomyces vini*; штамм Мегри-139-В. Источником γ -лучей служил препарат радиоактивного кобальта (установка ГУТ-400). Облучению подвергали покоящиеся дрожжевые клетки, суспензированные в стерильной водопроводной воде, при концентрациях порядка 700 тыс. кл/мл или 70 млн кл/мл. После облучения клетки переносили в стерильную необлученную воду и инкубировали различные сроки при разной температуре, а затем высевали на покрытые питательным агаром предметные стекла или в чашки Петри на агаризированное сусло (сусло 5°Балл+2% агара) для определения степени пораженности популяции. В некоторых опытах облученные клетки перед перенесением в непитательную среду инкубировали 1—8 ч. в жидком сусле (5°Балл) при 30°. Иногда сразу после облучения клетки высевали в чашки Петри на среду, содержащую 0,2, 1 и 5°Балл и

выращивали при разной температуре вплоть до полного проявления эффекта.

Пострадиационное восстановление нам удалось наблюдать только на диплоидных и тетраплоидных дрожжах. Степень пораженности гаплоидных дрожжевых клеток не зависит от продолжительности пребывания их после облучения в покоем состоянии [6]. Основные результаты, полученные нами в опытах на диплоидных дрожжевых организмах, сводятся к следующим:

1. Пострадиационное восстановление распространяется как на вызываемую облучением задержку почкования дрожжей, так и на первичные радиобиологические изменения, обуславливающие гибель клеток спустя один и несколько циклов размножения [7]. Интенсивное восстановление наблюдается даже после воздействия дозами в 110 кр; получившие такую дозу клетки, при высеве их на питательную среду сразу после облучения, обнаруживают 99,8% инактивации [8].

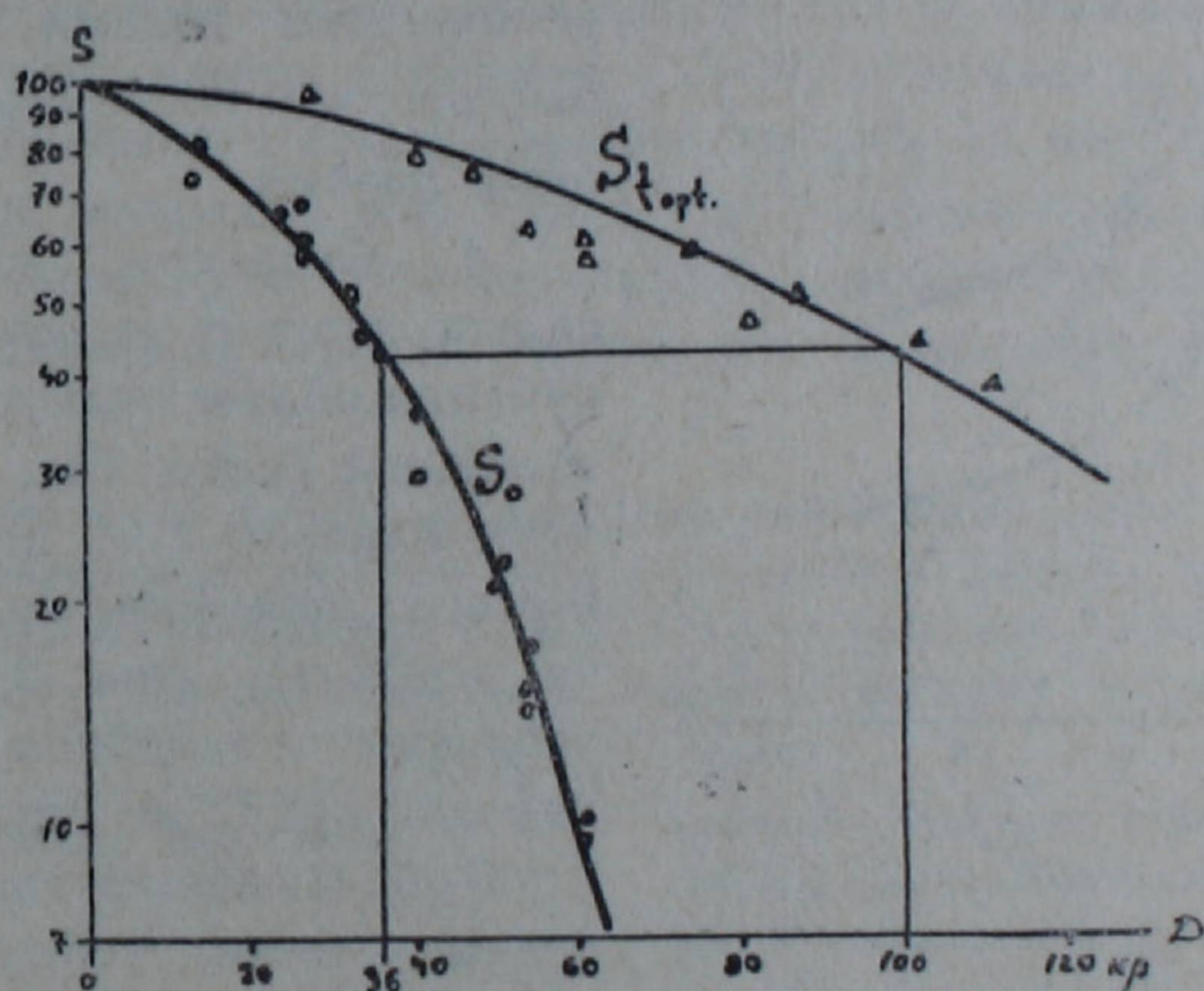


Рис. 1. Кривые выживания диплоидных дрожжей при высеве их на питательную среду сразу после облучения (S_0) и спустя 24–48 ч. ($S_{opt.}$). Ось абсцисс—доза в кр; ось ординат — выживаемость в %, в логарифмическом масштабе. Объяснения в тексте.

2. При инкубации облученных клеток в непитательной среде при 30° восстановительные процессы почти полностью завершаются в течение 1–2 суток. Количественно степень восстановления удобно выражать в процентах уменьшения «эффективной дозы». Так, если клетки облучить дозой в 100 кр, то при высеве их на питательный агар сразу после воздействия выживаемость составит 0,35%, а при высеве их спустя 2 суток—42%. Последняя цифра соответствует выживаемости, получаемой при высеве клеток сразу после облучения дозой в 36 кр. (рис. 1). Таким образом, эффективная доза вследствие восстановления уменьшилась со 100 кр. до 36 кр, т. е. на 64%. Эту величину можно назвать степенью вос-

становления и обозначить через $R = \frac{D_s - D_R}{D_s} 100\%$. Анализ кривых выживания клеток, высеваемых на питательную среду сразу после облучения и спустя срок, оптимальный для восстановления (кривые S_0 и $S_{\text{топт.}}$ на рис. 1), показывает, что значение R на изученном интервале доз почти не зависит от дозы и всегда близок к 64%.

3. Во времени пострадиационное восстановление протекает по закону, близкому к экспоненциальному (рис. 2). Перегиб кривых восстановления обуславливается наличием необратимых компонентов пораже-

ния, в количественном отношении эквивалентных 36% заданной дозы. Скорость пострадиационного восстановления тем выше, чем ниже доза облучения, и поэтому восстановительные процессы после облучения невысокими дозами завершаются быстрее, чем после облучения высокими дозами.

4. Скорость восстановления сильно зависит от температуры инкубации облученных клеток в питательной среде. Так, при температуре, близкой к 0°, пострадиационное восстановление протекает крайне медленно (рис. 2, В). Однако первичные радиобиологические изменения при 0° не утрачивают свойства обратимости: так, если облученные клетки, суспензированные в стерильной водопроводной воде, инкубировать в течение 2—6 суток при 0°, а затем перенести на 1 сутки в 30°, выживаемость во всех случаях повышается до одного и того же значения (табл. 1).

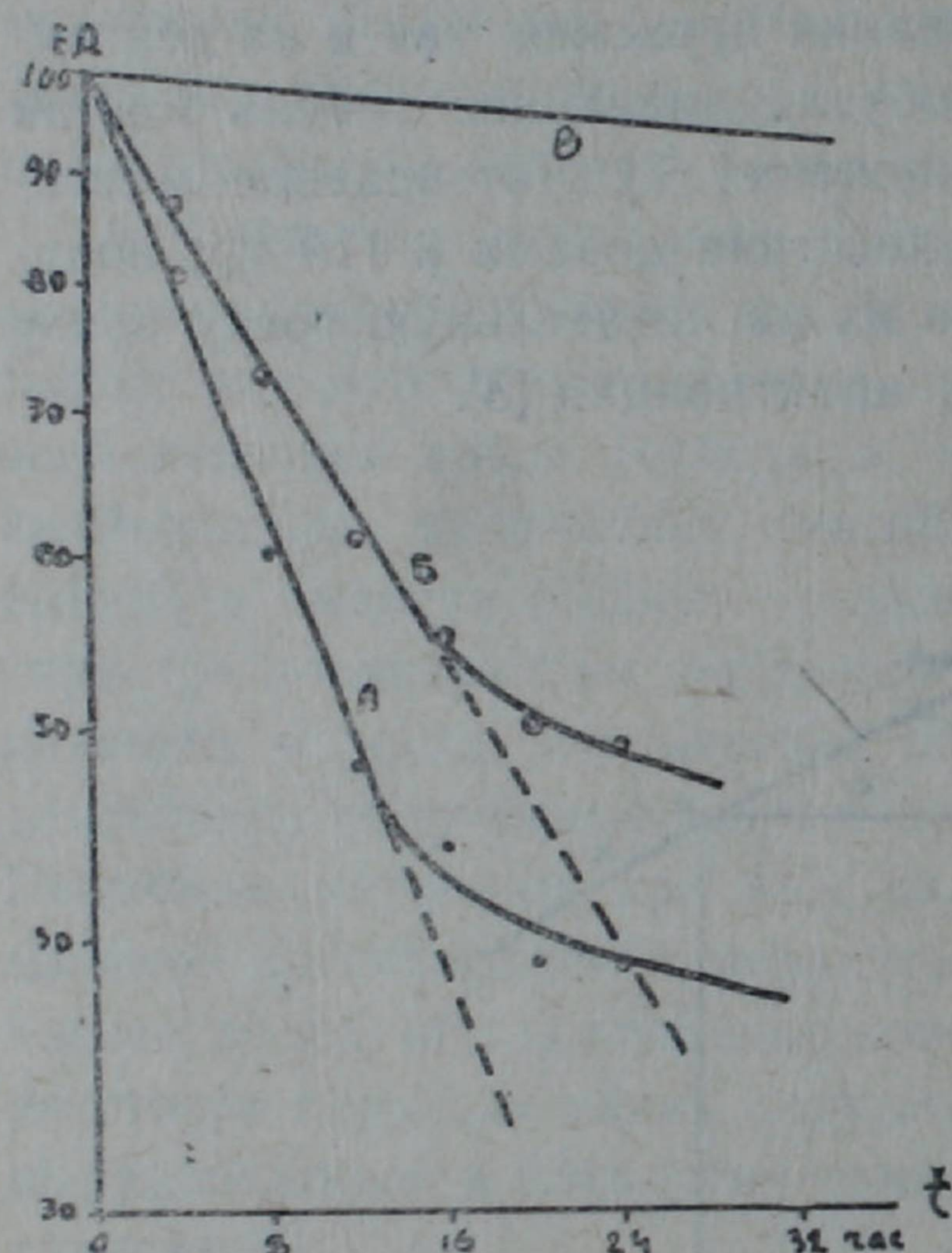


Рис. 2. Динамика пострадиационного восстановления дрожжевых клеток: А — доза 60,8 кр, восстановление при 30°; Б — доза 114,7 кр, восстановление при 30°; В — доза 175,7 кр, восстановление при 0°. Ось абсцисс — время в часах; ось ординат — относительные значения «эффективной дозы», в логарифмическом масштабе.

Объяснения в тексте.

Таким образом, низкая температура как бы консервирует первичные радиобиологические изменения, не позволяя им реализоваться и в то же время препятствуя их восстановлению. Вот почему пострадиационное пребывание при температуре, близкой к 0°, не приводит к модификации последствий облучения ни у насекомых [12], ни у земноводных [2], ни у дрожжевых организмов, высеваемых сразу после облучения на питательную среду (наши неопубликованные данные).

5. Для выяснения закономерностей перехода обратимых первичных радиобиологических изменений в необратимую форму мы провели серию опытов по следующей схеме: облученные дрожжи инкубировали 1—8 ч.

Таблица 1

Влияние пострadiaционной инкубации дрожжевых клеток при 0° на степень обратимости первичных радиобиологических нарушений. (Концентрация облучавшейся суспензии около 200 млн кл/мл, доза 175,7 кр.)

Выживаемость после инкубации при 0°		Выживаемость после дополнительной инкубации при 30°	
продолжительность инкубации при 0° (в сутках)	S%	продолжительность дополнительной инкубации при 30° (в сутках)	S%
0	$2,9 \pm 0,03$	0	$2,9 \pm 0,03$
0	—	1	$27 \pm 2,71$
2	$3,8 \pm 0,20$	1	$23 \pm 2,40$
4	$7,3 \pm 0,51$	1	$28 \pm 4,12$
6	$10,0 \pm 0,45$	1	$26 \pm 0,81$

в пивном сусле при 30°, затем промывали стерильной водой и дополнительно инкубировали в голодной среде при 30° еще 23—16 ч., после чего высевали на чашки Петри для определения выживаемости. Результаты одного из опытов этой серии приведены в табл. 2. Оказалось, что инкубация облученных клеток в течение 1—8 ч., оптимальных для роста и развития, не оказывает существенного влияния на интенсивность восстановительных процессов при последующей дополнительной инкубации их в непитательной среде. Эти результаты можно объяснить, лишь сделав два допущения: а) переход первичных обратимых радиобиологи-

Таблица 2

Влияние предварительной инкубации облученных дрожжевых клеток в питательной среде на пострadiaционное восстановление (густота облучавшейся суспензии около 100 мл/кл, доза 94,5 кр; выживаемость облученных дрожжевых клеток после 24-часового пребывания в непитательной среде, без предварительной инкубации в сусле; принята за 100%)

Продолжительность инкубации в сусле в часах)	0	2	4	6	8
Дополнительная инкубация в голодной среде (в часах)	24	22	20	18	16
Выживаемость (в %)	$100 \pm 2,8$	$75 \pm 6,9$	$95 \pm 17,5$	$71 \pm 3,6$	$72 \pm 10,7$

ческих изменений в необратимую форму, совершающийся в функционирующих клетках, происходит не постепенно, а внезапно и приурочен к определенному этапу жизненного цикла клетки, не успевающего осуществиться в течение 8 ч. инкубации облученных клеток в сусле при наших условиях эксперимента. Возможно, что такой переход приурочен к митотическому делению ядра; б) восстановление с одинаковой интенсивностью протекает как в покоящихся, так и в активно метаболизирующих клетках, тогда как реализация первичных радиобиологических изменений (т. е. развитие лучевого поражения) возможно лишь во втором случае. Последнее положение подтверждается результатами опытов Лучника и Царапкина, обнаруживших, что клетки облученных корешков гороха, проходящих первый митоз в более поздние сроки после об-

лучения, имеют меньше хромосомных повреждений, чем клетки таких же корешков, но проходящие первый митоз в более ранние сроки [10].

6. Если скорость восстановительных процессов не зависит от интенсивности клеточного метаболизма, определяющего лишь сроки перехода первичных радиобиологических изменений в необратимую форму, то чем медленнее будут размножаться облученные клетки, тем выше, при

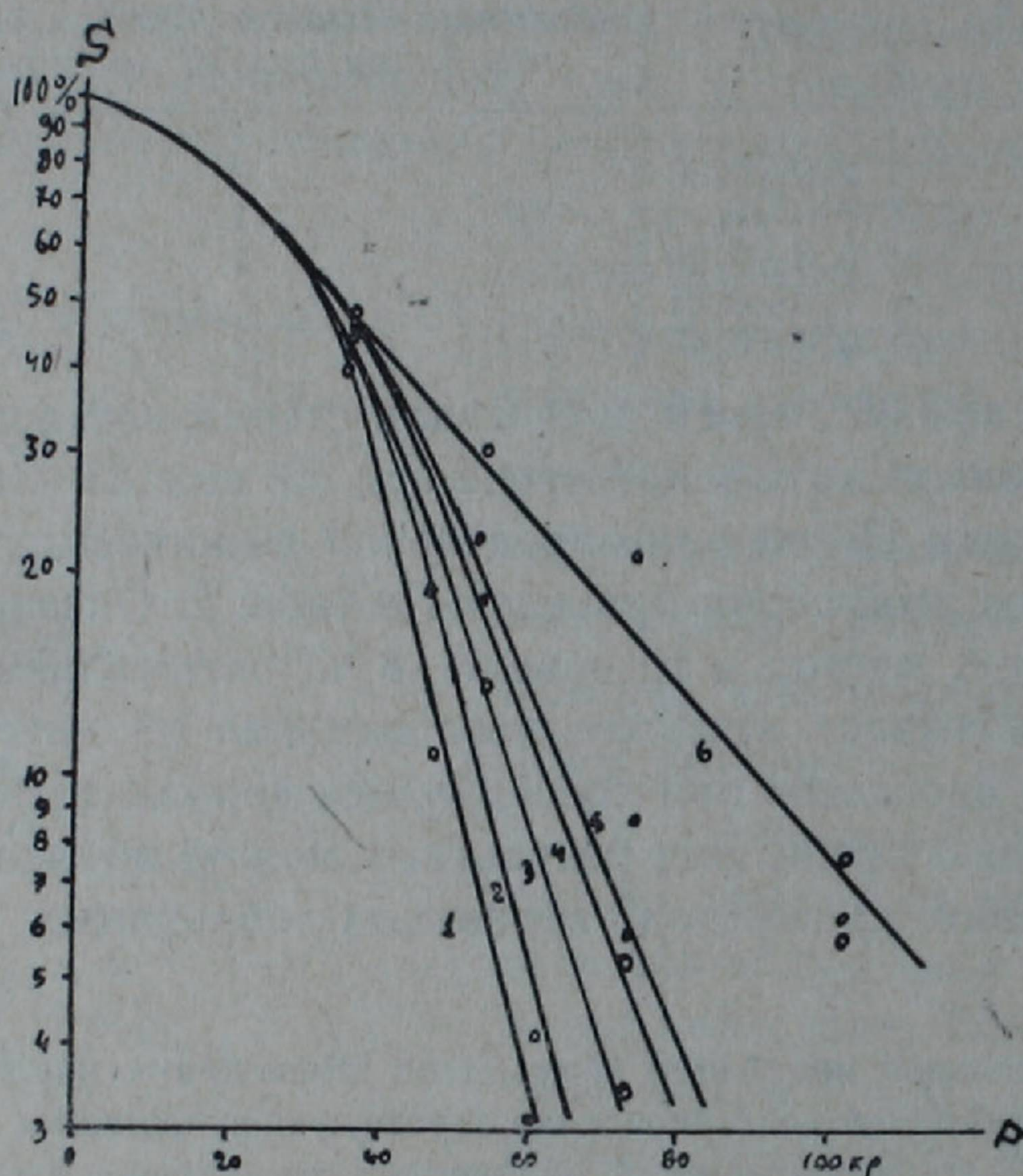


Рис. 3. Кривые выживания дрожжевых клеток при высеве их сразу после облучения на питательные среды, содержащие различное количество сусла, и выращивание при разных температурах: 1 — сусло 5° Балл, температура 20°; 2 — сусло 5° Балл, температура 25°; 3 — сусло 5° Балл температура 30°; 4 — сусло 17° Балл, температура 30°; 5 — сусло 1° Балл, температура 30°; 6 — сусло 0,2° Балл, температура 30°. Ось абсцисс — доза в кр; ось ординат — выживаемость в %, в логарифмическом масштабе.

прочих равных условиях, должна быть их выживаемость после облучения одинаковыми дозами ионизирующих излучений. Повлиять на скорость размножения дрожжевых клеток можно, в частности, двумя способами: варьируя концентрацию питательных веществ в среде и изменяя температуру инкубации. Нами было установлено, что при выращивании дрожжевых клеток на средах, содержащих 0,2; 1,0; 5,0 и 17°Балл сусла, первое почкование происходит тем быстрее, чем меньше отличается содержание сусла в среде от оптимального значения в 5°Балл. Поэтому максимальное выживание облученных дрожжевых клеток можно было ожидать при выращивании их сразу после облучения на среде, содержащей минимальную концентрацию сусла. Результаты экспериментов полностью подтвердили это предположение (рис. 3).

7. Действие температуры на выживаемость дрожжевых клеток должно быть сложнее, нежели влияние концентрации сусла в питательной среде, ибо понижение температуры вызывает как снижение скорости восстановления, так и торможение клеточного деления, и эффект должен зависеть от относительного влияния температуры на оба эти процесса. Опыты показали, что выращивание облученных дрожжевых клеток при температуре более низкой, чем 30° приводит к снижению их выживаемости (рис. 3). Это происходит, по-видимому, вследствие того, что температурные изменения на изученном диапазоне сильнее влияют на скорость восстановления, чем на интенсивность клеточного деления. Подтверждение этого положения было получено в опытах по совместному влиянию температуры и концентрации сусла в питательной среде на выживаемость облученных дрожжевых клеток, показавших полную аддитивность этих двух факторов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние концентрации сусла и температуры на выживаемость дрожжевых клеток, выращиваемых на питательной среде сразу после облучения. Доза 74,3 кр, концентрация клеток в облучавшейся суспензии около 100 тыс. кл/мл. Выживаемость выражена в % от контроля.

Температура инкубации (в $^{\circ}\text{C}$)	Концентрация сусла (в $^{\circ}\text{Балл}$)			
	0,2	1,0	5,0	17
20	$28,1 \pm 0,36$	$7,98 \pm 0,37$	$1,59 \pm 0,17$	$6,11 \pm 0,55$
25	$31,8 \pm 0,73$	$11,8 \pm 0,81$	$4,75 \pm 0,40$	$9,35 \pm 0,15$
30	$46,1 \pm 0,76$	$20,1 \pm 0,50$	$6,40 \pm 0,41$	$10,2 \pm 0,93$

Полученные нами экспериментальные данные, а также имеющийся в литературе материал показывают, что первичные радиобиологические нарушения, возникающие в клетках непосредственно во время облучения, можно разделить по крайней мере на две категории: обратимые и необратимые.

На основании опытов с гаплоидными дрожжами [16, 20] можно предположить, что к категории необратимых первичных радиобиологических изменений относятся, в частности, рецессивные летальные мутации точечного типа. Такие мутации служат, по-видимому, основной причиной гибели облученных гаплоидных клеток. В пострadiационной гибели диплоидных клеток рецессивные летальные мутации вряд ли играют существенную роль, ввиду чрезвычайно малой вероятности возникновения таких мутаций в параллельных локусах обеих хромосомных наборов.

Инактивация диплоидных клеток требует значительно более высоких доз, чем равная по величине инактивация гаплоидных клеток и включает в себя, по-видимому, более разнообразные механизмы. Выше было показано, что в судьбе облученных диплоидных дрожжей сущест-

венная роль принадлежит первичным радиобиологическим изменениям обратимого типа. Обратимые первичные радиобиологические изменения могут включать в себя как локальные, так и кумулятивные эффекты облучения. Так, согласно Н. В. Лучнику [9], ионизирующие излучения могут вызывать временное локальное подавление авторепродуктивной активности хромосом, реализующееся во время митоза в виде хроматидных аберраций. Кумулятивные эффекты облучения, состоящие в физико-химических изменениях клеточных микроструктур массового типа, в процессе развития лучевого поражения могут приводить к различным патологическим сдвигам генетического и негенетического характера. Высокая степень обратимости некоторых последствий кумулятивных эффектов облучения хорошо известна [20].

Механизм восстановления обратимых первичных радиобиологических изменений пока что не ясен, однако установлено, что для осуществления процессов восстановления требуется нормальная обводненность клеток [10, 13] и наличие достаточно высоких температур. Было показано также, что в кислой среде восстановление клеток происходит более интенсивно, чем в щелочной [15]. На основании этих фактов, а также учитывая экспоненциальный характер развития восстановительных процессов во времени, можно предположить, что пострадиационное восстановление состоит в каких-то химических реакциях первого порядка, претерпеваемых поврежденными радиацией макромолекулами облученных клеток. К сожалению, до сих пор не установлено, могут ли такие условия внешней среды, как степень обводненности, температура, кислородное напряжение, концентрация водородных ионов и пр., сдвигать верхний порог восстановления, или они оказывают влияние только на быстроту достижения восстановительными процессами этого порога.

Обратимые первичные радиобиологические изменения играют, по-видимому, существенную роль в развитии лучевого поражения у самых различных представителей мира животных и растений, клетки которых имеют минимум по два хромосомных набора. Об этом свидетельствуют как хорошо известное влияние мощности дозы и фракционирования дозы во времени на летальные последствия облучения высших животных, так и недавно описанный факт некоторого ослабления цитологических эффектов облучения селезенки крысы вследствие кратковременного нарушения ее кровоснабжения [1]. Поэтому можно полагать, что разработка методов ускорения пострадиационного восстановления обратимых первичных радиобиологических изменений и, особенно, рациональное применение таких методов в комплексе с другими терапевтическими мероприятиями должно существенно помочь борьбе с нежелательными последствиями биологического действия ионизирующих излучений.

Վ. Ի. ԿՈՐՈԳՈԴԻՆ

ՀԵՏՈՒԱԴԻԱՑԻՈՆ ՇՐՋԱՆՈՒՄ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՀԱՌԱԳԱՅԹԱՅԻՆ ՎՆԱՍՄԱՆ
ՄՈԴԻՖԻԿԱՑԻԱՅԻ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Աշխատանքում քննության են առնվում հետադիացիոն շրջանում բջիջների ճառագայթային վնասման մոդիֆիկացիայի մի քանի հնարավորություններ: Դիպլոիդ շաքարասնկերի (*Saccharomyces vini* Մեդրի—139—Վ շտամ) վրա դրված փորձերով ցույց է տրված գամմա-ճառագայթավորման մահացու էֆեկտների կախվածությունը բջիջների հետադիացիոն մարզման ջերմությունից և սնուցիչ միջավայրի կոնցենտրացիայից:

Ստացված արդյունքները բացատրվում են հետադիացիոն վերականգնմամբ, որն առկա է ոչ միայն հանգիստ, այլև ակտիվ նյութափոխանակություն կատարող ճառագայթավորված բջիջներում: Վերջին դեպքում վերականգնման պրոցեսների իրագործման տևողությունը սահմանավորվում է միտոտիկ ցիկլի որոշ ֆազին բջիջների անցնելու ժամկետներով:

Ենթադրություն է արվում բարձրակարգ օրգանիզմների ճառագայթավորումից առաջացող ռեակցիաներում բջիջների հետադիացիոն վերականգնման հնարավոր դերի մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Баракина Н. Ф. ДАН СССР, 1959, 125, 5, 1141.
2. Бычкова И. Б. Цитология, 1959, 1, 4, 387.
3. Корогодин В. И. Биофизика, 1957, 2, 2, 178.
4. Корогодин В. И. Биофизика, 1958, 3, 2, 206.
5. Корогодин В. И. Биофизика, 1958, 3, 6, 703.
6. Корогодин В. И. и Лю Ай-шень. Цитология, 1959, 1, 4, 397.
7. Корогодин В. И., Малиновский О. В., Порядкова Н. А. и Изможеров Н. А. Цитология, 1959, 1, 3, 306.
8. Корогодин В. И. и Малютин Т. С. Природа, 1959, 10, 82.
9. Лучник Н. В. ДАН СССР, 1959, (в печати).
10. Лучник Н. В. и Царапкин Л. С. ДАН СССР, 1959, 124, 1, 213; Цитология, 1, 1, 71.
11. Надсон Г. А. Вестник рентгенологии и радиологии, 1920, 1, 1—2, 46.
12. Сумаруков Г. В. Биофизика, 1958, 3, 3, 374.
13. Царапкин С. Л. ДАН СССР, 1959, 128, 1, 190.
14. Шапиро Н. И., Бочарова Е. М. и Белицина Н. В. ДАН СССР, 1959, 126, 1, 191.
15. Alper T., Gillies N. E. 1958, J. Gen. Microbiology, 18 (2): 461.
16. Gillies N. E., Alper T. 1959, Nature, 183 (4656): 237.
17. Kimball R. E., Gaither N., Wilson S. M. 1956, Rad. Reas., 5 (4): 485.
18. Kimball R. E., Caither N., Wilson S. M. 1959, Rad. Res., 10 (4): 490.
19. Latarjet R. 1954, Acta Radiol., 41 (1): 84.
20. Lea D. E. 1946, Actionson of radiations on living cells, Cambridge.
21. Nordback K., Auerbach C. 1957, in: Advances in Radio—biology, London, p. 481.
22. Pratt A. W., Moos W. S., Eden M. 1955, J. of National Cancer Institute, 15 (4): 1039.

-
23. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 1958, New York.
 24. Stapleton G. E., Billen D., Hollaender A. 1953, J. Cell. Physiol., 41, (2):345.
 25. Tobias C. A., Mortimer R. K., Gunther R. L., Welch G. P., 1958, The action of penetrating radiations on yeast cells, in: Second United Nations International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy.