

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ОДНОВРЕМЕННОГО ДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ГИПЕРТЕРМИИ

© Л. Н. Комарова, М. Д. Тхабисимова, В. Г. Петин

ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск;  
электронный адрес: [petin@obninsk.com](mailto:petin@obninsk.com)

Описаны результаты экспериментальных исследований выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800) после одновременного действия УФ-излучения (254 нм) и гипертермии (53—57 °С). Показано, что доля клеток, способных к восстановлению в непитательной среде после действия этих агентов, снижалась с увеличением температуры, при которой происходило облучение. Для количественного прогнозирования доли необратимых повреждений после комбинированных воздействий предложена математическая модель, учитывающая синергическое взаимодействие агентов. Продемонстрировано хорошее соответствие между экспериментальными данными и предсказаниями модели. Обсуждается значимость полученных результатов для интерпретации механизмов синергического взаимодействия различных факторов.

Ключевые слова: дрожжевые клетки, синергический эффект, УФ-излучение, гипертермия, восстановление, необратимый компонент.

Повышенный фон УФ-излучения, обусловленный уменьшением озонового слоя в стратосфере, является потенциально опасным для окружающей среды (Stapleton, 1992). Известно, что гипертермия может подавлять способность клеток восстанавливаться от сублетальных и потенциально летальных повреждений, индуцированных УФ-излучением (Joshi et al., 1984). На этом основании механизм синергического взаимодействия УФ-излучения с гипертермией (Bodel et al., 1984; Тхабисимова и др., 2002) или некоторыми химическими агентами (Collins, Johnson, 1979; Cleaver, 1982; Borchers et al., 1990; Lee-Chen et al., 1993) связывают с ингибированием восстановления клеток от повреждений, индуцированных при комбинированных воздействиях. Это ингибирование проявляется в уменьшении как скорости, так и объема восстановления клеток. Оба этих процесса могут реализовываться за счет уменьшения константы восстановления, характеризующей вероятность восстановления в единицу времени, или благодаря формированию в условиях комбинированных воздействий нерепарируемых повреждений. В частности, для диплоидных дрожжевых клеток было показано (Тхабисимова и др., 2002; Kim et al., 2004), что синергическое взаимодействие УФ-излучения с гипертермией обусловлено не подавлением самих процессов восстановления, как это традиционно предполагалось, а связано с формированием большей доли повреждений, от которых клетки не способны восстанавливаться. Эти факты должны учитываться при интерпретации и моделировании эффектов синергизма. Ранее была предложена математическая модель синергического взаимодействия различных факторов окружающей среды (Петин, Комаров, 1989). Модель основана на предположении о том, что механизм синергического взаимо-

действия УФ-излучения с гипертермией обусловлен образованием дополнительных эффективных повреждений благодаря взаимодействию некоторых субповреждений, образованных каждым агентом и не являющихся эффективными при их отдельном применении. Модель описывает эффекты синергизма при различных соотношениях «доз» применяемых агентов, прогнозирует величину максимального синергизма и условие его достижения. Однако эта модель не учитывает данных, демонстрирующих, что дополнительно образуемые при комбинированных воздействиях повреждения носят необратимый характер, от которых клетки не способны восстанавливаться (Тхабисимова и др., 2002; Kim et al., 2004). В связи с важностью этого факта для понимания механизмов синергического взаимодействия в настоящей работе были поставлены следующие цели: экспериментально исследовать зависимость объема восстановления дрожжевых клеток после одновременного действия УФ-излучения и гипертермии; адаптировать математическую модель синергизма для прогнозирования доли необратимых повреждений, формируемых при действии этих агентов; сопоставить полученные экспериментальные результаты с предсказаниями математической модели.

### Материал и методика

При исследовании одновременного действия УФ-излучения и гипертермии использовали диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800) в стационарной стадии роста, выращенные на полной питательной среде в течение 4 сут при 30 °С. Облучение проводили с помощью излучателя, собранного на базе

ртутной лампы ПРК-4, с интенсивностью 1.5 Вт/м<sup>2</sup>. Линию 254 нм выделяли газожидкостным светофильтром. Непосредственно перед облучением в кварцевые кюветы (объемом 1.4 мл) со стерильной дистиллированной водой, предварительно прогретые до необходимой температуры, прибавляли 0.1 мл клеточной суспензии в концентрации  $1.5 \cdot 10^7$  клеток/мл. Регулировку температуры облучаемой суспензии осуществляли при помощи ультрагермостата. Промежуток времени между введением клеток в предварительно прогретую до необходимой температуры воду и началом УФ-облучения составлял около 0.1 мин, что было значительно меньше общей продолжительности облучения. После прекращения облучения образцы быстро охлаждали, поэтому продолжительность действия гипертермии всегда равнялась продолжительности действия УФ-излучения. Облучаемая суспензия не содержала комков и состояла из одиночных клеток примерно одинакового размера, число почкующихся клеток в ней не превышало 1—2 %. Чтобы избежать вклада фотореактивации в регистрируемую реакцию, воздействие, разведение суспензии и посев клеток на питательную среду проводили при красном свете, а восстановление клеток и их инкубирование на питательной среде проходили в темноте. После воздействия клеточные суспензии высевали на питательную среду сразу после облучения и после различных сроков их выдерживания в режиме темнового пострадиационного восстановления — непитательная среда при 30 °С (Корогодина, 1966; Жестянников, 1979). Выживаемость клеток определяли путем подсчета видимых невооруженным глазом макроколоний. Каждый опыт повторяли 3—5 раз. Результаты измерений обрабатывали и оценивали с применением методов вариационной статистики.

### Математическое описание необратимого компонента

В математической модели синергизма (Петин, Комаров, 1989) предполагается, что одно субповреждение от какого-то фактора взаимодействует с одним субповреждением от другого фактора для образования одного дополнительного эффективного повреждения. Пусть каждому летальному повреждению, индуцированному УФ-излучением, соответствует  $p_1$  субповреждений. Аналогично можно ввести параметр  $p_2$  — число субповреждений, индуцированных гипертермией на одно летальное повреждение. Общее число летальных повреждений  $N_\Sigma$  при комбинированном действии двух факторов будет равно

$$N_\Sigma = N_1 + N_2 + N_3, \quad (1)$$

где  $N_1$  и  $N_2$  — летальные повреждения, индуцированные УФ-излучением и гипертермией соответственно,  $N_3$  — минимальное число дополнительных летальных повреждений, обусловленных взаимодействием субповреждений:

$$N_3 = \min\{p_1N_1; p_2N_2\}, \quad (2)$$

где  $p_1N_1$  и  $p_2N_2$  — количества субповреждений, образованных УФ-излучением и гипертермией соответственно.

Тогда коэффициент синергизма, показывающий отношение числа эффективных повреждений, индуцированных при комбинированном воздействии, к числу по-

вреждений, ожидаемых при независимом сложении повреждений, сформированных каждым агентом, может быть записан в виде

$$k = \frac{N_\Sigma}{N_1 + N_2} = \frac{N_1 + N_2 + \min\{p_1N_1; p_2N_2\}}{N_1 + N_2}. \quad (3)$$

Если  $p_1N_1 < p_2N_2$ , т. е. клетки гибнут преимущественно от действия гипертермии, то  $\min\{p_1N_1; p_2N_2\} = p_1N_1$ . Тогда из уравнения (3) получаем

$$k_1 = 1 + p_1 / \left( 1 + \frac{N_2}{N_1} \right). \quad (4)$$

Из уравнения (4), зная коэффициент синергизма  $k_1$ , экспериментально полученный при условии  $p_1N_1 < p_2N_2$ , можно найти значение  $p_1$ .

Аналогично, если клетки гибнут в основном от действия УФ-света, тогда  $p_1N_1 > p_2N_2$  и  $\min\{p_1N_1; p_2N_2\} = p_2N_2$ . Из уравнения (3) получаем

$$k_2 = 1 + p_2 / \left( 1 + \frac{N_1}{N_2} \right). \quad (5)$$

Из уравнения (5), зная коэффициент синергизма  $k_2$ , экспериментально полученный при условии  $p_1N_1 > p_2N_2$ , можно найти значение  $p_2$ . Значение  $N_2/N_1$  можно определить, например, из отношения наклонов кривых выживаемости после отдельного действия нагревания и облучения, т. е. это отношение чувствительностей клеток к нагреву и УФ-свету:

$$N_2/N_1 = D_{01}/D_{02}, \quad (6)$$

где  $D_{01}/D_{02}$  — отношение среднелетальных доз каждого из агентов, снижающих выживаемость клеток в  $e = 2.71$  раза на экспоненциальном участке кривой выживаемости, изображенной в полулогарифмическом масштабе.

Каждый из трех типов летальных повреждений ( $N_1$ ,  $N_2$  и  $N_3$ ) можно охарактеризовать своей величиной необратимого компонента:  $K_1$  и  $K_2$  — доли невосстанавливаемых повреждений, вызванных УФ-излучением и гипертермией соответственно;  $K_3$  — доля невосстанавливаемых повреждений, вызванных взаимодействием субповреждений, индуцированных обоими факторами. В соответствии с определением Корогодина (1966) и Капутьцевича (1978) необратимый компонент представляет собой отношение числа повреждений, от которых клетки не способны восстанавливаться, к общему числу повреждений в клетке, т. е. для синергического взаимодействия двух факторов необратимый компонент может быть записан в виде

$$K = \frac{K_1N_1 + K_2N_2 + K_3N_3}{N_1 + N_2 + N_3}. \quad (7)$$

Учитывая формулу (2) и основные постулаты модели синергизма, уравнение (7) можно трансформировать в следующее:

$$K = \begin{cases} \frac{K_1N_1 + K_2N_2 + K_3p_1N_1}{N_1 + N_2 + p_1N_1}, & \text{если } p_1N_1 < p_2N_2 \\ \frac{K_1N_1 + K_2N_2 + K_3p_2N_2}{N_1 + N_2 + p_2N_2}, & \text{если } p_1N_1 > p_2N_2 \end{cases}. \quad (8)$$

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены зависимости выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *S. cerevisiae* (штамм XS800) после одновременного воздействия УФ-излучения и гипертермии от дозы УФ-излучения. УФ-облучение проводили при различных температурах (°C): 20 (а), 53 (б), 54 (в), 55 (г), 56 (д) и 57 (е). Клетки высевали на питательную среду сразу после воздействия (кривые 1) и после 3-суточного пострадиационного восстановления в непитательной среде при 30 °C (кривые 2). Видно, что увеличение температуры, при которой происходило облучение клеток, приводило к прогрессивному повышению чувствительности клеток к УФ-облучению. Увеличение конечного наклона кривых «доза—эффект» и уменьшение их экстраполяционного числа с повышением температуры облучаемой суспензии свидетельствуют об участии процессов восстановления от сублетальных и потенциально летальных повреждений в механизме проявления синергического взаимодействия использован-

ных агентов. Видно также, что с увеличением температуры, при которой происходило УФ-облучение, различия между кривыми выживаемости, полученными сразу после облучения и после полного восстановления, значительно уменьшаются. Это означает, что с увеличением термической нагрузки одновременного действия гипертермии и УФ-излучения существенно уменьшается способность клеток восстанавливаться от УФ-повреждений, формируемых после комбинированных воздействий.

На основании экспериментальных данных, представленных на рис. 1, необратимый компонент может быть оценен отношением изоэффективных доз на кривой сразу после облучения и после полного восстановления соответственно:

$$K = D_1/D_2. \tag{9}$$

Необратимый компонент является величиной, обратной традиционно используемому фактору изменения дозы. Удобство введения понятия необратимого компонента

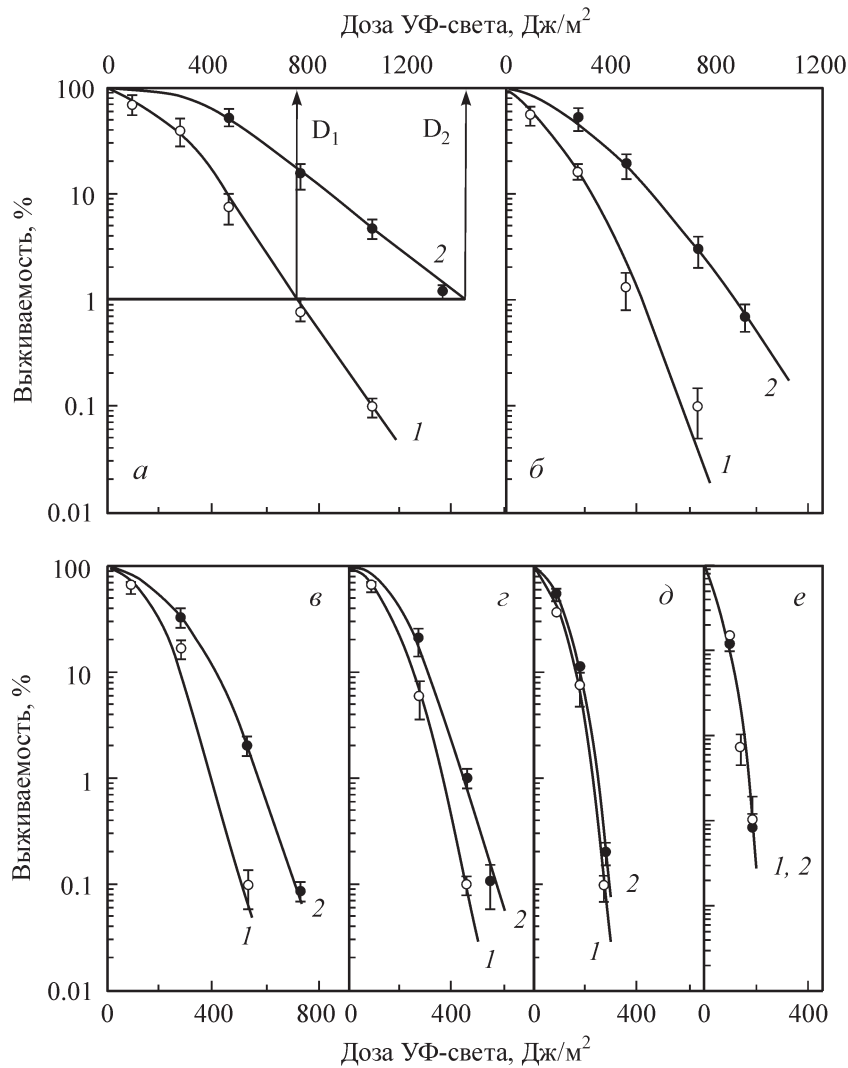


Рис. 1. Зависимость выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800) от дозы УФ-излучения.

Клетки высевали на питательную среду сразу после облучения (кривые 1) и после полного пострадиационного восстановления клеток в непитательной среде при 30 °C (кривые 2). УФ-облучение происходило при различных температурах клеточной суспензии: а — комнатной, б — 53 °C, в — 54 °C, г — 55 °C, д — 56 °C, е — 57 °C.

**Необратимый компонент радиационного повреждения после одновременного действия УФ-излучения (254 нм) и гипертермии на диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800)**

Температура, °С	$N_2/N_1$ , отн. ед.	Необратимый компонент	
		экспериментальные данные, отн. ед.	прогнозируемые значения, отн. ед.
20	0	$0.56 \pm 0.05$	0.56
53	0.11	$0.60 \pm 0.07$	0.70
54	0.16	$0.69 \pm 0.07$	0.74
55	0.21	$0.80 \pm 0.07$	0.77
56	0.95	$0.92 \pm 0.08$	0.87
57	4.29	$1.00 \pm 0.08$	0.94

заключается в том, что его величина непосредственно указывает долю необратимых повреждений, от которых клетки не способны восстанавливаться.

Используя результаты, приведенные на рис. 1, и уравнение (9), получили экспериментальные значения необратимого компонента для одновременного действия УФ-излучения и гипертермии (см. таблицу). Эти данные показывают, что необратимый компонент возрастает с увеличением температурной нагрузки. Это означает, что способность клеток восстанавливаться от повреждений, индуцированных УФ-светом, обратно пропорциональна температуре, при которой происходило облучение. Дрожжевые клетки, облученные при 57 °С, полностью утратили способность к восстановлению ( $K = 1$ ).

На рис. 2, а приведены кривые выживаемости дрожжевых клеток, подвергавшихся действию гипертермии при 54 °С (кривая 1), УФ-света при комнатной температуре (кривая 2), а также одновременному воздействию обоих факторов (кривая 4). Кривая 3 на рис. 2 представляет собой теоретически ожидаемую кривую выживаемости для независимого действия гипертермии и УФ-излучения. Эти данные позволяют оценить коэффициент синергического усиления, определяемый по формуле

$$k = t_2/t_1, \quad (10)$$

где  $t_1$  и  $t_2$  — продолжительности воздействия, снижающие выживаемость до 1 %, на теоретически ожидаемой и экспериментальной кривых выживаемости соответственно (рис. 2, а). Рассчитанный таким образом коэффициент синергизма для 54 °С равен 1.48. Используя это значение коэффициента синергизма и зная, что в этом случае выполняется условие  $p_1N_1 > p_2N_2$ , находим с помощью уравнения (5) значение  $p_2 = 3.48$ . На рис. 2, б приведены аналогичные кривые выживаемости дрожжевых клеток, полученные для случая, когда выполняется условие  $p_1N_1 < p_2N_2$ , в данном случае для 56 °С. Рассчитанный для этой температуры коэффициент синергического усиления равен 1.8. Используя это значение и уравнение (4), находим, что  $p_1 = 1.56$ . Отметим, что кривые выживаемости, представленные на рис. 2, получены для всех исследованных температур. Используя набор этих кривых, мы рассчитали экспериментальные значения (рис. 3, темные кружки) коэффициента синергического усиления (уравнение 10) для всех условий облучения. На рис. 3 эти значения приведены в зависимости от  $N_2/N_1$ ,

которые были рассчитаны по формуле (6). Значения  $N_2/N_1$  суммированы в таблице для различных воздействующих температур. Используя найденные значения  $p_1$  и  $p_2$  и уравнение (3), мы рассчитали теоретически ожидаемые значения коэффициента синергизма для всех температур, использованных в эксперименте. Получено хорошее соответствие между теоретически предсказанными (рис. 3, кривая) и экспериментально полученными (рис. 3, темные кружки) значениями коэффициента синергизма. Это означает, что рассмотренная модель синергизма хорошо описывает экспериментальные данные и может быть использована нами для предсказания величины необратимого компонента после одновременного действия УФ-излучения и гипертермии.

Оценим способность описанной модели прогнозировать необратимый компонент после одновременного действия УФ-излучения и гипертермии (уравнение 8). Можно предположить, что необратимый компонент, индуцируемый одним УФ-излучением,  $K_1 = 0.56$  (облучение при комнатной температуре). Поскольку во всех наших экспериментах дрожжевые клетки не восстанавливались после действия одной гипертермии, мы полагаем, что  $K_2 = 1$ , т. е. термические повреждения носят необратимый характер. Как было показано ранее для одновременного действия гипертермии с УФ-излучением (Тхабисимова и др., 2002; Kim et al., 2004), дополнительные повреждения, ответственные за синергизм и формируемые в этих условиях, также носят необратимый характер, т. е.  $K_3 = 1$ . Следовательно, все параметры, содержащиеся в уравнении (8), нам известны и можно рассчитать теоретически предсказываемые значения необратимого компонента для различных условий одновременного дейст-

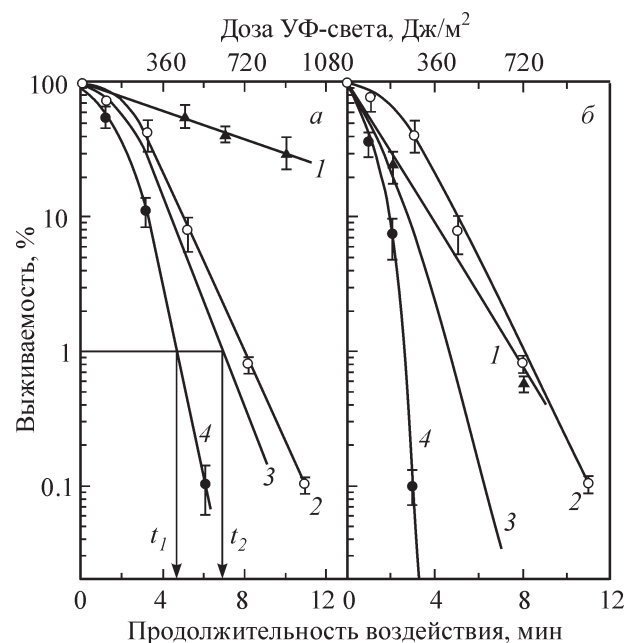


Рис. 2. Зависимость выживаемости диплоидных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800) от продолжительности воздействия различных факторов.

Кривые 1 — действие гипертермии, кривые 2 — действие УФ-излучения при комнатной температуре, кривые 3 — теоретически ожидаемые кривые при независимом действии УФ-излучения и гипертермии, кривые 4 — экспериментально полученные кривые выживаемости клеток после одновременного действия УФ-излучения и гипертермии. а — 54 °С, б — 56 °С.

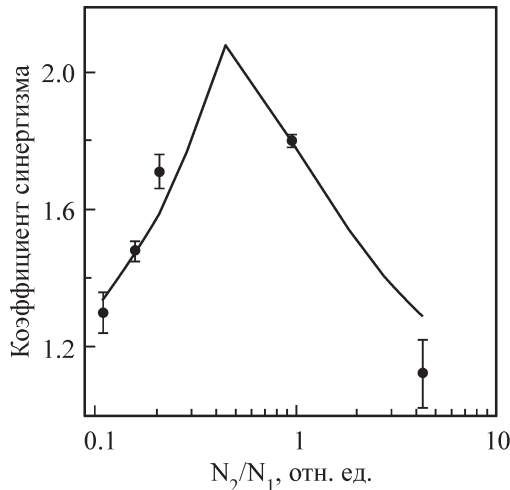


Рис. 3. Зависимость коэффициента синергизма от соотношения ( $N_2/N_1$ ) летальных эффектов, индуцированных теплом и УФ-светом, на диплоидные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (штамм XS800).

Кривая — теоретически предсказанные значения, темные кружки — экспериментально полученные данные.

вия УФ-излучения и гипертермии. Результаты расчетов представлены в таблице. Видно, что теоретически ожидаемые значения хорошо соответствуют экспериментальным данным для всех условий одновременного воздействия УФ-излучения и гипертермии. Следовательно, описанная математическая модель синергизма и полученное на ее основе математическое уравнение (8) позволяют прогнозировать восстановление дрожжевых клеток после УФ-излучения и гипертермии, т. е. количественно предсказывать долю необратимых повреждений.

Представляет интерес обсудить на основе полученных результатов механизм синергического взаимодействия тепла и УФ-света. Наличие оптимального соотношения воздействующих агентов для достижения максимального синергического взаимодействия тепла и УФ-излучения, наблюдавшегося в настоящей работе (рис. 3) и в наших предыдущих публикациях (Жураковская, Петин, 1988; Kim et al., 2004), было продемонстрировано и для комбинаций различных физических и химических агентов (Leenhouts et al., 1986; Petin, Kim, 2004), в том числе для комбинации УФ-света с химическими соединениями (Hartwig, Beyersmann, 1989; Borchers et al., 1990). Рассмотренная в настоящей работе математическая модель синергизма основывалась на предположении о том, что механизм синергического взаимодействия обусловлен формированием дополнительных летальных повреждений, возникающих в результате взаимодействия субповреждений, индуцированных обоими факторами. Приведенные результаты показывают, что восстановление дрожжевых клеток прогнозируется моделью, основанной на предположении о том, что дополнительные летальные повреждения, ответственные за синергизм, носят необратимый характер. Тогда ингибирование восстановления при комбинированных воз-

действиях не может рассматриваться в качестве причины синергического взаимодействия, как это предполагается многими авторами (Collins, Johnson, 1979; Cleaver, 1982; Bodel et al., 1984; Lee-Chen et al., 1993), поскольку является прямым следствием образования при комбинированных воздействиях необратимых повреждений, от которых клетки не способны восстанавливаться.

### Список литературы

Жестяников В. Д. 1979. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука. 285 с.

Жураковская Г. П., Петин В. Г. 1988. Зависимость степени синергизма одновременного действия УФ-света и гипертермии на дрожжевые клетки от интенсивности УФ-света. Цитология. 30 (12) : 1276—1280.

Капулицевич Ю. Г. 1978. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Энергоатомиздат. 232 с.

Корогодин В. И. 1966. Проблемы пострадиационного восстановления. М.: Атомиздат. 290 с.

Петин В. Г., Комаров В. П. 1989. Количественное описание модификации радиочувствительности. М.: Энергоатомиздат. 192 с.

Тхабисимова М. Д., Комарова Л. Н., Петин В. Г. 2002. Темновое восстановление диплоидных дрожжевых клеток после одновременного воздействия УФ-излучения и гипертермии. Цитология. 44 (6) : 555—560.

Bodel W. J., Cleaver J. E., Roti Roti J. L. 1984. Inhibition by hyperthermia of repair synthesis and chromatin reassembly of ultraviolet-induced damage to DNA. Radiat. Res. 100 : 87—95.

Borchers A. H., Kennedy K. A., Straw J. A. 1990. Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamster ovary cells following exposure to ultraviolet radiation or ethylmethanesulfonate. Cancer Res. 50 : 1786—1789.

Cleaver J. E. 1982. Specificity and completeness of inhibition of DNA repair by novobiocin and aphidicolin. Carcinogenesis. 3 : 1171—1174.

Collins A., Johnson R. 1979. Novobiocin: an inhibitor of the repair of UV-induced but not X-ray-induced damage in mammalian cells. Nucl. Acids Res. 7 : 1311—1320.

Hartwig A., Beyersmann D. 1989. Commutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. Biol. Trace Element Res. 21 : 359—365.

Joshi D. S., Haveman I., Barendsen G. W. 1984. Influence of hyperthermia on the effectiveness of UV-radiation for induction of reproductive death of cultured mammalian cells. Ind. J. Exp. Biol. 22 : 248—250.

Kim J. K., Petin V. G., Tkhabisimova M. D. 2004. Survival and recovery of yeast cells after simultaneous treatment of UV light radiation and heat. Photochem. Photobiol. 79 : 349—355.

Lee-Chen S. F., Wang M. C., Yu C. T., Wu D. R., Jan K. Y. 1993. Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. Biol. Trace Element Res. 37 : 39—50.

Leenhouts H. P., Sijms M. J., Cebulska-Wasilewska A., Chadwick K. H. 1986. The combined effect of DBE and X-rays on the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. Int. J. Radiat. Biol. 49 : 109—119.

Petin V. G., Kim J. K. 2004. Survival and recovery of yeast cells after combined treatment with ionizing radiation and heat. Radiat. Res. 161 : 56—63.

Stapleton A. E. 1992. Ultraviolet radiation and plants — burning question. Plant Cell. 4 : 1353—1358.

Поступила 17 V 2006

PROGNOSIS OF YEAST CELLS RECOVERY AFTER SIMULTANEOUS EXPOSURE  
TO UV-RADIATION AND HYPERTHERMIA*L. N. Komarova, M. D. Tkhabisimova, V. G. Petin*Medical Radiological Research Center, Obninsk;  
e-mail: petin@obninsk.com

The results of experimental investigations of survival of diploid yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* (strain XS800) after simultaneous exposure to UV-radiation (254 nm) and hyperthermia (53—57 °C) have been described. It was shown that the portion of cells capable of recovery in innutrient medium after the action of these agents decreased with the increasing of temperature under which the irradiation was occurred. Mathematical model taking into account the synergistic interaction was suggested for quantitative prediction of irreversible component after combined actions of these agents. A good correspondence between experimental data and model predictions has been demonstrated. The importance of the results obtained for the interpretation of the synergistic interaction mechanisms are discussed.

---