

На правах рукописи

ГОРШКОВА Татьяна Александровна

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ПРОЯВЛЕНИЯ АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ
И РАДИАЦИОННОГО ГОРМЕЗИСА
У ПОПУЛЯЦИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК**

03.00.01 – радиобиология и 03.00.16 - экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск – 2007

Диссертация выполнена в биофизической лаборатории Отдела исследования комбинированных воздействий ГУ «Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук»

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Петин Владислав Георгиевич;
кандидат биологических наук Комарова Людмила Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Борейко Алла Владимировна
доктор биологических наук, профессор Сынзыныс Борис Иванович

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится 24 апреля 2007 г. в 11.00 час.

на заседании диссертационного совета Д 001.011.01 при ГУ «Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук» по адресу: 249036, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королева, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ–МРНЦ РАМН

Автореферат разослан 21 марта 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Палыга Г.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современной радиобиологии и радиэкологии наиболее актуальным направлением в настоящее время является изучение эффектов малых доз. Это определяется расширением сфер использования ионизирующих излучений в промышленности и медицине и, следовательно, связано с необходимостью реальных оценок последствий радиационных аварий для больших когорт населения, а также для природных сообществ значительных регионов планеты. Проблема малых доз атомной радиации возникает при экстремальных ситуациях, приводящих к радиоактивному загрязнению больших территорий, также она является актуальной для рабочих урановых рудников, предприятий по переработке урановых руд, получению вторичного ядерного горючего, отработке отходов АЭС. В связи с этим закономерности действия ионизирующего излучения как природного, так и антропогенного экологического фактора, на биологические объекты требуют детального изучения на всех уровнях организации биологических систем. Многочисленные накопленные в литературе факты о биологическом воздействии ионизирующей радиации в малых дозах свидетельствуют как о позитивном (Кузин, 1995), так и о негативном их влиянии на ранние и отдаленные эффекты у облученных клеток, организмов, популяций, сообществ (Зайнуллин, Таскаев, 2005). До настоящего времени отсутствует целостное представление о механизмах, формирующих эффекты малых доз (Эйдус, 1996; Боднарчук, 2002). Спектр реакций на облучения у многоклеточных организмов во многом определяется индивидуальными особенностями функционирования их иммунной и других надклеточных систем (Liu, 2003), тогда как изучение данной проблемы на одноклеточных организмах, к которым относятся использованные в настоящей диссертационной работе дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, позволяет вычленить закономерности и механизмы действия малых доз облучения, проявляющиеся на клеточном и популяционном уровнях. Для одноклеточных организмов, менее радиочувствительных чем многоклеточные, эволюционировавших в условиях на порядки меньшего радиационного фона, мало изучены диапазоны доз и мощностей доз, вызывающих эффекты гормезисного увеличения сроков жизни клеток и их адаптивной реакции на последующее облучение. В связи с этим актуальной представляется также оценка вклада генотипа клеток в характер их реакции на облучение, изучение особенностей динамики гибели и размножения клеток, подвергшихся облучению, исследование совместного действия на клетки ионизирующей радиации и другого экологического фактора – температуры, определение роли радиорезистентности отдельных клеток в устойчивости к облучению клеточной популяции в целом.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является выявление количественных закономерностей формирования эффектов радиационного гормезиса и адаптивного ответа у дрожжевых клеток под действием острого и пролонгированного облучения.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1–изучить закономерности динамики отмирания дрожжевых клеток после однократного острого облучения в малых и больших дозах;
- 2–исследовать зависимость изменения динамики отмирания клеток в облученных и контрольных популяциях от дозы облучения и температуры инкубирования;
- 3–оценить зависимость отмирания клеток после облучения от их способности репарировать радиационные повреждения ДНК;
- 4–установить зависимость степени проявления адаптивной реакции популяции клеток в логарифмической фазе развития от мощности дозы предварительного пролонгированного облучения и от величины дозы острого адаптирующего воздействия;
- 5–выявить величины диапазонов доз и мощностей доз предварительного облучения, вызывающих последующий адаптивный ответ у *Saccharomyces cerevisiae*,
- 6–выяснить зависимость величины адаптивного ответа от временного интервала между облучениями в адаптирующей и тестирующей дозах;
- 7–подтвердить важность непрерывного хронического воздействия естественного радиационного фона как экологического фактора в экспериментах по отмиранию дрожжевых клеток при снижении интенсивности фонового излучения.

Научная новизна работы.

– Впервые получены данные о замедлении скорости отмирания клеток *Saccharomyces cerevisiae*, остро и пролонгированно облученных в различных дозах, в том числе вызывающих гибель значительной части клеток популяции, и инкубированных в непитательной среде;

– показаны увеличение скорости гибели клеток *Saccharomyces cerevisiae* при 30-кратном снижении радиационного фона и замедление отмирания клеток в популяции при хроническом воздействии ионизирующей радиации с мощностями доз, на порядки превосходящими фоновые значения;

– проведено сравнительное изучение влияния генотипических особенностей дрожжевых клеток разных штаммов, инкубированных при различных температурах, на изменение сроков их гибели после воз-

действия облучения. Отмечено возможное участие немишеных, не связанных с повреждением молекулы ДНК событий в проявлении гормезисного замедления отмирания клеток;

– установлены границы диапазона доз и мощностей доз, вызывающих адаптивный ответ дрожжевых клеток на последующее облучение. Обнаружено существование адаптивной реакции у клеток, выживших после предварительного облучения как в малых, так и в высоких дозах, вызывающих гибель значительной части популяции.

Практическая значимость. Полученные экспериментальные данные могут иметь практическую значимость для прикладной радиобиологии, радиоэкологии, медицинской радиологии, а также для прогнозирования отдаленных последствий облучения. Обнаруженные и описанные в данной работе эффекты могут иметь значение для разработки математических моделей динамики развития популяций организмов, отличающихся высокой радиорезистентностью, в ответ на действие природных или вызванных антропогенно повышенных уровней радиации. Результаты работы имеют также фундаментальное значение, дополняя современный уровень представлений об особенностях и вероятных механизмах таких эффектов малых доз, как гормезисное увеличение средней продолжительности жизни и адаптивный ответ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 154 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы, содержащей результаты экспериментальных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов и списка литературы, содержащего 228 источников, из которых 90 опубликованы на русском языке и 138 – на английском. Результаты работы иллюстрированы 8 таблицами и 34 рисунками.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на *III Международной научно-практической конференции «Медико-дозиметрические регистры – основа регламентации радиационной безопасности профессионалов и населения»* (Омск, 2004), *XI научных чтениях памяти К.Э.Циолковского* (Калуга, 2005), *V съезде по радиационным исследованиям* (Москва, 2006), *IX Российской научной конференции «Радиационная защита и радиационная безопасность в ядерных технологиях»* (Обнинск, 2006).

Диссертация апробирована на заседании кафедры биологии Обнинского Государственного Технического Университета Атомной Энергетики (ИАТЭ) 13 декабря 2006 г. и на межлабораторной научной конференции экспериментального радиологического сектора ГУ-МРНЦ РАМН 21 декабря 2006 г.

Основные положения, выносимые на защиту:

- проявление радиационного гормезиса по критерию уменьшения скорости отмирания клеток в популяциях после облучения в малых и больших дозах ионизирующего излучения у дрожжей различных генотипов, инкубированных при нескольких температурах;
- зависимость выраженности адаптивного ответа облученных популяций дрожжевых клеток от величины, мощности адаптирующей дозы, временного интервала между облучениями;
- возможность проявления адаптивного ответа клетками, облученными в высоких дозах или с высокими мощностями доз, вызывающими остановку размножения и гибель части клеток популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В данной работе были использованы следующие штаммы *Saccharomyces cerevisiae*: диплоидный штамм дикого типа T1 (RAD/RAD), радиочувствительный мутант T4 (rad2/rad2 rad54/rad54), дикий диплоидный штамм XS800 (RAD/RAD) и мутантный по репарации радиационных повреждений штамм XS1898 (rad52-1/rad52-1). В качестве биологического теста была выбрана выживаемость, определяемая по способности клеток образовывать макроколонии при 30 °С на плотной питательной среде в чашках Петри.

Источники ионизирующего излучения и условия облучения. В работе использовали γ -излучение изотопов ^{60}Co (установки «Исследователь» с мощностью дозы порядка 3300 Гр/ч, «Луч» с мощностью дозы от 10^{-2} до 70 Гр/ч, «Фотон» с мощностью дозы 10^{-6} – 10^{-5} Гр/ч) и ^{137}Cs (установка «Панорама» с мощностью дозы 10^{-4} – 10^{-2} Гр/ч). Варьирование мощности дозы на установках «Луч», «Панорама», «Фотон» осуществляли изменением расстояния от источника. На установке «Исследователь» давали только острые дозы свыше 20 Гр. Острое облучение производили при комнатной температуре, время острого воздействия составляло от нескольких секунд до 25 мин. Пролонгированное воздействие ионизирующего облучения, продолжительность которого в зависимости от условий опыта варьировало от 2,5 - 24 ч до 30 сут., осуществляли с использованием суховоздушного термостата с температурой 30 °С. Контрольные суспензии во время облучения подопытных образцов находились в аналогичных температурных условиях при фоновых значениях ионизирующей радиации, составлявших в среднем около 10^{-7} Гр/ч. В опыте по изучению влияния пониженного радиационного фона на отмирание клеток использовали специальную низкофоновую камеру, изготовленную из свинца, выплавленного до начала эпохи ядерных испытаний. Камера, вмещающая пробы, помещенные в термостат с температурой 30 °С, обеспечивала снижение мощности дозы редкоизирующего компонента естественного радиационного фона до $0,3 \cdot 10^{-8}$ Гр/ч.

Методика и условия экспериментов. В многодневных опытах по изучению старения и отмирания дрожжевых клеток использовали клеточные суспензии на основе дистиллированной воды с начальной концентрацией клеток порядка 10^6 клеток/мл, которую определяли при помощи камеры Горяева. После острого облучения, термостатирования при $t=30, 37$ и 40 °С, либо хронического облучения при температуре 30 °С осуществляли разведение суспензий и посев клеток в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды. В опытах по исследованию действия 24-часового адаптирующего облучения на популяции клеток, находящиеся в логарифмической фазе роста, использовали клеточные суспензии в жидкой питательной среде состава: 2 % глюкозы, 0,2 % дрожжевого экстракта, 1 % пептона, 96,8 % дист. воды. Начальная концентрация клеток, подобранная с использованием камеры Горяева, составляла $10^2 - 10^5$ клеток/мл в зависимости от условий облучения, определявших степень размножения и гибели клеток. После прекращения пролонгированного облучения концентрации размножившихся клеток составляли $10^6 - 10^7$ клеток/мл суспензии. Для последующего острого облучения концентрацию клеток в пробах по необходимости доводили до уровня 10^6 клеток/мл, разбавляя суспензию достаточным количеством свежей жидкой питательной среды. После облучений и соответствующих разведений в дистиллированной воде клетки высевали в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды. В экспериментах с острым и 2,5 – 5-часовым пролонгированным адаптирующим воздействием ионизирующего излучения на растущие популяции *Saccharomyces cerevisiae* клетки культивировали в течение 7 – 8 ч при температуре 30 °С для достижения ими середины логарифмической фазы. Концентрация клеток в питательной среде составляла не больше 10^6 клеток/мл суспензии. Клетки облучали адаптирующими дозами и помещали на восстановление в термостат с температурой 30 °С. Спустя 1 – 24 ч концентрации размножившихся в жидкой питательной среде клеток приводили к уровню $\leq 10^6$ клеток/мл и облучали тестирующими острыми дозами. Учет выживаемости клеток осуществляли по описанному выше методу макроколоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Закономерности замедления отмирания облученных дрожжевых клеток

Эксперименты проводили на клетках диких и мутантных по способности к репарации штаммов, выдерживаемых после облучения в дистиллированной воде при температурах $30, 37$ и 40 °С.

На рис. 1 представлены кривые отмирания облученных и интактных клеток дикого штамма Т1 в непитательной среде. Из рис. 1.А видно, что острое облучение дрожжей в дозе, снижающей выживаемость клеток до 75 %, приводило к значительному замедлению скорости отмирания выживших после облучения клеток по сравнению с необлученным контролем. Это видно как по увеличению «плеча» на кривых отмирания, т. е. продолжительности накопления субповреждений, неэффективных для гибели большей части клеток популяции, так и с уменьшением наклона экспоненциальных участков этих кривых. На рис. 1.Б выживаемость клеток, переживших облучение, нормирована к 100 %. При такой форме сопоставления кривых выживаемости становится возможным анализ эффективности воздействия ионизирующего излучения для гормезисного увеличения сроков жизни клеток облученной популяции.

Экспериментальные данные по замедлению отмирания выживших после облучения клеток различных генотипов по сравнению с интактными клетками в данной диссертационной работе получены в диапазоне доз от 13 до 1200 Гр. Впервые явление замедления отмирания показано не только после предварительных малых доз, но и после воздействия в больших дозах, когда выживает малая часть популяции.

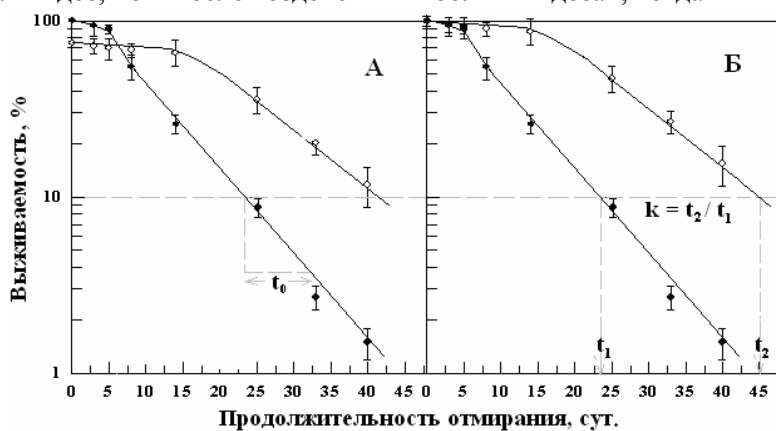


Рис. 1. А – зависимость отмирания контрольных (●) и облученных в дозе 130 Гр (○) дрожжевых клеток штамма Т1 в непитательной среде при 37 °С. Б – та же зависимость при нормировании выжившей после облучения части популяции к 100 %. О показателях k и t см. в тексте

В качестве основной количественной характеристики, отражающей процесс замедления гибели облученных клеток, введен коэффициент замедления отмирания клеток (k), определяемый отношением продолжительности отмирания облученных и контрольных клеток, рассчитанным для некоторого изоэффек-

тивного уровня (например, для выживаемости клеток, равной 10 %). Для сопоставления интервалов времени после облучения, в течение которого отмирание контрольной и облученной клеточных популяций происходит не по экспоненциальному закону, введен *показатель τ* : отношение продолжительности времени, которой соответствует «плечо» на кривой отмирания клеток облученной популяции к аналогичному временному промежутку для интактных клеток. Введен также *показатель приращения времени (t_0)*, необходимого для снижения количества живых клеток в популяции в «e» раз, где e – основание натуральных логарифмов. Этот показатель для кривых отмирания отражает наклон линейной части графиков зависимости выживаемости от времени выдерживания клеток в непитательной среде. Способ расчета критерия k и показателя t_0 отражен на рис. 1.

О благоприятном воздействии ионизирующего излучения на выживаемость клеток облученной популяции по сравнению с необлученным контролем свидетельствуют повышенные показатели τ ($> 1,0$), t_0 -обл. (по сравнению с соответствующим t_0 -контр.) и критерий k ($> 1,0$). Указанные параметры кривых отмирания, полученные в трех основных сериях экспериментов для штаммов дикого типа (T1 и XS800) и мутанта (T4), сведены в таблице.

Таблица. Зависимость кинетики отмирания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от генотипа, дозы облучения и температуры последующего инкубирования в непитательной среде

Штамм	T1 (дикий тип)			XS800 (дикий тип)			T4 (рад. мутант)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
доза, Гр	130	670	1200	580	580	580	50	50	50
выживаемость, %	75,0 ± 5,2	20,1 ± 4,3	5,2 ± 1,9	15,1 ± 1,6	15,1 ± 1,6	15,1 ± 1,6	20,0 ± 5,0	20,0 ± 5,0	20,0 ± 5,0
температура, °C	37	37	37	30	37	40	30	37	40
τ	3,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	-	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	-
t_0 -контр., сут.	9,0 ± 1,0	2,7 ± 0,5	3,5 ± 0,6	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,4	1,5 ± 0,4	3,0 ± 0,6	3,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2
t_0 -обл., сут.	12,5 ± 1,0	4,3 ± 0,3	8,5 ± 1,0	8,5 ± 1,5	4,0 ± 0,3	2,8 ± 0,3	7,7 ± 0,5	4,6 ± 0,3	2,3 ± 0,3
k	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1

Из приведенных данных видно, что эффект радиационного гормезиса по критерию снижения скорости отмирания клеток в популяции характерен не только для диких штаммов, для которых существуют механизмы пострadiационной репарации повреждений ДНК, но и для мутантного штамма, возможности восстановления которого после воздействия ионизирующего излучения ограничены. Параметры кривых отмирания клеток при одинаковых условиях для всех трех штаммов совпадают в пределах статистической варируемости (как, например, в столбцах 2, 5 и 8). Это свидетельствует о возможном участии немишен-ных событий в проявлении гормезиса, если рассматривать молекулу ДНК как основную мишень для γ -квантов.

При изучении зависимости динамики отмирания клеток от дозы (столбцы 1 – 3), было отмечено замедление процессов отмирания выживших клеток даже в случае облучения в дозе, вызывающей гибель большей части клеточной популяции. При отсутствии закономерного изменения параметра k с дозой, с увеличением дозы угол расхождения кривых отмирания облученных и интактных клеток даже несколько возрастал. Это свидетельствует о некотором снижении чувствительности к факторам, вызывающим старение и отмирание, у клеток, переживших не только малую, но и высокую дозу облучения, и о переходе выжившей фракции клеток в новое, стабильное состояние.

При воздействии на клетки острого облучения в разных дозах и дополнительного экологического фактора – повышенной температуры было выявлено (столбцы 4 – 9), что клетки, инкубированные после предварительного облучения при температурах 30, 37 и 40 °C, в целом демонстрируют более медленный темп отмирания, чем контроль. Коэффициент замедления отмирания для уровня выживаемости 10% при всех изменениях температуры остается достаточно стабильным в пределах статистической варируемости, отражая слабую зависимость динамики отмирания облученных клеток от температуры инкубирования.

При исследовании влияния длительного *хронического облучения* на популяции дрожжевых клеток было выявлено, что отмирание клеток в условиях 30-кратного снижения радиационного фона происходит до значительно меньшего уровня выживаемости, чем при фоновом или даже при повышенном уровне радиации (это видно на рис. 2). Данный факт указывает на важность непрерывного хронического воздействия естественного радиационного фона Земли как экологического фактора для поддержания процессов нормальной жизнедеятельности организмов.

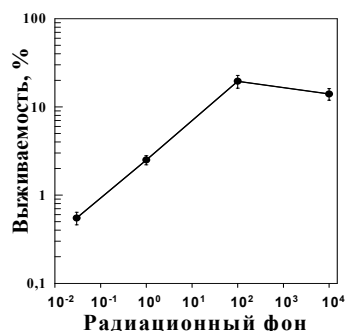


Рис. 2. Кривая зависимости выживаемости диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* XS1898, инкубированных в непитательной

среде при температуре 30 °С в течение одного месяца, от мощности дозы хронического облучения, нормированной к интенсивности редкоионизирующего компонента естественного радиационного фона (10^{-7} Гр/ч)

Из литературы известно (Булдаков, Калистратова, 2003; Luskey, 1991), что острые дозы, влияющие на увеличение средней продолжительности жизни, лежат в том же диапазоне, что и дозы, вызывающие адаптивный ответ на последующее облучение. Как показано в настоящем исследовании, эта закономерность может быть выявлена и для дрожжевых клеток.

Проявление адаптивной реакции делящихся дрожжевых клеток

В сериях экспериментов были изучены закономерности зависимости величины адаптивного ответа от дозы, мощности дозы, продолжительности облучения, длительности интервала между адаптирующим и поражающим облучением для клеток популяций *Saccharomyces cerevisiae* дикого диплоидного штамма XS800, находящихся в жидкой питательной среде в логарифмической фазе роста.

Влияние мощности дозы пролонгированного адаптирующего облучения на последующий адаптивный ответ в широком диапазоне мощностей доз – от 10^{-5} до 70 Гр/ч – исследовано впервые.

На рис. 3 представлены типичные для данной серии опытов кривые выживаемости интактных и адаптированных с мощностями доз 10^{-4} и 10 Гр/ч клеток при повторном воздействии γ -излучения в тестирующих острых дозах от 80 до 1400 Гр. Показан расчет основного параметра – фактора изменения дозы (ФИД) – это отношение равноэффективных доз тестирующего облучения для адаптированной и контрольной популяций клеток, например, для уровня выживаемости 10 %.

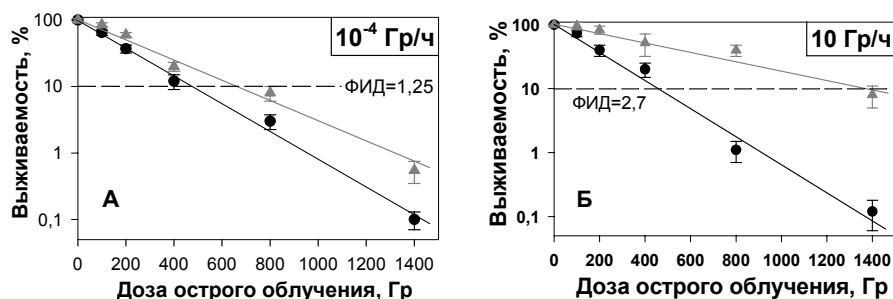
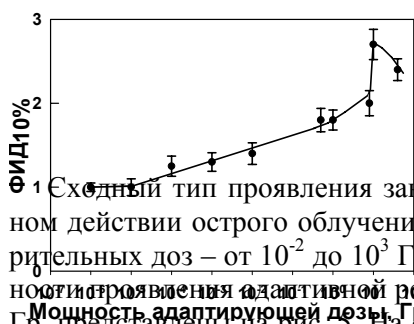


Рис. 3. Адаптивная реакция адаптированных в течение 24 ч диплоидных дрожжевых клеток (\blacktriangle) штамма XS800 в логарифмической фазе роста по сравнению с контролем (\bullet). А – мощность дозы предварительного облучения 10^{-4} Гр/ч; Б – мощность дозы 10 Гр/ч

Начиная с мощности дозы 10^{-4} Гр/ч, являющейся пороговой для проявления эффекта, величина адаптивного ответа, оцениваемая по параметру ФИД, растет до некоторого предела мощности адаптирующей дозы, находящегося в области около 10 Гр/ч. Далее с увеличением мощности дозы наблюдается снижение показателя ФИД для адаптированной и контрольной клеточных популяций. Общий характер изменения параметра ФИД в связи с увеличением мощности дозы адаптирующего излучения отражен на рис. 4. Мощность дозы 10 Гр/ч не является критической для роста популяции, она не останавливает его, но в значительной степени тормозит. В представляемой диссертационной работе впервые показана возможность проявления адаптивной реакции у клеток после предварительного облучения с высокими мощностями доз, вызывающего значительное снижение скорости размножения облученной клеточной популяции или даже преобладание гибели клеток над размножением при длительном культивировании популяции в жидкой питательной среде.

Рис. 4. Зависимость фактора изменения дозы (ФИД) от мощности дозы 24-часового адаптирующего воздействия при адаптивном ответе облученных клеток штамма XS800 в логарифмической фазе роста по сравнению с контролем



Сходный тип проявления закономерностей адаптивной реакции был обнаружен и при предварительном действии острого облучения в качестве адаптирующего. Был исследован широкий диапазон предварительных доз – от 10^{-2} до 10^3 Гр. Фрагменты результатов серии экспериментов, отражающих закономерности проявления адаптивной реакции дрожжевыми клетками в диапазоне адаптирующих доз 1 сГр – 800 Гр, представлены на рис. 5. На основании полученных данных построены пары кривых «доза – эффект», для каждой из которых сопоставлены уровни равноэффективных доз и рассчитаны $ФИД_{10\%}$.

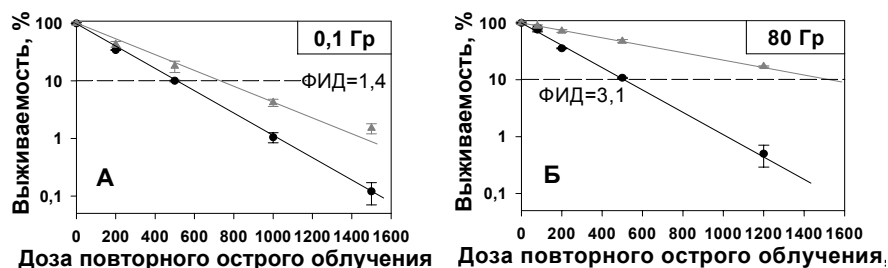


Рис. 5. Адаптивная реакция клеток штамма XS800 в логарифмической фазе роста, облученных в острых адаптирующих дозах (\blacktriangle), по сравнению с неадаптированным контролем (\bullet). Продолжительность между облучениями – 4 ч, $t=30^\circ\text{C}$. Величины адаптирующих доз для **А** – 0,1 Гр (пороговая доза), для **Б** – 80 Гр (доза, инициирующая максимальное проявление адаптивного ответа)

В серии экспериментов по изучению острого адаптирующего воздействия γ -излучения на клетки *Saccharomyces cerevisiae* было выявлено, что пороговая доза для острого адаптирующего облучения составляет около 10 сГр, для области доз 50 – 160 Гр существует экстремум в проявлении адаптивной реакции, а после увеличения адаптирующей дозы выше 800 Гр адаптивный ответ клеток популяции невозможен.

Получены данные о зависимости величины адаптивного ответа делящихся клеток XS800 от длительности промежутка между острыми облучениями – адаптирующим и тестирующим. Результаты исследования отражены на диаграмме на рис. 6. Показано, что существует оптимальный для формирования адаптивного ответа промежуток времени, после которого наблюдается снижение резистентности клеток к последующему облучению. Этот результат также важен для экологии, свидетельствуя о большей эффективности хронического воздействия фактора для проявления эффекта по сравнению с острым его приложением.

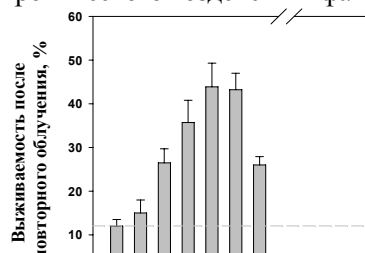


Рис. 6. Зависимость выживаемости клеток штамма XS800 в логарифмической фазе роста, остро облученных в адаптирующей дозе 80 Гр и облученных в последующей тестирующей дозе 500 Гр (столбцы 1-6, 24), от продолжительности времени между облучениями. Столбец «К» – выживаемость контроля, однократно облученного в дозе 500 Гр.

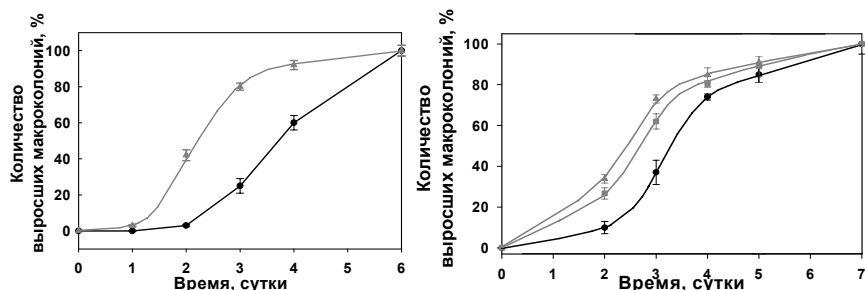


Рис. 7. Зависимость количества (%) макроколоний, образованных облученными дрожжевыми клетками штамма XS800, от продолжительности их роста на твердой питательной среде. **А.** Клетки, находящиеся в логарифмической стадии роста, предварительно облучены в адаптирующей дозе в течение 24 часов при мощности дозы 7 Гр/ч; последующая тестирующая доза составляла 2200 Гр (\blacktriangle). Контрольная популяция дрожжевых клеток не подвергалась предварительному хроническому облучению (\bullet). **Б.** Клетки, находящиеся в логарифмической стадии роста, облучены только в тестирующей дозе 1200 Гр (\bullet), а также в этой же тестирующей дозе после предварительного острого облучения клеток в адаптирующих дозах 80 Гр (\blacktriangle) и 160 Гр (\blacksquare).

Обнаружен эффект ускорения деления клеток и формирования макроколоний при высеве на плотную питательную среду у предварительно адаптированных клеток после тестирующего облучения по сравнению с клетками, облученными только в тестирующей дозе. Данную закономерность наблюдали как после хронического облучения в адаптирующей дозе (это отражено на рис. 7. А), так и после предварительного острого воздействия на клетки γ -излучения (что видно на рис. 7. Б). Возможно, данный эффект можно объяснить феноменом стимуляции клеток к делению под воздействием ионизирующего излучения.

Таким образом, в работе количественно описаны эффект проявления замедления скорости гибели клеток в облученных популяциях дрожжей и реакция адаптивного ответа предварительно облученных клеток на последующее облучение.

ВЫВОДЫ

1. Получены экспериментальные данные, демонстрирующие эффект радиационного гормезиса на популяциях дрожжевых клетках различного генотипа. Этот эффект проявлялся в замедлении отмирания выживших после облучения клеток по сравнению с интактными клетками. Впервые показано, что гормезисные эффекты могут быть выявлены не только в области малых доз, как это традиционно предполагается, но и после больших доз ионизирующего излучения, когда доля погибших клеток составляет 80-95%. Этот факт имеет большое значение для проблем экологии, указывая на возможные механизмы восстановления природных популяций микроорганизмов после поражающего действия ионизирующего излучения.

2. Для количественного описания эффекта гормезиса введен коэффициент замедления отмирания клеток, определяемый отношением продолжительностей отмирания облученных и контрольных клеток и рассчитанный для некоторого изоэффективного уровня. В соответствии с этим параметром, выжившие после облучения клетки, отмирали почти в 2 раза медленнее контрольных ($1,9 \pm 0,2$). В исследованном диапазоне доз (13 – 1200 Гр) этот параметр не зависел от дозы, в которой были облучены популяции клеток, а также от температуры (30-40 °С) пострадиационного культивирования клеток.

3. Показана возможность замедления скорости гибели в популяциях облученных клеток диких штаммов и штаммов, частично дефектных по способности репарировать радиационные повреждения ДНК. Поскольку традиционно молекула ДНК рассматривается в качестве одной из главных мишеней в клетке, поглощение энергии в которой приводит к регистрируемым радиационным эффектам, полученные нами данные свидетельствуют о возможном участии немишеных событий в проявлении гормезиса.

4. Степень выраженности адаптивного ответа облученных популяций дрожжевых клеток на последующее воздействие ионизирующего излучения зависит от величины и мощности адаптирующей дозы. Выявлена возможность проявления адаптивного ответа клетками, облученными в высоких дозах или с высокими мощностями доз, вызывающими остановку размножения и гибель части клеток популяции. Эти данные имеют непосредственное значение для экологии, указывая на возможные механизмы повышения устойчивости природных популяций микроорганизмов к поражающему действию ионизирующего излучения.

5. Впервые детально изучены количественные закономерности проявления адаптивной реакции популяций дрожжевых клеток. Показано, что адаптивный ответ при пролонгированном облучении ионизирующим излучением начинается при мощности дозы порядка 10^{-4} Гр/ч, максимален при 10 Гр/ч, далее с ростом мощности дозы снижается. Пороговая доза для острого адаптирующего облучения составляет около 1 сГр, для области доз 50 – 160 Гр существует экстремум в проявлении адаптивной реакции, после увеличения адаптирующей дозы выше 800 Гр адаптивный ответ популяции клеток невозможен.

6. На дрожжевых клетках подтверждена зависимость величины адаптивной реакции от временного интервала между адаптирующим и тестирующим облучениями: существует оптимальный для формирования адаптивного ответа промежуток времени, после которого наблюдается снижение резистентности клеток к последующему облучению. Этот результат также важен для экологии, указывая на важность непрерывного хронического воздействия естественного радиационного фона Земли на биоту.

7. Дальнейшее подтверждение этому выводу получено в экспериментах по отмиранию дрожжевых клеток при очень низких интенсивностях ионизирующего излучения. Показано, что при 30-кратном снижении естественного радиационного фона отмирание клеток происходит быстрее по сравнению с естественным радиационным фоном. Эти данные являются прямым указанием на значимость естественного радиационного фона Земли для биосферы в целом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петин В.Г., Морозов И.И., Кабакова Н.М., Горшкова Т.А. Некоторые эффекты радиационного гормезиса бактериальных и дрожжевых клеток // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 176-178.
2. Горшкова Т.А., Кабакова Н.М., Жураковская Г.П. Сохранение радиобиологических характеристик восстановленных клеток: Тез. докл. Третья международная научно-практическая конференция «Медико-дозиметрические регистры – основа регламентации радиационной безопасности профессионалов и населения». – Омск, 2004. –С. 64.
3. Комарова Л.Н., Горшкова Т.А. Влияние облучения ионизирующей радиацией на отмирание дрожжевых клеток разного генотипа: Тез. докл. Сороковые научные чтения памяти К.Э Циолковского «Научное творчество К.Э. Циолковского и современное развитие его идей. – Калуга: ИП Кошелев А.Б. – 2005. – С. 101-102.
4. Горшкова Т.А., Комарова Л.Н., Кабакова Н.М., Петин В.Г. Особенности проявления адаптивной реакции дрожжевых клеток на действие ионизирующего излучения: Тез. докл. Пятый съезд по радиационным исследованиям. – Москва. – 2006. – Т. 1. – С. 144.
5. Горшкова Т.А. Некоторые закономерности адаптивного ответа растущих популяций *Saccharomyces cerevisiae* на действие ионизирующего излучения // Радиация и риск. – 2006. – Т. 15. – № 1-2. – С.59-67.
6. Горшкова Т.А. Особенности адаптивного ответа делящихся клеток *Saccharomyces cerevisiae* на действие γ -излучения: Тез. докл. Девятая российская научная конференция «Радиационная защита и радиационная безопасность в ядерных технологиях». Обнинск, изд-во ФЭИ. – 2006. – С. 437-438.

Доктору биологических наук
БОРЕЙКО А.В.
Старшему научному сотруднику
Лаборатории радиационной биологии
Объединённого института ядерных исследований

141980, Московская обл., гор.Дубна,
ул. Ж.Кюри,6

Глубокоуважаемая Алла Владимировна!

Диссертационный совет Д 001.011.01 при ГУ Медицинском радиологическом научном центре РАМН (гор. Обнинск) рекомендовал Вас в качестве официального оппонента диссертации ГОРШКОВОЙ Татьяны Александровны на тему: «Количественные закономерности проявления адаптивной реакции и радиационного гормезиса у популяций дрожжевых клеток», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 – радиобиология и 03.00.16 – экология.

Защита диссертации назначена на 24 апреля 2007 г. в 11.00 час.

В отзыве просьба оценить актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна, а также дать заключение о соответствии диссертации критериям, установленным пунктом 8 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 30.01.2002 г. № 74.

Ваш отзыв в 2-х экземплярах, обязательно с датой подписания и заверенный по месту работы, желателен иметь в диссертационном совете не позже 13 апреля с.г.

С целью получения Вами причитающегося гонорара за оппонирование в день защиты диссертации, направляем 2 экземпляра договора между ГУ МРНЦ РАМН и Вами, который **просьба внимательно заполнить с двух сторон, полностью отвечая на поставленные вопросы, но не проставляя даты подписания договора и акта приёма, и вернуть в диссертационный совет не позже 10 апреля с.г.**

Приложение: 1. Диссертация – 1 том;
2. Автореферат диссертации – 1 экз.
3. Договор – 2 экз.

С уважением.

Зам. председателя
диссертационного совета
профессор
(Исп.Палыга Г.Ф., Тел. (48439)7-47-80)

САЕНКО А.С.

**Доктору биологических наук
СЫНЗЫНЫСУ Б.И., профессору
кафедры экологии Обнинского
гос. технического университета
Атомной энергетики МОиН РФ**

**249020, гор.Обнинск Калужской обл.,
Студгородок,1**

Глубокоуважаемый Борис Иванович!

Диссертационный совет Д 001.011.01 при ГУ Медицинском радиологическом научном центре РАМН (гор. Обнинск) рекомендовал Вас в качестве официального оппонента диссертации ГОРШКОВОЙ Татьяны Александровны на тему: «Количественные закономерности проявления адаптивной реакции и радиационного гормезиса у популяций дрожжевых клеток», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 – радиобиология и 03.00.16 – экология.

Защита диссертации назначена на 24 апреля 2007 г. в 11.00 час.

В отзыве просьба оценить актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна, а также дать заключение о соответствии диссертации критериям, установленным пунктом 8 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 30.01.2002 г. № 74.

Ваш отзыв в 2-х экземплярах, обязательно с датой подписания и заверенный по месту работы, желательно иметь в диссертационном совете не позже 13 апреля с.г.

С целью получения Вами причитающегося гонорара за оппонирование в день защиты диссертации, направляем 2 экземпляра договора между ГУ МРНИЦ РАМН и Вами, который **просьба внимательно заполнить с двух сторон, полностью отвечая на поставленные вопросы, но не проставляя даты подписания договора и акта приёмки, и вернуть в диссертационный совет не позже 10 апреля с.г.**

Приложение: 1. Диссертация – 1 том;
2. Автореферат диссертации – 1 экз.
3. Договор – 2 экз.

С уважением.
Зам. председателя
диссертационного совета
профессор

(Исп.Палыга Г.Ф., Тел. (48439)7-47-80)

САЕНКО А.С.

ДИРЕКТОРУ
Всероссийского НИИ сельскохозяйственной
радиологии и агроэкологии Россельхозакадемии
академику РАСХН, профессору
АЛЕКСАХИНУ Р.М.
249030, гор. Обнинск Калужской обл.,
Киевское шоссе, 109- км.

Глубокоуважаемый Рудольф Михайлович!

Диссертационный совет Д 001.011.01 при ГУ «Медицинский радиологический научный центр РАМН» (гор. Обнинск) рекомендовал руководимое Вами учреждение в качестве ведущей организации для отзыва по диссертации ГОРШКОВОЙ Татьяны Александровны на тему: «Количественные закономерности проявления адаптивной реакции и радиационного гормезиса у популяций дрожжевых клеток», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 – радиобиология и 03.00.16 – экология.

Защита диссертации назначена на 24 апреля 2007 г. в 11.00 час.

В отзыве просьба отразить значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов и выводов, конкретные рекомендации по их использованию, а также дать заключение о соответствии диссертации критериям, установленным пунктом 8 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 30.01.2002 г. № 74.

Утверждённый Вами или Вашим заместителем отзыв ведущей организации в 2-х экземплярах вместе с диссертацией ГОРШКОВОЙ Т.А. желательно иметь в диссертационном совете не позже **13 апреля с.г.**

Приложение: 1. Диссертация – 1 том;
2. Автореферат диссертации – 1 экз.

С уважением.

Зам. директора ГУ МРНЦ РАМН
по научной работе,

Зам. председателя диссертационного совета
профессор

САЕНКО А.С.

(Исп.Палыга Г.Ф., тел (48439)7-47-80)

Б Ю Л Л Е Т Е Н Ъ
 Диссертационный совет Д 001.011.01
 К заседанию совета 24 апреля 2007 г., № 6

Фамилия, имя, отчество соискателя	Достоин учёной степени	Результаты голосования
ГОРШКОВА Татьяна Александровна	Кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 - радио- биология и 03.00.16 – эколо- гия.	Да Нет

Бюллетень не подписывается. В графе «Результаты голосования»
вычеркнуть ненужное.

Б Ю Л Л Е Т Е Н Ъ
 Диссертационный совет Д 001.011.01
 К заседанию совета 24 апреля 2007 г., № 6

Фамилия, имя, отчество соискателя	Достоин учёной степени	Результаты голосования
ГОРШКОВА Татьяна Александровна	Кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 - радио- биология и 03.00.16 – эколо- гия.	Да Нет

Бюллетень не подписывается. В графе «Результаты голосования»
вычеркнуть ненужное.

Б Ю Л Л Е Т Е Н Ъ
 Диссертационный совет Д 001.011.01
 К заседанию совета 24 апреля 2007 г., № 6

Фамилия, имя, отчество соискателя	Достоин учёной степени	Результаты голосования
ГОРШКОВА Татьяна Александровна	Кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 - радио- биология и 03.00.16 – эколо- гия.	Да Нет

Бюллетень не подписывается. В графе «Результаты голосования»
вычеркнуть ненужное.

Б Ю Л Л Е Т Е Н Ъ
 Диссертационный совет Д 001.011.01
 К заседанию совета 24 апреля 2007 г., № 6

Фамилия, имя, отчество соискателя	Достоин учёной степени	Результаты голосования
ГОРШКОВА Татьяна Александровна	Кандидата биологических наук по специальностям 03.00.01 - радио- биология и 03.00.16 – эколо- гия.	Да Нет

Бюллетень не подписывается. В графе «Результаты голосования»
вычеркнуть ненужное.

