

## Zum Strahlenschutz von Glycerin bei Hefezellen verschiedenen Ploidiegrades

WERNER F. SCHMIDT

Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin (Dir. Prof. Dr. W. STEIN)

(Z. Naturforschg. 21 b, 145—147 [1966]; eingegangen am 11. November 1965)

The radioprotective action of glycerol was studied on haploid, diploid, and tetraploid yeast cells (*Sach. cer.*). The experimental results can be explained on the basis of a physical adsorption process a suggested by WEBB.

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß die Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen durch Inkorporation geeigneter Substanzen (Schutzstoffe, Sensibilisatoren) oder durch die im wäßrigen Zellmilieu gelösten Gase modifiziert werden kann. Die Wirkungsweise dieser Substanzen hängt in der Regel davon ab, ob sie vor, während oder nach der Bestrahlung auf die Zellen einwirken. Es können daher die verschiedenen Stadien der Strahlenwirkung beeinflußt werden.

Ein Teil der bei Zellen und speziell bei Mikroorganismen gesetzten Schäden wird auf die Wirkung der im wäßrigen Milieu der Zelle durch die ionisierende Strahlung erzeugten Wasserradikale zurückgeführt. Aus der Strahlenchemie wäßriger Lösungen ist bekannt, daß schon kurz nach dem Einsatz der Bestrahlung (in einigen  $\mu\text{sec}$ ) auf Grund der Diffusionsprozesse eine homogene Verteilung der Radikale erreicht wird. Zwischen den Wasserradikalen und den biologisch wichtigen Makromolekülen finden Oxydations-Reduktionsprozesse statt, die zu einer Inaktivierung dieser Moleküle führen können. Befinden sich während der Bestrahlung Radikalfänger in der Zelle, so konkurrieren diese Moleküle mit den Makromolekülen hinsichtlich der Reaktion mit den Wasserradikalen. Der primäre Strahleneffekt wird dadurch modifiziert. Über die Wirkung verschiedener Stoffe als Radikalfänger in vitro und in vivo wurde von NAKKEN<sup>1</sup> zusammenfassend berichtet.

Neben dem Radikaleinfang scheint ein anderer Schutzmechanismus eine wichtige Rolle zu spielen, der auf der Umhüllung der biologisch wichtigen Moleküle durch die Schutzstoffmoleküle beruht.

WEBB<sup>2</sup> konnte bei *Staphylococcus aureus* zeigen, daß die Schutzwirkung von Glycerin-Wasser-Gemischen mit steigender Glycerinkonzentration zunahm.

<sup>1</sup> K. F. NAKKEN, Radical Scavengers and Radioprotection, in: Current Topics in Radiation Research North Holland Publ. Comp. 1965.

Auf Grund dieser Ergebnisse folgerte WEBB, daß es sich hierbei um einen physikalischen Adsorptionsprozeß handelt, für den die Langmuirsche Adsorptionsisotherme zur Beschreibung Anwendung finden kann. Vorausgesetzt wurde dabei, daß die Schutzwirkung proportional zur Besetzung der Oberfläche der Makromoleküle mit Glycerinmolekeln ist. WEBB erhielt mit diesem Modell (vgl. Abb. 1) fol-

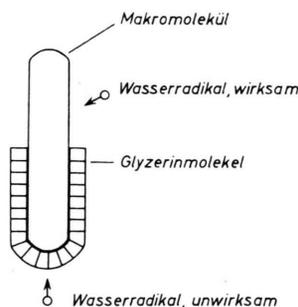


Abb. 1. Zum Schutzmechanismus des Glycerins.

$$\Theta = \frac{b \cdot c}{1 + b \cdot c} ; \quad \Theta = \frac{\text{bedeckte Fläche}}{\text{Gesamtfläche}}$$

Langmuirsche Adsorptionsisotherme auf die biologischen Verhältnisse übertragen:

$$\Theta = \frac{k_0 - k_g}{k_0 - k_{gs}}$$

genden Zusammenhang zwischen den Inaktivierungskonstanten  $k_g$  und der Glycerinkonzentration  $c_g$ :

$$\frac{1}{k_0 - k_g} = \frac{1}{b(k_0 - k_{gs})} \frac{1}{c_g} + \frac{1}{k_0 - k_{gs}} \quad (1)$$

mit:  $k = D_{37}^{-1}$  ( $D$  Strahlendosis),  $k_0$  Inaktivierungskonstante ohne Glycerin,  $k_g$  Inaktivierungskonstante bei der Glycerinkonzentration  $c_g$ ,  $k_{gs}$  Anteil der Inaktivierungskonstanten, der durch Glycerin nicht beeinflußt wird ( $k_g$  extrapoliert für  $c_g \rightarrow \infty$ ).

Bei Gültigkeit dieses Modells sollte  $1/(k_0 - k_g)$  über  $1/c_g$  eine Gerade ergeben. Die experimentellen

<sup>2</sup> R. B. WEBB, Radiation Res. 18, 607 [1963].

Ergebnisse bei *Staphylococcus aureus*<sup>2</sup> und bei haploiden Hefezellen<sup>3</sup> erfüllen diese Folgerung.

Insbesondere erwies sich  $k_{gs} \ll k_0$ , so daß WEBB<sup>4</sup> die Vermutung äußerte, daß Glycerin theoretisch gegen jede Art von Strahlenschaden schützend wirken sollte. Vernachlässigt man daher in Gl. (1)  $k_{gs}$  gegen  $k_0$ , so erhält man

$$\frac{1}{k_g} = \frac{b}{k_0} c_g + \frac{1}{k_0} \quad (2)$$

oder, da  $k = D_{37}^{-1}$

$$\frac{D_{37}^{(g)} - D_{37}^{(o)}}{D_{37}^{(o)}} = b c_g, \quad (3)$$

d. h.  $1/k_g$  über  $c_g$  müßte eine Gerade ergeben, deren Anstieg  $b/k_0$  liefert. Aus Gl. (3) folgt, daß der relative Schutz proportional zur Glycerinkonzentration ist;  $b$  stellt in diesem Modell die relative Änderung der  $D_{37}$  pro Einheit der Konzentration dar.

Zur weiteren Überprüfung dieser Folgerung wurden Versuche mit diploiden und tetraploiden Hefezellen durchgeführt (*Sacch. cer.* Stamm 211-1aM/2 und Stamm 401).

Die Kulturen wurden 41 Stdn. bei 30 °C in einer Nährlösung (2% Glucose, 1% Yeast-Extrakt, 0,5% Pepton) herangezogen. Nach dem Abzentrifugieren und mehrmaligem Waschen mit dest. Wasser erfolgte die Aufnahme mit  $1/20$ -m.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer. 15 min vor der Bestrahlung wurden die Zellen in eine Glycerin-Phosphatpufferlösung bestimmter Konzentration gebracht. MANNEY u. a.<sup>5</sup> haben gezeigt,

daß der maximale Schutzeffekt bei Glycerin erst nach ca. 10 min Einwirkung auftritt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Machlet-Röhre bei 55 kV, 25 mA, 0,05 mm Al-Filterung, Bestrahlungstemperatur  $(24 \pm 1)$  °C. Die Dosisleistung wurde mit dem Fricke-Dosimeter<sup>6</sup> zu 9,6 krad/min bestimmt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellsuspensionen bei kleineren Glycerinkonzentrationen bis (5 Mol/l) 1:10, bei höheren Glycerinkonzentrationen 1:100 mit Pufferlösung verdünnt. Auf Agarplatten wuchsen die Zellen bei 30 °C in 3 Tagen zu makroskopisch sichtbaren Kolonien heran.

Da die Inaktivierungskurven bei den diploiden und den tetraploiden Stämmen im Gegensatz zum haploiden Stamm eine Schulter aufweisen, wurden die effektive  $D_{37}^{(a)}$  im Anfangsteil der Dosiseffektkurve und die  $D_{37}^{(e)}$  des anschließenden exponentiellen Teiles bestimmt (vgl. Abb. 2). In Abb. 3 ist  $D_{37}^{(e)} = 1/k_g$  (krad) als Funktion von  $c_g$  (Mol/l) für die verschiedenen Stämme aufgetragen. Der nach Gl. (2) bestehende lineare Zusammenhang wird durch die experimentellen Ergebnisse befriedigend erfüllt. In Tab. 1 sind die Steigungen  $b/k_0$  und die daraus ermittelten Konstanten  $b$  wiedergegeben.

Daß  $b$  bei den multiploiden Stämmen merklich von den Werten für den haploiden Stamm abweicht, könnte ein Hinweis darauf sein, daß unterschiedliche Strahleneffekte geschützt werden, die an unterschiedliche Molekülstrukturen gebunden sind. Da

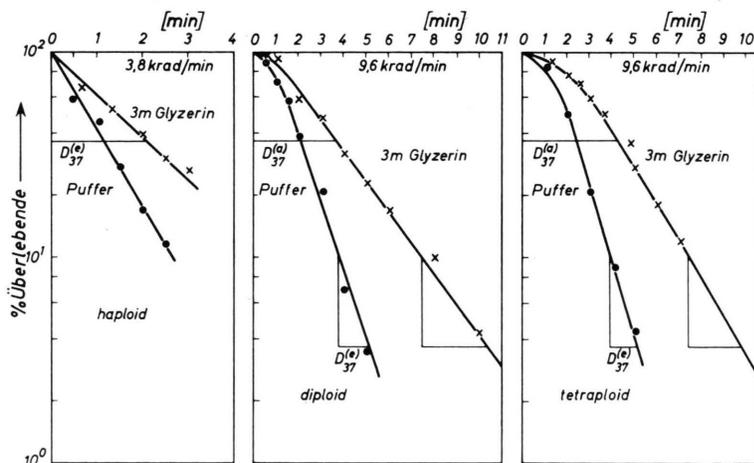


Abb. 2. Dosis-Effektkurven für die verschiedenen Stämme.

<sup>3</sup> W. F. SCHMIDT, Vortrag auf der Biophysikertagung 1965 Homburg-Saar (Tagungsbericht im Druck).

<sup>4</sup> R. B. WEBB, Kap. 18, in: Physical Processes in Radiation Biology (Ed. L. AUGENSTEIN u. a.), Academic Press 1964.

<sup>5</sup> T. R. MANNEY u. a., Radiation Res. **18**, 374 [1963].

<sup>6</sup> J. WEISS u. a., Genfer Konferenz 1955, P/155.

Stamm	$b/k_0^{(e)}$ [krad Mol <sup>-1</sup> l]	$b/b^{(e)}$ [Mol <sup>-1</sup> l]	$b^{(a)}$ [krad Mol <sup>-1</sup> l]
haploid (211-1aMn)	1,1 ± 20%	0,26 ± 20%	(1,1 ± 20%)
diploid (211-1aM/2)	4,6 ± 20%	0,46 ± 20%	4,9 ± 20%
tetraploid (401)	5,0 ± 20%	0,5 ± 20%	8 ± 20%

Tab. 1. Die für die verschiedenen Stämme ermittelten Konstanten.

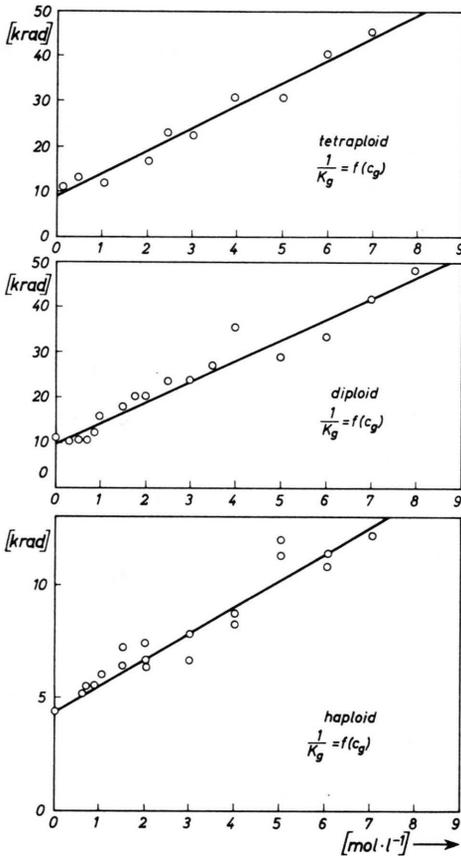


Abb. 3. Abhängigkeit der  $D_{37}^{(e)}$  von der Glycerinkonzentration in der Zellsuspension. (Für jede Glycerinkonzentration wurden 2 bis 5 Inaktivierungskurven aufgenommen. Die in der Abb. dargestellten Punkte sind die Mittelwerte.)

eine Analyse der Strahlenschäden bei Hefezellen dazu geführt hat, die Inaktivierung des haploiden Stammes vorwiegend auf rezessive und die der multipliden Stämme vorwiegend auf dominante Letalmutationen zurückzuführen<sup>7</sup>, wäre ein unterschiedlicher Schutzmechanismus nicht unwahrscheinlich. Solche Folgerungen setzen aber voraus, daß bei einer bestimmten Glycerinkonzentration in der Suspension von den Zellen der verschiedenen Ploi-

<sup>7</sup> W. STEIN u. W. LASKOWSKI, Z. Naturforsch. 15 b, 734 [1960].

diegrade im Zellinnern die gleiche Glycerinkonzentration bzw. das gleiche Konzentrationsgefälle zwischen außen und innen erreicht wird. Bei der engen genetischen Verwandtschaft der Stämme liegt eine derartige Annahme zwar auf der Hand, bedarf aber noch der experimentellen Nachprüfung.

Die Werte für die  $D_{37}^{(a)}$  im Anfangsteil der Dosis-effektkurven hängen ebenfalls linear von der Glycerinkonzentration  $c_g$  ab (Abb. 4). Die Steigungen  $b/k_0^{(a)}$  sind ebenfalls in Tab. 1 angegeben.

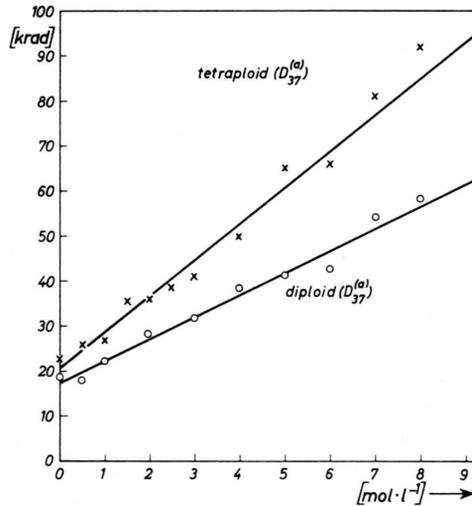


Abb. 4. Abhängigkeit der  $D_{37}^{(a)}$  von der Glycerinkonzentration in der Zellsuspension (vgl. Abb. 3).

Schon einfache Inaktivierungsmodelle zeigen, daß dieser effektiven  $D_{37}^{(a)}$  eine recht komplexe Bedeutung zukommt, so daß weitere Folgerungen aus diesen Werten hier nicht gezogen werden sollen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß auch für den Strahlenschutz von Äthanol und Butandiol-1.4 bei haploiden Hefezellen eine Konzentrations-Abhängigkeit nach Gl. (2) gefunden wurde<sup>8</sup>.

Fräulein CHR. UMLAUF danke ich für die sorgfältige und umsichtige Mitarbeit bei den Versuchen. Herrn Prof. Dr. W. STEIN bin ich für anregende Diskussionen sehr zu Dank verpflichtet.

<sup>8</sup> W. F. SCHMIDT, unveröffentlichte Ergebnisse.