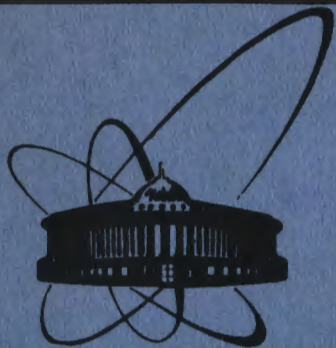


2/IV-84



Объединенный
институт
ядерных
исследований
Дубна

1677/84

P19-83-906

Р.Д.Говорун, Ю.В.Оводков, Т.Е.Фоменкова

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР
НА ХРОМОСОМЫ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Направлено в журнал "Цитология"

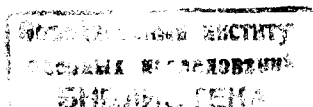
1983

В последние годы все чаще появляются работы, посвященные исследованию воздействия гипертермии на клетки и ткани, что в известной степени определяется поиском возможностей использования этого метода в онкологии/1/. Показано, что клетки наиболее чувствительны к нагреванию /по тесту выживаемости/ в митозе и в конце S-фазы и терморезистентны в стадии G₁/2,3/, что может свидетельствовать и о возможном повреждении ядерных структур клеток. Вместе с тем сведения о влиянии повышенной температуры на хромосомный аппарат клеток немногочисленны. Отмечено, что длительное воздействие повышенных температур на культуру клеток млекопитающих приводит к увеличению числа аберрантных клеток/4,5/. Данные о влиянии гипертермии на культуру лимфоцитов человека единичны/6,7/, причем исследовалось только краткосрочное воздействие высокой температурой.

Нами проведено исследование влияния повышенных температур в разных стадиях клеточного цикла на хромосомы лимфоцитов периферической крови человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использована венозная кровь здоровых доноров обоего пола в возрасте от 22 до 47 лет. Гепаринизированную кровь /20 ед.гепарина на мл./разводили средой 199 в соотношении 1:6. В суспензию клеток добавляли раствор ФГА /"Reanal", ВНР/ в соотношении 500:1. Воздействие повышенной температурой осуществлялось в диапазоне 38-41°C в разные периоды клеточного цикла. Для оценки продолжительности разных фаз клеточного цикла исходили из данных/8/. Клетки инкубировали при повышенных температурах со 2-го по 24-26-й час /G₁ - стадия/, с 24-го по 48-й час /S + G₂/, с 36-го по 48-й час /G₂/, со 2-го по 50-й час /T - полный клеточный цикл/. До и после воздействия повышенной температурой клетки культивировали при 37°C. При этой же температуре инкубировали контрольные образцы. За 3 ч до фиксации в суспензию клеток добавляли раствор колхицина до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Гипотонизацию проводили 0,075 М раствором KCl при 37°C. Суспензию клеток фиксировали охлажденной смесью этанола и ледяной уксусной кислоты /3:1/. Препараты готовили путем накапывания суспензии клеток на влажные холодные стекла и высушивали в струе теплого воздуха, окрашивали азураном по методу Романовского. Отбор метафазных пластинок и идентификацию



хромосомных aberrаций проводили в соответствии с общепринятыми требованиями. Кроме того, определяли митотическую активность лимфоцитов, которую оценивали по статмокинетическому индексу /процент накопленных митозов/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки термочувствительности лимфоцитов человека в разные периоды первого клеточного цикла приведены в табл.1. В условиях культивирования при температуре 41°C в течение G₁-стадии не отмечено существенного повышения частоты хромосомных нарушений. Воздействие высокой температурой на /S + G₂/-стадии вызвало увеличение числа клеток с хромосомными aberrациями, причем эффект был примерно такой же, как и при воздействии в течение всего клеточного цикла. Высоко термочувствительной является также G₂-стадия цикла. В этих случаях гипертермия приводит к увеличению общего числа образующихся хромосомных нарушений, появляются клетки со множественными хромосомными повреждениями. Среднее число aberrаций на aberrантную клетку при воздействии высокой температурой во время G₂-, /S + G₂/-стадий и в течение всего клеточного цикла составило 1,5; 1,7 и 2,8 соответственно, в то время как в G₁-стадии оно не отличалось от контроля /около 1,0/. Aberrантные клетки с числом хромосомных повреждений от 2 до 5, образовавшиеся в результате воздействия температурами 40,5°-41°C в течение /S + G₂/-стадии или всего клеточного цикла, составили около 40% от общего их количества.

Следует отметить, что высокая частота aberrантных метафаз сопровождается снижением митотической активности клеток, о чем свидетельствуют низкие величины статмокинетического индекса. Последнее, вероятнее всего, является следствием блокирования клеточного деления в G₂-стадии цикла и интерфазной гибели части клеток.

Весьма характерен морфологический вид препаратов лимфоцитов, испытавших воздействие высокой температурой в термочувствительных фазах цикла: невелико количество бластных клеток, содержится много клеток с густо окрашенным ядром, большое количество детрита. Хромосомы чрезмерно конденсированы, имеют нечеткие очертания, нередко хроматиды далеко отстоят друг от друга в области центромеры. Наличие детрита и большого количества клеток с пикнотичным ядром может служить показателем развития деструктивных процессов, приводящих к интерфазной гибели. Наблюдаемая чрезмерная конденсация хромосом может являться следствием теплового блока митоза.

Была исследована зависимость выхода хромосомных aberrаций от сроков фиксации клеток. Поставлены опыты, в каждом из которых клетки подвергали воздействию высокой температурой в течение всего первого клеточного цикла /0-47 ч/, а затем переносили в контрольный термостат /37°C/, где они инкубировались в течение

Таблица 1

Цитогенетические нарушения в лимфоцитах после воздействия температурой 41°C на клетки в разных фазах клеточного цикла

Стадия клеточного цикла	Просчитано клеток	Aberrантные клетки, %	Число aberrаций (на 100 клеток)	Статмокинетический индекс, %
G ₁	160	3,1 ± 1,4	3,1 ± 1,4	1,8 ± 0,2
G ₂	138	18,8 ± 3,7	29,0 ± 4,6	1,3 ± 0,2
S + G ₂	236	33,9 ± 3,8	57,6 ± 4,9	0,6 ± 0,1
T	38	39,4 ± 10,3	110,6 ± 17,1	0,4 ± 0,1
Контроль, 37° C	1676	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2

Таблица 2

Зависимость эффектов от времени культивирования лимфоцитов после воздействия температурой 40,5°C в течение первого клеточного цикла /47 ч/

Условия опыта	Дополнительная инкубация при 37°C, ч	Просчитано клеток	Aberrантные клетки, %	Число aberrаций (на 100 клеток)	Статмокинетический индекс, %
Повышенная температура (40,5° C)	3	100	15,0 ± 3,9	20,0 ± 4,5	0,8 ± 0,2
	6	200	8,5 ± 2,0	10,5 ± 2,3	1,6 ± 0,2
	9	100	2,0 ± 1,4	2,0 ± 1,4	1,1 ± 0,2
	12	100	4,0 ± 2,0	4,0 ± 2,0	1,1 ± 0,2
	15	100	4,0 ± 2,0	4,0 ± 2,0	0,9 ± 0,2
Контроль (37° C)	50 - 57	1676	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2

разного времени до фиксации. Результаты этих опытов представлены в табл.2, из которой видно, что aberrантные клетки с высокой

частотой наблюдались только при ранних сроках фиксации после воздействия высокой температурой. Их число уменьшалось в несколько раз, если после гипертермии клетки некоторое время выдерживали при оптимальных условиях роста.

Анализ величин статмокинетического индекса культуры лимфоцитов свидетельствует о характерном изменении их митотической активности. При ранней фиксации клеток, подвергавшихся воздействию повышенной температурой, отмечено снижение митотической активности, являющееся, очевидно, следствием блокирования вступления клеток в митоз. Оно сменяется повышением по сравнению с контролем величины статмокинетического индекса /вследствие снятия блока митоза/ и последующей нормализацией этого показателя.

Исследование зависимости выхода aberrантных клеток от температуры выявило /см. рисунок/ более быстрое увеличение числа aberrантных клеток с ростом температуры выше 38,5°C при воздействии на клетки в стадиях G₂ и /S + G₂/ или всего клеточного цикла. Гипертермия в стадии G₁ привела лишь к небольшому увеличению числа aberrантных клеток /примерно в 2 раза по сравнению с контролем/. Пребывание клеток при температуре 41°C в течение 68 ч /T + часть G₁-фазы второго цикла/ привело к увеличению числа aberrантных клеток только на несколько процентов по сравнению с их числом после ее воздействия в течение только первого клеточного цикла.

Анализ образовавшихся хромосомных aberrаций разных видов в опыте и контроле /табл.3/ показал, что при воздействии высокой температурой на разных стадиях клеточного цикла основное количество aberrаций /70-80% от общего их числа/ составляли хроматидные фрагменты. Парные ацентрические фрагменты составляли около 15-20%, другие виды aberrаций были единичными.

Особенностью воздействия на клетки высоких температур явилось появление заметного количества хроматидных и хромосомных aberrаций, образовавшихся в результате разрыва в области центромеры. При воздействии температур 40,5°-41°C в течение термочувствительных периодов или всего клеточного цикла их количество достигало до 15% от общего числа хромосомных aberrаций. В контроле подобные повреждения не встре-

тываются.

Зависимость содержания лимфоцитов с хромосомными aberrациями от температуры культивирования в разные периоды клеточного цикла: х - контроль, 37°C; □ - G₁; ● - /S + G₂/; ○ - G₂; Δ - T; ▲ - T + G₁ второго митоза.

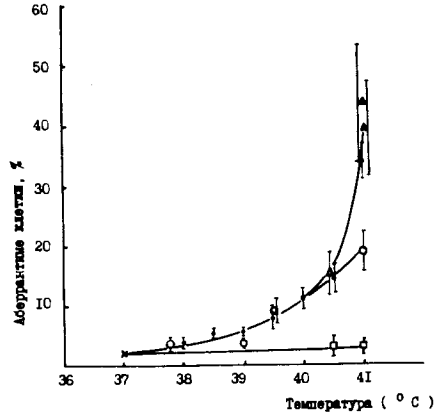


Таблица 3

Хромосомные aberrации в лимфоцитах, подвергнутых воздействию температур 40°-41°C на разных стадиях клеточного цикла

Стадия клеточного цикла	Просчитано клеток	Число aberrаций хромосом (на 100 клеток)	Хроматидные фрагменты		Парные фрагменты		Обменные aberrации	
			на 100 клеток	% от общего числа	на 100 клеток	% от общего числа	на 100 клеток	% от общего числа
G ₁	360	3,3 ± 1,0	2,2 ± 0,8	66,7	0,8 ± 0,5	25,0	0,3 ± 0,3	8,3
G ₂	248	22,6 ± 3,0	18,2 ± 2,7	80,3	4,0 ± 1,3	17,9	0,4 ± 0,4	1,8
S + G ₂	837	29,7 ± 1,9	20,9 ± 1,6	70,3	5,9 ± 0,8	19,7	3,0 ± 0,6	10,8
T	338	24,6 ± 2,7	19,2 ± 2,4	78,3	3,9 ± 1,1	15,7	1,5 ± 0,7	6,0
Контроль (37° C)	1676	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,3	67,8	0,4 ± 0,1	19,4	0,2 ± 0,1	12,9

Продолжительность культивирования клеток - 50-53 ч.

чались. Появление повреждений хромосом в области центромеры может свидетельствовать о возможном тепловом повреждении других структур клетки, например мембран^{/9,10/}, митотического аппарата^{/4/} и др.

Полученные результаты согласуются с опубликованными данными о наибольшей термочувствительности перевиваемых линий клеток млекопитающих в стадиях S или S+G₂[/], которая оценивалась по выходу сестринских хроматидных обменов^{/5/} и выживаемости клеток^{/2-4/}. Наблюдаемый эффект может быть связан с тем, что в клетках, находящихся в S-фазе, большое количество ДНК находится в однонитчатой форме. Поскольку в клетках активно протекают, в частности, процессы спонтанной депуринизации ДНК и др.^{/11/}, то при воздействии высоких температур могли ускоряться процессы деградации такой ДНК.

Вместе с тем ряд авторов отмечал, что гипертермия вызывает длительную инактивацию репарационных ферментов^{/12/}, в частности ДНК-полимераз^{/13/}, приводит к торможению процессов репарации повреждений энзиматического происхождения^{/14/}. Это могло оказать влияние на наблюдаемый эффект, в частности при ранней фиксации клеток после воздействия гипертермии. Снижение частоты образующихся хромосомных повреждений при более поздней фиксации может также служить указанием на возобновление процессов репарации тепловых повреждений хромосом в период последующей инкубации клеток при оптимальных условиях. Вклад этой репарации мог повлиять на регистрируемый эффект в разные сроки фиксации клеток после воздействия высокой температурой.

Как было показано, при воздействии на клетки повышенных температур относительные частоты разных видов образующихся хромосомных aberrаций не отличались от значений контроля. Это дает основание предполагать, что образование хромосомных повреждений при повышенных температурах культивирования клеток происходит по типу спонтанного мутирования. Известно^{/11/}, что делеции хромосом являются одним из наиболее частых типов спонтанных мутаций. Если исходить из того, что спонтанные aberrации в культивируемых клетках млекопитающих возникают в период редупликации хромосом в результате образования временных разрывов и брешей, которые фиксируются только в митозе, то, возможно, при высоких температурах происходит ингибирование этапа сшивки новообразованных отрезков ДНК. Имеющиеся указания на аккумуляцию коротких отрезков новообразованной нити ДНК при культивировании клеток при повышенных температурах также свидетельствует в пользу такого предположения^{/5/}.

Таким образом, проведенные исследования цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови человека позволили выявить их высокую термочувствительность в течение S + G₂-стадии клеточного цикла; критической является температура ~38,5°C, превышение которой приводит к быстрому увеличению выхода aberrантных клеток. Совпадение частот различных видов

хромосомных повреждений при воздействии высоких температур и в контроле свидетельствует об их образовании в основном по типу спонтанного мутирования. Особенностью воздействия высоких температур явилось образование клеток с повышенным числом хромосомных aberrаций /до 3-5 на клетку/, а также появление не встречающихся в контрольных образцах aberrаций в результате разрывов хромосомы в области центромеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hahn G.M. Hyperthermia and Cancer. N.Y.-L., 1982.
2. Westra A., Dewey W.C. Int.J.Radiat.Biol., 1971, 19, p.467.
3. Kim S.H., Kim J.H., Hahn E.W. Radiat. Res., 1976, 66, p.337.
4. Dewey W.C. et al. Int.J.Radiat.Biol., 1971, 20, p.505.
5. Kato H. Cancer Genet.Cytogenet., 1980, 2, p.61.
6. Севанькаев А.В., Айрапетян Л.Г. В кн.: X Всесоюзный съезд рентгенологов и радиологов. "Медицина", М., 1977, с.10.
7. Yang S.J., Rafla S. Int.J.Radiat.Biol., 1980, 37, p.451.
8. Bender M.A., Prescott D.M. Exptl. Cell Res., 1962, 27, p.221.
9. Волков Е.И., Полежаев А.А., Чернавский Д.С. Препринт ФИАН, № 66, М., 1981.
10. Ceri H., Wright J.A. Exptl.Cell Res., 1977, 104, p.389.
11. Виленчик М.М. Закономерности молекулярно-генетического действия химических канцерогенов. "Наука", М., 1977, с.60-72.
12. Gerweck L.E., Gillette E.L., Dewey W.C. Radiat.Res., 1975, 64, p.611.
13. Spiro I.J., Denman D.L., Dewey W.C. Radiat.Res., 1982, 89, p.134.
14. Ben-Hur E., Elkind M.M., Riklis E. In: Cancer Therapy: by Hyperthermia and Radiation. Baltimore/Munich, 1978, p.29.

Рукопись поступила в издательский отдел
28 декабря 1983 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц, Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
D11-80-13	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
D4-80-271	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
D4-80-385	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
D2-81-543	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
D10,11-81-622	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
D1,2-81-728	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
D17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
D1,2-82-27	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
P18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
D2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
D2,4-83-179	Труды XV Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Дубна, 1982.	4 р. 80 к.
	Труды УШ Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Протвино, 1982 /2 тома/	11 р. 40 к.
D11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
D7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
D2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу;
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Говорун Р.Д., Оводков Ю.В., Фоменкова Т.Е. P19-83-906
Влияние повышенных температур на хромосомы лимфоцитов человека

Исследовано влияние повышенных температур в диапазоне 38-41°C на хромосомы лимфоцитов периферической крови человека в разных стадиях клеточного цикла. Показана высокая термочувствительность хромосом в течение (S + G₂)-периода клеточного цикла. Отмечено быстрое увеличение числа aberrантных клеток с ростом температуры выше 38,5°C. Основным типом хромосомных aberrаций являются хроматидные и хромосомные делеции. При высоких температурах /40-41°C/ отмечено появление клеток с 3-5 aberrациями, а также aberrаций, образовавшихся в результате разрывов хромосом в области центромеры.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Govorun R.D., Ovodkov Ju.V., Fomenkova T.E. P19-83-906
Influence of Higher Temperatures on Human Lymphocyte Chromosomes

The influence of higher temperatures from 38 up to 41°C range on chromosomes of human peripheral lymphocytes in different phases of the cell cycle was studied. High thermosensitivity of chromosomes during (S + G₂)-phases of the cell cycle was demonstrated. There was a significant increase in the number of aberrant cells at t > 38,5°C. The mean type of chromosome aberrations was the chromatid and chromosome deletions. Cells with 3-5 aberrations and the induction of chromosome aberrations due to breaks in centromere region were marked at high temperatures /40-41°C/.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградовой