



ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

P19-97-296

В. Л. Корогодина, А. Пантелева, И. А. Ганичева,  
Е. А. Кузнецова, Г. А. Лазарева, Л. А. Мельникова,  
Ю. В. Мокров, В. И. Корогодин

ВЛИЯНИЕ МОЩНОСТИ  
ДОЗЫ СЛАБОГО ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ  
НА МИТОЗ И АДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК  
МЕРИСТЕМЫ КОРЕШКОВ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

1997

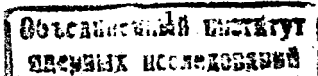
В настоящее время проводится много исследований по влиянию малых доз облучения. Они посвящены разным феноменам и порой вступают в кажущееся противоречие. При анализе регистрируемых эффектов надо учесть, что мы имеем дело каждый раз с двумя-тремя наиболее значимыми при данной мощности дозы и дозе процессами [1,2]. Получены данные по стимуляции митотической активности [3,4], адаптивному ответу [1], выходу ХА клеток [5,6].

Авторы данной работы ставят своей задачей связать аномальный митоз клеток после облучения дозой слабой мощности и их адаптивный ответ. Для этой цели были использованы семена гороха с низким и высоким уровнями естественного мутирования. Эти два типа семян были получены из одной партии семян при разных режимах хранения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В опыты были взяты семена гороха (сорт Пелюшка, Немчиновский-817, урожай 1996 г.), полученные от проф. Г.А. Дебелого (НИИСХ, Немчиновка, Россия). Семена этого сорта имеют бурую окраску. Были использованы семена с низким и высоким уровнями естественного мутирования. Низкий уровень мутирования в контроле соответствует хранению семян при пониженной температуре 3-4°C и влажности 13-14 % (такой режим хранения способствует хорошему прорастанию). Высокий уровень мутирования соответствует хранению при повышенной температуре (25°C) и влажности 10%. Перед опытами в любом случае семена доводили до влажности 16% [7].

Семена облучали ( $^{60}\text{Co}$ , установка Е-37, доза - 7 сГр) при разных мощностях дозы (от 0.3 сГр/ч до 19.1 сГр/ч). Начало облучения совпадало с началом намачивания. После периода намачивания (24 ч) семена проращивали при 25°C и корешки (примерно по 20 на вариант) фиксировали в ацетоуксусном спирте (3:1). Временные давленные препараты окрашивали ацетоорсеином. В половине



семян определяли количество клеток в профазе, метафазе, анафазе и телофазе, а также митотический индекс (МИ). В этих же препаратах анализировали все анаелофазные клетки и учитывали долю клеток с абберациями хромосом (ХА). Выделяли хроматидные и хромосомные мосты, фрагменты. Часть семян после периода намачивания облучали вторично ( $^{137}\text{Cs}$ , установка "Свет", острая доза 50 Гр), для исследования адаптивного ответа (АО). АО определяли по ХА по той же схеме. Первый митоз определяли по длине корешка ( $30 \pm 3$ ) мм. Не проросшие семена и корешки с дефектами отбрасывали.

Был проведен анализ распределений по индивидуальным показателям растений для всех вариантов опыта, и было показано, что они подчиняются статистике Пуассона. Статистический анализ проводили с использованием пакета статистических программ SIGMA PLOT для PC с учетом вариабельности изучаемых показателей по растениям.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Естественный уровень ХА у гороха.** Как известно, уровень естественного мутирования в первичных корешках бобовых определяется аутомутагенными веществами кожуры [8,9] и условиями хранения. Средний уровень естественного мутирования при разных режимах влажности и температуры дан в табл.1.

Повышение естественного уровня ХА было вызвано повышенной температурой хранения ( $25^\circ\text{C}$ ) [10] и низкой влажностью семян [11]. Мы наблюдали динамику мутирования клеток при разных сроках фиксации (табл.1, рис.1,А). И при низком, и при высоком уровнях мутирования имеет место повышение естественного уровня ХА при более поздних сроках фиксации. Это объясняется аутомутагенными свойствами кожуры семян. Известно, что кожура бобовых содержит фенольные соединения, вызывающие ХА в корешках растений [12]. При низком уровне мутирования сроки прохождения первого митоза меньше, чем при высоком.

Таблица 1. Число клеток с абберациями в первом митозе в меристеме корешков проростков гороха в контроле с низким и высоким уровнями мутирования и при облучении в дозе 7 сГр при разных сроках фиксации

Вариант	Число растений	Срок фиксации	Изучено анафаз	Число клеток с абберациями, %		
				все абберации	одиночные фрагменты	мосты
К1	8	36 час	806	3.9±0.8	2.0±0.4	1.9±0.5
	5	48 час	617	6.2±1.3	2.7±0.5	3.5±0.8
К2	9	42	718	7.2±0.8	5.0±1.21	2.2±0.7
	8	46	611	9.7±1.4	6.1±1.9	3.6±1
0.3сГр/час	14	52	1334	10.8±1.7	7.3±1.1	3.5±0.7
	6	64	600	21.8±2.0	16.3±1.5	5.5±1.1
1.2сГр/час	12	42	932	7.1±1.3	5.6±1.3	1.5±0.9
	14	46	1515	8.4±0.6	4.3±0.6	4.2±0.5
19.1сГр/ч	7	42	564	3.1±0.7	1.9±0.6	1.2±0.3
	4	46	332	9.8±1.0	6.7±0.4	3.2±0.7
19.1сГр/ч	4	52	400	7.8±1.9	4.5±1.0	3.3±1.3
	9	52	649	10.9±1.1	8.7±2.6	2.0±0.5
	11	64	443	24.6±2.8	17.6±0.3	7.0±1.7

Повышение уровня естественного мутирования происходит за счет клеток с фрагментами, которые были зафиксированы в более поздние сроки. Подобную картину наблюдали на клетках лимфоцитов: после облучения количество клеток с фрагментами и дицентриками возрастало на поздних сроках фиксации [13].

**Зависимость митотического индекса и фаз митоза от мощности дозы.** При облучении в дозе 7 сГр время прохождения первого митоза сокращается, особенно при мощностях дозы 0.3-1.2 сГр/ч. В этих случаях происходит увеличение числа делящихся клеток за счет доли клеток в профазе в ранние сроки (табл.2). При мощности дозы 19.1 сГр/ч происходит сдвиг первого митоза клеток к поздним срокам.

Митотическая активность в этом диапазоне мощности дозы также меняется. В табл.2 даны максимальное и среднее значения митотического индекса в каждом варианте опыта. По этим показателям мощность дозы 0.3 сГр/ч немного угнетает митотическую активность клеток, а мощность дозы 1.2 сГр/ч - увеличивает. Мощность дозы 19.1 сГр/ч снижает митотическую активность.

Зависимость количества клеток с абберациями от времени фиксации представлена на рис. 1. Во всех случаях наблюдается увеличение числа клеток с абберациями при увеличении срока фиксации. Можно сразу отметить низкий постоянный уровень мостов и корреляцию общего количества клеток с абберациями с количеством клеток с фрагментами (табл.1).

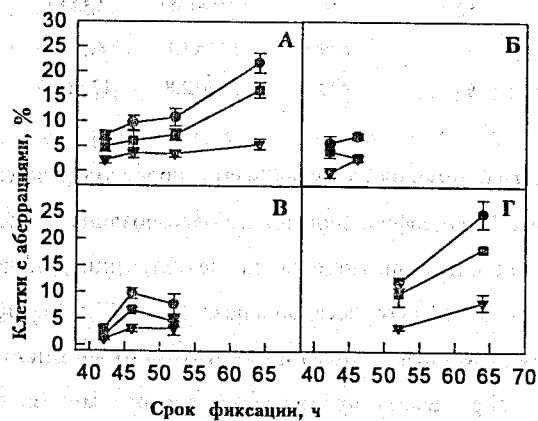


Рис.1. Выход ХА клеток гороха с высоким уровнем естественного мутирования в контроле и после облучения в дозе 7 сГр при разных сроках фиксации. А - контроль; Б - мощность дозы 0.3 Гр/ч; В - мощность дозы 1.2 сГр/ч; Г - мощность дозы 19.1 сГр/ч; ● - все абберации; ■ - фрагменты; ▼ - мосты и фрагменты.

Таблица 2. Митотическая активность клеток и фазы митоза после облучения в дозе 7 сГр при разных сроках фиксации

Мощность дозы, сГр/ч	Срок фиксации, ч	Число клеток	Митотический индекс и фазы митоза, %				
			Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза	МИ
контроль	42	4479	2.2±0.22	1.3±0.17	0.8±0.11	0.2±0.03	4.4±0.28
	46	3128	2.8±0.25	1±0.21	0.7±0.04	0.2±0.08	4.7±0.31
	52	14892	3.5±0.16	1.8±0.18	1.2±0.11	0.2±0.04	6.6±0.33
	64	6402	3.7±0.18	1.7±0.12	0.95±0.11	0.2±0.05	6.5±0.35
0.3	52	9336	2.8±0.36	1.5±0.36	0.8±0.23	0.2±0.01	5.4±0.46
	64	11195	2.5±0.14	0.8±0.11	0.4±0.71	0.2±0.02	3.8±0.25
1.2	42	4286	2.5±0.11	1.5±0.17	1.1±0.14	0.1±0.03	5.1±0.31
	46	4478	4.7±0.28	1.3±0.28	0.8±0.11	0.2±0.06	6.8±0.28
	52	4370	3.2±0.84	1.2±0.25	0.9±0.37	0.2±0.08	5.5±1.6
19.1	42	9336	2.9±0.32	1.2±0.09	0.8±0.04	0.1±0.02	5.0±0.27
	46	11195	3.8±0.24	1.3±0.13	0.9±0.07	0.2±0.03	6.1±0.24

Как известно, последними вступают в митоз наименее жизнеспособные клетки [14], несущие большее число повреждений [15, 16]. Можно предположить, что ХА в группе клеток, зафиксированных в контроле через 64 часа после облучения при мощностях дозы 0.3 сГр/ч и 1.2 сГр/ч, были частично отрепарированы, и эти клетки уже с меньшими повреждениями вступили в митоз в более ранние сроки. Напротив, при облучении с мощностью дозы 19.1 сГр/ч произошло увеличение числа ХА, которые сдвинули митоз клеток к более поздним срокам. Известно, что практически у всех эукариотических клеток в результате облучения происходит сдвиг G<sub>2</sub>. Этот сдвиг соответствует уровню экспрессии в G<sub>2</sub> митотических циклинов - белков, контролирующих цикл клетки, и зависит от дозы облучения [13].

В контроле с высоким уровнем мутирования при поздних сроках фиксации зарегистрировано примерно 35 % клеток от их общего количества с aberrациями. Посмотрим, что с этими клетками происходит при мощности дозы 0.3 и 1.2 сГр/ч. Вступление клеток в митоз произошло раньше: при 0.3 сГр/ч оно произошло с 42 до 46 часов, а при 1.2 сГр/ч - с 42 до 52 часов. Доля клеток с ХА также снизилась. В случае 0.3 сГр/ч в популяции находится 70 % клеток с aberrациями от их количества в контроле, а в случае 1.2 сГр/ч - только 50 %. То же мы видим на рис. 2, где представлена зависимость количества клеток с ХА от мощности дозы. При мощности дозы 0.3 сГр/ч процент aberrантных клеток снизился на 32 %, а при 1.2 сГр/ч - на 47 %.

В исследованиях [17] показано, что в процессе намачивания радиочувствительность семян увеличивается пропорционально времени намачивания. В наших опытах облучение в дозе 7 сГр совпадало с началом намачивания, и семена, облучавшиеся с мощностью дозы 0.3 сГр/ч, экспонировались 24 ч (1 гр.); 1.2 сГр/ч - 6 ч (2 гр.); 19.1 сГр/ч - 22 мин (3 гр.). Наиболее радиочувствительными из них являются те, которые облучались 24 часа. Выход ХА в семенах, облученных за 24 часа (0.3 сГр/ч) и 6 часов (1.2 сГр/ч) аналогичен [17]. В этих двух группах семян, надо полагать, основную роль играет время намачивания, которое в данных опытах обратно пропорционально мощности дозы облучения. Репарация повреждений в этих группах делает количество aberrантных клеток ниже контрольного, уровень ХА в каждой из этих групп будет зависеть от времени намачивания. В группе семян, облученных при мощности дозы 19.1 сГр/ч радиочувствительность еще меньше, и уровень ХА после облучения должен бы быть еще ниже. Однако уровень ХА возрос над спонтанным уровнем ХА, и мы наблюдаем прямую зависимость от мощности дозы облучения (рис. 2). Это означает, что произошло включение другой системы репарации, зависящей от мощности дозы.

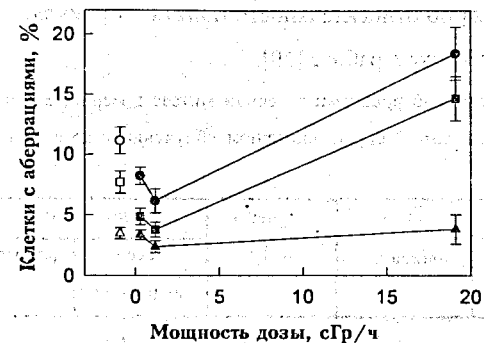


Рис.2 Зависимость выхода ХА клеток гороха с высоким уровнем естественного мутирования при облучении в дозе 7 сГр от мощности дозы. ● - все aberrации; ■ - фрагменты; ▲ - мосты с фрагментами.

Авторы [18] наблюдали переход от зависящей от мощности дозы индукции 6-тиогуанин-резистентных мутантов в клетках китайского хомячка к "безошибочной системе репарации" при уменьшении мощности дозы  $\gamma$ -облучения в области очень малых доз (0.4-40 мГр/ч).

**Адаптивный ответ клеток.** Для этих же семян был исследован адаптивный ответ по выходу ХА. Мощность дозы 1.2 сГр/ч и в этом случае явилась критической: при этой мощности дозы наблюдается задержка митоза и рост числа клеток с фрагментами (табл.3). Она соответствует максимуму выхода ХА, в сравнении с большей и меньшей мощностью дозы, включая облученный в острой дозе контроль (рис.3). Можно сказать, что эффект стимуляции при малых дозах предварительного облучения соответствует наибольшему повреждающему действию ионизирующей радиации при последующем облучении в острой дозе. Возможно также, что способность к адаптивному ответу клеток сопряжена с включением индуцибельной системы репарации в области 1.2 сГр/ч, и, так же, как эффект в этом диапазоне доз, увеличивается при росте мощности дозы предварительного облучения.

Этот факт говорит об относительности понятия "стимуляция при облучении", на что было указано также в работе [19].

Таблица 3. Число клеток с абберациями в первом митозе в меристеме проростков гороха при облучении в дозе 7 сГр и повторном облучении в дозе 50 Гр при разных сроках фиксации

Вариант	Число растений	Срок фиксации, ч	Изучено анафаз	Число клеток с абберациями, %		
				все абберации	фрагменты	мости
К	6	46	269	52.7±7.4	20.2±1.9	32.5±9.2
	5	52	144	63.4±6.0	33.7±3.7	29.7±4.5
	12	64	537	63.8±2.9	32.9±3.5	30.9±2.5
0.3сГр/ч	7	42	700	53.6±3.2	29.9±2.4	25.6±3.2
	7	46	673	57.8±2.5	28.0±2.7	27.9±2.0
	10	52	636	60.9±3.9	31.5±2.0	26.7±2.4
	11	64	934	61.7±2.9	38.5±1.8	23.2±1.5
1.2сГр/ч	7	46	264	47.8±5.1	27.0±5.2	20.8±3.4
	6	52	151	64.4±5.8	36.1±5.7	28.2±3.2
	16	64	1092	68.4±2.8	41.3±2.8	27.1±1.5
19.1сГр/ч	7	42	331	47.1±3.0	22.6±3.9	24.6±4.2
	9	46	803	49.3±2.2	28.8±1.9	20.6±2.4
	6	52	600	60.0±4.5	30.8±2.8	29.1±3.8
	2	64	104	40.5±4.8	21.6±2.6	18.9±2.2

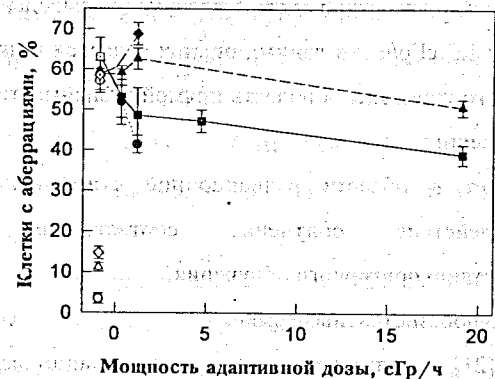


Рис.3. Зависимость АО клеток после облучения в дозе 7 сГр от мощности дозы. Повторная доза 50 Гр. Приведены результаты 4-х опытов. Опыты от 26 апреля и 10 июня были выполнены на семенах с низким уровнем мутирования. Опыты от 22 июля и 1 сентября выполнены на семенах с высоким уровнем мутирования.

Дата	Контроль	Облучение в дозе 50Гр	Облучение в дозе 50Гр +7сГр
26.04	□	□	□
10.06	○	○	○
22.07	△	△	△
1.09	◇	◇	◇

Рассмотрим нижнюю кривую, полученную по той же схеме для семян с низким уровнем ХА. Как видно, АО увеличивается с ростом мощности дозы. Точка мощности дозы 1.2 сГр/ч не выделяется. Однако видно, что большая радиочувствительность клеток приводит к большей величине адаптивного ответа клеток. Это находится в согласии с полученными данными о том, что дефектные по системе репарации клетки имеют меньшую величину адаптивного ответа [20].

На основании этих данных можно сделать следующие выводы:

1. Мощность дозы 1.2 сГр/ч в данных опытах является точкой перехода из области радиационного гормезиса в область прямой зависимости выхода ХА от мощности дозы облучения;

2. АО отсутствует в области радиационной стимуляции. Наибольшее стимулирующее действие облучения соответствует наибольшему повреждающему действию повторного облучения;

3. АО больше у радиорезистентных семян.

В исследованиях [21] выдвигается гипотеза, что радиационная стимуляция у растений происходит за счет репопуляции клеток. Если мы вернемся опять к зависимости выхода клеток с абберациями от сроков фиксации, то увидим, что при добавлении пробужденных покоящихся клеток к тем, которые представлены на рис.1.А, произойдет уменьшение среднего значения выхода ХА и увеличение дисперсии этого распределения. Это означает, что после облучения при мощностях дозы 0.3 и 1.2 сГр/ч (рис.1, Б,В) мы должны были бы фиксировать первый митоз и при 64 часах. Однако этого нет, и мы можем сказать, что гипотеза репопуляции без учета репарации клеток не проходит. Поэтому наиболее подходящими для описания наших данных являются модели индукции репарации [22,23].

Авторы выражают большую благодарность всем, кто поддержал эту работу в период разработки методики и обсуждения.

#### Литература

1. Бурлакова, Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В., Гуревич С.М., Жижина Г.П., Казаченко А.И., Конрадов А.А., Корман Д.Б., Молочкина Е.М., Наглер Л.Г.,

Озерова И.Б., Скалацкая С.И., Смотряева М.А., Тарасенко О.А., Треценкова Ю.А., Шевченко В.А.// Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т.36.Вып.4. С.610-631.

2. Petin V.G., Zhurakovskaya G.P.// Yeast. 1994. V.11. p.549-554.

3. Ганасси Е.Э.// Радиационное повреждение и репарация хромосом. М: Наука. 1976. С.103.

4. Гудков И.Н.// Клеточные механизмы пострадиационного восстановления растений. Киев: Наукова Думка. 1985. С.225.

5. Митрофанов Ю.А. // Радиобиология. 1986. Т.26. Вып.3. С.383-387.

6. Кузин А.М.// Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. М: Наука. 1995. С.158.

7. Luchnik, N.V., Fesenko E.V., Ovchinnikova V.G. // Mutat. Res. 1976. V.34. p.367-388.

8. Дубинин, Н.П., Щербаков В.К.//Докл.АН СССР.1964. Т.159.с.652

9. Пона Н.Е.//Генетика. 1969. Т.5. №9.с.53-60.

10. Навашин М.С., Герасимова Е.Н. // Биологический журнал, Т.4, Вып.4.С.593-634.

11. Н.В.Лучник// Биофизика цитогенетических повреждений и генетический код. Ленинград.: Медицина. 1968. С.296.

12. Levan A. and Lotfy T.// Hereditas. 1950. V.36. p.470-482

13. Boei J.J.W.A, Vermeulen S., Natarajan A.T.// Mutat.Res.1996. V.349.p.127-135.

14. Korogodina, V.L., Korogodin, V.I., N.V.Simonyan and E.S. Majorova. //Yeast. 1995. V.11.p.701-712.

15. Ritter S., E.Nasonova, M.Scholz, W.Kraft-Werather, G.Kraft. //Int.J.Radiat.Biol., 1996., vol.69, no.2, p.155-166.

16. Bernhard E.J., Maity A. Muschel R.J., McKenna W.G. //Radiat.Environ.Biophys. 1995. V.34.p.79-83.

17. *Н.А. Порядкова, Н.В. Тимофеев-Ресовский и Н.В.Лучник*// Труды Института Биологии Уральского филиала АН СССР. 1960. Вып.12. сс.159-188.
18. *Crompton N.E.A., Barth B., Kiefer J.* // *Radiat. Res.* V.124. P.300-308.
19. *Зяблицкая Е.Я., Гераськин С.А., Удалова А.А., Спирин Е.В.*// Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т.36. Вып. 4 С.498-505.
20. *Зюзиков Н.А.* //Материалы 1-ой открытой конференции молодых ученых ОИЯИ. 1997. Дубна (в печати).
21. *Серебряный А.М., Морозова,И.С.,Зоз Н.Н.*// Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т.34. Вып.6 С.818-826.
22. *Шевченко В.А., Печуренков В.Л., Абрамов В.И.*// Радиационная генетика природных популяций. М: Наука, 1992. 220 с.
23. *Гераськин С.А.* //Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т.35. Вып.5.С.571-580.

Рукопись поступила в издательский отдел  
30 сентября 1997 года.