

Н. И. ШАПИРО, Ю. А. МАНЦЫГИН, А. М. БАГРОВА

ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ И ЛУЧЕВАЯ ГИБЕЛЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 4 VIII 1969)

Многочисленные эксперименты, выполненные на самых разнообразных объектах, позволяют считать, что ядро является одной из наиболее радиочувствительных клеточных органелл. Больше того, в ряде исследований, проведенных в основном на половых клетках животных, показано, что причиной лучевой гибели этих клеток или их потомства является именно повреждение ядерного аппарата (¹⁻⁶). Однако подобные данные желательно иметь и в отношении соматических клеток, особенно млекопитающих. Это представило бы не только теоретический, но, вероятно, и практический интерес, поскольку можно полагать, что гибель облученных млекопитающих (по крайней мере при воздействии в дозах, вызывающих так называемую костномозговую смертность) является следствием репродуктивной гибели определенного вида клеток (⁷). Вместе с тем, число исследований, посвященных выяснению роли ядерных повреждений в лучевой гибели соматических клеток млекопитающих, весьма ограничено, а, главное, на основе приведенных в них данных нельзя сделать какого-либо определенного заключения по интересующему нас вопросу. В ряде случаев эти исследования методически несовершенны, поскольку они выполнены до того, как стала очевидной необходимость учитывать радиочувствительность различных стадий митотического цикла (⁸⁻¹²), а в других случаях полученные результаты противоречивы (^{13, 14}).

Вследствие этого мы сочли желательной постановку специальных экспериментов, цель которых — ответить на вопрос, какова роль ядерных повреждений в лучевой гибели (репродуктивной) соматических клеток млекопитающих.

Определив (путем использования модификаторов радиочувствительности) ряд достаточно резко отличающихся значений дозы, вызывающей одинаковую, например пятидесятипроцентную, гибель (LD_{50}), и облучая клетки в этих дозах, исследовали, будут ли они определять одинаковый выход хромосомных aberrаций. Если ядерные повреждения являются основной причиной репродуктивной гибели облученных клеток, то выход хромосомных aberrаций при используемых дозах воздействия должен быть строго постоянным и одинаковым во всех случаях. Больше того, если вновь возникшие грубые нарушения хромосомной структуры будут вызывать гибель облученных клеток при их делении, должно обнаружиться соответствие между частотой гибели клеток и числом клеток, несущих aberrации.

Исследование проведено на синхронизированных клетках китайского хомячка (клон 431, модальное число хромосом 22), которые культивировались на питательной среде Игла с добавлением 10—30% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков (100 ед на 1 мл пенициллина и 50 ед на 1 мл стрептомицина). Клетки росли на чашках Петри, содержащих 6—7 мл среды при регулируемом газовом (воздух + 5% CO_2) и температурном (37°) режимах. Синхронизация велась по методу Стаблфиль-

да (15), позволившему исследовать действие рентгеновских лучей (аппарат РУМ-11, 180 в, 15 ма, фильтры: Al 1 мм и Cu 0,5 мм, мощность дозы 160 р/мин) на выбранных стадиях митотического цикла G₁ и S поздняя. Индекс синхронизации в наших экспериментах был 0,86 (16). В качестве факторов, модифицирующих радиочувствительность клеток, был использован 5-бромдезоксисуридин (БУДР) (сенсibilизатор) и цистеамин (протектор). Включение БУДР в одну нить ДНК проводили в течение 12 час. после синхронизации, а в две нити — в течение 48 час. перед синхронизацией клеток. Концентрация БУДР — 5 мкг/мл. Раствор цистеамина (5 мМ) вводили за 30 мин. до облучения, после которого протектор удалялся.

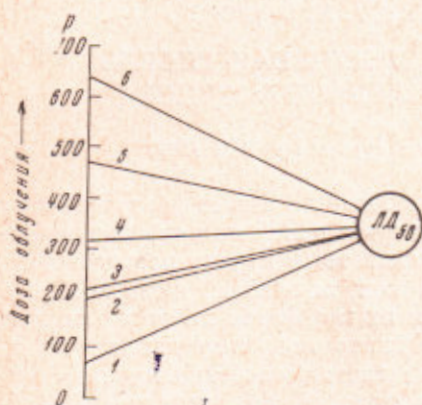


Рис. 1. Значения LD₅₀, полученные с помощью различных модификаторов радиочувствительности. 1 — доза 70 р, стадия G₁, БУДР (включение в обе нити ДНК), 2 — доза 200 р, стадия S поздняя, БУДР (включение в одну нить ДНК), 3 — доза 215 р, стадия G₁, 4 — доза 310 р, стадия S поздняя; 5 — доза 470 р, стадия G₁, цистеамин, 6 — доза 640 р, стадия S поздняя, цистеамин

Была изучена длительность митотического цикла и отдельных его стадий для клеток используемого клона, а также длительность задержки прохождения этих стадий, вызываемых как самим облучением, так и применением модификаторов радиочувствительности. Все эти вопросы исследовались в специальных экспериментах, в частности, с помощью радиоавтографии. Длительность митотического цикла изучаемых клеток в норме не превышала 16 час., в том числе стадия G₁ 4 часа и стадия S 9 час.

Хромосомный анализ проводился на стадии метафазы первого пострадиационного деления клеток, фиксированных смесью этилового спирта с уксусной кислотой (3:1) и окрашенных ацетоорсеином. Отмечались перестройки хромосомного типа: дигцентрические хромосомы, кольцевые хромосомы, фрагменты и хроматидного типа — четкие разрывы, обмены. Бреша (пробелы) не учитывали.

Прежде всего были получены кривые, характеризующие зависимость гибели клеток от дозы облучения, и определено значение LD₅₀ для стадии G₁ и S поздняя во всех вариантах опыта. Выживаемость определялась методом, разработанным Паком (8), путем учета числа хорошо видимых колоний, проявляющихся через 8—10 суток после посева определенного числа клеток.

Значение вычисленных LD₅₀ представлено на рис. 1 в виде схемы.

Как видно из приведенных на рис. 1 данных, используя модификаторы радиочувствительности, нам удалось получить достаточно разнообразные значения LD₅₀, причем крайние варианты этих величин отличались почти на целый порядок (доза 70 р на стадии G₁ при введении БУДР в обе нити ДНК и доза 640 р на стадии S поздняя при введении цистеамина). Согласно данным табл. 1, при всем разнообразии доз облучения, вызывающих одинаковую гибель клеток, количество клеток, несущих хромосомные нарушения весьма постоянно во всех вариантах опыта. Это постоянство устанавливается и в отношении числа возникающих хромосомных aberrаций. Необходимо также отметить (хотя эти данные здесь не приводятся), что не меняется от опыта к опыту и соотношение видов хромосомных нарушений.

Таким образом, можно заключить, что при всех испытанных дозах облучения, вызывающих одинаковую гибель клеток, выход хромосомных aberrаций остается практически одинаковым. Этот ответ, как мы уже

указывали, и должен был быть получен в случае, если вклад ядерных повреждений в лучевую гибель клеток достаточно велик и постоянен. О размере этого вклада можно получить сведения из сопоставления количества клеток, погибающих после облучения, с числом клеток, содержащих хромосомные aberrации. Но этот вопрос требует более подробного рассмотрения. Здесь прежде всего необходимо обратить внимание на то, что в графе «количество гибнущих клеток» табл. 1 фигурирует не только пятидесятипроцентная их гибель, но и (примерно) семидесятипроцентная. Это изменение численности погибающих клеток есть следствие учета методических особенностей эксперимента. При использованной нами методике синхронизации (сбор делящихся клеток, находящихся в основном на стадии метафазы), как правило, начало колонии дают не одиноч-

Таблица 1

Гибель облученных клеток китайского хомячка и выход хромосомных aberrаций (в процентах)

Варианты	Количество гибнущих клеток		Метафазы, содержащие хромосомные aberrации	Всего aberrаций (на 100 клеток)
	эмпирически установленное	после введения поправки на «множественность»		
Контроль	—	—	7,00±1,04	7,66±1,28
G ₁ (215 p)	49,46±0,91	69,82	73,34±1,99	168,00±6,03
G ₁ БУДР, 48 ч. (70 p)	46,62±0,84	67,61	76,00±4,27	182,00±13,26
G ₁ , цистеамин (470 p)	49,93±0,58	70,15	74,00±2,53	169,00±6,10
S поздняя (310 p)	49,12±0,48	69,65	79,50±2,85	160,50±10,65
S поздняя, БУДР, 12 ч. (200 p)	49,03±1,20	69,50	79,00±2,88	165,00±10,90
S поздняя, цистеамин (640 p)	48,21±0,70	68,71	76,00±3,02	157,00±10,13
Среднее	48,73±0,55	69,25	76,47±1,1	167,83±3,99

ные клетки, а две клетки. Отсюда ясно, что величина летальности, определяемая по соотношению числа посеянных клеток и образовавшихся из них колоний, оказывается заниженной и не соответствует реальному числу погибших от облучения клеток. Это обстоятельство не имело значения, пока рассматривался вопрос о том, одинаков ли выход хромосомных aberrаций при использовании различных доз облучения, вызывающих одну и ту же величину гибели соматических клеток. При переходе же к сопоставлению числа погибающих клеток с числом клеток, содержащих хромосомные aberrации, необходимо знать именно реальную величину гибели одиночных клеток. Эта величина вычисляется по формуле (17): $S = 1 - (1 - f)^{1/\bar{N}}$, где S — выживаемость отдельных клеток; f — выживаемость микроколоний; \bar{N} — «множественность клеток» (число клеток, давших начало колониям). Искомая величина гибели отдельных клеток оказалась равной примерно 70%.

Таким образом, использованные в работе дозы облучения определяли гибель не 50% клеток, а около 70%. Эту цифру и надо сопоставлять с числом клеток, содержащих ядерные повреждения. Сопоставление средних значений названных двух цифр выявляет их большее сходство (соответственно 69,25 и 76,47). Это сходство, возможно, в действительности еще более полное. Число клеток, содержащих хромосомные aberrации несколько завышено так как мы учитывали их в тот срок, когда они представлены в максимальном количестве. Вместе с тем, число aberrантных клеток несколько уменьшается в более поздние сроки фиксации (не выходящие за пределы первого пострadiaционного митоза) (18).

Таким образом, рассматривая представленные в статье материалы в целом, можно заключить, что практически вся лучевая гибель (репродуктивная) соматических клеток китайского хомячка идет за счет хромосомных aberrаций.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
18 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. E. Lea, *Actions of Radiation on Living Cells*, Cambridge, 1946. ² Б. Л. Астауров, Журн. общ. биол., 8, № 6, 424 (1947). ³ Б. Л. Астауров, В сборн. Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений, Изд. АН СССР, 1963, стр. 140. ⁴ Н. П. Дубинин, Проблемы радиационной генетики, М., 1961. ⁵ Н. И. Шапиро, В кн. Основы радиационной биологии, «Наука», 1964, стр. 131. ⁶ D. K. Davies, H. J. Evans, In: *Advances Rad. Biol.*, N. Y.—London, 2, 1966, p. 243. ⁷ Е. Д. Плотникова, Н. И. Шапиро, Генетика, № 6, 5 (1965). ⁸ T. T. Puck, P. I. Marcus, *J. Exp. Med.*, 103, 653 (1956). ⁹ T. T. Puck, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 44, 772 (1958). ¹⁰ M. A. Bender, S. Wolff, *Am. Natur.*, 95, 39 (1961). ¹¹ C. L. Greenblatt, *Intern. J. Rad. Biol.*, 4, 185 (1961). ¹² И. М. Шапиро, Э. Н. Фалеева, Радиобиология, 5, 873 (1965). ¹³ W. C. Dewey, *Radiation Res.*, 31, 577 (1967). ¹⁴ C. Yu. W. K. Sinclair, *J. Nat. Cancer Inst.*, 39, 619 (1967). ¹⁵ Stubblefield, R. Klevecz, L. Deaven, *J. Cell. Physiol.*, 69, 345 (1967). ¹⁶ L. K. Blumenthal, S. A. Zhaler, *Science*, 135, 724 (1962). ¹⁷ W. K. Sinclair, R. A., *Radiation Res.*, 29, 450 (1966). ¹⁸ Ю. А. Манцыгин, А. М. Багрова, Н. И. Шапиро, Генетика, № 12 (1969).