

Ю. С. ДЕМИН, Т. В. ЕЛИСОВА

**АНАЛИЗ «ПЕРИОДА СЛИПАНИЙ» ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN VITRO В СВЯЗИ С МЕХАНИЗМОМ
ОБРАЗОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ МУТАЦИЙ**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 22 XII 1969)

Механизм образования перестроек хромосом все еще остается неясным. Почти все исследователи проводят анализ на сроках, достаточно удаленных от времени действия радиации на хромосому. Однако в этот период для анализа доступны, как правило, уже сформированные перестройки. Период, занимающий первые 1—2 часа после облучения, так называемый период слипаний хромосом, из анализа обычно выпадает. Есть три основных взгляда на природу слипаний. Согласно первому (¹), слипание хромосом представляет собой физиологический эффект действия радиации и к образованию хромосомных перестроек отношения не имеет. Согласно второму (²), слипания — это субхроматидные перестройки. И, наконец, существует мнение, что слипания есть замаскированные хроматидные перестройки (^{3, 4}). Первые две гипотезы не имеют достаточных экспериментальных доказательств, и в дальнейшем мы к ним возвращаться не будем. Что касается третьей точки зрения, то было показано, что период слипаний и образование по крайней мере одного типа аберраций — изолюкусных делеций являются взаимосвязанными процессами. Эта связь была объяснена тем, что образование изолюкусных перестроек имеет временную протяженность, а период слипаний есть период формирования этого типа аберраций.

Работы, где устанавливается связь между периодом слипаний и механизмом образования перестроек хромосом, проведены на растительном материале. Однако найдено качественное различие между спектром хромосомных перестроек в клетках растений и млекопитающих (⁵). Если период слипаний действительно является начальным периодом образования хромосомных перестроек, то можно предположить, что в клетках млекопитающих он будет протекать не так, как в растительном материале. Установление характера поведения хромосом в первые часы после облучения может, в свою очередь, дать нам сведения о подходах к модификации действия радиации на хромосому и к защите наследственных структур от повреждающего действия излучений. Настоящая работа была поставлена для изучения хромосомного аппарата клеток млекопитающих в первые часы после действия радиации, т. е. для изучения периода слипаний в этих клетках.

Работа проведена на клетках эмбриональных фибробластов человека и на легочных клетках мышей-сосунков in vitro. Культуру получали по методике (⁶). Клетки облучали на аппарате РУП-200—20—5 (Cu 0,5 мм + Al 1,0 мм). Учитывали нарушение хромосом: в клетках мышей на стадии анафазы через 10; 20; 30; 45 мин. и 1; 3; 4; 5 час. после облучения дозой 100 р, в клетках человека — на стадии анафазы через 30; 45 мин. и 1; 2; 3; 4 часа и на стадии метафазы через 0,75; 1; 2 часа после облучения дозой 50 р. К категории слипаний относили как типичные картины, так и одиночные и множественные мосты без фрагментов (рис. 1), исходя из того, что терминальные слипания могут иметь вид типичного моста.

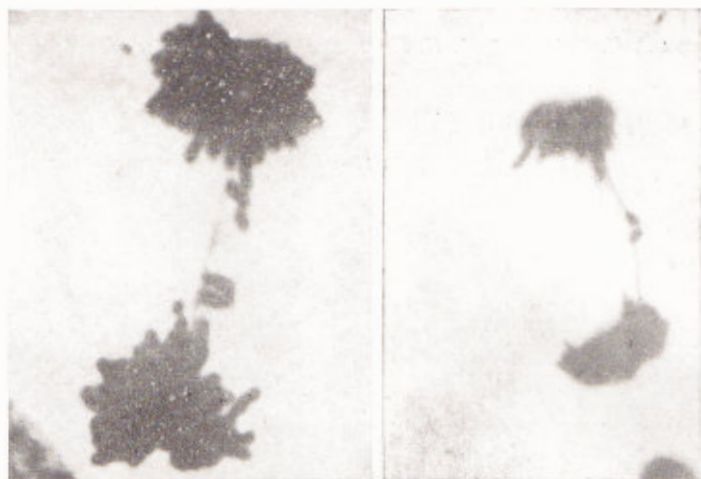


Рис. 1. Типы слипаний хромосом

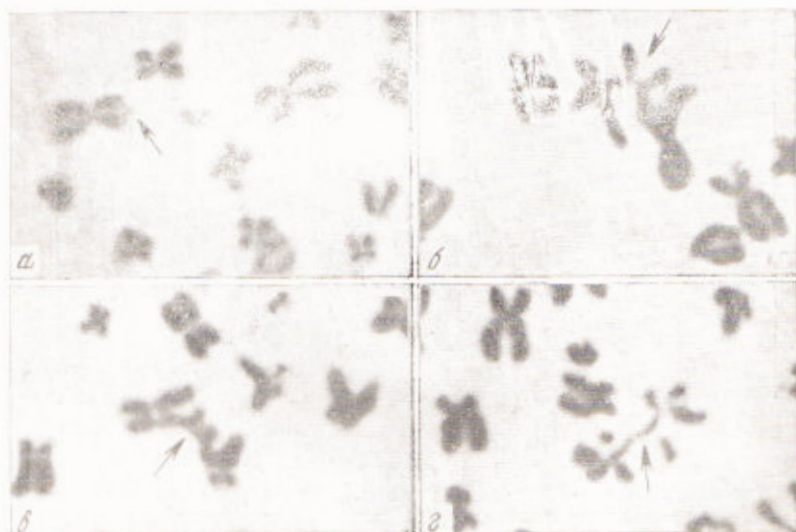


Рис. 2. Картины «становления» обменных перестроек на стадии метафазы. а — изолюкусный обмен; б, в, г — транслокации

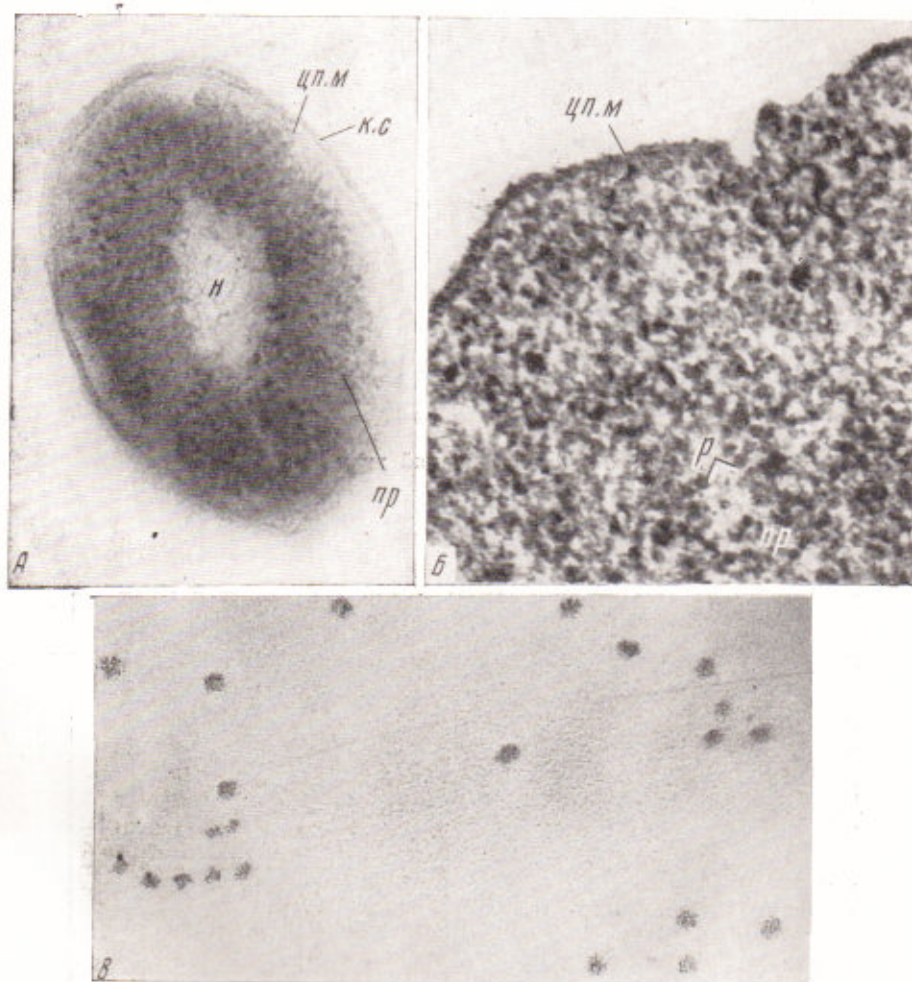


Рис. 3. Электронномикроскопические снимки *Bac. coagulans*. А — ультратонкий срез intactной клетки (фиксация осмием, контрастирование уранилацетатом, 120 000 $\times$). Б — фрагмент протопласта (фиксация глутаральдегидом, контрастирование свинцом, 150 000 $\times$). В — изолированные рибосомы гялоплазмы (контрастирование уранилацетатом, 125 000 $\times$). к.с. — клеточная стенка, ц.п.м. — цитоплазматическая мембрана, р — рибосомы, пр — изолирибосомы, н — нуклеоид

Из табл. 1 можно видеть, что частота анафазных нарушений, отнесенных нами к категории слипаний, уже через 30 мин. после облучения статистически достоверно превышает уровень контроля; через 1—2 часа эта частота достигает максимума, а затем снижается, но и на последней точке анализа остается статистически достоверно выше контрольного уровня. Хромосомные перестройки в количестве, статистически отличном от уровня контроля, появляются

Таблица 1

Анализ клеток человека *in vitro* на стадии анафазы
(дозы 50 р)

Время после облучения, час.	Число изуч. клеток	Частота клеток со слипаниями, %			Частота клеток с абберациями, %
		слип.	мосты	всего	
0,5	462	3,5	1,7	5,2±1,0	—
0,75	937	1,8	1,5	3,3±0,6	1,5±0,4
1	672	4,9	3,3	8,2±1,0	7,7±1,0
2	175	8,6	1,1	9,7±2,3	23,4±3,2
3	244	1,2	2,1	3,3±1,1	18,8±2,5
4	452	0,4	2,2	2,6±0,7	11,8±1,5
Контр.	688	0,3	0,3	0,6±0,3	0,9±0,4

через 1 час после облучения. Затем, вплоть до 4 часа, уровень перестроек превышает уровень слипаний. Аналогичная динамика нарушений получена при анализе культуры клеток мышеч-сосунков. Анализ метафаз был проведен с целью установления качественной картины хромосомных нарушений. Это необходимо было сделать в связи с тем, что нарушения, регистрируемые в анафазе как хромосомные фрагменты, в действительности могут быть отстающими хромосомами, а не результатом разрывов хромосом. Оказалось, что перестройки хромосом появляются через 1 час после облучения. Это согласуется с результатами анализа нарушений в анафазе. Кроме того, при анализе обменных перестроек в метафазах на точках 1 и 2 часа мы вынуждены были обратить внимание на морфологию этого типа нарушений. Большинство из них (23 случая из 31 транслокации) находились как бы на стадии образования, когда обменные процессы еще не успели закончиться. Мы наблюдали все переходные стадии этого процесса — от едва заметной конъюгации хроматид двух близлежащих хромосом до типичного, но еще не законченного обмена (рис. 2). Однако для того, чтобы свести к минимуму возможность ошибки вследствие субъективности оценки таких «стертых» случаев, мы вынуждены были учитывать только те из них, в отношении которых не было сомнений. Такие же картины «становления» наблюдались и для изолюкусных разрывов (рис. 2), но значительно реже. Возможно, это связано с трудностью учета. В целом, при анализе метафаз на точках 1 и 2 часа после облучения морфология всех типов аббераций позволяет сделать допущение, что процесс образования перестроек к этому времени еще не закончился.

В предыдущей работе было показано ⁽⁵⁾, что преобладающим типом аббераций в клетках млекопитающих на стадии G₂ являются хроматидные делеции. Если период слипаний действительно является отражением обменных процессов, то частота слипаний в клетках млекопитающих никогда не должна достигать общего уровня нарушенных митозов (что найдено в растительном материале ⁽⁴⁾), так как значительная доля поврежденных клеток будет вести необменные перестройки (делеции). Именно такая картина получена нами в настоящей работе. Этот этап анализа позволяет заключить, что в клетках млекопитающих слипания представляют собой обмены между хроматидами, которые не успели завершиться к моменту вступления клетки в митоз.

До сих пор оставался открытым вопрос, являются ли слипания стадией формирования только изолюкусных перестроек или этот феномен присущ также и другим обменным абберациям. Мы думаем, что наш материал позволяет заключить, что все хроматидные обмены в начальный период их

образования дают феномен слипаний. Из представленных микрофотографий (рис. 2) можно видеть, что если бы клетка не была заблокирована колхицином, а вошла в обычную анафазу, то мы наблюдали бы типичную картину слипаний. Эти картины мы трактуем как становление обменной перестройки.

Кроме того, «анафазный» и «метафазный» анализы показывают, что делеции также не появляются сразу же после облучения, т. е. для их образования требуется определенное время. Полученный нами материал по динамике слипаний хромосом и хромосомных aberrаций, а также морфология aberrаций на стадии метафазы позволяют сделать предположение, что образование всех типов хромосомных aberrаций есть процесс, имеющий временную протяженность. Нам хотелось бы подчеркнуть важность этого момента с точки зрения возможности модификации радиационных повреждений. Действительно, если сразу после облучения хромосома не рвется, то теоретически время «становления» хромосомной мутации может быть использовано для снятия тем или иным путем радиационного поражения.

Полученный материал позволяет также высказать некоторые соображения о механизме образования хромосомных мутаций. Образование хромосомной перестройки — многоступенчатый процесс. Aberrация не возникает сразу же вслед за поражением. Возникшее после действия мутагенного фактора поражение или реализуется, или репарируется. Реализация может развиваться в двух направлениях и приводить к образованию или разрывов (делеций), или обменных aberrаций. Для того чтобы произошла обменная перестройка, требуется контакт пораженных локусов. Затем происходит разрыв и рекомбинация фрагментов. Необходимо подчеркнуть, что, согласно нашей схеме, контакт и разрыв — независимые события (в отличие от схемы Ривелла⁽⁶⁾). Разрыв происходит независимо от контакта, примером чему, по нашим наблюдениям, может служить образование делеций⁽³⁾. Следовательно, разрыв и контакт — явления, между собой не связанные. Но обмен, вероятно, всегда начинается с контакта. Наша схема сводится, таким образом, к формуле «контакт, затем обмен». В той части, которая касается обменных перестроек, предлагаемая схема близка, по-видимому, к обменной гипотезе Серебровского⁽⁷⁾.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Е. Ли, Действие радиации на живые клетки, М., 1963, стр. 150. ² L. F. La Cour, R. Rutishauser, *Chromosoma*, 6, № 8, 696 (1953). ³ G. Ostergren, T. Wakonig, *Botaniska Notiser*, 4, 357 (1954). ⁴ Б. Н. Сидоров, Н. Н. Соколов, Ю. С. Демин, *Радиобиология*, 6, в. 1, 84 (1966). ⁵ Ю. С. Демин, Б. Н. Сидоров, Н. Н. Соколов, *Генетика*, № 6, 10 (1967). ⁶ S. H. Revell, *Proc. Radiobiol. Symp.*, Liege, 1954, Butterworth, London, 1955, p. 243. ⁷ A. A. Se-rebrovsky, *Am. Natur.*, 63, № 687, 374 (1929).