

Член-корреспондент АН СССР Н. И. НУЖДИН, Н. С. САМОХВАЛОВА,
И. А. НЕЧАЕВ, Э. М. ШЕКШЕЕВ

**ХРОМОСОМНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ В КЛЕТКАХ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ПОСЛЕ
ОДНОКРАТНОГО И ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ
В АЗОТЕ И НА ВОЗДУХЕ**

Изучение процесса становления хромосомных мутаций в биологических системах с пониженным метаболизмом с использованием разных форм подачи энергии излучения, разных по продолжительности периодов разрыва между фракциями и сроков пострadiационного хранения, а также связей между выходом мутаций и изменением спектра свободных радикалов заслуживает внимания в связи с решением проблемы мутагенеза.

Семена ячменя сорта Одесский 17, находящиеся в состоянии вынужденного покоя, были однократно (15 и 7,5 кр) и фракционированно (7,5 + 7,5 кр) облучены гамма-лучами Cs^{137} при интенсивности излучения 620 р / мин и влажности семян, равной 8%. Облучение и пострadiационное хранение семян проводилось в атмосфере азота и на воздухе при комнатной температуре. В сериях с однократным облучением полудозой 7,5 кр определение э.п.р. и постановку семян на проращивание для цитологического анализа проводили в сроки 0, 15, 30, 90, 240 мин, 1, 4 и 8 сут., после облучения в дозе 15 кр — 0, 30, 60, 180, 460 мин., 2 и 8 сут. Фракционированное облучение проводили с интервалами между фракциями 15, 30, 90, 240 мин., 1, 4 и 8 сут., которые соответствовали срокам хранения семян после однократного облучения их в дозе 7,5 кр. Проращивание семян и определение сигналов э.п.р. проводили как сразу после подачи второй полудозы, так и в разные сроки пострadiационного хранения, соответствующие времени хранения семян после однократного облучения в дозе 7,5 кр.

Изучался выход аберрантных клеток (с ацентрическими фрагментами и децентрическими мостами) в поздней анафазе и ранней телофазе первых митозов меристемы кончиков первичных корешков. У проросших семян, число которых в каждом варианте было не менее 30, фиксировали главный корешок. Запись спектров э.п.р. проводилась у целых семян на стандартном радиоспектрометре.

Данные опыта, проведенного на воздухе, свидетельствуют о том, что пострadiационное хранение семян, облученных однократно в дозах 7,5 и 15 кр, приводит к достоверному увеличению числа аберрантных клеток (рис. 1, 1 и 2). Как видно из рисунка, обе кривые идут практически параллельно, различаясь своим положением по оси ординат. Это показывает, что нарастание аберрантных клеток в зависимости от срока пострadiационного хранения семян идет с одинаковой интенсивностью как при облучении в дозе 15 кр, так и в дозе 7,5 кр и, таким образом, не зависит (по крайней мере в исследованных диапазонах) от величины дозы. Это особенно отчетливо выявляется при обработке материала методом наименьших квадратов для вариантов 15 кр на отрезке от 8 час. до 8 сут. и для варианта 7,5 кр — от 1 до 8 сут. Соответствующие углы наклона линии регрессии очень близки (1,63—15 кр и 1,44—7,5 кр) (рис. 2).

Сопоставляя результаты выхода аберрантных клеток при однократном облучении семян в дозах 7,5 и 15 кр, необходимо отметить, что в пределах

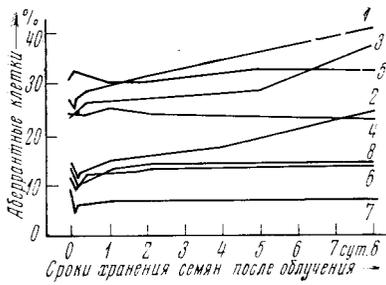


Рис. 1

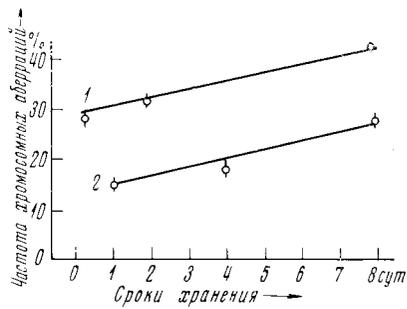


Рис. 2

Рис. 1. Выход хромосомных aberrаций в меристематических клетках первичных корешков семян ячменя в разных вариантах опыта. Воздух: 1 — 15 кр, 2 — 7,5 кр, 3 — фракционированное облучение с интервалами 15 мин., 4 — 1 сут., 5 — 8 сут. Азот: 6 — 15 кр, 7 — 7,5 кр, 8 — фракционированное облучение с интервалом 1 сут.

Рис. 2. Влияние сроков хранения семян на частоту хромосомных aberrаций в меристематических клетках первичных корешков семян ячменя после облучения в дозах 15 (1) и 7,5 (2) кр.

первых суток после облучения эффект хранения не проявляется. Наличие пострadiационной лаг-фазы было показано и в других исследованиях (2, 3).

Проведение опытов с фракционированием основной дозы 15 кр на две фракции с различными по длительности интервалами между полудозами позволило получить следующие результаты (рис. 3). Эффект фракционирования при облучении на воздухе наблюдается уже при интервале между фракциями, равном 15 мин. Однако в этом случае влияние фракционирования еще не является завершенным, так как увеличение срока хранения после воздействия второй полудозы приводит к увеличению повреждающего действия радиации, чего не наблюдается в вариантах с облучением второй полудозой через 1 сут. и 8 сут. после первой фракции (рис. 1). Максимальный эффект фракционирования падает на интервал, равный 1 часу (рис. 3), дальнейшее увеличение времени разрыва между фракциями приводит не к увеличению, а к снижению эффекта фракционирования. Причиной нарастания aberrантных клеток, наблюдающегося при интервалах в одни сутки и более, является отчетливо проявляющийся к этому времени эффект хранения, как последствие первой фракции облучения. Длительность пострadiационного хранения по окончании воздействия второй полудозы не влияет на процент aberrантных клеток: эффект хранения, обусловленный последствием облучения второй фракцией, отсутствует (рис. 1, 4, 5). Анализ результатов по фракционированию подтвердил ранее полученные данные (1, 2), что эффект фракционирования в основном зависит от снижения эффекта второй полудозы. На рис. 4 представлены результаты опыта с облучением полной дозой 15 кр, данной фракционированно, и опыта с облучением в дозе 7,5 кр при однократном ее воздействии. Кривая 3 отражает эффект второй полудозы.

Влияние азота, использованного в газовой фазе в момент облучения и последующего (до 8 сут.) хранения сухих семян, проявилось в снижении частоты aberrантных клеток по сравнению с облучением на воздухе. При облучении и хранении семян в азоте отсутствуют эффект хранения и эффект фракционирования дозы. Фракционированное облучение в азоте показывает сходные с однократным полным облучением результаты. Это свидетельствует о том, что при облучении и хранении в азоте реализуются лишь истинные поражения (поражения I класса). Следовательно, и эффект хранения, и эффект фракционирования связаны с потенциальными поражениями (поражения II и III классов).

Изложенные результаты опытов по фракционированному облучению сухих семян ячменя нельзя объяснить ни с позиции классической теории

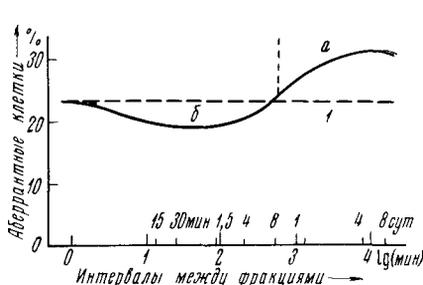


Рис. 3

Рис. 3. Влияние продолжительности интервала между полудозами на выход хромосомных аберраций при фракционированном облучении семян ячменя. *а* — проявление эффекта хранения 1-й полудозы, *б* — эффект фракционирования. *1* — линия, соответствующая 15 кр без хранения

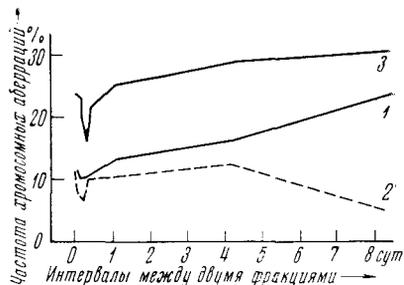


Рис. 4

Рис. 4. Влияние 1-й и 2-й фракций облучения на выход хромосомных аберраций в меристематических клетках первичных корешков семян ячменя в зависимости от длительности интервалов между полудозами. *1* — 1-я фракция 7,5 кр, *2* — 2-я фракция 7,5 кр, *3* — суммарный эффект 7,5 + 7,5 кр

Сакса и Ли, ни с позиции теории восстановления. Полученные данные отличаются и от результатов, обнаруженных в опытах Лейна и других авторов (⁴⁻⁸). Согласно гипотезе, выдвинутой Лейном, первая полудоза при фракционированном облучении вызывает в клетке лишь временное нарушение ее физиологического состояния. По истечении некоторого периода нормальное состояние клетки восстанавливается, у хромосом возобновляется прежняя способность к образованию индуцированных повреждений. В нашем опыте такие циклические изменения при облучении сухих семян на воздухе не обнаружены: «защитный» эффект первой полудозы сохраняется в течение 8 сут. Это, однако, не опровергает приведенной интерпретации Лейна, а лишь свидетельствует о специфике использованного в эксперименте материала (²).

Количественный анализ свободнорадикального состояния облученных семян, проведенный параллельно с цитологическим, дал возможность исследовать первичную реакцию клетки на облучение и провести сравнение свободнорадикального состояния субстрата с видимым биологическим повреждением.

Данные опытов с однократным облучением и последующим хранением семян на воздухе свидетельствуют об отсутствии линейной зависимости образования радикалов от дозы: доза 15 кр дала лишь незначительный прирост в величине спектров сигналов э.п.р. по сравнению с дозой 7,5 кр. На протяжении первых (до 4) часов после облучения в дозе 7,5 и 15 кр величина сигналов э.п.р. стабильно держится на высоком уровне, после чего резко падает, что связано с распадом радикалов. Необходимо подчеркнуть, что в этот период при цитологическом анализе установлено нарастание количества аберрантных клеток: начало распада радикалов совпадает с моментом ликвидации лаг-фазы и началом проявления «эффекта хранения».

По сравнению с однократным облучением полной дозой, фракционированное облучение на воздухе с использованием различных интервалов между полудозами снижает количество индуцированных свободных радикалов, причем на долю второй фракции приходится весьма незначительный радиобиологический эффект. Скорость распада свободных радикалов увеличивается при наложении действия второй полудозы. Длительность интервалов между двумя полудозами при облучении на воздухе имеет большое значение: при увеличении интервала до 4 час. и более происходит снижение в выходе свободных радикалов. Длительность же хранения семян после воздействия второй фракции облучения, как показали полученные данные, не вызывает изменений в величине спектров э.п.р.

Измерение спектра э.п.р. у семян, облученных в азоте, показало сходную закономерность, что и в вариантах с облучением на воздухе: доза 15 кр индуцирует лишь небольшой прирост в выходе свободных радикалов по сравнению с дозой 7,5 кр. Однако длительность пострадиационного хранения в азоте не сказывается на величине спектров э.п.р.

Фракционированное облучение в азоте дает спектры э.п.р., по своей величине не превышающие величин, индуцированных дозой 7,5 кр, данной однократно. О причинах повышения выхода свободных радикалов в двух вариантах опыта с продолжительностью интервалов между фракциями в полтора часа и четверо суток сказать что-либо определенное трудно. Однако необходимо отметить, что колебания в величине спектров э.п.р. при облучении и хранении в азоте не сказываются на частоте aberrантных клеток, как это имеет место в вариантах с облучением на воздухе. Хранение семян в азоте после фракционированного облучения в той же среде не приводит к изменению в выходе свободных радикалов.

При облучении сухих семян на воздухе возникают повреждения разного типа. Истинные нарушения проявляются сразу в виде хромосомных aberrаций, потенциальные для своей реализации требуют особых условий и времени. Азот во время воздействия гамма-лучей и при пострадиационном хранении не дает возможности возникнуть и реализоваться многим группам свободных радикалов, большинство из которых ответственны за потенциальное повреждение клетки. При облучении в азоте индуцируются лишь два типа свободных радикалов: стабильные и нестабильные к азоту (⁹, ¹⁰). Методом э.п.р. обнаруживаются лишь стабильные к азоту радикалы, интенсивность которых, согласно полученным данным, в малой степени зависит от дозы и не зависит от сроков пострадиационного хранения.

Данные опыта с облучением и хранением семян на воздухе и в азоте согласуются с гипотезой Конжера (¹¹), что только те эффекты усиливают биологическое воздействие, которые увеличивают образование свободных радикалов, проявляющихся немедленно после облучения, и ускоряют их распад. Кислород воздуха, присутствующий во время облучения и при хранении семян, взаимодействует с определенной группой индуцированных радикалов и приводит в итоге к резкому усилению радиобиологического эффекта и снижению уровня радикалов.

Приведенные данные по числу aberrантных клеток и выходу свободных радикалов в клетках при разных вариантах облучения сухих семян в воздухе и в азоте дают возможность установить, что снижение радиационного повреждения при фракционированном облучении обусловлено уменьшением эффекта второй полудозы. Изменения, вызванные первой фракцией облучения в клетках семян ячменя, способны длительное время (в нашем опыте до 8 сут.) воздействовать на реакцию биологической системы к повторному облучению, намного смягчая радиобиологический эффект гамма-лучей.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцшино-на-Оке

Поступило
2 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. И. Нурдип, Р. Л. Дозорцева, Н. С. Самохвалова, Сборн. Действие ионизирующих излучений на растительный и животный организм, «Наука», 1965, стр. 4. ² Н. И. Нурдип, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 883 (1970). ³ Н. И. Нурдип, Р. Л. Дозорцева, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1 (1972). ⁴ G. R. Lane, Heredity, 5, 1 (1951). ⁵ G. R. Lane, Heredity, 6, Suppl. 23 (1953). ⁶ H. J. Evans, In: Genetical Aspects of Radio Sensitivity: Mechanisms of Repair, Proc. of a Panel, Vienna, 1966, p. 31. ⁷ D. R. Davies, E. T. Wall, Genetics, 46, 787 (1961). ⁸ Н. В. Лучник, Биофизика, 1, 7, 633 (1956). ⁹ N. J. F. Dodd, M. Ebert, Int. J. Radiat. Biol., 18, 5, 463 (1970). ¹⁰ Ibid., p. 451. ¹¹ А. Д. Конжер, Сборн. Восстановление клеток от повреждений, 1963, стр. 46.