

Н. В. ЛУЧНИК, К. Н. МОРОЗОВ, Э. В. ФЕСЕНКО, В. А. ЛЫЧЕВ

ВЛИЯНИЕ СТАДИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ВРЕМЕНИ ФИКСАЦИИ НА ЧАСТОТУ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ОБЛУЧЕНИЕМ

(Представлено академиком С. С. Шварцем 25 V 1973)

В опытах по вызыванию хромосомных aberrаций с изменением стадии клеточного цикла, на которой происходит воздействие мутагеном, изменяется и интервал времени между воздействием мутагена и фиксацией. Поэтому наблюдающиеся различия в количественном выходе aberrаций разные авторы связывают либо с разной чувствительностью разных стадий цикла, либо с разной степенью пострadiационного восстановления (¹⁻⁴). Разделить влияние этих двух факторов можно с помощью радиоактивной метки, что и было сделано в настоящей работе.

Семена *Crepis capillaris* проращивали в течение 30 час. на влажной фильтровальной бумаге. Импульсная метка H^2 -тимидином (концентрация 7 μ С/мл, уд. активность 4,2 С/ммоль) давалась в течение 20 мин.; в течение следующих 20 мин. невключенный тимидин отмывали проточной водой и проростки облучали гамма-лучами Co^{60} в дозе 400 рад при мощности дозы 20 рад/мин. Через разное время после облучения проростки помещали на 2 часа в 0,01% раствор колхицина и фиксировали в смеси Карнуа. На окрашенных ацетокармином препаратах исследовали метафазы на наличие и характер хромосомных aberrаций, отмечая их координаты на препарате и схематически зарисовывая. Затем препараты покрывали фотографической эмульсией, экспонировали в течение недели и определяли наличие метки в проанализированных клетках. В результате большинство клеток, облученных в стадии синтеза,

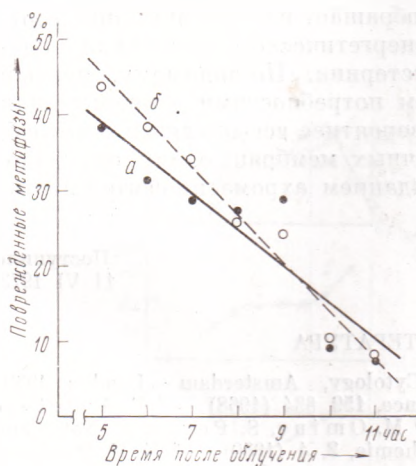


Рис. 1. Влияние времени фиксации на частоту aberrаций в меченых (а) и немеченых (б) клетках

содержали метку, в то время как большинство клеток, облученных вне этой стадии, были немечеными.

Полученные результаты представлены в табл. 1. (В опыте, кроме того, была произведена фиксация через 3 и 4 часа после облучения, но в первом случае меченых клеток не было, а во втором индекс мечения составлял лишь 0,9%.) Из табл. 1 видно, что проростки вступали в фазу синтеза весьма асинхронно. Все приведенные в таблице варианты были проанализированы на гетерогенность по индексу мечения и по числу aberrантных клеток. Результаты анализа приведены в табл. 2. По индексу мечения во всех вариантах, кроме двух (первого и последнего), наблюдалась статистически достоверная вариация между корешками. Вариация по числу aberr-

Таблица 1

Зависимость числа меченых и аберрантных клеток от времени после облучения
проростков *Steris capillaris* в дозе 400 рад

Время фиксации, часы	№№ корешков	Число просчитанных клеток			Число меченых клеток			Число немеченых клеток			Индекс мечений, %
		всего	поврежденные	%	всего	поврежденные	%	всего	поврежденные	%	
5	1	180	68	37,8	38	13	34,2	142	55	39,0	21,1
	2	90	36	40,0	22	9	40,9	68	27	39,7	24,4
	3	124	61	49,2	21	7	33,3	103	54	53,2	16,9
	4	29	15	51,7	8	5	62,5	21	10	47,7	26,6
Всего		423	180	42,5	89	34	38,2	334	146	43,7	21,0
6	1	129	40	31,0	84	24	28,6	45	16	35,6	65,1
	2	32	11	34,4	14	3	21,4	18	8	44,4	43,7
	3	96	32	33,3	37	11	29,7	59	21	35,6	38,5
	4	140	55	39,3	55	20	36,4	85	35	41,2	23,5
	5	164	62	37,8	35	12	34,3	129	50	38,8	54,7
Всего		561	200	35,6	225	70	31,1	336	130	38,7	40,0
7	1	203	68	33,5	131	50	38,2	72	18	25,0	64,7
	2	173	49	28,3	120	33	27,5	53	16	30,2	69,4
	3	103	30	29,1	52	9	17,3	51	21	41,2	50,5
	4	81	26	32,1	59	16	27,2	22	10	45,5	72,8
	5	184	54	29,3	132	34	25,8	52	20	38,4	71,8
Всего		744	227	30,5	494	142	28,8	250	85	34,0	66,4
8	1	61	16	26,2	23	3	13,0	38	13	34,3	37,7
	2	126	23	18,5	49	12	24,5	77	11	14,3	29,5
	3	166	46	27,7	106	31	29,3	60	15	40,0	64,0
	4	150	41	27,3	98	23	23,5	52	18	34,6	65,4
	5	130	44	33,9	97	34	35,0	33	10	30,4	74,6
Всего		633	170	26,9	373	103	27,6	260	67	25,8	58,9
9	1	156	48	30,8	57	26	45,6	99	22	22,2	36,5
	2	80	22	27,5	51	14	27,5	29	8	27,6	63,7
	3	150	30	20,0	83	17	20,5	67	13	19,4	55,3
	4	64	15	23,5	39	12	30,4	25	3	12,0	61,0
	5	125	27	21,6	70	18	25,7	55	9	16,4	56,0
Всего		575	142	24,7	300	87	29,0	275	65	23,7	52,2
10	1	100	11	11,0	21	3	14,3	79	8	10,1	21,0
	2	343	33	9,6	27	2	7,4	316	31	9,8	7,9
	3	137	13	9,5	31	2	6,5	106	11	10,4	22,6
	4	152	16	10,5	22	3	13,6	130	13	10,0	14,5
	5	85	11	13,6	14	1	17,1	61	10	16,4	16,5
	6	141	16	11,3	16	1	6,3	125	15	12,0	11,4
Всего		958	100	10,4	131	12	9,6	827	88	10,6	13,7
11	1	66	7	10,6	5	0	0,0	61	7	11,5	7,7
	2	189	15	7,9	38	3	7,9	151	12	7,9	20,1
	3	137	9	6,6	22	1	4,5	115	8	7,0	16,0
	4	87	9	10,3	12	2	16,7	75	7	9,3	13,8
	5	89	7	7,9	10	1	10,0	79	6	7,6	11,2
Всего		568	47	8,3	87	7	8,0	481	40	8,3	15,3

рантных клеток (кроме первого варианта) была в пределах случайной изменчивости. Уже этот результат показывает, что нахождение клетки в стадии синтеза не определяет ее чувствительность.

Для исследования влияния времени фиксации на частоту наблюдаемых aberrаций был проведен регрессионный анализ отдельно для меченых и немеченых клеток. Экспериментальные результаты описываются для немеченых клеток уравнением

$$y = 44,91 (\pm 1,31) - 6,17 (\pm 0,45) x,$$

а для меченых

$$y = 38,93 (\pm 3,34) - 4,80 (\pm 0,97) x,$$

где y — процент aberrантных клеток, а x — время фиксации в часах.

Коэффициенты регрессии в обоих случаях статистически достоверны (соответственно, $t_5 = 13,13$, $P < 0,0001$; $t_5 = 4,94$, $P = 0,004$). Оба уравнения ни по одному из параметров не отличаются достоверно друг от друга. Для коэффициентов регрессии разница $1,37 \pm 1,07$ ($t_{10} = 1,28$, $P = 0,22$), для пересечений с осью ординат разница $5,98 \pm 3,60$ ($t_{10} = 1,66$, $P = 0,13$). Таким образом, время фиксации существенно влияет на процент aberrантных клеток, причем в меченых и немеченых клетках влияет одинаково. Это наглядно видно из рис. 1, где изображена зависимость эффекта от времени фиксации (прямые проведены в соответствии с уравнениями, вычисленными выше).

Таким образом, радиочувствительность хромосом не связана существенно с тем, облучаются ли клетки в фазе синтеза или вне ее. Вместе с тем, продолжительность интервала между облучением и фиксацией сильно влияет на выход aberrантных клеток, причем влияет одинаково на клетки, облученные на стадиях S и G₂.

Полученному результату может быть дано два объяснения. Во-первых, можно предполагать, что клетки с постоянной вероятностью восстанавливаются на протяжении всего цикла, а потому, чем больше времени проходит между облучением и фиксацией, тем более вероятно, что клетки будут к началу митоза восстановлены. Во-вторых, возможно, что восстановление

Таблица 2

Результаты анализа на однородность по индексу мечения и числу aberrантных клеток

Время фиксации, часы	Число проростков	Индекс мечения		Aberrантные клетки	
		χ^2	P	χ^2	P
5	4	2,66	0,46	8,23	0,035
6	5	57,93	$< 10^{-10}$	2,63	0,62
7	5	15,90	0,003	1,55	0,82
8	5	49,51	$< 10^{-10}$	7,95	0,08
9	5	23,45	$< 0,0001$	5,88	0,22
10	6	24,29	0,0004	1,11	0,96
11	5	7,66	0,1	1,85	0,76

происходит только на определенной стадии цикла или что в цикле имеется период повышенной чувствительности к радиации. Недавно Сэвидж и Миллер⁽⁵⁾ рассмотрели этот вопрос теоретически и показали, что даже узкий пик повышенной чувствительности должен приводить в гетерогенной популяции к плавному изменению эффекта.

Если это так, то стадия восстановления (или период повышенной чувствительности) коррелирует, как показывают результаты наших опытов, не со временем синтеза, а со временем митоза. В свое время было показано, что смена типов aberrаций также определяется не синтезом ДНК^(6, 7).

Сказанное делает вероятным вывод о том, что эффект облучения определяется процессами, локализация которых в цикле не коррелирует или мало коррелирует со временем синтеза. Это находится в соответствии с гипотезой о хромосомном цикле ДНК, выдвинутой одним из авторов настоящей статьи⁽⁸⁾, согласно которой в клеточном цикле имеется две стадии проверки (перед синтезом и перед митозом), во время которых происходит восстановление от первичных повреждений или распространение этих повреждений с одних субъединиц хромосомы на другие.

Научно-исследовательский институт
медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР
Обнинск

Поступило
25 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Н. П. Дубинин, Проблемы радиационной генетики, М., 1961. ² Х. Ивенс, Повреждения хромосом ионизирующими излучениями, М., 1966. ³ Н. В. Лучник, Биофизика цитогенетических поражений и генетический код, Л., 1958. ⁴ Н. В. Лучник, В кн.: Пострадиационная репарация, 1, М., 1970, стр. 154. ⁵ J. R. K. Savage, M. W. Miller, In: The Dynamics of Meristem Cell Populations, N. Y., 1971, p. 211. ⁶ S. Wolff, H. E. Luippold, Exp. Cell Res., 34, 548 (1964). ⁷ H. J. Evans, J. R. K. Savage, J. Cell Biol., 18, № 3, 525 (1963). ⁸ N. V. Luchnik, Stadia biophysica, 27, № 2, 157 (1972).