

УДК 576.312.3

ЦИТОЛОГИЯ

Л. Я. ЛОМАКИНА, Л. Н. ВОРОНКОВА, В. Н. САХАРОВ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ У.-Ф. МИКРОЛУЧА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОСОМ В ИНТЕРФАЗНОМ ЯДРЕ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 10 IV 1975)

Согласно современным представлениям, в ядре клетки могут протекать функционально различные виды синтеза ДНК, обладающие определенными временными закономерностями. Репликативный синтез связан с удвоением количества ДНК и достаточно строго ограничен во времени S-периодом, в то время как репаративный синтез, ответственный за коррекцию нормальной репликации и транскрипции, возникает по мере необходимости и может происходить в любом периоде клеточного цикла ⁽¹⁾. Течение процессов синтеза ДНК может быть нарушено радиационными воздействиями. Это нарушение проявляется как в подавлении репликации ДНК в клетках, находившихся в момент облучения в S-периоде, так и в стимуляции репаративного внепланового синтеза ДНК в клетках, находившихся в это время в других периодах клеточного цикла ⁽²⁻⁴⁾.

Для изучения закономерностей репликативного и репаративного синтезов ДНК в ряде работ ⁽⁵⁻⁸⁾ был применен метод микрооблучения. Этот метод (впервые предложенный С. С. Чахотиным в 1912 г.) позволяет локально воздействовать на отдельные участки живой клетки, не подвергая облучению всю клетку. В частности, в экспериментах на культуре клеток млекопитающих ^(7, 8) показано, что после локального облучения интерфазного ядра тонким у.-ф. микролучом репаративный синтез возникает не во всем ядре, а лишь в том его участке, который непосредственно подвергался облучению.

В настоящей работе исследовалась возможность стимуляции репаративного синтеза ДНК путем локального у.-ф. облучения хромосом в клетках, находящихся в митозе. В этом относительно коротком периоде клеточного цикла хромосомный материал предельно конденсирован, отдельные хромосомы легко различимы в световом микроскопе и доступны для локального микрооблучения. Задача исследования состояла в том, чтобы вызвать репаративный синтез ДНК в небольшом участке хромосомного материала, с тем чтобы иметь возможность ввести в этот участок тимидин, меченный тритием, и таким образом избирательно «пометить» определенную часть генома живой делящейся клетки. При этом предполагалось, что изучение распределения радиоактивной метки после выхода локально облученных клеток из митоза позволит выявить закономерности размещения и перемещения деконденсированного хромосомного материала в интерфазном ядре. Приводимые ниже результаты подтверждают принципиальную возможность использования предлагаемого экспериментального подхода для решения поставленных вопросов.

Опыты проводили на однослойной культуре клеток почки эмбриона свиньи (линия СПЭВ), которую выращивали на питательной среде 199, содержащей 10% сыворотки. Клетки росли на поверхности кварцевого покровного стекла, которое закрепляли в специальном отверстии, вырезанном на дне флакона. Прижизненные наблюдения в фазово-контрастном инвертированном микроскопе показали, что в таких условиях клетки способны активно размножаться в течение нескольких суток и продолжитель-

ность их клеточного цикла составляет 20—25 час. Облучение проводили через 24 часа после посева клеток во флакон. Распластанные на стекле клетки облучали снизу сквозь кварцевое стекло инвертированным у.-ф. микролучом с длиной волны света 280 нм. Поперечное сечение луча в плоскости фокусировки имело форму равностороннего треугольника с длинной стороны 5 или 3 мкм. Длительность микрооблучения была 1 сек. при мощности дозы $2 \cdot 10^{-3}$ эрг/мкм²·сек. Для микрооблучения выбирали клетки на стадии анафазы (рис. 1а) и микролучом большего или меньшего размера облучали большую часть или около половины хромосомного материала в каждой сестринской группе расходящихся хромосом. В отдельных случаях облучению подвергали только одну из сестринских групп хромосом, а другую оставляли необлученной для контрольных исследований. Через 0,5—1 час после облучения в среду на 45 мин. вводили тимидин-³H («Амершем», Англия; 5 С/ммоль) в концентрации 100 мкС/мл и затем материал фиксировали в смеси абсолютного спирта с уксусной кислотой (3 : 1). Для получения радиоавтографов клетки обрабатывали 3% хлорной кислотой два раза по 30 мин. при 4°, промывали водой и сухие препараты покрывали жидкой эмульсией (Илфорд К₂ «А», Англия). После 9 дней экспозиции препараты проявляли и окрашивали гематоксилином.

Результаты прижизненных наблюдений показали, что в течение 1,5—2 час., проходящих от момента облучения до фиксации материала, в облученной клетке завершаются стадии анафазы и телофазы, хромосомный материал деконденсируется и формируются сестринские интерфазные ядра, одни из которых содержат облученный, а другие — необлученный или частично облученный материал. В ядрах с необлученным хромосомным материалом образуются нормальные интерфазные ядрышки, а в облученных сестринских ядрах вместо нормальных ядрышек появляется множество мелких плотных тел, появление которых описано и обсуждено в наших предыдущих работах (^{9, 10}).

На рис 1б видно, как выглядит на радиоавтографе необлученная клетка, фиксированная через 2 часа после анафазы. Ядро такой клетки относится к категории немеченых, что свидетельствует об отсутствии синтеза ДНК в этом периоде клеточного цикла. Исследование автографов клеток, фиксированных в другие сроки, показало, что нормальный репликативный синтез ДНК начинается не ранее, чем через 7—8 час. после митоза. Автограф ядра, находящегося в S-периоде, приведен на рис. 1в. Такие ядра относятся к категории сильно меченых.

На рис. 1г виден типичный автограф ядра интерфазной клетки, фиксированной через 2 часа после анафазы, во время которой была облучена приблизительно половина ее хромосомного материала. В отличие от ядер с необлученным хромосомным материалом, в таком ядре активно включается меченый тимидин, что указывает на интенсивный внеплановый пострадиационный синтез ДНК. Однако этот синтез обнаруживается не во всем ядре, а главным образом в той его части, где, по данным прижизненных наблюдений, располагались облученные хромосомы до их деконденсации в конце митоза. Этот факт свидетельствует о том, что локальное облучение не вызывает общей стимуляции включения меченого тимидина во всем ядре, а стимулирует синтез ДНК лишь в местах расположения хромосомного материала, подвергнутого облучению. Такие ядра можно отнести к категории слабо меченых с локализованным включением метки.

В экспериментах, в которых во время анафазы облучали не половину, а большую часть хромосомного материала, включение метки на автографах интерфазных ядер не было локализовано и метка обнаруживалась по всему ядру. Такие ядра оказывались также в категории слабо меченых, что характерно для ядер, в которых имеет место репаративный внеплановый синтез ДНК (³).

Полученные данные свидетельствуют о том, что локальное у.-ф. облу-

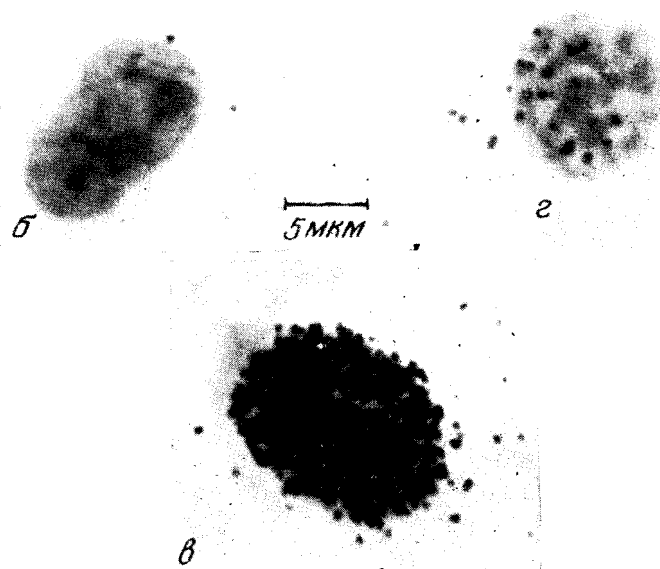


Рис. 1. *а* — анафазная клетка культуры СПЭВ в момент облучения. Положение микролуча показано светлым треугольником. Фазовый контраст. Об. 40×. *б*, *в*, *г* — радиоавтографы ядер клеток, фиксированных после 45 мин. инкубации в среде с тимидином- ^3H (100 мкС/мл, 5 С/ммоль). Радиоавтографы экспонировали с эмульсией 9 дней. *б* — клетка с необлученным хромосомным материалом через 2 часа после анафазы; *в* — клетка в S-периоде клеточного цикла; *г* — клетка, фиксированная через 2 часа после анафазы, во время которой было облучено около половины ее хромосомного материала

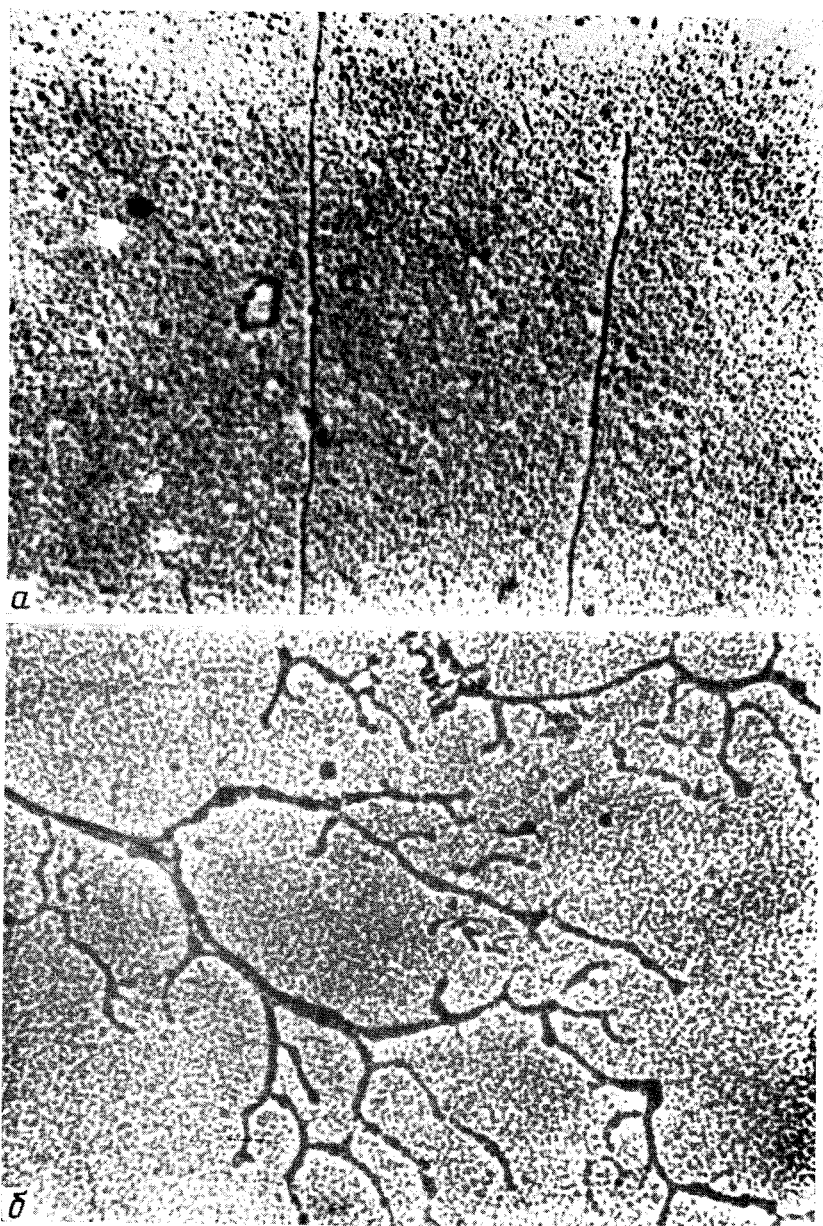


Рис. 1. Электронные микрофотографии облученной γ -ф. ДНК (доза 300 эрг/мм²). *a* — без антител; *б* — после совмещения с антителами (разбавление антител 10^{-2})

чение анафазных хромосом может стимулировать интенсивный внеплановый репаративный синтез в облученной ДНК, вследствие чего в небольшой участок ДНК хромосом может быть введен радиоактивный тимидин. Эта стимуляция наблюдается при облучении в дозах, не препятствующих завершению митоза, деконденсации хромосомного материала и формированию интерфазных ядер. В связи с этим фактом открывается методическая возможность с помощью микрооблучения избирательно и направленно вводить радиоактивную метку в отдельные участки набора митотических хромосом в живой делящейся клетке, а в дальнейшем выявлять локализацию меченого хромосомного материала в интерфазных ядрах. Такие исследования могут способствовать выявлению закономерностей размещения деконденсированного материала отдельных групп хромосом, отдельных хромосом, а возможно, и отдельных специфических участков хромосом в интерфазных ядрах в норме и в различных экспериментальных условиях.

Работа выполнена сотрудниками Лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии АН СССР и Отдела медицинской биофизики Института химической физики АН СССР. Авторы выражают благодарность О. И. Епифановой за ценные критические замечания.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. Я. Ломакина, В кн.: Клеточный цикл, «Наука», 1973, стр. 9. ² В. Н. Парубок, Е. Г. Семенова, Цитология, т. 12, 1423 (1970). ³ R. E. Rasmussen, R. B. Painter, J. Cell Biol., v. 29, 11 (1966). ⁴ R. B. Painter, J. E. Cleaver, Radiation Res., v. 37, 451 (1969). ⁵ P. P. Dendy, C. L. Smith, Proc. Roy. Soc. Ser. B, v. 160, 328 (1964). ⁶ S. Takeda, S. Naruse, R. Yatani, Nature, v. 213, 696 (1967). ⁷ G. Moreno, Exp. Cell Res., v. 65, 129 (1971). ⁸ G. Moreno, G. Salet, Radiation Res., v. 58, 52 (1974). ⁹ В. Н. Сахаров, Л. Н. Воронкова, Генетика, т. 6, 144 (1968). ¹⁰ В. Н. Сахаров, Л. Н. Воронкова, Ю. С. Ченцов, Научн. докл. высшей школы, Биол. науки, т. 5, 56 (1972).