

Е. А. Кравец, В. В. Бережная, В. И. Сакада, Н. М. Рашидов,  
академик НАН Украины Д. М. Гродзинский

## Нелинейность дозовых зависимостей частоты хромосомных аберраций при радиационном повреждении корня

*Дозовые зависимости частоты хромосомных аберраций в меристеме корня гороха через 48 ч после облучения характеризуются нелинейностью и наличием плато в области 6–8 Гр, что отражает активизацию восстановительных процессов на клеточно-популяционном уровне. В диапазоне плато уровень поврежденных составляет для данного генотипа 33% ЧАА, 2,3 Аб/АК и 0,74 Аб/К. Разрыв между значениями Аб/АК и Аб/К, а также характер дозовых зависимостей при 6 Гр свидетельствуют об индукции мультиабберрантных повреждений, с одной стороны, и репопуляции, с другой. При 10 Гр дозовая кривая формирует следующую экспоненту, обусловленную вовлечением в мутационный процесс большого числа новых клеток с нерепарируемыми повреждениями. Возрастание Аб/К до 1,1 свидетельствует о “критичности” повреждения меристемы.*

Одним из основных эффектов радиационного поражения меристемы являются хромосомные перестройки. Однако абберрантные клетки, в зависимости от характера и степени повреждения хромосомного аппарата, могут репарироваться, сохраняться и пролиферировать или подвергаться инактивации [1]. В случае продленного хромосомного мутагенеза реализация повреждений ДНК в аберрации хромосом происходит в ряду последовательных клеточных делений после облучения [2, 3]. Количественные зависимости частоты хромосомных аберраций в одних случаях удовлетворительно описываются линейными, в других — нелинейными моделями [4–8]. В связи с этим в последние десятилетия в радиобиологии остро дискутируются вопросы о нелинейности дозовых зависимостей, пороговости эффектов, “критическом” уровне повреждения и дискретности индукции разных систем защиты [6–9]. Приведенные в данной работе результаты дают возможность проанализировать характер кривых доза–эффект в диапазоне средних доз и связать их особенности с индукцией определенных механизмов восстановления в зависимости от уровня повреждения.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследования использовали проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Комелот). Трехсуточные проростки облучали на рентгеновской установке РУМ-17 ( $I = 10$  А;  $U = 200$  кэВ) в дозовом диапазоне от 4 до 10 Гр. Анализ меристемы проводили через 48 ч после облучения, используя ана-телофазный метод подсчета хромосомных аберраций. Оценивали частоту абберрантных и нормальных ана-телофаз (ЧАА и ЧНА), распределение аберраций по клеткам (процент клеток с 1, 2 и множественными аберрациями к числу абберранных анафаз), число аберраций на абберрантную анафазу (Аб/АК), число аберраций на анафазу (Аб/К) и площадь клеток в дистальной меристеме и среди гистогенов первичной коры. В категорию мультиабберрантных клеток относили “toque” клетки с тремя и более повреждениями хромосом любого типа и в различных сочетаниях. Объем выборки составлял 15–17 корешков, для определения площади клеток —

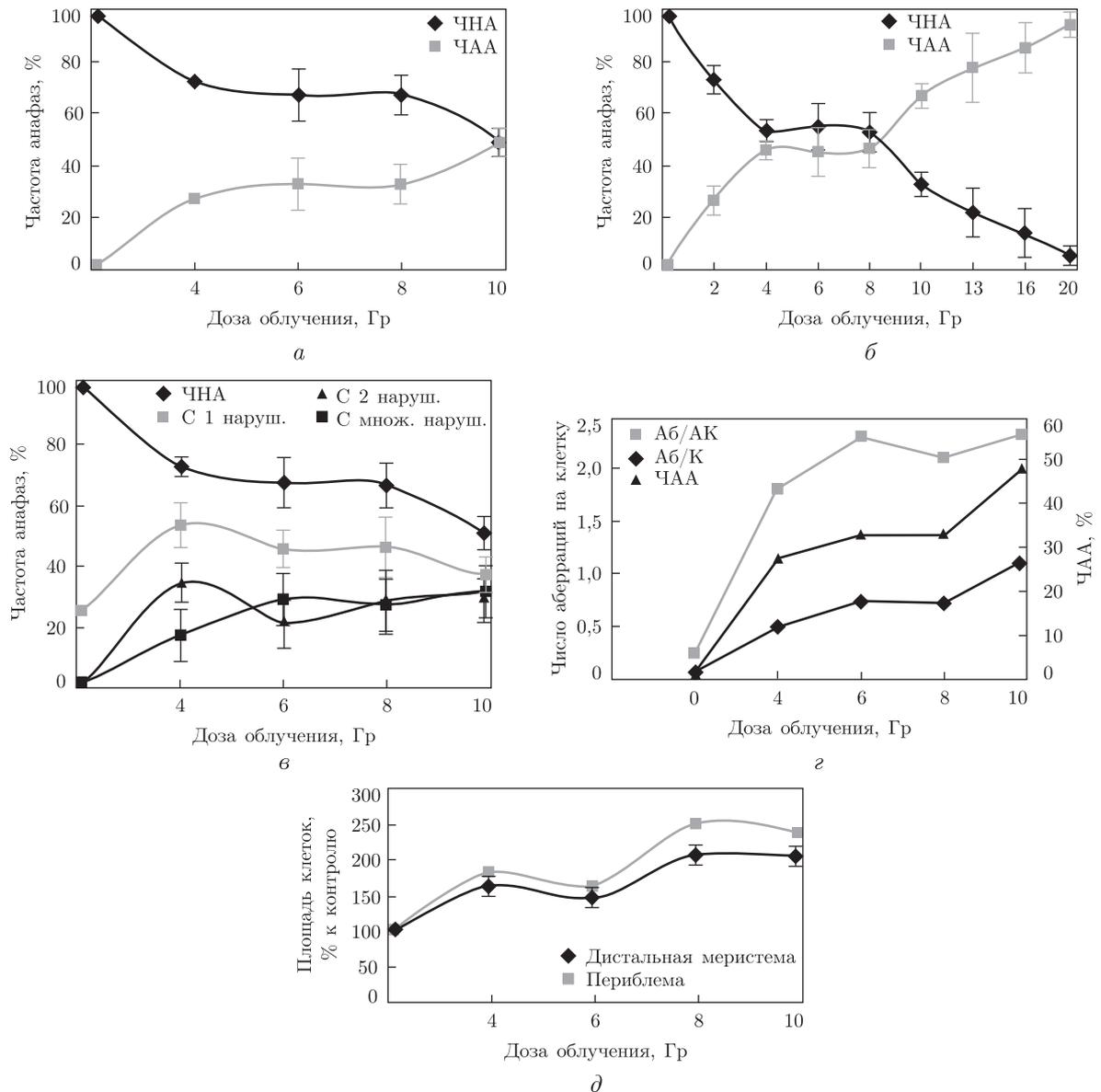


Рис. 1. Дозовые зависимости по частоте aberrантных анафаз (*а*, *б*), поклеточному распределению aberrаций (*в*), нагруженности клеток aberrациями (*г*) и площади клеток (*д*)

60–70 клеток на вариант. Площадь клеток определяли с помощью функций программы Image. Материал статистически обрабатывали с использованием функций программы Microsoft Excel. Для подсчета aberrаций изготавливали давленные ацетокарминовые препараты, площади клеток — полутонкие срезы, подкрашенные метиленовой синью или с помощью ШИК-реакции [10].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Дозовая зависимость по ЧАА имеет нелинейный характер с “порогом” на уровне 27% при 4 Гр и плато в диапазоне 6–8 Гр на уровне 33% (рис. 1, *а*). При использовании более широкого диапазона доз (от 2 до 20 Гр) и другого генотипа гороха дозовая кривая формировала “порог” и плато при тех же дозах,

хотя и с более высокими показателями ЧАА (см. рис. 1, б). Дозовые зависимости распределения aberrаций по клеткам характеризуются наличием перегибов и плато (см. рис. 1, в). При 4 Гр наблюдается формирование максимумов aberrантных анафаз с 1 и 2 перестройками. С увеличением дозы (6 Гр) их число снижается, а вклад в формирование индекса ЧАА повышается со стороны мультиaberrантных анафаз. При 8 Гр картина примерно сохраняется, а при 10 Гр поклеточное распределение существенно меняется — частота всех aberrаций, кроме анафаз с 1 перестройкой возрастает, что и формирует следующую экспоненту ЧАА. Формирование “порога” можно связать с активацией репаративной системы и последующей индукцией гибели “нагруженных” клеток с нерепарируемыми повреждениями. Выход дозовых кривых на плато совпадает с активацией пролиферативной активности в меристеме и указывает на подключение компенсаторного механизма восстановления — репопуляции. Истощение механизмов восстановления при 10 Гр приводит к снижению процента нормальных анафаз и анафаз с 1 перестройкой и одновременному возрастанию вклада мультиaberrантных перестроек (см. рис. 1, в).

Дозовые кривые нагруженности пролиферирующей клетки aberrациями (Аб/АК и Аб/К) характеризуются наличием перегибов и плато (см. рис. 1, г). Уровень “нагруженности” клеток возрастает с дозой, достигая максимума — 2,3 Аб/АК при 6 Гр, что, по-видимому, является показателем индукции мультиaberrантных повреждений и пролиферативной гибели клеток. Разрыв между значениями Аб/АК и Аб/К, а также характер дозовых зависимостей при 6 Гр (см. рис. 1, в) предполагают индукцию мультиaberrантных повреждений за счет нерепарируемых двойных разрывов ДНК, с одной стороны, и репопуляции, с другой. При 8–10 Гр показатель Аб/АК снижается и вновь достигает 2,3, в отличие от Аб/К, значение которого резко увеличивается до 1,1 (см. рис. 1, г), что указывает на вовлечение в мутагенез новых генераций клеток. По-видимому, возрастание Аб/К до 1,1 свидетельствует о “критичности” повреждения меристемы.

Известно, что размеры клеток обычно коррелируют с интенсивностью пролиферации. Площадь клеток увеличивается в диапазоне применяемых доз в 1,5–2 раза в дистальной части и в 1,6–2,5 раза среди гистогенов первичной коры, по отношению к контролю (см. рис. 1, д). Дозовая зависимость носит немонотонный характер. Снижение размеров клеток в точке 6 Гр совпадает с активацией пролиферации (репопуляцией). Возрастает степень варьирования размеров клеток, причем более значительно в дистальной меристеме (в 3 раза), чем в периферии (в 1,5 раза). Значительное варьирование показателей площади клеток в дистальной меристеме может быть связано с наложением процессов инактивации поврежденных инициалей, гистогенов и репопуляции.

Итак, для дозовых зависимостей частоты хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков гороха характерны наличие порога, перегибов и плато. О причинах появления плато на дозовой кривой высказаны различные предположения, в частности: неоднородность популяций клеток, включение репарации радиационных повреждений, причем двух разных систем — “адаптационной”, выработанной в ходе эволюции, и SOS-системы — аварийной, наконец, существование субпопуляции “клеток эволюционного резерва” с повышенной репарационной способностью [6–9, 11, 12]. Считают, что формирование порогов и ступенчатый характер кривой в диапазоне средних и высоких доз свидетельствуют о дискретности индукции систем защиты с разным механизмом действия, адекватных соответствующему уровню повреждения [2, 13]. Перегибы дозовых кривых указывают на существование некоторого разброса в реакции объекта на облучение, т. е. совмещение разных механизмов восстановления.

Пороговый уровень регистрируемых эффектов у данного генотипа гороха составляет 27% aberrantных анафаз, нагруженности aberrациями 1,8 Аб/АК и 0,5 Аб/К. Его формирование сопряжено, по-видимому, с активацией систем репарации. В диапазоне плато показатели повреждения поднимаются до 33% ЧАА и 0,74 Аб/К, что инициирует индукцию мультиaberrantных повреждений (2,3 Аб/АК) (с последующей гибелью клеток) и, соответственно, репопуляцию. В новых клеточных потоках, тем не менее, уровень хромосомного мутагенеза сохраняется высоким. При 10 Гр дозовая кривая формирует следующую экспоненту, указывающую на вовлечение в мутационный процесс большого числа новых клеток (1,1 Аб/К), с которыми указанные механизмы восстановления уже не справляются. Превышение 50% рубежа ЧАА имеет, как правило, летальные последствия для меристемы [14]. Следовательно, 50% ЧАА и 1,1 Аб/К являются показателями “критичности” радиационного повреждения меристемы корня гороха.

1. Ганасси Е. Э. Радиационное повреждение и репарация хромосом. – Москва: Наука, 1976. – 103 с.
2. Бычковская И. Б. Проблема отдаленной радиационной гибели клеток. – Москва: Энергоатомиздат, 1986. – 160 с.
3. Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M. Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability // *Oncogene*. – 2003. – **22**. – P. 6988–6993.
4. Zaka R., Chenal C., Misset M. T. Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen.* – 2002. – **517**, No 1–2. – P. 87–99.
5. Elhajouji A., Lukamowicz M., Cammerer Z., Kirsch-Volders M. Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring // *Mutagenesis*. – 2011. – **26**, No 1. – P. 199–204.
6. Гераськин С. А., Зяблицкая Е. Л., Удалова А. А. Закономерности индукции гамма-излучением структурных мутаций в корневой меристеме проростков семян гексаплоидной пшеницы // *Радиац. биология. Радиоэкология*. – 1995. – **35**, № 2. – С. 137–149.
7. Гераськин С. А., Дикарев В. Г., Удалова А. А. и др. Анализ цитогенетических последствий хронического облучения в малых дозах посевов сельскохозяйственных культур // Там же. – 1998. – **38**, вып. 3. – С. 367–374.
8. Trott K. R., Rosemann M. Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, non-threshold dose response model of radiation risk estimation // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2000. – **39**, No 2. – P. 79–87.
9. Эйдус Л. Х. О проблеме экстраполяции дозовой зависимости цитогенетических повреждений от больших доз к малым // *Радиац. биология. Радиоэкология*. – 1999. – **39**. – С. 177–180.
10. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
11. Спитковский Д. М. Концепция действия малых доз ионизирующего излучения на клетки и ее возможные приложения к трактовке медико-биологических последствий // *Радиобиология*. – 1992. – **32**, № 5. – С. 627–630.
12. Спитковский Д. М., Зайцев С. В., Талызина Т. А. Моделирование особенностей инициации генетических повреждений малыми дозами ионизирующих излучений в клетках эукариот на основе концепции существования клеток эволюционного резерва // *Радиац. биология. Радиоэкология*. – 1994. – **34**, № 6. – С. 739–747.
13. Календо Г. С. Различные уровни радиозащиты в популяции опухолевых клеток // Там же. – 2001. – **41**, № 5. – С. 519–527.
14. Кравец Е. А., Михеев А. Н., Овсянникова Л. Г., Гродзинский Д. М. Критический уровень радиационного повреждения апикальной меристемы корня и механизмы ее восстановления (на примере *Pisum sativum* L.) // *Цитология и генетика*. – 2011. – **45**, № 1. – С. 24–34.

ГУ “Институт пищевой биотехнологии  
и геномики НАН Украины”, Киев  
Институт клеточной биологии и генетической  
инженерии НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 27.10.2011

О. А. Кравець, В. В. Бережна, В. І. Сакада, Н. М. Рашидов,  
академік НАН України Д. М. Гродзинський

### Нелінійність дозових залежностей частоти хромосомних аберацій при радіаційному ушкодженні кореня

*Дозові залежності частоти хромосомних аберацій у меристемі кореня гороху через 48 год після опромінення характеризуються нелінійністю та наявністю плато в діапазоні 6–8 Гр, що відображує активізацію відновлювальних процесів на клітинно-популяційному рівні. У діапазоні плато рівень ушкоджень становить для даного генотипу 33% ЧАА, 2,3 Аб/АК і 0,74 Аб/К. Розбіжність значень Аб/АК і Аб/К, а також характер дозових залежностей при 6 Гр свідчать про індукцію мультиабераційних аберацій, з одного боку, і репопуляції, з іншого. При 10 Гр дозова крива формує наступну експоненту, обумовлену залученням у мутаційний процес великої кількості нових клітин з нерепарованими ушкодженнями. Зростання Аб/К до 1,1 свідчить про “критичність” пошкодження меристеми.*

Е. А. Kravets, V. V. Berezhnaya, V. I. Sacada, N. M. Rashidov,  
Academician of the NAS of Ukraine D. M. Grodzinsky

### Non-linear character of dose dependences of chromosome aberration frequency in radiation-damaged root

*The dose dependences of the aberrant anaphases in the root meristem in 48 hours after the irradiation have non-linear character and a plateau in the region about 6–8 Gy. The plateau indicates the activation of recovery processes. In the plateau range, the level of damages for this genotype is 33% for aberrant anaphases (FAA), 2.3 aberrations per aberrant anaphase (A/AC), and 0.74 aberrations for the total number of anaphases. At 10 Gy, the dose curve forms the exponential region caused by the involvement of the large number of new cells with unrepaired damages in the mutation process. The increase of A/AC to 1.1 indicate the “criticality” of the meristem radiation damage.*