

МЕХАНИЗМЫ
РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**МЕХАНИЗМЫ
РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ**

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1976

М55
581.4

УДК 632.118.3:(582.4 + 582.5)

В монографии приведены результаты теоретических и экспериментальных исследований механизмов радиоустойчивости растений, рассматриваются причины различной радиоустойчивости растительных организмов от прокариотов до эукариотов, а также причины, обеспечивающие радиоустойчивость растений на различных уровнях организации от молекулярного до организменного. Особое внимание уделяется разработке малоизученных факторов, ответственных за различную радиоустойчивость растений: разный уровень повреждаемости генетических и негенетических уникальных структур, способность к репарационному восстановлению, репопуляции, регенерации и др. Излагается специфика стратегии противолучевой защиты и радиосенсибилизации лучевого поражения растительного организма.

Рассчитана на радиобиологов, физиологов, биофизиков и биохимиков растений, а также преподавателей и студентов вузов.

Ответственный редактор
чл.-кор. АН УССР *Д. М. Гродзинский*

Рецензенты
д-р мед. наук *Е. Е. Чеботарев*
канд. биол. наук *Е. П. Старченков*

Редакция физиологии, биохимии и медицины

М 21005-140 384-76
М 221 (04) — 76

© Издательство «Наукова думка», 1976 г.

ВВЕДЕНИЕ

Радиобиология растений как раздел общей радиобиологии сформировалась сравнительно недавно, хотя радиобиологи использовали растения в качестве объекта исследований с первых лет изучения действия ионизирующей радиации на живые организмы. Можно считать убедительно доказанным значительное варьирование радиоустойчивости различных видов растений. Если на молекулярном уровне радиационно-химических процессов у разных организмов трудно выявить различия радиобиологических эффектов, то при переходе к более высоким уровням все рельефнее проступают черты видовой специфичности лучевой реакции организма. Радиобиологическая реакция растений, как и иных организмов, многоэтапная: начавшись с радиационно-химических превращений, она проходит этапы развития в биохимических системах клетки, управления клеточными и тканевыми процессами и, в конечном счете, проявляется в разнообразных формах интегральных реакций всего организма. Поэтому говорить о радиоустойчивости растения можно лишь на основании учета таких интегральных реакций, как гибель меристем, резкое изменение эпигенетических реакций, морфогенез.

Наблюдения над облученными растениями показывают, что радиоустойчивость организма не определяется каким-либо одним свойством его клеток. Напротив, радиоустойчивость обусловлена комплексом свойств, формирующихся как результат множественных явлений. Поэтому для раскрытия природы радиоустойчивости растения необходимо внимательно прослеживать всю цепочку радиобиологических элементарных реакций на разных уровнях их проявления. Такой ход исследований может оказаться весьма поучительным и полезным не только для дальнейшего развития радиобиологических представлений о радиоустойчивости, но и для выяснения некоторых вопросов, касающихся механизмов интеграции частных реакций клетки до уровня сложной физиологической функции. Действительно, элементарное радиационное повреждение какой-либо уникальной структуры в клетке сопровождается ~~нарушением функций~~

непосредственно связанных с данной структурой. Постепенно в круг нарушенных систем вовлекаются все новые и новые функциональные единицы клетки, органа, всего организма. В процессе временного развития лучевого поражения не только увеличивается степень повреждения, но проявляется и противодействие расширению вредных для организма дефектов функций. Такое противодействие осуществляется и спонтанно, и под влиянием специальных систем клетки и тканей. Очевидно, от эффективности функционирования этих систем во многом зависит уровень переносимых организмом доз радиации, его радиоустойчивость.

Природа радиоустойчивости, несомненно, находится сейчас в центре внимания радиобиологов, что объясняется важной ролью этой проблемы для ослабления поражающего действия радиации на организм. Конечно, до полного знания о природе радиоустойчивости растений нужно совершить еще длинный путь. Однако достигнутое уже достаточно для того, чтобы заключить, насколько разнообразны механизмы, лежащие в основе радиоустойчивости клетки и многоклеточных систем, и вместе с тем убедиться, что такие механизмы отличаются общностью проявления у самых разнообразных видов растений.

В настоящей книге отражены итоги работ Отдела биофизики и радиобиологии Института физиологии растений АН УССР, сделана попытка изложения основных представлений о путях формирования радиационного поражения растения и о тех процессах, благодаря которым растения могут освобождаться от нанесенных им радиацией повреждений.

ГЛАВА I

РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЯДРА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

Ядро, как полностью сформированный органоид клетки, свойственно эукариотическим организмам. У прокариотов обособленные ядерные структуры отсутствуют: наследственный материал представлен у них одними нитями ДНК. Известны прокариотические организмы, переносящие дозы облучения в сотни миллионов рад. Аппарат наследственности эукариотов представляет собой структурно организованное ядро с хромосомами нуклеопротеидной природы. И хотя к эукариотам относятся организмы различной сложности, от одноклеточных до человека, радиобиологи установили, что все эукариоты более радиочувствительны, чем прокариоты. Растения являются эукариотическими организмами.

Исследования уровня радиочувствительности ядра обоснованы концепцией «чувствительной» (уникальной) мишени [18, 80] и принципом множественности попадания, вследствие чего возникает дисперсное начальное повреждение клетки [33]. Однако самая важная предпосылка усиления радиобиологических исследований ядра заключена в его функциональном значении — хранении и передаче генетической информации. Кроме того, все более очевидным становится участие ядра в обеспечении функциональной интеграции таких сложных процессов в клетке, как дифференциация, развитие, регуляция функций других компонентов клетки. Исследование радиационного нарушения структурной и биохимической организации ядра, несомненно, является важным этапом в изучении его радиочувствительности и радиочувствительности всей клетки.

СТРУКТУРНАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕР РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Согласно данным электронной микроскопии, ядра окружены двойной мембраной, сохраняющей более крупные компоненты ядра — хромосомы, ядрышки и др. В настоящее время принято считать, что ядро состоит из внешней двухслойной мембраны, хромосомного материала, ядрышек и ядерного сока (кариоплазмы). Все эти компо-

ненты отличаются друг от друга структурной организацией и функциональным значением, но образованная ими мозаика ядра является довольно сложенной системой со сложной функциональной деятельностью. Ведущая роль в этой системе принадлежит хромосомному материалу.

Биохимический состав ядра изучен довольно подробно благодаря появившейся возможности работать с изолированными ядрами. Изолированные ядра были получены 100 лет назад, однако лишь в последнее время усовершенствование биохимических методов исследования и очистки ядер позволило пополнить знания об их биохимической организации. Тотальное изучение биохимического состава компонентов ядер эукариотов проведено И. Б. Збарским [13]. В его лаборатории разработан метод получения изолированных ядерных мембран, которые разделяются по плотности на две фракции — 1,19 и 1,16. Исследования показали, что мембрана с плотностью 1,19 является внутренней, а с плотностью 1,16 — внешней.

Изучение биохимического состава мембран ядер показало, что в них, кроме белков и липидов, содержатся ДНК, РНК и некоторые ферменты (АТФ-азы, цитохромоксидазы, глутаматдегидрогеназы и др.) [11, 12]. В ядерной мембране были обнаружены поры, что отличает ее от других мембран клетки. Внешняя мембрана у животных и растений не гладкая, а образует выпячивания, которые иногда глубоко проникают в цитоплазму и сливаются с эндоплазматическим ретикулумом [37]. Ядерная мембрана по своему химическому составу отличается от мембран других клеточных органоидов.

Другим компонентом ядра являются ядрышки. Все организмы, имеющие ядра, в том числе и растительные, содержат ядрышки. В настоящее время удалось получить фракцию очищенных ядрышек [10, 38]. Биохимический анализ показал, что эта фракция состоит из 87—90% белка, 8—12% РНК и 0,3—1% ДНК. В функциональном отношении ядрышко является местом образования рибосомальных РНК и рибосом, как ядерных, так и цитоплазматических.

Согласно представлениям Франклина [60] ядрышки участвуют в синтезе цитоплазматических белков следующим образом: рибосомная РНК, образованная на ядрышковой ДНК, комплексируясь с белком, собирается в рибонуклеопротеидные частицы — рибосомы. Рибосомы выходят из ядрышка в ядро или цитоплазму, где участвуют в биосинтезе белков. Более подробно структурная и биохимическая организация ядрышка изложена в обзора [12, 35].

Кариоплазма представлена глобулиновой фракцией белков, которая легко экстрагируется 0,14 M NaCl [12] и составляет около 20% сухого вещества ядра. Однако основной субстанцией ядра является хромосомный материал, составляющий около 70% сухого вещества ядер. Хотя изучению молекулярной организации хроматина посвящено большое количество исследований, в настоящее время есть еще много вопросов, требующих разрешения. Наряду с необходимостью изучения элементарных единиц хроматина — дезоксирибонуклеопротеидов, исследование надмолекулярной орга-

низации хроматина, обуславливающей его функционирование как органоида, является первостепенной задачей.

Согласно данным Бониера [1], хроматин зародышей гороха состоит из 36,5% ДНК общей массы хроматина, гистон — 37,5%. РНК составляет 28% общей суммы нуклеиновых кислот в хроматине, а негистоновые белки — 20% общего белка хроматина. Имеются и другие данные, однако они довольно близки приведенным и отражают аналогичное соотношение компонентов в хроматине. В состав негистоновых белков входят ДНК, РНК-полимеразы и другие ферменты генетического материала. ДНК хроматина эукариотов представлена двунитчатой спиральной молекулой. Изучение ДНК хроматина растений гороха [40] показало, что молекулярный вес его хромосомы $250 \cdot 10^6$. Это свидетельствует о том, что длина хромосомной ДНК гороха более чем в 100 раз превышает длину ДНК *E. coli*. До сих пор нет единого мнения о том, состоит ли эта ДНК из одной или нескольких, соединенных между собой молекул.

Большинство исследователей считают, что ДНК хроматина эукариотов отличается от циклической ДНК прокариотов линейной формой. Однако в проростках пшеницы была обнаружена циклическая ДНК [67]. Упаковка длинных молекул ДНК в хроматиновую нить должна быть очень плотной, и многие исследователи пришли к единому мнению, что в спирализации ДНК в спирали высшего порядка принимают участие белки, входящие в состав хроматина.

Гистоновые и негистоновые белки являются предметом исследования большой группы ученых. Свойства и классификация этих белков представлены в обзора [1, 2, 3, 4]. В настоящее время более полно изучены основные белки хроматина — гистоны. Они богаты аминокислотами аргинином и лизином, определяющими их основность, бедны тирозином и фенилаланином; в них не обнаружены цистин, цистеин и триптофан. Гистоны растительных и животных клеток состоят из нескольких фракций, отличающихся аминокислотным составом: F_1 (богатая лизином); F_{2a} , состоящая из двух подфракций, и F_{2b} (фракции промежуточного типа); F_3 (богатая аргинином).

Негистоновые (кислые) белки изучены недостаточно, хотя в последнее время им уделяется все больше внимания. Показана роль негистоновых белков в реконструкции хроматина и обнажении специфических последовательностей ДНК [75]. В составе негистоновых белков выявлены и выделены ДНК-полимеразы [68], обнаружена полинуклеотидлигазная [7] и РНК-полимеразная активности [79].

В составе хромосом всегда присутствует РНК. В животных клетках была обнаружена РНК, которая быстро метилась мечеными предшественниками и получила название «быстрометающейся» [62, 70]. РНК, выделенная из хромосом типа ламповых щеток, имеет информационный характер: нуклеотидный состав ее адекватен составу оснований у геномной ДНК [56]. Есть предположение об

участии белка в комплексировании данной РНК с ДНК в хроматине [71]. Однако биохимический состав хроматина непостоянен. Он зависит от фазы клеточного цикла, от функционирования хроматина. Нами был исследован биохимический состав общего хроматина в клетках меристем корешков гороха в G_1 фазе митотического цикла, который приведен ниже:

Вещество	Содержание компонентов, мкг/100 г меристем
Хроматин	3 000 — 5 000
ДНК	1 080 — 1 900
РНК	186 — 320
Гистон	1 218 — 2 100
Негистоновые белки	224 — 380
Отношение гистон: ДНК	1,12 — 1,50
» н/г: ДНК	0,20 — 0,30
» ДНК: РНК	3,00 — 5,82

Хроматин в ядре находится, по крайней мере, в двух структурных состояниях, отличающихся соотношением компонентов [16, 61]. Это гетеро- и эухроматин. ДНК эухроматина не насыщена гистонами, имеет много свободных фосфатных групп; эухроматин богат негистоновыми белками и вновь образованной РНК. Гетерохроматин беден негистоновыми белками и РНК, содержит относительно большое количество гистонов. ДНК в составе гетерохроматина имеет гораздо меньше, чем эухроматиновая, свободных фосфатных групп.

РАДИАЦИОННО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЯДРАХ ОБЛУЧЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

В последнее время интенсивно исследуются молекулярные механизмы радиационного поражения ядра. Это обусловлено важнейшими функциями ядра и методической возможностью перехода от морфологического уровня исследований к молекулярному. В ядре содержится не только важнейшая генетическая информация, но и программа развития клетки в процессе онтогенеза. Слаженность процессов дифференциации контролируется ядром.

Проводились исследования нарушений развития организма в онтогенезе под действием ионизирующей радиации. Именно на растениях были обнаружены задержки фаз развития, задержки цветения, плодоношения и т. д. Молекулярные механизмы этих нарушений до сих пор не выяснены. Дифференциация на молекулярном уровне определяется изменением популяции белковых молекул в дифференцирующихся клетках [65]. К сожалению, природа этих белков, их ферментативные свойства, а также динамика чередования белковых фракций в процессе клеточной дифференциации до сих пор не изучены. Начало морфогенетических процессов определяется биосинтезом белков [17]. Исследования подобного рода в радиобиологическом аспекте представляют интерес в связи с установлением факта возникновения блоков при прохождениях фаз кле-

точного цикла [32, 69]. Природа радиочувствительности ядра в целом определяется радиочувствительностью его компонентов. Радиационная повреждаемость ядерной мембраны, хроматина, сформированных хромосом и других компонентов ядра отражена во многих исследованиях, обзор которых представлен А. М. Кузиным [14]. Судьбу радиационного поражения или возможного восстановления определяют ферменты репарации, которые также могут инактивироваться радиацией [14, 53]. Поэтому, чтобы характеризовать радиочувствительность ядра, нужно определить биохимическую ситуацию в ядре в момент облучения. Возможность восстановительных процессов в облученном ядре зависит от кинетики биохимических изменений в пострадиационный период, затрагивающих все компоненты целостного ядра.

Нами проведено определение количества и интенсивности синтеза ядерных белков клеток меристем корешков гороха, облученных в предсинтетической фазе митотического цикла. Исследование проводили через 2 ч после облучения (табл. 1).

Таблица 1

Влияние гамма-облучения на накопление и интенсивность синтеза белков ядер в клетках меристем корешков гороха

Белки ядер	Содержание белка, мкг на 100 мкг ядер		% к контролю	Удельная активность, имп/мин на 1 мкг белка		% к контролю
	контроль	5 крад		контроль	5 крад	
Белки ядерного сока	22±3	11±0,1	50	388±12	181±9	47
Гистоны	37,3±1,1	24,1±1,5	64	79±9	41±15	52
Негистоновые белки	7,8±0,2	5,3±0,6	68	161±7	211±17	131
Остаточные белки	3,5±0,5	12,7±0,9	362	190±11	240±5	126

Как видно из приведенных данных, в первые часы после облучения в меристемных клетках корешков гороха наблюдалось уменьшение количества белков ядерного сока, гистонов и негистоновых белков. В то же время сильно возрастало количество остаточных белков ядер. Последнее может быть связано не только с усилением синтеза указанных белков, но и, возможно, с изменением после облучения свойств белков, ассоциированных с мембраной. В частности, освобождение гистонов из хроматина может привести к деспирализации ДНК. Деспирализованные участки ДНК могут неспецифически связываться с белками [27]. В данном случае возможна неспецифическая ассоциация остаточных белков с ДНК-мембранным комплексом.

Данные по изучению интенсивности включения метки из $2-^{14}\text{C}$ -лейцина в эти же белки как бы подтверждают, что уменьшение количества белков обусловлено ослаблением их синтеза. Однако для негистоновых белков наряду с уменьшением количества наблюдалася интенсивный их синтез. Учитывая, что в состав негистоновых белков входят, как уже упоминалось, ферменты репарации, ДНК- и

РНК-полимеразы, можно предполагать, что указанное явление вызвано усилением синтеза этих ферментов в связи с репарационными процессами.

Нарушение синтеза ядерных белков в пострадиационный период зависит от функционального состояния клетки в момент облучения. Мы исследовали интенсивность включаемости метки из ^{14}C -лизина в ядерные белки клеток меристем и зоны растяжения, отличающихся набором белков, характеризующих исследуемые клетки, и в целых проростках, облученных после 24-часового намачивания семян. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Интенсивность включения ^{14}C -лизина в гистоны и негистоны белки ядер облученных клеток корешков гороха, $\text{имп}/\text{мин}$ на 1 мг белка

Зона корешка гороха	Доза, крад			
	0	0,5	1,0	10
Гистоны				
Меристема	424 \pm 18	258 \pm 21	564 \pm 11	715 \pm 20
Зона растяжения	1749 \pm 27	979 \pm 11	1847 \pm 23	1700 \pm 10
Негистоны белки				
Меристема	208 \pm 11	123 \pm 9	405 \pm 21	972 \pm 17
Зона растяжения	4069 \pm 41	2315 \pm 22	1879 \pm 29	4234 \pm 37

Следует отметить два фактора, которые ответственны за биосинтез белков и повреждаются при действии разных доз облучения. Один из них очень радиочувствителен, повреждение его приводит к существенному снижению включаемости метки в белки уже при дозах облучения 0,5—1,0 крад. При дозе облучения 10 крад включается какой-то механизм, индуцирующий усиление включаемости метки в изучаемые белки. По-видимому, в этом и заключается одно из различий радиочувствительности белкового синтеза в ядрах клеток меристем и зоны растяжения. Однако большой интерес представляют белки, ассоциированные с ДНК и образующие хроматин. Влияние облучения на синтез белков хроматина будет рассмотрено в соответствующем разделе настоящей главы.

Изучая радиационно-биохимические процессы, всегда следует учитывать сложность организации клеточного ядра и его компонентов. Ядерная мембрана не только поддерживает контакт с остальной частью клетки, но и принимает активное участие в функционировании генетического аппарата, что подтверждается наличием в ядрах ДНК-мембранных комплексов, интенсивно изучаемого в последнее время. Радиационные изменения мембран почти не изучены, хотя возможность получения их в изолированном состоянии позволяет расширить эти исследования. На роль радиационного повреждения мембран ядер в стационарном состоянии клетки указывал А. Г. Пасынский [23]. К сожалению, большинство радиаци-

онных изменений ядерных мембран показано косвенно, главным образом по выходу веществ из ядер. Заслуживают внимания данные, полученные А. М. Кузиным. Основываясь на том, что цитохромы входят в состав внутренней мембраны ядер, А. М. Кузин [14] изучал уровень цитохромов в ядрах тимуса крыс, облученных *in vivo* и *in vitro* гамма-радиацией, и обнаружил интенсивное уменьшение содержания цитохромов после облучения (более 60%). Указанные потери цитохромов наблюдались как при облучении изолированных ядер, так и при облучении животных.

Была показана высокая радиочувствительность ядерной мембраны, с которой соединено большое количество конденсированного хроматина [52]. Радиочувствительность ДНК-мембранных комплексов из *E. coli* в присутствии кислорода возрастила в 7—8 раз [49]. Поскольку на ядерной мембране локализованы репликативные центры и она тесно связана с гетерохроматином [22], ее повышенную радиочувствительность можно объяснить именно высокой степенью конденсации системы. Кроме того, значительную роль в радиочувствительности ядерной мембраны могут играть изменения, возникающие в ее липидной фракции [81].

Ядерная мембрана является барьером, определяющим ядерно-цитоплазматические отношения. Показано участие ее в активном транспорте таких макромолекул, как иРНК, тРНК [5], гистонов [66], негистоновых белков [63], рибонуклеаз [44], а также уже собранных РНП-частиц (субъединиц рибосом) [5]. Ограничивающая свободный транспорт, ядерная мембрана избирательно непроницаема, определяя тем самым компартментализацию таких веществ, как трикарбоновые кислоты, аминокислоты, нуклеотиды и др. [76]. Приведенный далеко не полный перечень функций ядерной мембраны показывает, насколько важно сохранение ее неприкосновенности для обеспечения нормального функционирования ядра и целостной клетки и каких сложных последствий можно ожидать при радиационном ее повреждении.

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА НАДМОЛЕКУЛЯРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ХРОМАТИНА ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА

Первые исследования надмолекулярной организации хроматина интерфазного ядра растительных клеток с помощью микроскопа были проведены Рицом [76], который обнаружил нити хроматина толщиной 100—200 Å. Исследуя препараты ДНП, он [76] обнаружил более высокую спирализацию нитей ДНП толщиной 200—250 Å. Хроматиновые нити толщиной 250 Å в растениях также были обнаружены Вольфе [82]. Спирализация хроматиновых нитей в спирали высшего порядка с очень плотной упаковкой (10 : 1 — 56 : 1) была детально исследована в работах Дю Про [50]. Было показано, что кроме нитей толщиной около 200 Å имеются также тонкие

фибриллы 35—65 Å, которые, по его мнению, являются исходными при формировании нитей толщиной 200 Å. В состав гетерохроматина входят лишь нити толщиной 200 Å. Боннер и Гриффит [42] считают, что тонкие нити хроматина могут относиться к фибриллам ДНП эухроматина. В дальнейшем были получены данные, показывающие переход конденсированного хроматина в деспирализованную форму [35]. Ситуации в ядре, при которых возможен переход нитей хроматина разной спирализации, включая различные фазы митотического цикла, достаточно полно представлены в исчерпывающем обзоре Ю. С. Ченцова и В. Ю. Полякова [35].

Если принять модель структурно-функциональной организации хромосом многоклеточных организмов, предложенную М. И. Шальновым [34], согласно которой при формировании хромосомы имеет место прогрессивная спирализация двойной спирали ДНК второго, третьего и даже четвертого порядка, то в основе соотношения между гетеро- и эухроматином лежит разная степень спирализации.

Две формы существования хроматина — конденсированную и диспергированную — многие исследователи склонны считать взаимообратимыми [6, 20]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе гетерохроматинизации, несомненно, связаны с участием белков хроматина, состав которых в обеих фракциях различен [6, 73, 66]. Согласно данным Мирфи и соавт. [73], быстроседиментирующую фракцию гетерохроматина содержит два высокомолекулярных негистоновых белка, которые отсутствуют в эухроматине. В эухроматине имеется 4—5 белков, не обнаруживаемых в гетерохроматине.

Облучая 24-часовые проростки гороха и выделяя из их меристематических клеток спустя 2 ч после облучения гетеро- и эухроматиновые фракции, мы обнаружили увеличение выхода эухроматиновой фракции, по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3
Содержание фракций хроматина в меристемах облученных проростков, % к сумме обеих фракций

Фракции хроматина	Доза, крад			
	0	0,5	5	20
Гетерохроматин	68	73	51	42
Эухроматин	32	27	49	58

Однако при облучении 18—20-часовых проростков нами замечено даже некоторое увеличение выхода гетерохроматиновой фракции. Если в норме в исследуемый период, т. е. через 2 ч после облучения (возраст проростков достиг уже 20—22 ч), отношение гетеро- к эухроматину составляло 3 : 1, то при облучении в дозе 5 крад — 3,9 : 1.

Увеличение выхода эухроматина за счет уменьшения гетерохроматиновой фракции в облученных ядрах клеток тимуса наблюда-

ли в своих исследованиях Н. Б. Стражевская и В. Н. Стручков [24]. Авторы склонны считать причиной этих изменений отщепление белкового компонента от ДНК. Наши экспериментальные данные, приведенные выше, показывают, что в зависимости от функционального состояния хроматина в момент облучения можно получить радиационный эффект обратного значения. При облучении проростков в возрасте 18—20 ч меристематические клетки их находились в G_1 фазе митотического цикла, в то время как при облучении в возрасте 24 ч клетки исследуемого материала находились в конце G_1 фазы. И, как оказалось, возможность деконденсации хроматина в исследуемые сроки была разной.

Нами проведено исследование кинетики содержания суммы белков в общем хроматине после облучения 24-часовых проростков (табл. 4).

Таблица 4

Кинетика содержания суммарных белков общего хроматина меристематических клеток проростков гороха, мкг на 100 мкг ДНК

Доза, крад	Время после облучения, ч					
	40 мин	%	3	%	5	%
0	222 ± 0	100,0	140 ± 1	100,0	124 ± 0	100,0
0,5	230 ± 3	3,6	152 ± 1	8,5	158 ± 2	27,4
1,0	252 ± 5	13,5	178 ± 2	2,7	168 ± 1	35,4
5,0	172 ± 1	-22,6	160 ± 0	14,0	164 ± 0	30,2

Потерю суммарного белка, достигающую 22%, наблюдали лишь через 40 мин после облучения, а в дальнейшем происходило даже увеличение содержания белков в хроматине. Можно допустить, что для деконденсации гетерохроматина достаточно непродолжительное обеднение белком. Деспирализованные участки гетерохроматина в дальнейшем претерпевают изменения, которые характеризуются наблюдающейся перегруппировкой фракционного состава белков. Распределение белков между фракциями хроматина через 2 ч после облучения показано в табл. 5.

Таблица 5

Содержание белков хроматина через 2 ч после облучения корешков гороха, мкг на 100 мкг ДНК

Фракции хроматина	Гистоны			Негистоновые белки			Остаточные белки		
	контроль	5 крад	%	контроль	5 крад	%	контроль	5 крад	%
Гетерохроматин	122 ± 3	122 ± 1	100	91 ± 3	82 ± 1	90	26 ± 3	28 ± 1	107
Эухроматин	111 ± 1	99 ± 0	89	68 ± 0	68 ± 1	100	37 ± 1	43 ± 3	116

Как видно из приведенных данных, содержание отдельных групп белков после облучения изменяется более существенно в эухроматиновой фракции. В гетерохроматине обнаружено небольшое умень-

шение негистоновых белков, содержание гистонов и остаточных белков постоянно. В эухроматине после облучения снижалось количество гистонов и увеличивалось содержание остаточного белка, количество негистоновых белков в исследуемый период было неизменным.

Ядерные белки, входящие в состав хроматина, являются теми компонентами, которые играют основную роль в структурной организа-

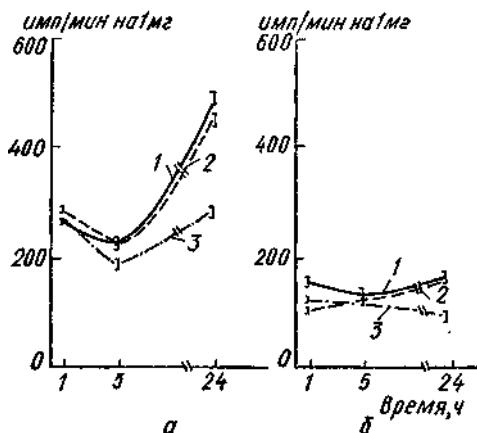


Рис. 1. Кинетика включения метки из ^{14}C -аргинина (а) и ^{14}C -лизина (б) в гистоны хроматина, выделенного из меристем корешков облученных проростков:

1 — контроль, 2, 3 — соответственно облучение в дозе 1 и 10 крад.

рализацию нитей ДНП. Аргининбогатый гистон снижает растворимость комплекса и увеличивает упорядоченность ДНП-нитей. Добавление же фракции лизинбогатого гистона еще более структурирует ДНП, увеличивая его нерастворимость и одновременно повышая эластичность фибрилл ДНП. Различные гистоны занимают на молекуле ДНК разное количество связывающих мест с разной протяженностью. Полом и Гилиором [75] было показано, что специфическую реконструкцию хроматина нельзя получить с особо очищенной ДНК без добавления остаточного белка негистонового типа. Совершенно очевидно, что радиационные нарушения в составе белкового компонента хроматина отражаются на способности ДНП-фибрилл к образованию надмолекулярных структур.

Нами исследовалась кинетика включения аминокислот аргинина и лизина в гистоны хроматина облученных меристематических клеток корешков гороха (облучали целые проростки). Поскольку указанные аминокислоты локализованы в соответствующих фракциях гистонов, нарушение координации включаемости их в гистоны может свидетельствовать о нарушении их синтеза после облучения, что отражается на надмолекулярной организации хроматина. Как показано на рис. 1, в более ранние сроки после облучения нару-

зизации дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП), хроматина. При присоединении миорных количеств белка к ДНК вязкость ее существенно уменьшается, следовательно, форма становится более компактной, чем в свободном виде. В составе ДНП каждый из белков выполняет определенную функцию. Уже незначительное количество остаточного белка существенно меняет конформацию ДНК, приближая ее к ДНП. В образовании спиралей высшего порядка принимает участие богатая лизином фракция гистона F_1 [72]. Фракция F_3 , богатая аргинином, ответственна за более тонкую спиральизацию нитей ДНП. Аргининбогатый гистон снижает растворимость комплекса и увеличивает упорядоченность ДНП-нитей. Добавление же фракции лизинбогатого гистона еще более структурирует ДНП, увеличивая его нерастворимость и одновременно повышая эластичность фибрилл ДНП. Различные гистоны занимают на молекуле ДНК разное количество связывающих мест с разной протяженностью. Полом и Гилиором [75] было показано, что специфическую реконструкцию хроматина нельзя получить с особо очищенной ДНК без добавления остаточного белка негистонового типа. Совершенно очевидно, что радиационные нарушения в составе белкового компонента хроматина отражаются на способности ДНП-фибрилл к образованию надмолекулярных структур.

Нами исследовалась кинетика включения аминокислот аргинина и лизина в гистоны хроматина облученных меристематических клеток корешков гороха (облучали целые проростки). Поскольку указанные аминокислоты локализованы в соответствующих фракциях гистонов, нарушение координации включаемости их в гистоны может свидетельствовать о нарушении их синтеза после облучения, что отражается на надмолекулярной организации хроматина. Как показано на рис. 1, в более ранние сроки после облучения нару-

шается синтез лизинбогатой фракции гистона, и лишь спустя 5 ч наступает снижение включения аргинина в гистоны хроматина. Очевидно, после облучения имеет место более раннее нарушение суперспирализации, что и наблюдалось нами как результат увеличения эухроматина, и лишь спустя некоторое время нарушается тонкая структура нитей ДНП. Это находится в соответствии с наблюдавшей нами в пострадиационный период деконденсацией хроматина.

Надмолекулярная организация хроматина зависит также от прямой деструкции, происходящей вследствие облучения его компонентов. Радиационные нарушения ДНК будут рассмотрены в третьей главе монографии. Радиационно-химические поражения белкового компонента, и особенно первичный радиолиз гистонов, наблюдаются лишь в диапазоне больших доз облучения, лежащих далеко за пределами «биологических» доз. Тем не менее радиочувствительность ДНП и хромосом очень высокая, о чем свидетельствует возникновение хромосомных аберраций и других дефектов. Особенности надмолекулярной организации структур ДНП, определяющие их радиочувствительность, нашли отражение в исследованиях многих авторов [27, 28, 31].

Молекулярная организация хроматина создается многими компонентами: ДНК, гистонами, негистоновыми белками, РНК. Взаимодействие между ними полностью не изучено. Типы связей гистонов с ДНК большинство исследователей считает электростатическими, а между негистоновыми белками и ДНК — гидрофобными. Кроме связей гистон — ДНК, ДНК — негистоновый белок могут существовать связи между гистонами и негистоновыми белками, а также белками и РНК, образуя тройные комплексы с ДНК.

Нарушение комплексообразующей способности белков хроматина при облучении растворов (1 мг/мл) суммарных гистонов и их фракций в дозах 50 и 100 крад изучали В. И. Токарская и соавт. [31]. Облученные гистоны использовали для реконструкции нуклеогистонов. Несмотря на высокие дозы облучения, комплексообразующая способность гистонов не изменялась. Однако гамма-облученная ДНК [31] связывала меньшее количество гистонов всех фракций, чем нативная, но большее, чем денатурированная ДНК, и гораздо большее, чем обычное количество гистонов в хроматине эукариотических клеток. Упрочнение связи ДНК — белок (гистон) при облучении обоих компонентов нуклеогистона наблюдал Н. И. Рябченко [29], который показал, что лишь 2—5% белка, входящего в состав нуклеопротеидного комплекса, способно включаться в упрочненную связь. Упрочнение связи ДНК — гистон автор наблюдал как в случае облучения целого комплекса, так и его компонентов до образования комплекса. Однако в упрочнении связи большую роль он отводит ДНК, в которой вследствие облучения возникают денатурированные участки. По месту этих денатурированных участков и происходит упрочнение связи ДНК — белок. *In vivo* такие денатурированные участки не были обнаружены [30].

При действии радиации на ДНП происходит лабилизация связи ДНК — белок и, вместе с тем, упрочнение ее с небольшой частью его ($10-12$ молекул гистона на ДНК с мол. весом 6×10^6). На способность комплексообразования гистонов с ДНК могут влиять радиационные нарушения: вторичной структуры белков, которые наблюдаются при относительно низких дозах облучения. Нарушение вторичной структуры и более высоких уровняй структурированности белков может явиться причиной неспецифической модификации белков, в частности гистонов, вследствие обнаженности функциональных групп полипептидной цепи. О возможности таких изменений свидетельствует структурная организация и конформация молекул гистонов [27, 30]. Показано наличие такой модификации гистонов *in vivo*, играющей роль не только при взаимодействии гистонов с ДНК, но также и в реализации функциональных возможностей хроматина [4, 6]. В ядре модификация структуры гистонов возможна в результате реакций ацетилирования, фосфорилирования и метилирования [4, 6]. Механизмы реакций, модифицирующих структуру гистонов, окончательно не выяснены. Известно, что модификация гистонов происходит уже после завершения синтеза полипептидной цепи [4, 6]. Показана роль уровня модификации гистонов в регуляции генетической активности и структурированности [4, 6] хроматина.

Модификация гистонов при ацетилировании их лизиновых остатков приводит к уменьшению положительного заряда белка, вследствие чего ослабляется связь между гистонами и отрицательно заряженной ДНК. Изменение уровня ацетилирования гистонов при облучении может произойти как вследствие прямого радиационного нарушения вторичной структуры гистонов, так и вследствие нарушения этого процесса, если в ацетилировании принимают участие ферменты. В обоих случаях результатом является нарушение тонкой структуры хроматина или изменений взаимоотношений ДНК — белок, неоднократно наблюдавшееся в радиобиологических экспериментах.

Таблица 6

Интенсивность включения ^{14}C -ацетата в гистоны ядер, изолированных из корешков гороха, $\text{имп/мин на 1 мг белка}$

№ опыта	Контроль	5 крад	% к контролю
1	155 ± 2	172 ± 3	111
2	280 ± 12	318 ± 15	113
3	140	213	152
4	137	193	140

Таблица 7

Интенсивность включения ^{214}C -ацетата в гистоны гетеро- и эухроматина изолированных ядер из облученных проростков гороха

Гистоны фракций хроматина	Удельная активность, $\text{имп/мин на 1 мг белка}$	
	контроль	5 крад
Гетерохроматин	517 ± 23	771 ± 27
Эухроматин	976 ± 15	1003 ± 17

Как показали проведенные нами исследования (табл. 6), уровень ацетилирования гистонов в пострадиационный период в сум-

марных гистонах общего хроматина увеличивался в пределах 15—50%.

Степень ацетилирования гистонов гетеро- и эухроматина различна как в норме, так и при облучении (табл. 7).

Ацетилирование гистонов хроматина после облучения повышалось в эу- и гетерохроматиновых фракциях, однако гистоны гетерохроматина облученных проростков ацетилировались намного интенсивнее. Незначительное повышение уровня ацетилирования обнаружено и для гистонов эухроматиновой фракции.

При модификации гистонов фосфорилированием их в системе изолированных ядер аналогичной лабильности этого процесса нами не выявлено. Изучение интенсивности фосфорилирования, проведенное с помощью метода инкубации гамма-облученных корешков, а также изолированных из них ядер с меченным по фосфору неорганическим фосфатом, показало повышенную способность к фосфорилированию гистонов из облученных проростков (табл. 8).

Весьма вероятно, что закономерности, обнаруженные нами при изучении уровня модификации гистонов после облучения, могут вносить вклад в радиационное нарушение надмолекулярной организации хроматина, независимо от того, в результате чего возникли нарушения модификации — вследствие первичной денатурации белков или в результате нарушения ферментов, принимающих участие в процессах фосфорилирования и ацетилирования.

По данным Н. Б. Стражевской [27], большую роль в нарушении надмолекулярной организации хроматина играют белки негистоновой природы. Автор обнаружила упрочнение связи ДНК — белок при облучении растворов ДНП. При облучении крыс в дозах 1—5 крад наблюдалась аналогичная картина, только проявление радиационного эффекта было значительно меньшим. Н. Б. Стражевская предлагает три этапа действия ионизирующей радиации на ДНП — структуры:

1) первичные физико-химические нарушения ДНП при прямом действии радиации; 2) компенсаторный этап, связанный с деятельностью репарирующих систем; 3) вторичный ферментативный этап, вследствие чего активируются нуклеазы и протеазы, лабилизируется связь ДНК — белок. Упрочнение же неспецифической связи ДНК — белок обусловлено повреждением структуры ДНК, так как структурных повреждений гистонов при облучении в дозе 5 крад не выявлено.

Таблица 8
Влияние гамма-облучения на интенсивность включения ^{32}P в гистоны хроматина у проростков гороха

Фракции хроматина	Удельная активность, $\mu\text{мк/мин на 1 мг белка}$	
	контроль	5 крад
Общий хроматин	286	388
	310	380
	491	530
Гетерохроматин	127	203
Эухроматин	311	325

В неспецифическую связь с поврежденной ДНК вступают негистоновые белки хроматина. Такое комплексирование негистоновых белков с ДНК наблюдали *in vivo*. По мнению Н. Б. Стражевской, белок, прочно связанный с ДНК, представляет собой функциональный белок, предположительно ДНК- и РНК-полимеразы, лигазы, которые могут иметь значение в репарационных процессах. Подтверждением этого предположения служат полученные автором данные о репарации одно- и двунитевых разрывов в эу- и гетерохроматиновой ДНК [27]. В гетерохроматине они быстро ликвидируются, а в эухроматине не выявлены.

Участие белкового компонента хроматина в радиационном поражении надмолекулярных структур изучалось нами с помощью применения ингибиторов биосинтеза белков. Сразу после облучения проростков гороха в корешки вводили хлорамфениколл и сравнивали заселенность хроматина белками с хроматином необлученных проростков. Полученные данные позволяют предполагать, что в упрочнении связи ДНК — белок после облучения участвуют белки, не синтезированные *de novo*, а имевшиеся в ядре до облучения. К такому заключению мы пришли, оценивая выделенный после облучения и инкубации с хлорамфениколлом хроматин по количеству свободных фосфатных групп ДНК в хроматине (табл. 9).

Таблица 9
Влияние хлорамфениколла на интенсивность связывания
тотундинового синего хроматином после облучения
проростков гороха

Схема опыта	Краска, связанная с алликовой хроматином, %		% к конт- ролю
	контроль	5 крад	
Без хлорамфениколла	59,3 ± 1,8	43,2 ± 1,5	72
С хлорамфениколлом	52,3 ± 1,6	27,0 ± 0	52

Как видно из приведенных данных, при добавлении хлорамфениколла количество связывающих мест на ДНК хроматина при облучении не только не увеличивалось, но, наоборот, количество краски, связанной хроматином, уменьшалось. Полученные данные могут свидетельствовать также о возможности перераспределения белков в хроматине после облучения. Однако не исключена возможность присоединения свободных белков ядер к хроматину после облучения. Необходимы доказательства, является ли обнаруженный факт следствием денатурационного действия радиации или функциональной мобилизацией белков к пострадиационному восстановлению.

Более позднее нарушение комплексообразовательной способности компонентов хроматина обнаружено В. С. Лиходедом и соавт. [19], которые исследовали комплексообразующую способность гистонов, кислых белков ядер и РНК печени крыс через 24 ч после

облучения в дозе 800 μ . По мнению авторов, все перечисленные компоненты хроматина характеризовались изменениями, возникшими не только при первичном действии радиации, но и обусловленными вторичными эффектами, неравномерностью синтетических процессов тех или иных белков. Была обнаружена повышенная способность к комплексообразованию лизинбогатой фракции гистонов с РНК; способность к образованию комплексов кислых белков при этом не менялась. Гистоны из облученных органов связывались более сильно не только с РНК, но и с кислыми белками.

Согласно данным Бауэра и Олифант [43], ДНК, остающаяся в ядре, а также переходящая в растворимое состояние спустя несколько часов после облучения животных, обладала пониженным сродством к гистонам. Каковы причины столь отдаленных последствий действия радиации на свойства макромолекул, составляющих хроматин, определят дальнейшие исследования.

РАДИАЦИОННЫЕ НАРУШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ ХРОМАТИНА, ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ЯДРА И ПРОЦЕССАХ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Модификация лучевого повреждения ДНК в клетках эукариот до сих пор не известна. Постоянное соотношение белка и ДНК в хромосомах должно играть существенную роль в реализации радиационных повреждений и процессах восстановления. Еще в ранних радиобиологических исследованиях [28, 55] было показано, что белки, ассоциированные с ДНК, в 10 раз снижают ее радиочувствительность, оцениваемую химическими повреждениями структуры. Применение ингибиторов белкового синтеза убедило в необходимости для восстановления деградированной радиацией ДНК синтеза белков *de novo* [51, 59].

В радиобиологии, и в частности в радиационной биохимии, исследование нарушения синтеза белкового компонента хроматина является важным этапом в изучении проявления и развития как радиационного поражения клеток, так и восстановительных процессов в ней. В первых исследованиях белкового компонента хроматина было установлено освобождение гистонов из ядер облученных организмов, а также изолированных ядер [53]. В дальнейшем было обнаружено обеднение хроматина после рентгеновского облучения гистонами и, в первую очередь, их высокомолекулярными фракциями [78]. Затем было показано [43], что потери ДНК и гистонов происходят в равной степени в течение первых 24 ч после облучения. Отношение ДНК/гистон в этот период постоянно. Все фракции гистонов отделяются в равном количестве и с одинаковой скоростью. Удалось обнаружить деградацию гистонов, которая оказывает влияние на степень повреждения клеток.

Изучение радиочувствительности биосинтеза белков хроматина представляет интерес не только в связи с радиочувствительностью

ядра и клетки в целом, но и в чисто биологическом аспекте, поскольку показано наличие внутриддерного синтеза белков, отличающегося некоторыми особенностями [57]. Так, в исследованиях на экспоненциально размножающихся клетках табака и проростках гороха было показано, что механизм синтеза гистонов отличается от механизма синтеза других белков [58], и установлено, что местом активного синтеза гистонов является ядрышко [1]. Синтез гистонов протекает параллельно синтезу ДНК, однако он не ингибируется 5-фтордезоксиуридином.

Особенности биосинтеза негистоновых белков хроматина и более высокая, по сравнению с гистонами, скорость их синтеза показаны в работах Буша [2]. Обобщение достижений последнего времени в изучении негистоновых белков представлено в трудах лаборатории Боннера [54]. Согласно этим представлениям, негистоновые белки хроматина представлены множеством ферментов, таких как НАД-синтетазы, РНК- и ДНК-полимеразы, окислительные и гидролитические ферменты, ферменты белкового синтеза и ДНК-лигазы. Показано, что ДНК-лигазы, входящие в состав белков хроматина млекопитающих, легко репарируют однонитевые разрывы в системе ДНК — гистон. Однако свободные гистоны ингибируют лигазную репарацию ДНК в составе нуклеопротеида [8]. Негистоновые белки вызывают разворачивание хроматина, способствующее связыванию РНК-полимеразы [75].

Фракция остаточного белка содержит цистеин, который способен образовывать межмолекулярные связи [77]. По мнению Д. М. Сплитковского и сотр. [28], эта фракция может играть существенную роль в образовании надмолекулярных структур ДНП.

Обзор работ по изучению действия ионизирующей радиации на биосинтез ядерных белков приведен в монографии А. М. Кузина [14]. Опубликованные данные не позволяют пока оценить роль степени нарушения синтеза белков хроматина в ранний пострадиационный период, определяющий судьбу пораженного ядра. Тем не менее именно раннее развитие радиационного поражения в синтезе белков хроматина наиболее существенно отражается на его нормальном функционировании. Эксперимент для выяснения ряда пострадиационных нарушений скорости синтеза белкового компонента хроматина состоял в следующем. Синхронизированные с помощью оксимочевины клетки меристем корешков гороха метили ^{14}C -гидролизатом белков. Через 3 ч после снятия блока оксимочевины проростки облучали. Через 1, 3, 5, 6 и 8 ч после облучения корешки фиксировали жидким азотом, изолировали из них меристемы, из которых выделяли хроматин и его фракции по методу Френстера [61]. Контроль выделенных фракций хроматина проводили с помощью электронного микроскопа. Таким образом, мы получали хроматин через 5, 7, 8, 9 и 11 ч после снятия блока оксимочевины, что соответствовало концу фазы G_1 и всей фазы S_1 митотического цикла. Облучение проводили через 2,5 ч после снятия блока оксимочевины, что соответствовало фазе G_1 . В изучаемый период мы следили за

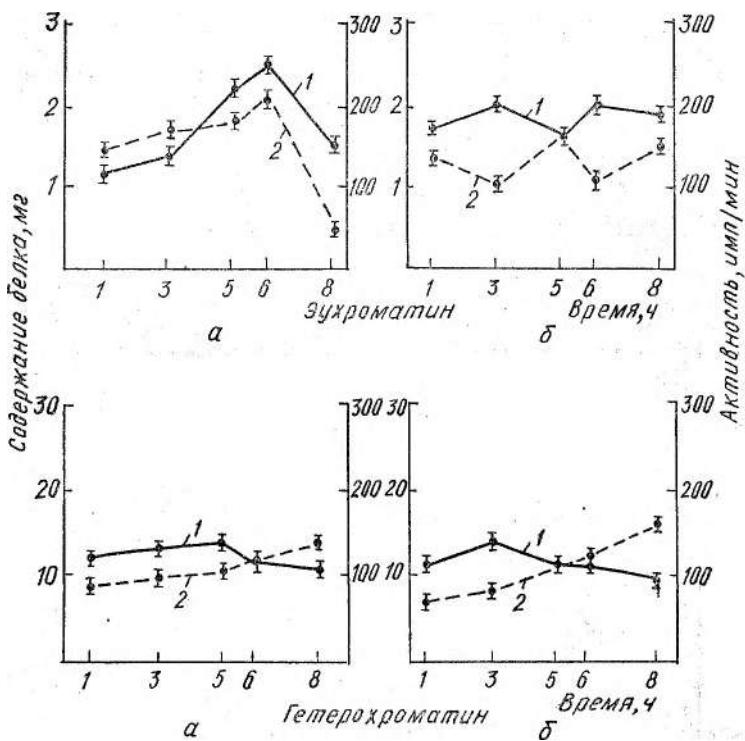


Рис. 2. Кинетика содержания (1) и радиоактивности (2) гистонов эу- и гетерохроматина, меченных до облучения ^{14}C -гидролизатом белков: а — контроль, б — облучение.

изменением как содержания белков, так и их радиоактивности. Из приведенных на рис. 2, 3 и 4 данных видно, что изменения в хроматине прежде всего затрагивают эухроматиновую фракцию. Содержание гистонов в эухроматине облученных и необлученных тканей одинаково. От начала наблюдения идет постепенное накопление гистонов, которое увеличивается в контроле в два раза к 9 ч 30 мин после снятия блока оксимочевины, а затем начинает уменьшаться, достигая исходного уровня. Кривая удельной активности указанных белков параллельна кривой накопления. Кинетика содержания гистонов в эухроматине клеток меристем корешков гороха, облученных в фазе G_1 , имеет аналогичный характер. Однако максимальное увеличение количества гистонов наступает на 1 ч раньше, чем в норме. Изменение радиоактивности гистонов в течение исследуемого времени показывает, что сразу после облучения из эухроматиновой фракции отделялись ассоциированные с ней гистоны, которые сразу же пополнялись как синтезированными *de novo*, так и находившимися в ядре в свободном состоянии. Несмотря на колебания в скорости синтеза указанных белков, обеспеченность хроматина

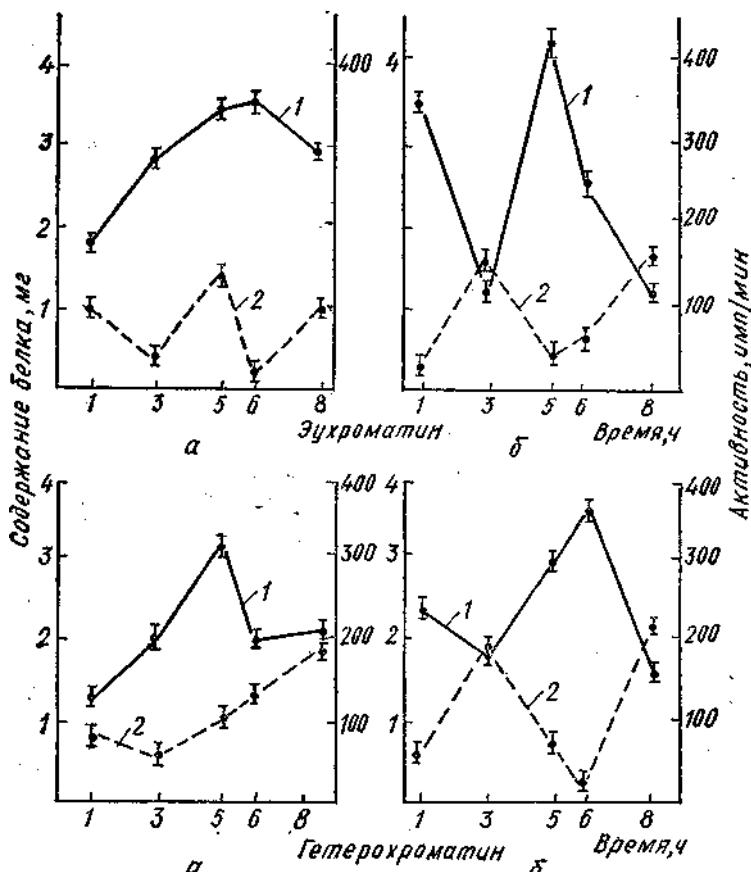


Рис. 3. Кинетика содержания (1) и радиоактивности (2) негистоновых белков зу- и гетерохроматина, меченных до облучения ^{14}C -гидролизатом белков:

а — контроль, б — облучение.

гистонами достигается, очевидно, перераспределением белков. Характер изменений содержания и активности гистонов в гетерохроматине облученных клеток аналогичен таковому в норме. Однако при облучении увеличение удельной активности гистонов наступает на 1 ч раньше. Возможно, при облучении наступает разобщение синтеза ДНК и гистонов, неоднократно наблюдавшееся при действии 5-фторурацила на опухолевых клетках [78] и 5-фтордезоксиуридина на клетках табака [58].

Более сильные нарушения в пострадиационный период мы обнаружили у негистоновых белков. В течение исследуемого периода у интерфазного хроматина удельная активность негистоновых белков эухроматина сначала снижалась, что может быть истолковано усилением синтеза белков *de novo* с меньшей удельной активностью,

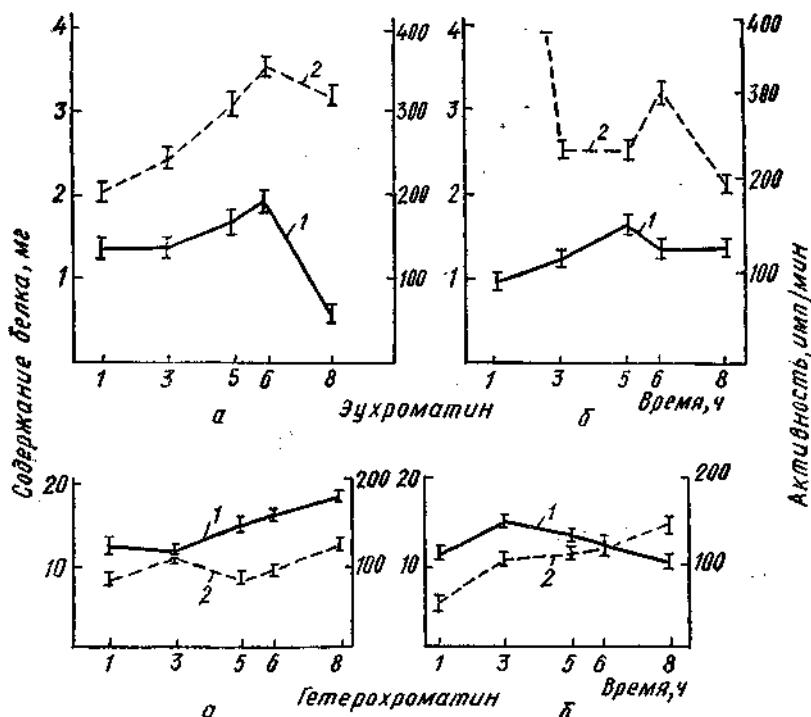


Рис. 4. Кинетика содержания (1) и радиоактивности (2) остаточных белков эу- и гетерохроматина, меченных до облучения ^{14}C -гидролизатом белков:
а — контроль, б — облучение.

поскольку фонд свободных меченых аминокислот с течением времени иссякает. Однако можно допустить наличие в ядре некого фонда не обменивающихся быстро белков, которые после облучения комплексируются с эухроматином. Через 3 ч после облучения наступает отсоединение указанных белков и с эухроматином остаются синтезированные в предсинтетической фазе белки с высокой удельной активностью. В дальнейшем наиболее вероятно обновление хроматина вновь синтезированными белками с меньшей удельной активностью.

Аналогична закономерность кинетики содержания и активности негистоновых белков в гетерохроматине, что, согласно полученным нами ранее данным, показывающим деспирализацию гетерохроматина, может быть истолковано как обеспечение негистоновыми белками тех участков гетерохроматина, которые необходимы для активации.

Изменения, наблюдающиеся в остаточных белках хроматина после облучения, были обнаружены в обеих фракциях хроматина. Эти белки в исследуемый период оказались наиболее быстро обменивающимися, о чем свидетельствует более высокий, по сравнению с

другими белками хроматина, уровень радиоактивности. В указанную фракцию белков, особенно гетерохроматиновую, очевидно, включена часть белков ДНК-мембранных комплексов. Обнаруженные нами изменения в остаточных белках как в контроле, так и при облучении свидетельствуют о их высокой функциональной активности и довольно большой роли в пострадиационных процессах в хроматине. Характер кривых кинетики изменения белков хроматина в пострадиационный период также может служить косвенным доказательством возможности сдвига в фазах клеточного цикла, о чем свидетельствует синхронность изменений при облучении во всех белках гетерохроматина.

Обнаруженная лабильность негистоновых белков после облучения, а также их ферментативные свойства обосновывают целесообразность исследования радиационного воздействия на биосинтез одной из групп негистоновых белков — РНК-полимераз. Хаген [84] установил, что облученная ДНК связывает в 1,6 раза больше РНК-полимеразы, чем необлученная. РНК-полимераза присоединялась по местам одиночных разрывов в ДНК, что могло тормозить ее транскрибирующую функцию. Данные об активности РНК-полимераз после облучения довольно противоречивы. Не обнаружено изменения активности РНК-полимеразы печени после облучения *in vitro*, а также в облученных тканях [48]. Наряду с этим имеются данные, свидетельствующие об активации РНК-полимераз облученных мышей [64]. Причиной этого могут быть не только изменения специфической активности РНК-полимераз, но и уровень их содержания.

Учитывая приведенные выше данные, мы исследовали интенсивность синтеза РНК-полимераз после облучения проростков корешков гороха. РНК-полимеразы выделяли по методу [36], разработанному для высших растений, и хроматографировали на колонках с ДЭАЭ-сепадексом А-25 согласно прописи [36]. Интенсивность синтеза отдельных фракций РНК-полимераз определяли по их удельной активности после инкубации корешков гороха в среде, содержащей 2^{14}C -лейцин с аликвотой смеси немеченых аминокислот. Через 2 ч после облучения при импульсном введении метки из меристематических тканей корешков гороха получали меченные РНК-полимеразы. Из облученных тканей нами выделено на 30% меньше белка, чем в контроле. Удельная активность суммарного препарата составляла в контроле $471 \pm 18 \text{ имп/мин}$ на 1 мг белка, а при облучении — 679 ± 21 . При разделении белков на колонках с сепадексом А-25 мы обнаружили, главным образом, две фракции РНК-полимераз — Iв и II; Iа и III были представлены значительно меньшим количеством (рис. 5). При облучении фракция III нами не была обнаружена. Импульсное введение метки позволило сделать вывод об усилении после облучения синтеза РНК-полимераз.

Для выяснения причины уменьшенного выхода белка повторно экстрагировали осадок согласно приведенной выше методике, но увеличив pH экстрагируемой смеси до 8,8—9. Из осадка хроматина облученного материала мы получили дополнительно 15% белка

общего выхода, что почти соответствует уровню содержания белка в норме. Удельная активность повторно экстрагированных белков была в 10 раз ниже удельной активности полученных при первом извлечении в облученном варианте (71 ± 8 имп/мин на 1 мг) и в два раза ниже, чем в контроле. Из контрольного варианта дополнительно получено 3–5% белка.

Полученные нами данные позволяют констатировать усиление после облучения синтеза РНК-полимераз. Очевидно, часть РНК-полимераз, содержащихся в хроматине до облучения, в пострадиационный период более прочно связывается с хроматином. Об этом свидетельствует более низкий уровень радиоактивности выделенных дополнительной экстракцией РНК-полимераз.

Выявленные закономерности пострадиационных изменений белков хроматина позволяют определять ранние нарушения как состава белкового компонента хроматина, так и интенсивности его синтеза. Интенсивное изменение состава негистоновых белков после облучения, особенно эухроматиновой фракции, свидетельствует об активном участии указанных белков в восстановительных процессах.

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ХРОМАТИНА

Главная функциональная роль хроматина состоит в хранении, воспроизведении и передаче генетической информации в морфогенетические системы. Несмотря на наличие генетических систем в других органеллах — пластидах, митохондриях — основные процессы, происходящие в них, контролируются хроматином ядер. Поэтому исследование радиационного воздействия на хроматин и проявление его функций является одним из важнейших этапов изучения радиочувствительности ядра. От степени и характера нарушений функций хроматина зависит развитие радиационного поражения всей клетки, а также предопределяется возможность репарационных и восстановительных процессов в клетке. В практическом аспекте указанные исследования представляют ценность для выяснения механизма радиационного мутагенеза, возможности управления мутациями и установления контроля за направленностью метаболических и структурообразовательных процессов, составляющих сущность морфогенеза.

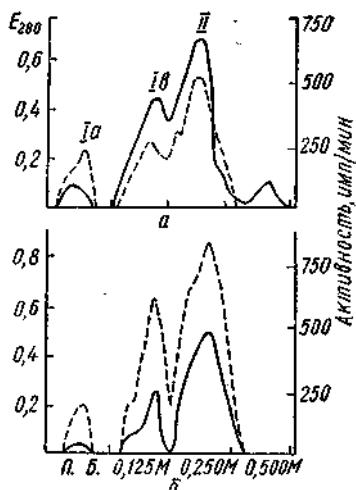


Рис. 5. Хроматографический профиль на колонке с сепадексом А-25 меченых *in vivo* РНК-полимераз:

а — контроль, б — облучение в дозе 5 крад; п. б. — посадочный буфер.

Функциональная активность хроматина тесно связана с динамичностью его состояния. Деконденсация является проявлением активации, а спирализация — уменьшением функциональной активности. Поэтому состояние хроматина в интерфазе, в частности соотношение между гетеро- и эухроматином, определяет его функциональную активность. Ее можно оценивать также по скорости репликации ДНК и транскрибирования информационных РНК, по включению меченых предшественников — тимидина, уридиновой кислоты и фосфора. Функциональную активность хроматина можно определить, установив количество свободных фосфатных групп ДНК, по интенсивности связывания хроматина с такими красителями, как акридиновый оранжевый, толуидиновый синий, что характеризует степень доступности матрицы. Активность хроматина может быть определена уровнем специфической активности ядерных РНК-полимераз, а также повышением их содержания.

Для оценки радиационного воздействия на активность хроматина мы использовали некоторые из приведенных выше критерии. Как уже указывалось (см. табл. 3), через 2 ч после облучения проростков гороха количество эухроматиновой фракции увеличивалось, одновременно уменьшалось количество гетерохроматина. С увеличением дозы облучения наблюдалось усиление эффекта.

Согласно некоторым литературным данным [12, 15], негистоновые белки сосредоточены во фракции эухроматина, где локализована генетически активная ДНК. Учитывая, что в составе негистоновых белков хроматина содержатся нуклеазы, полимеразы нуклеиновых кислот и ферменты репарации, количество указанных белков в хроматине играет немаловажную роль в развитии радиационного поражения или восстановления хроматина. Гистоны неспецифически инактивируют ДНК и принимают участие в суперспирализации ее, уменьшая тем самым доступность матрицы. В связи с этим соотношение указанных фракций белков, динамика их содержания и интенсивность синтеза сразу после облучения также могут служить критерием его функциональной активности.

Мы провели исследование влияния гамма-облучения меристематических клеток в составе целых проростков, находящихся в предсинтетической фазе, на кинетику содержания гистонов и негистоновых белков хроматина через 1, 3 и 5 ч после облучения. В эти же сроки определялась интенсивность связывания хроматином толуидинового синего. Этот метод, предложенный Миурой и Охбай [74], позволяет определить количество свободных фосфатных групп в ДНК хроматина.

На рис. 6 показана кинетика содержания суммарных гистонов и негистоновых белков хроматина при дозах облучения 0,5 и 5 крад. Сравнение полученных данных с интенсивностью связывания толуидинового синего показывает, что количество связанный краски со свободными фосфатными группами ДНК хроматина находится в прямой зависимости от содержания негистоновых белков и в обратной — от содержания гистонов. Следовательно, количество

гистонов в хроматине конкурирует за места связывания хроматина с краской. Особенно четко это наблюдается при дозе облучения 5 крад, когда кривая изменения содержания гистонов является зеркальным отображением кривой связывания толуидинового синего. Эти данные хорошо согласуются с приведенными данными об изменении фракционного состава хроматина.

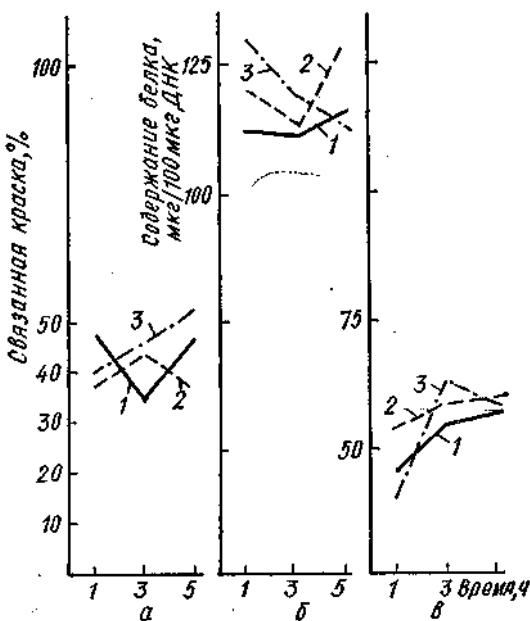


Рис. 6. Пострадиационные изменения интенсивности связывания толуидинового синего (а), содержания гистонов (б) и негистоновых белков (в) в общем хроматине меристем корешков облученных проростков гороха:

1 — контроль, 2, 3 — соответственно дозы облучения 0,5 и 5 крад.

Кроме того, из полученных данных явствует, что зависимость активности хроматина от дозы облучения, определяемая количеством свободных фосфатных групп ДНК, меняется в различные периоды после облучения, что свидетельствует о перестройке молекулярной организации хроматина, а следовательно, и его активности. Некоторые различия в характере полученных зависимостей в норме и при облучении могут свидетельствовать о неспецифической дерепрессии хроматина, которая больше всего проявляется при дозе 5 крад. Оценку активности хроматина и его фракций проводили через 2 ч после облучения по интенсивности включения меченого урацила. Приведенные в табл. 10 данные показывают, что метка была обнаружена не только в составе РНК, но и в ДНК.

Согласно литературным данным [21], РНК, выделяемая вместе с хроматином, является гетерогенной: она представлена не только «хроматиновой» РНК [17, 21], но значительная часть ее состоит из «быстрометающейся» и вновь образованной РНК. Исследования некоторых авторов показали целесообразность использования комплексно связанной с хроматином РНК для оценки транскрибирующей активности генома [17, 21]. Исходя из сказанного выше, представленные в табл. 10 данные могут характеризовать транскрибирующую активность хроматина. Увеличенное количество метки в гетерохроматине облученного материала можно объяснить состоянием хроматина в конце G_1 фазы.

Таблица 10

Интенсивность включения ^{14}C -урацила во фракции хроматина, выделенного из меристем корешков гороха, облученных в G_1 фазе, имп/мин на 1 мг РНК, ДНК

Фракции хроматина	РНК			ДНК		
	контроль	5 крад	%	контроль	5 крад	%
Гетерохроматин	4545 \pm 18	3327 \pm 31	73	86 \pm 11	106 \pm 5	123
Эухроматин	2420 \pm 37	4354 \pm 49	179	174 \pm 15	216 \pm 17	124

В предсинтетической фазе клеточного цикла может наблюдаться включение метки из тимидина (урацила) в связи с неконсервативным репаративным синтезом одиночных цепей ДНК, деполимеризованных в местах синтеза иРНК. По интенсивности этого включения можно судить о матричной активности ДНК в предсинтетической фазе. Особенно возрастает матричная активность ДНК к концу G_1 фазы [46]. В недавно опубликованной работе [83] показано, что при УФ-облучении клеток млекопитающих в G_1 фазе наблюдались структурные изменения хроматина, подобные его состоянию в синтетической фазе. Авторы обнаружили внеплановый синтез ДНК, индуцированный УФ-облучением. При рентгеновском облучении указанные изменения в хроматине не были обнаружены, но были выявлены разрывы хроматиновых нитей, которые воссоединялись без дополнительного синтеза ДНК. Полученное нами увеличение включения метки из урацила в ДНК при облучении может быть истолковано исходя из приведенных выше соображений или вследствие повышенной прочности гибридов ДНК-РНК.

Через 12 и 18 ч после общего рентгеновского облучения в дозе 1 крад в печени крыс обнаружены изменения уровня транскрипции, показано повышение матричной активности хроматина, обусловленное изменениями связи белок — ДНК, соответственно на 26 и 63%. Матричная активность исследовалась в РНК-полимеразной системе [77].

Результаты проведенных нами определений активности хроматина по интенсивности включения метки из тимидина в ДНК разных фракций хроматина меристематических клеток корешков го-

роха, облученных в G_1 фазе митотического цикла, приведены в табл. 11. Полученные данные свидетельствуют о повышении включаемости метки из меченого по углероду тимидина в гетерохроматиновую фракцию облученных клеток. Возможно, наблюдаемая активация включения метки является результатом интенсификации reparационных процессов или неспецифической деспирализацией гетерохроматина после облучения и переход его в активное состояние.

Таблица 11

Включение ^{14}C -тимидина в ДНК разных фракций хроматина меристем корешков гороха

Фракции хроматина	Опыт № 1			Опыт № 2		
	контроль	5 крад	% к контролю	контроль	5 крад	% к контролю
Общий хроматин	—	—	—	212 \pm 19	427 \pm 21	200
Гетерохроматин	144 \pm 18	280 \pm 11	194	74 \pm 11	141 \pm 18	190
Эухроматин	733 \pm 51	189 \pm 21	25	425 \pm 20	116 \pm 3	27

Приведенные данные свидетельствуют о глубоких пострадиационных нарушениях в хроматине, несомненно, искажающих его функционирование. Возможность нормализации структуры хроматина в пострадиационный период соответственно определяет восстановительную реакцию. Вся совокупность данных свидетельствует о потере в ранний пострадиационный период контроля над биосинтезом белков, что является причиной многих нарушений как в ядре, так и в целостной клетке, выражающихся в нарушении фаз митотического цикла, дифференциации, морфогенеза и ряда других процессов организма.

ОБЩИЕ ПРИЧИНЫ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЯДРА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕГО РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

В настоящее время считается установленным, что радиационное повреждение ядра более существенно для развития лучевого поражения всей клетки, чем повреждение других цитоплазматических структур. Уровень радиочувствительности ядра определяется степенью повреждаемости его компонентов (хроматин, ядрышко, мембранны, кариоплазма и другие образования ядра) в момент облучения. Еще в ранние годы развития радиобиологии утверждалось представление, что хромосома — основной компонент ядра — является главной мишенью, при повреждении которой возникают летальные и генетические последствия в живых организмах.

Первым этапом радиационного поражения ядра является прямая инактивация макромолекул ядра, а также возникновение первичных продуктов радиационно-химических реакций, происходящих в результате поглощения энергии. Эти первичные продукты

в виде свободных радикалов, перекисей, гидроперекисей и др., обладающие различной продолжительностью жизни, могут реагировать с макромолекулами хроматина, ядерных мембран, а также с ферментами, входящими в их состав. Возможна модификация этими продуктами молекул ДНК и белков на различных уровнях их структурной организации. Прямая инактивация макромолекул, разрывы цепи ДНК, белков, изменения их вторичной структуры и высших уровней организации, конформационные изменения, модификация макромолекул с помощью первичных продуктов радиационно-химических реакций, потеря способности молекул к узнаванию являются факторами, искающими функциональные проявления хроматина, ядерной мембранны, ДНК-мембранных комплексов и ядра в целом. В результате указанных изменений могут возникнуть: неспецифическая репрессия или дерепрессия хроматина, нарушение кардинальных процессов в ядре — биосинтеза ДНК, РНК, белков, самосборки хроматина и его строительного материала, дезоксирибонуклеопротеидов, ядерных мембран.

Молекулярные механизмы радиационного поражения компонентов ядра, определяющих уровень его радиочувствительности, до сих пор полностью не изучены, хотя в последнее время поток информации в данном направлении увеличился. Большинство исследований проводится на клетках животных организмов. Радиационно-биохимические процессы в ядре растительного организма изучали лишь некоторые авторы. Хотя основные функции ядра растительной и животной клетки аналогичны, исследования на растениях актуальны в связи с радиационным мутагенезом; кроме того, растительная клетка является доступной моделью для исследования эукариотических организмов.

Полученные нами экспериментальные данные позволяют характеризовать некоторые стороны описанных выше радиационных эффектов на уровне компонентов ядра, а также функциональной интеграции их в целостном ядре. Мы обнаружили, что проявление радиационного эффекта на надмолекулярном уровне хроматина выражается в изменении соотношения между гетеро- и эухроматином. В зависимости от состояния хроматина в момент облучения этот эффект проявляется либо в деспирализации хроматина, либо в усилении его конденсации.

Существенный вклад в радиационное поражение хроматина вносит изменение его белкового компонента, которое в условиях наших экспериментов проявлялось в перераспределении белков между фракциями хроматина, а также между хроматином и свободными белками ядра, в нарушении скорости их биосинтеза, в посттрансляционной модификации гистонов, определяющейся уровнем ацетилирования и фосфорилирования, в нарушении взаимодействия ДНК с РНК-полимеразой и скорости синтеза последней. В комплексе указанных эффектов особое место занимает радиационное повреждение ферментов, ассоциированных с хроматином и ядерной мембраной. Сюда относится как первичное повреждение

белковой молекулы, так и нарушение высших уровней структурированности фермента, вплоть до способности белковой молекулы к образованию четвертичной структуры — сборки субъединиц фермента, вследствие конформационных изменений. Все отмеченные изменения приводят к нарушению молекулярного узнавания между компонентами хроматина, а в результате этого — к искажению его функций. В наших экспериментах функциональные нарушения хроматина проявлялись в изменении включаемости в компоненты хроматина меченых предшественников ^{14}C -тимидина и ^{14}C -урацила, в степени обнаженности свободных фосфатных групп ДНК и степенью конденсации хроматина.

Наименее изучены радиационные эффекты в ядрышке. Учитывая, что в ядрышках происходит процесс образования рибонуклеопротеидов (предположительно, синтез белков основного характера), а возможно, и сборка моносом, можно представить последствия радиационного поражения данного компонента ядра. Не менее существенным фактором, определяющим радиочувствительность ядра, является ядерная мембрана. Поражение субъединиц мембранных структур приводит к нарушению ядерно-цитоплазматических отношений, к нарушению транспорта и компартментализации веществ, вследствие изменения проницаемости. Эти изменения играют существенную роль в усилении радиационно-химических эффектов. Кариоплазма является средой, в которой функционируют основные компоненты ядра. Сохранение постоянства ее состава — необходимое условие сохранения радиостойчивости ядра. И, наконец, радиочувствительность ядра определяется уровнем репарационных и восстановительных процессов, что, в свою очередь, зависит от степени повреждения ферментативных систем, участвующих в этих процессах.

Степень радиационного поражения ядра и его компонентов определяет судьбу прохождения клетки по митотическому циклу, нормальный морфогенез и способность к восстановлению всех систем клетки как путем репарации, так и интенсификации функций регуляторных систем клетки. Значение радиочувствительности ядра в общем лучевом патогенезе клетки еще более увеличивается в связи с утверждением представлений, что кардинальные процессы в клетке и ее субструктурах контролируются ядром. Наличие же белоксинтезирующих систем в других органеллах предназначено главным образом для воссоздания их структурной организации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боннер Дж. Молекулярная биология развития. М., «Мир», 1967.
2. Буш Г. Гистоны и другие ядерные белки. М., «Мир», 1967.
3. Воробьев В. И. Структура дезоксирибонуклеопротеида. — В кн.: Успехи современной генетики, т. 3. М., «Наука», 1971.
4. Гистоны и перенос генетической информации. М., «Мир», 1967.
5. Георгиев Г. П. Цитология ферментов. М., 1971.
6. Георгиев Г. П. Структура и матричная активность хроматина. — В кн.: Успехи современной генетики, т. 3. М., «Наука», 1971.

7. Газиев А. И., Закржевская Д. Т., Уманский С. Р., Стражевская Н. Б., Стручков В. А., Кузина А. М. Полинуклеотидилгазная активность негистоновых белков хроматина клеток костного мозга. — ДАН СССР, 1971, 199, 470.
8. Газиев А. И., Закржевская Д. Т., Уманский С. Р., Кузина А. М. ДНК-лигаза в нуклеопротеидном комплексе. — В кн.: IV междунар. биофиз. конгр., т. I. 1972, 262.
9. Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М., «Мир», 1972.
10. Ермолаева Л. П. Фракционирование и метаболическая активность белков ядрышек животных клеток. — Биохимия, 1966, 31, 5, 936.
11. Збарский И. Б., Георгиеv Г. П. Структура клеточного ядра. Сопоставление данных цитохимии и электронной микроскопии. — Цитология, 1962, 4, 6, 605.
12. Збарский И. Б. Клеточное ядро. Морфология, физиология и биохимия. М., «Наука», 1972.
13. Збарский И. Б. Химическая организация клеточного ядра. — В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., «Наука», 1970.
14. Кузина А. М. Молекулярная радиобиология клеточного ядра. М., Атомиздат, 1973.
15. Конарев В. Г. Клеточное ядро и его ультраструктуры. М., «Наука», 1970.
16. Конарев В. Г. Цитохимия и гистохимия растений. М., «Высшая школа», 1966.
17. Конарев В. Г. Белки, нуклеиновые кислоты и проблемы прикладной ботаники, генетики и селекции. — В кн.: Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 52, вып. 1. Л., 1973, 1.
18. Ли Д. Е. Действие радиации на живые клетки. М., Госатомиздат, 1963.
19. Лиходед В. С., Паскевич И. Ф. Влияние облучения на образование комплексов между РНК и ядерными белками. — Радиобиология, 1972, 12, 4, 592.
20. Маркет К., Уршпуринг Г. Генетика развития. М., «Мир», 1973.
21. Махлаева Р. Ф. Природа ДНК-РНК комплекса и его связь с активностью генома. — В кн.: Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 52, вып. 1. Л., 1973, 57.
22. Онищенко Г. Е., Ченцов Ю. С. Механизмы регуляции функции клеточного ядра. Тбилиси, 1972.
23. Пасынский А. Г. — Радиобиология, 1964, 6, 57.
24. Стражевская Н. Б., Стручков В. А. Пострадиационное восстановление одно- и двунитевых разрывов в эу- и гетерохроматиновой ДНК тимуса и печени гамма-облученных крыс. — Радиобиология, 1972, 12, 4, 498.
25. Стражевская Н. Б., Трояновская М. Л. Первичные изменения ДНП хроматина тимуса крыс после гамма-облучения животных. — Радиобиология, 1971, 11, 1, 17.
26. Стражевская Н. Б., Трояновская М. Л., Кривцов Г. Г. Механизмы радиационного повреждения ДНП хроматина в животной клетке. — Радиобиология, 1971, 11, 3, 329.
27. Стражевская Н. Б. Механизмы радиационного поражения и восстановления ДНП. Пущино-на-Оке, 1972.
28. Спилковский Д. М., Андрианов В. Г., Писаревский А. Н. Радиационная биофизика нуклеопротеида. М., Атомиздат, 1969.
29. Рябченко Н. И. Действие гамма-облучения на макромолекулярную структуру ДНК. — В кн.: IV междунар. биофиз. конгр., т. I. 1972, 200.
30. Рябченко Н. И. Механизмы радиационного поражения и восстановления ДНП. Пущино-на-Оке, 1972.
31. Токарская В. И., Уманский С. Р., Король Б. А., Рунова Ю. Н. Влияние облучения на свойства реконструированных нуклеогистонов. — В кн.: IV междунар. биофиз. конгр., т. I. 1972, 201.
32. Холмс Б. Ионизирующие излучения и клеточный метаболизм. М., ИЛ, 1958.

33. Хуг О., Келлерер А. Стохастическая радиобиология. М., Атомиздат, 1966.
34. Шальников М. И. Структурно-функциональная организация хромосомы и роль радиационных повреждений ее ДНК. — В кн.: Молекулярная радиобиология, т. III. М., Атомиздат, 1972, 155.
35. Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М., «Наука», 1974.
36. Alberg A., Massol N., Raynaud J. R., Balent E. E. Estradiol Binding of Exceptionally High Affinity by a Nonhistone chromatin. — Protein Fraction. Biochemistry, 1971, 10, 21, 3835.
37. Aldrich H. C., Vasili J. K. J. — Ultrastr. Res., 1970, 32, 307.
38. Busch H. J. — Nat. Cancer Inst. Monogr., 1966, 23, 193.
39. Bonner J., Huang R. C. C. Properties of chromosomal nucleohistone. — J. Mol. Biol., 1963, 6, 169.
40. Bonner J. The Molecular biology of development. Oxford, Clarendon Press, 1965.
41. Bonner J., Widholm J. Molecular complementarity between nuclear DNA and organspecific chromosomal ENA. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 575, 1379.
42. Bonner J., Griffith J. D. Biol. Annual Rept. 1969. Pasadena, Calif. Inst. Technol., 1970.
43. Bauer R. D., Oliphant E. E. Studies of Radiations Influence on Histones and DNA in Rat-Thymus. — Radiat. Res., 1972, 51, 2, 454.
44. Brachet J., Decroly M., Ficq A., Quertier J. Ribonucleic acid metabolism in unfertilized and fertilized sea-urchin eggs. — Biochem. Biophys. Acta, 1963, 72, 660.
45. Beams H. W., Muller S. L. — Lellforsch., 1970, 108, 298.
46. Boublík M., Bradbury E., Crane-Robinson C. — Europ. J. Biochem., 1970, 17, 1951.
47. Bradbury E. M., Molgaard H. V., Stephens R. M., Bolund L. A., Johns E. W. X-Ray Studies of Nuclear Proteins Depleted of Lysine-Rich Histone. — Europ. J. Biochem., 1972, 31, 3, 474.
48. Chamberlain P. — Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, 3, 504.
49. Cramp W. A., Watkins D. K., Collins J. The synthesis of DNA by membrane — DNA complexes from *E. coli* B/r and Bs-1 after exposure to fast electrons and neutrons: the measurement oxygen enhancement ratios and RBE values. — Intern. J. Radiat. Biol., 1972, 22, 4, 379.
50. Du Praw E. J. Organisation of genetic material in eukaryotic chromosomes. — In: Cell and Molecular Biology. N. Y. — L., Acad. Press, 1968.
51. Dean C. J. Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation. Vienna, 1968.
52. Davies H. G., Smill G. V. Structure units in chromatin and their orientation on membranes. — Nature, 1968, 217, 1122.
53. Elkind M. M. — Current topics in Radiat. Res., 1970, 7.
54. Elgin Sarah C. R., Bonner J. Isolated chromatin in the study of gene expression. A personal and biased account of chromatin as of May 1972. "Biochem-Gene Express. High Organisms." Dordrecht — Boston, 1972, 162.
55. Emmerson P., Scholes G., Thomson D. H., Ward J. F., Weiss J. H. Chemical Effects of ionizing Radiations on Nucleic Acids and Nucleoproteins. — Nature, 1960, 187, 319.
56. Erdstrom J. E., Daneholt B. Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of *Chironomus tentans* salivary gland Cells. — J. Mol. Biol., 1967, 28, 331.
57. Flamm W. G., Birnstiel M., Filner P. — Biochem. Biophys. Acta, 1963, 76, 110.
58. Flamm W. G. — Biochem. Biophys. Acta, 1964, 87, 111.
59. Frampton E. W., Billen D. X-Ray-Induced Degradation of DNA in a Polyauxtrophic Bacterium. — Radiat. Res., 1966, 28, 109.
60. Franklin R. M., Baltimore D. — Gold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., 1962, 27, 175.

61. Frenster J., Wincent G., Allfrey G., Mirsky A. E. Repressed and Active Chromatin isolated from interphase Lymphocytes.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963, 50, 6, 1026.
62. Harris H. Nuclear ribonucleic acid.— Цит. по: Нуклеиновые кислоты. М., «Мир», 1966.
63. Holoubek V., Crocker T. T. DNA-associated acidic proteins.— Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, 352.
64. Gatin M. B. RNA-Polymerase Activity in Liver Nuclei of Intact and Adrenalecto mice γ-Irradiated Mice.— Experientia, 1970, 26, 490.
65. Gross P. R. The Control of Protein Sythesis in embryonic development and differentiation.— Current Topics Develop. Biol., 1967, 2, 1.
66. Goldstein L., Prescott D. M. Protein interactions between nucleus and cytoplasm.— In: The Control of Nuclear Activity. London, Gold Stein ed., 1966.
67. Kirk J. T. O. The genetic control of plastid formation: recent advances and strategies for the future.— Sub.-Cellul. Biochem. 1972, 1, 4, 333.
68. Kornberg A. Enzymatic Synthesis of a DNA. New York, 1961.
69. Laitha L. G.— On the Mechanism of Radiation. Effect on DNA synthesis.— Radiat. Res., 1958, 8, 1.
70. Lowenstein W. R., Kanno J. Studies on epithelial (gland) cell function. I. Modification of surface Membrane permeabilited.— J. Cell Biol., 1964, 22, 565.
71. Lowenstein W. R., Kanno J. Intercellular communication and tissue growth.— J. Cell. Biol. 1967, 33, 225.
72. Littau V. C., Budric C. G., Allfrey V. G., Mirsky A. E. The role of histones in the Maintenance of Chromatin Structure.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 1204.
73. Murphy E. C. Jr., Hall S. H., Shepherd J. H., Weisser R. S. Fractionation of mouse myeloma chromatin.— Biochemistry, 1973, 12, 20, 3843.
74. Miura A., Ohba J.— Biochem. Biophys. Acta, 1967, 145, 436.
75. Paul J., Gilmour R. S.— Regulation transcription and Translation Eukaryot.— In: 24th Colloq. Ges. Biol. Chem. 1973, Berlin, 1973, 31.
76. Ris H. The chemical basis of heredity. Baltimore, 1957.
77. Subba Rao M. N. Changes at transcriptional level in the rat liver following ronoleolody X-Radiation.— In: Proc. Symp. Contr. Mech. Cell Process. Bombay, 1973, 681.
78. Swingle K. F., Cole L. J. Current Topics in Radiat. Res. Ed. Ebert M., Howard A., 1968.
79. Teissera M., Penon P., Richard J. Hormonal control of chromatin availability and of the activity of purified RNA polymerases in higher Plants.— FEBS Lett., 1973, 30, 1, 65.
80. Timofeeff-Resofsky N. W., Limmer K. G. Das Treffenprinzip in der Biologie. Leipzig, 1947.
81. Wills E. D., Wilkinson A. E. The effect of irradiation on lipid peroxide formation in Subcellular fractions.— Radiat. Res., 1967, 31, 732.
82. Wolfe S. L. The effect on prefixation on the diameter of chromosome of fibers isolated by the Langmuir troughcritical point method.— J. Cell. Biol., 1968, 37, 3, 611.
83. Waldren Ch. A., Johnson R. T. Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X- and ultra-violet-irradiation.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4, 1137.
84. Hagen U.— Biochem. Biophys. Acta, 1970, 199, 115.

ГЛАВА II

РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК К ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Многие химические и физические факторы способны изменять лучевую реакцию организма. Модификация радиационного эффекта может быть обусловлена изменением характера первичных реакций или же условий функционирования репарирующих систем клетки. Перед радиобиологами стоят две основные задачи — защита клеток от повреждающего действия излучения и направленное повышение их радиочувствительности. Вопросы защиты биологических объектов от ионизирующей радиации широко исследуются как в теоретическом, так и в практическом плане. Результаты этих исследований обобщены в ряде монографий [1, 9, 16].

Сенсибилизация клеток к радиационному воздействию приобретает большое значение, открывая пути для изучения уникальных структур, повреждение которых приводит к гибели клетки, и в связи с проблемой повышения эффективности лучевой терапии опухолей. Известны химические соединения, обладающие способностью усиливать лучевую реакцию клеток при различных воздействиях во время и после облучения микроорганизмов [28, 52, 44] и клеток млекопитающих [8, 10, 33], но лишь единичные работы проведены на растениях.

Среди растений одной из старейших филогенетических групп являются синезеленые водоросли — Суапорфута, занимающие ключевые позиции на границе перехода от прокариотов к эукариотам. Они обладают биохимической автономностью, свойственной облигатно фотосинтезирующем организмам, исключительной резистентностью к ионизирующей радиации [47, 48] и эффективными системами репарации радиационных повреждений [15, 19, 60]. При выяснении причин исключительной резистентности этих организмов важным вопросом, по нашему мнению, является изучение возможностей и способов сенсибилизации их к радиации, так как благодаря возможности модифицировать радиочувствительность биологической системы можно выявлять и исследовать внутриклеточные механизмы, лежащие в ее основе.

В настоящей главе приведены результаты исследований сенсибилизации клеток синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* к гам-

ма-облучению химическими соединениями с разным механизмом действия. Были использованы различные экспериментальные подходы (фракционированное облучение, изучение пострадиационной деградации ДНК, седиментационный анализ ДНК) для исследования связи эффектов радиосенсибилизации с увеличением первичной повреждаемости клеток при облучении и нарушениями в процессах reparации радиационных повреждений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на одноклеточной синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* (№ 6301), полученной из коллекции ЛГУ. Культуру водорослей выращивали на модифицированной среде Хьюджа [5] в люменотермостате при температуре * 30—32° и освещенности 1000 лк. Длительность светового и темнового периодов составляла соответственно 16 и 8 ч. В экспериментах использовали культуру 4—5-дневного возраста.

При изучении радиосенсибилизации клеток *A. nidulans* к гамма-облучению применяли следующие конечные концентрации сенсибилизаторов: монойоддацетат ($0,5—3,0 \times 10^{-4}$ M), парахлормеркурибензоат ($0,5—1,0 \times 10^{-5}$ M), м-иодбензойная кислота (2×10^{-4} M), метилгидразин (1×10^{-4} M), нингидрин ($0,5—1,0 \times 10^{-4}$ M). Вещества растворяли в стерильной питательной среде и добавляли к суспензии клеток в разное время до или сразу после облучения. Концентрация клеток в облучаемых суспензиях составляла 2×10^6 в 1 мл.

Облучение проводили в пробирках при комнатной температуре в аэробных и аноксических условиях γ -лучами ^{60}Co в дозах 10—120 крад на установке УК-120000 при мощности дозы 100 рад/сек. Аноксия достигалась барботированием особо чистого азота (содержание кислорода $< 0,003\%$) через суспензию клеток в течение 18 мин до и во время облучения. Облученные клеточные суспензии разводили стерильной питательной средой до соответствующих концентраций и производили посев на плотную среду в чашки Петри для количественного учета выживаемости по числу образовавшихся колоний.

При исследовании фракционированного облучения клеток *A. nidulans* облученные суспензии выдерживали различное время (1—6 ч) при 30°, а затем подвергали действию второй фракции дозы. Для изучения влияния радиосенсибилизатора на судьбу сублетальных повреждений монойоддацетат (конечная концентрация 1×10^{-4} M) добавляли к клеткам непосредственно до облучения, после облучения на период между фракциями дозы или непосредственно перед второй фракцией дозы.

При исследовании пострадиационной деградации ДНК культуру *A. nidulans* выращивали в течение трех суток на среде с $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ура-

* Здесь и далее температура в градусах С.

цилом, 10 мккюри/мл. Следует отметить, что в наших предварительных экспериментах было обнаружено очень слабое включение 2^{14}C -тимидина в ДНК растущих клеток *A. nidulans*. В дальнейшем это подтвердилось [14], и в качестве меченого предшественника ДНК мы использовали 2^{14}C -урацил. Ту часть метки, которая включалась в РНК, отделяли с помощью щелочного гидролиза РНК. Клетки собирали на мембранных ультрафильтрах Sypro (0,45 мк) и сусpendировали в питательную среду в концентрации $6-8 \times 10^7$ клеток в 1 мл. Сенсибилизаторы добавляли за 10 мин до облучения и тщательно отмывали после облучения перед пострадиационной инкубацией. Облученные клетки собирали фильтрованием, ресусpendировали в 15—20 мл подогретой до 32° питательной среды и инкубировали в колбах в люменостате. Через определенные отрезки времени отбирали аликовты в пробирки с равным объемом NaOH и выдерживали 18 ч при 37° для гидролиза РНК, после чего пробы нейтрализовали и подкисляли 50%-ной трихлоруксусной кислотой до ее конечной концентрации 5%. Осадок ДНК собирали и промывали на ультрафильтрах. Радиоактивность в пробах определяли под сцинтилляционной жидкостью ЖС-7А на автоматическом счетчике SL-40. О степени деградации ДНК в клетках судили по величине остаточной радиоактивности метки (имп/мин) в кислотонерастворимой фракции после щелочного гидролиза, выражая ее в процентах от значения в соответствующих нулевых контрольных или облученных пробах.

Для выяснения влияния радиосенсибилизаторов на выход и восстановление однонитевых разрывов ДНК использовали модифицированный метод ультрацентрифугирования в щелочном градиенте сахарозы [51]. Клетки *A. nidulans* предварительно метили 2^{14}C -урацилом, затем отмывали от метки и облучали при 0° в присутствии сенсибилизаторов. При определении числа однонитевых разрывов, возникающих в ДНК после облучения, с целью предотвращения возможного воссоединения разрывов ДНК, культуру после облучения немедленно замораживали. Для оценки эффективности воссоединения однонитевых разрывов ДНК облученные культуры перед замораживанием инкубировали в питательной среде при 32° на протяжении 1 ч.

Лизис клеток проводили по методу Дулиттла [32] в маннит-фосфатном буфере (рН 6,8) обработкой лизоцимом (Serva) 15 мг/мл и 0,001 М ЭДТА на протяжении 1,5 ч с последующим добавлением додецилсульфата натрия до 1%. В отдельных экспериментах для разрушения комплекса ДНК-липиды клетки во время лизиса обрабатывали фосфолипазой (50 мкг/мл). После окончания лизиса соответствующие пробы (0,05 мл, где было $6-7 \times 10^7$ клеток) насыщали на поверхность 0,2 мл раствора 0,5 М NaOH, нанесенного на щелочную градиент сахарозы, и центрифугировали.

Ультрацентрифугирование ДНК проводили в щелочном градиенте при концентрации сахарозы 15—30% в роторе 3 × 5 центрифуги VAC-601. ДНК клеток *A. nidulans* центрифугировали

3,5 ч при 37 000 об/мин в полиалломерных пробирках объемом 5 мл при температуре +16°. На специальном приборе проводили фракционирование градиента на 40 фракций в пробирки, содержащие по 1 мл 0,5 М NaOH и ДНК-носитель (1—2 капли раствора 2 мг/мл стандартной ДНК), и выдерживали 18 ч при 37° для щелочного гидролиза РНК. Затем при 0° пробы подкисляли 50%-ной ТХУ, осаждали на ультрафильтрах Synpor (0,45 мк), трижды промывали 5%-ной ТХУ и подсчитывали радиоактивность.

При исследовании радиосенсибилизирующего действия активного ингибитора РНК-зависимой ДНК полимеразы — диметилбензилрифампицина (ДМБ) и актиномицина Д эти антибиотики добавляли к суспензиям клеток за 10 мин до облучения или сразу же после облучения в следующих конечных концентрациях: ДМБ — 20 мкг/мл, актиномицин Д — 10 мкг/мл.

РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК *A. NIDULANS* К ГАММА-ОБЛУЧЕНИЮ

Поскольку многие радиосенсибилизаторы токсичны для клеток, для получения достоверного эффекта сенсибилизации следует использовать довольно узкий диапазон концентраций, а именно — ниже токсического уровня. На основании изучения влияния разных концентраций радиосенсибилизаторов на жизнеспособность клеток (табл. 12) были выбраны оптимальные концентрации веществ, которые приводят к незначительному уменьшению репродуктивной способности клеток.

Таблица 12
Зависимость выживаемости клеток *A. nidulans* от концентрации использованных сенсибилизаторов

Радиосенсибилизатор	Концентрация, М	Выжившая фракция клеток	Радиосенсибилизатор	Концентрация, М	Выжившая фракция клеток
МИА	$0,5 \times 10^{-4}$	$0,96 \pm 0,04$	Нингидрин	$0,5 \times 10^{-4}$	$1,0 \pm 0,02$
	$1,0 \times 10^{-4}$	$0,85 \pm 0,06$		$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \pm 0,02$
	3×10^{-4}	$0,79 \pm 0,06$		3×10^{-4}	$0,70 \pm 0,04$
	5×10^{-4}	$0,53 \pm 0,03$		5×10^{-4}	$0,23 \pm 0,09$
ПХМБ	$0,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \pm 0,03$	Метилгидразин	1×10^{-4}	$0,95 \pm 0,03$
	1×10^{-5}	$1,0 \pm 0,03$		2×10^{-4}	$0,80 \pm 0,07$
	3×10^{-5}	$0,65 \pm 0,05$		5×10^{-4}	$0,19 \pm 0,04$
	5×10^{-5}	$0,07 \pm 0,08$		8×10^{-4}	$0,07 \pm 0,10$

При облучении клеток в присутствии мономиодоацетата (МИА) происходит существенная сенсибилизация как в аноксических, так и в аэробных условиях (рис. 7). Изменение наклона дозовой кривой выживаемости указывает на то, что МИА в этих условиях значительно повышает радиочувствительность клеточной популяции,

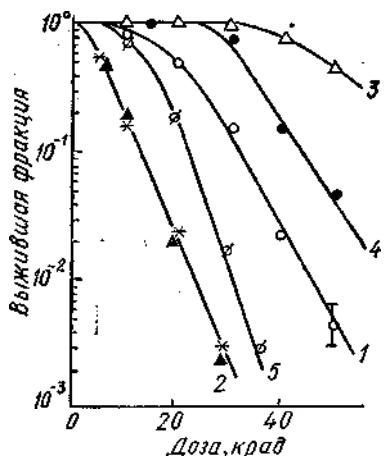


Рис. 7. Кривые выживаемости гамма-облученных культур *A. nidulans*, обработанных МИА:

1 — облучение в аэробных условиях, 2 — действие МИА (3×10^{-4} M) и последующее облучение в аэробных и аноксических условиях, 3 — облучение в аноксических условиях, 4 — действие МИА ($0,5 \times 10^{-4}$ M) и облучение в аноксических условиях, 5 — действие МИА (1×10^{-4} M) и облучение в аноксических условиях.

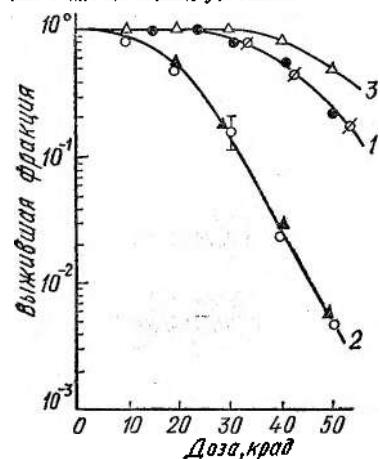


Рис. 9. Кривые выживаемости гамма-облученных культур *A. nidulans*, обработанных нингидином:

1 — облучение в аэробных условиях в присутствии и без нингилина (1×10^{-4} M), 2 — действие нингилина в различных концентрациях ($0,5 \times 10^{-4}$ и 1×10^{-4} M) и облучение в аноксических условиях, 3 — облучение в аноксических условиях.

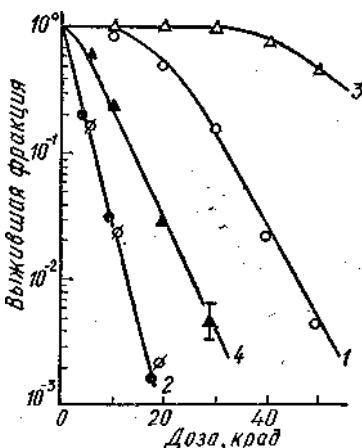


Рис. 8. Кривые выживаемости гамма-облученных культур *A. nidulans*, обработанных ПХМБ:

1 — облучение в аэробных условиях, 2 — действие ПХМБ (1×10^{-5} M) и последующее облучение в аэробных и аноксических условиях, 3 — облучение в аноксических условиях, 4 — действие ПХМБ ($0,5 \times 10^{-5}$ M) и облучение в аноксических условиях.

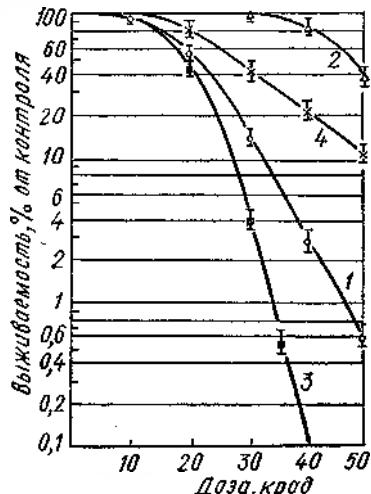


Рис. 10. Кривые выживаемости гамма-облученных культур *A. nidulans*, обработанных метилгидразином:

1 — облучение в аэробных условиях, 2 — облучение в аноксических условиях, 3 — действие метилгидразина (1×10^{-4} M) и облучение в аэробных условиях, 4 — действие метилгидразина (1×10^{-4} M) и облучение в аноксических условиях.

причем в аноксических условиях облучения радиосенсибилизирующий эффект МИА выше, чем у кислорода. Фактор изменения дозы (ФИД) достигает максимального значения — 5,6 в аноксических условиях облучения и 2,5 в аэробных.

При облучении клеток в присутствии паразхлормеркурибензоата (ПХМБ) наблюдался ярко выраженный эффект сенсибилизации в

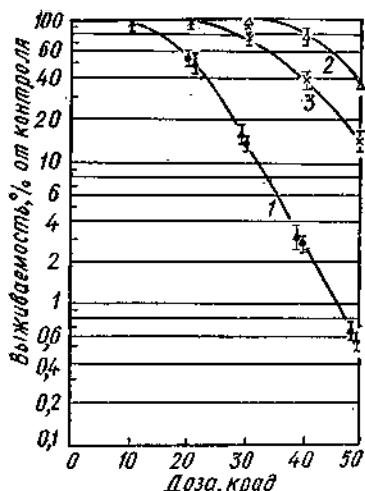


Рис. 11. Кривые выживаемости гамма-облученных культур *A. nidulans*, обработанных ИБК:

1 — облучение в аэробных условиях в присутствии и без ИБК (2×10^{-4} M), 2 — облучение в аноксических условиях, 3 — действие ИБК (2×10^{-4} M) и облучение в аноксических условиях.

на то, что метилгидразин сенсибилизирует данную клеточную популяцию в присутствии кислорода, ФИД равен 1,1. При облучении в аноксических условиях ФИД составляет 1,5.

Исходя из экспериментальных данных об изменении репродуктивной способности клеток при воздействии *m*-нодбензойной кислоты (ИБК), была выбрана концентрация 2×10^{-4} M, которая дает выживаемость $0,98 \pm 0,03$. ИБК вызывала эффект радиосенсибилизации только при облучении клеток в аноксических условиях (рис. 11), ФИД равен 1,3. Отсутствие эффекта сенсибилизации в аэробных условиях связано, по-видимому, с тем, что сам кислород является более эффективным радиосенсибилизатором, и на фоне его действия ИБК не вызывает дополнительно каких-либо повреждений жизненно важных структур клетки.

Таким образом, установлено, что клетки *A. nidulans* можно сенсибилизировать к гамма-облучению. Как следует из экспериментальных данных, радиосенсибилизация наблюдается как в аноксических, так и в аэробных условиях облучения, и сенсибилизирую-

аэробных и аноксических условиях при концентрации ПХМБ 1×10^{-5} M (рис. 8). ФИД для данной концентрации вещества в аноксических условиях облучения составляет 15,6, в аэробных — 6,9.

Нингидрин в условиях наших опытов не вызывал значительной сенсибилизации клеток. При облучении в аэробных условиях присутствие нингидрина не влияло на радиочувствительность клеточной популяции (рис. 9). В аноксических условиях происходила незначительная сенсибилизация, причем разные концентрации нингидрина ($0,5 \times 10^{-4}$ и 1×10^{-4} M) по своему действию достоверно не различаются и имеют ФИД, равный 1,2.

Предварительная обработка метилгидразином повышала чувствительность клеток *A. nidulans* как в аноксических, так и в аэробных условиях (рис. 10). Изменение наклона дозовой кривой указывает

щее действие МИА и ПХМБ превышает кислородный эффект (рис. 7, 8). Можно полагать, что действие облучения усиливается свободными радикалами иода, образующимися при облучении из МИА, а в случае ПХМБ — токсичными продуктами — атомами хлора и ртути. Эти промежуточные высокореакционноспособные продукты в процессе облучения могут вызывать повреждения жизненно важных структур клетки (изменения структуры ДНК, уменьшение SH-содержащих веществ, инактивацию систем репарации и др.), которые будут приводить к увеличению радиочувствительности клеток.

Физико-химические исследования продуктов радиолиза растворов МИА и других иодсодержащих веществ показали, что общим промежуточным продуктом у них является атомарный иод [52]. К тому же в экспериментах на *E. coli* B/r установлено, что гибель клеток находится в прямой зависимости от количества радиоактивного иода, включенного в белки при облучении клеток в присутствии МИА-¹³¹I [58]. Таким образом, иодсодержащие соединения могут рассматриваться как доноры токсического агента, возникающего под влиянием радиации.

Вместе с тем хорошо известно, что такие соединения, как МИА, иодацетамид, иодистый метил и др., являются тиоловыми ядами и могут сенсибилизировать к облучению путем инактивации тиолов [29, 49]. А. Г. Тарасенко и соавт. [11] на развивающейся икре морских ежей сделали попытку расчленить действие МИА как карбоксиметилирующего агента, с одной стороны, и как соединения, содержащего в своем составе иод, с другой. Эксперименты с отмыканием и облучением клеток, предварительно инкубировавшихся с KI, показали, что последний полностью удаляется из клеток. Об этом, в частности, свидетельствует отсутствие эффекта сенсибилизации. При отмывании же и облучении клеток, предварительно инкубировавшихся с МИА, наблюдался отчетливый радиосенсибилизирующий эффект, который полностью может быть отнесен за счет действия МИА в качестве карбоксиметилирующего агента, поскольку, как уже было сказано выше, ионный иод в условиях эксперимента полностью удаляется из клеток отмыванием. Таким образом, механизм радиосенсибилизации МИА складывается из двух факторов: действия его как карбоксиметилирующего агента, блокирующего преимущественно тиоловые группы жизненно важных структур клетки, и неспецифического повреждающего действия атомарного иода, образующегося из ионного иода в условиях действия радиации на клетку.

В механизме радиосенсибилизации ПХМБ определенную роль играет неспецифическое повреждающее действие токсичного продукта — иона ртути [25]. Значение реакции ПХМБ с тиолами в механизме радиосенсибилизирующего эффекта остается неясным, так как связывание ПХМБ с SH-группами имеет обратимый характер.

Наблюдавшееся в наших экспериментах превышение кислородного эффекта в аэробных условиях может быть обусловлено совместным проявлением повреждений жизненно важных структур

клетки, возникающих при воздействии радиосенсибилизаторов, с повреждениями тех же самых компонентов, вызванных присутствием кислорода во время облучения. Тот факт, что в аноксических условиях МИА и ПХМБ сенсибилизируют сильнее, чем кислород, указывает на существование некоторого резерва усиления сенсибилизирующего действия кислорода, который, как известно, переводит часть обратимых повреждений в необратимое состояние. По-видимому, МИА и ПХМБ способны переводить в нерепарируемое состояние большее число повреждений у клеток *A. nidulans*, чем кислород.

Нингидрин в условиях наших опытов вызывал незначительный эффект сенсибилизации (ФИД-1,2) только в аноксических условиях облучения. По-видимому, этим агентом системы репарации *A. nidulans* не повреждаются в значительной мере, и небольшое увеличение радиочувствительности, вызываемое нингидрином в аноксических условиях, можно рассматривать как результат уменьшения SH-содержащих веществ, предположительно ответственных за естественную клеточную защиту.

В случае обработки клеток *A. nidulans* метилгидразином происходит увеличение радиочувствительности при облучении как в аноксических, так и в аэробных условиях. Вполне вероятно, что метилгидразин, который не способен непосредственно блокировать внутриклеточные тиолы, может косвенно снижать уровень этих естественных радиозащитных агентов, изменения ход метаболических процессов.

Радиосенсибилизацию, вызываемую ИБК в аноксических условиях облучения, по-видимому, можно объяснить неспецифическим повреждающим действием атомарного иода, поскольку ИБК не вступает в реакцию с тиолами. Небольшая величина эффекта радиосенсибилизации в случае действия ИБК объясняется, возможно, тем, что вследствие ограниченной растворимости ИБК в воде нельзя было испытать более высокие концентрации этого вещества.

Добавление использованных в настоящей работе сенсибилизаторов к клеткам *A. nidulans* сразу же после облучения не вызывало заметного изменения радиочувствительности водорослей. Введение облученных сенсибилизаторов к необлученным клеткам также было неэффективно. Отсутствие в этих случаях эффекта пострадиационной сенсибилизации указывает, по-видимому, на необходимость присутствия радиосенсибилизаторов в среде во время облучения для увеличения радиационной гибели клеток.

Исходя из полученных данных о сенсибилизации клеток *A. nidulans* к гамма-облучению при помощи различных радиосенсибилизаторов, весьма существенным для понимания описанных результатов является вопрос о том, в какой степени увеличение радиационной гибели клеток в результате обработки сенсибилизаторами связано с нарушениями в процессах репарации повреждений, в частности сублетальных (подпороговых).

НАРУШЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЛЕТОК ОТ СУБЛЕТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРА (МИА)

Сублетальными принято называть повреждения, не приводящие непосредственно к инактивации клеток, но дающие летальный эффект при повторном облучении. Известно, что различные типы клеток как *in vitro*, так и *in vivo* способны репарировать сублетальные повреждения [7, 20, 42]. Мы изучали влияние МИА на фракционированное облучение клеток

A. nidulans. МИА был выбран как один из самых сильных радиосенсибилизаторов, действие которых существенно превышает эффект кислорода. При однократном аэробном облучении совместно с МИА (1×10^{-4} М) наблюдалось увеличение радиочувствительности клеток (рис. 12). ФИД равен 2,0. В экспериментах по фракционированию клетки облучали первой фракцией дозы — 24 крад (выжившая фракция $S = 0,372$) и затем выдерживали различное время при 30° для изучения восстановления от сублетальных повреждений. Вторую фракцию дозы давали в присутствии или без МИА (соответственно кривые 3 и 4).

В литературе о восстановлении клеток от сублетальных повреждений чаще всего судят по возникновению порога на прямолинейном участке доза-эффект [35]. Действительно, в случае полной ликвидации сублеталей (рис. 12, 5 — теоретически максимальное восстановление) популяция клеток, облучаемая второй фракцией дозы, должна повторять форму исходной кривой выживаемости с ее характерными особенностями, т. е. начальным пороговым участком и последующим выходом на прямолинейный участок. При интервале между фракциями дозы $\tau = 4$ ч возникает порог на кривой выживаемости, однако восстановление не является полным. Присутствие радиосенсибилизатора во время облучения нарастающими дозами во второй фракции (рис. 12, 3) устраняет порог. Можно полагать, что отсутствие порога в данном случае объясняется действием МИА на судьбу сублеталей, не восстановившихся после первой фракции дозы. ФИД при облучении второй фрак-

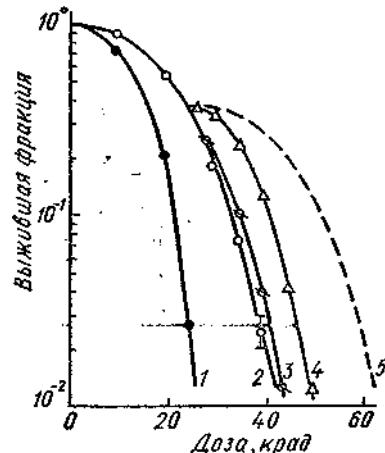


Рис. 12. Влияние МИА на радиационную инактивацию клеток *A. nidulans*:

1 — нефракционированное облучение,
 1×10^{-4} М МИА; 2 — нефракционированное облучение, без МИА; 3 — фракционированное облучение, интервал между фракциями дозы $\tau = 4$ ч, МИА добавляли перед второй фракцией дозы; 4 — фракционированное облучение, $\tau = 4$ ч, без МИА; 5 — теоретически максимально возможное восстановление.

цией дозы в присутствии радиосенсибилизатора равен 1,6. По-видимому, клетки, не полностью восстановившиеся от сублетальных повреждений, более радиочувствительны и поэтому могут быть сенсибилизированы в меньшей степени [6]. Это согласуется с предположением Дина и Александера [28] о том, что организмы, обладающие повышенной радиоустойчивостью, могут быть сенсибилизированы к облучению в большей степени.

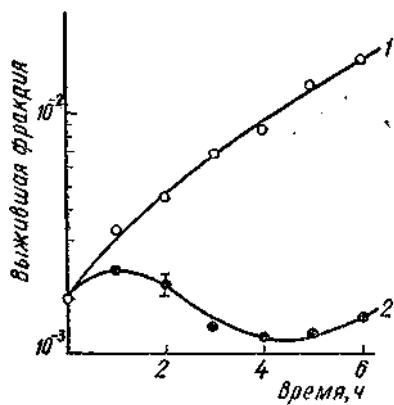


Рис. 13. Ингибирующий эффект МИА на восстановление сублетальных повреждений у клеток *A. nidulans*:

1 — контроль, 2 — клетки инкубированы с МИА (1×10^{-4} M). По оси абсцисс — время между двумя фракциями дозы по 24 крад.

восстановление отсутствует (рис. 13, 2).

Отмечено небольшое увеличение выживаемости при интервале между фракциями, равном 1 ч, однако при более продолжительных интервалах репарации сублеталей в присутствии МИА не происходит. Это означает, по-видимому, что радиосенсибилизатор (МИА) ингибирует процесс восстановления сублетальных повреждений у клеток *A. nidulans*. Ранее было высказано предположение, что МИА подавляет действие ферментов темновой репарации у *Micrococcus lysodeikticus* [34]. Можно предположить, что ингибирование процесса восстановления сублетальных повреждений у *A. nidulans* также связано с действием МИА на систему репарации. С какими ферментами связано ингибирование этого процесса у *A. nidulans* пока не ясно.

Уменьшение радиационного поражения, наблюдаемое при фракционировании дозы облучения, может быть связано также с восстановлением содержания в клетке эндогенных радиопротекторов, в первую очередь тиолов, в период между облучениями. Выше уже отмечалось, что МИА — карбоксиметилирующий агент, блокирующий тиольные группы. Поэтому его неблагоприятное действие в интервале между фракциями дозы может быть следствием

При изучении эффекта МИА на восстановление от сублетальных повреждений клетки облучали первой фракцией дозы (24 крад) и затем инкубировали в среде с МИА $1-6 \times 10^{-4}$ M при 30°. Было установлено, что в данной концентрации (1×10^{-4} M) МИА нетоксичен для клеток и не вызывает их пострадиационной сенсибилизации. Клетки облучали первой фракцией дозы (24 крад), затем инкубировали с МИА, отмывали от последнего и облучали второй фракцией дозы (рис. 13). У контрольных клеток (не обработанных МИА во время интервала между фракциями дозы) восстановление происходит по экспоненциальному закону (рис. 13, 1). У клеток, обработанных МИА, восстановление отсутствует (рис. 13, 2).

связывания сульфидрильных групп и препятствием их восстановления в облученных клетках. Однако изменение уровня естественной внутриклеточной защиты у этих клеток, по-видимому, не определяет полученный эффект, поскольку синезеленые водоросли — активные фотосинтезирующие организмы, продуцирующие кислород, который окисляет сульфидрильные группы.

Полученные данные дают основания полагать, что определенную часть в общем объеме радиосенсибилизирующего эффекта МИА у клеток *A. nidulans* занимает подавление восстановления сублетальных повреждений.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОСТРАДИАЦИОННОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДНК ПОД ВЛИЯНИЕМ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Одним из показателей характера нарушений в репаративных системах могут служить изменения в картине деградации ДНК в облученных клетках. Так, у мутантов *E. coli* с дефектом на первых этапах эксцизионного механизма уровень пострадиационной деградации ДНК ниже, чем в клетках дикого типа [22]. В клетках же *pol*⁻-мутантов с нарушениями в репаративном синтезе [23] и *Rec*

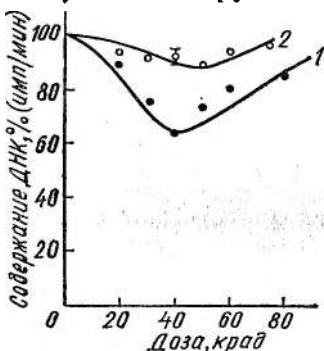


Рис. 14. Пострадиационная деградация ДНК (инкубация 10 ч при 32°) у клеток *A. nidulans*:

1 — облучение в аэробных, 2 — в анаэробических условиях.

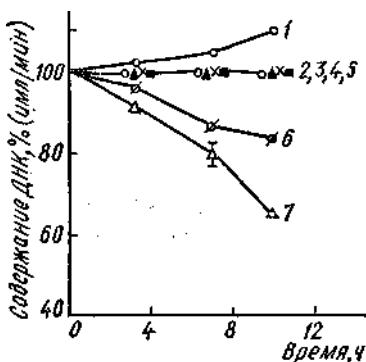


Рис. 15. Ингибирование деградации ДНК при обработке клеток *A. nidulans* сенсибилизаторами:

1 — необлученные клетки; 2 — МИА (3×10^{-4} М); 3 — никидрин (10^{-4} М); 4 — ИБК (2×10^{-4} М); 5 — ментилгидразин (10^{-4} М); 6 — ПХМБ (10^{-5} М); 7 — облучение в дозе 45 крад.

А-мутантов с повреждениями в системе пострепликативной репарации [26] УФ-облучение вызывает интенсивную деградацию ДНК.

Связан ли механизм радиосенсибилизации использованных соединений с изменением интенсивности пострадиационной деградации ДНК? Для того чтобы ответить на этот вопрос, нами были проведены исследования по выяснению влияния сенсибилизаторов, увеличивающих летальное действие радиации, на процесс пострадиационной

деградации ДНК. Величина остаточной радиоактивности ДНК (недеградированная, кислотонерастворимая фракция ДНК) у клеток, облученных без сенсибилизаторов в аэробных и аноксических условиях, показана на рис. 14. Наличие радиоактивности в кислотонерастворимой фракции служило мерой деградации ДНК. Максимальная деградация наблюдалась при 40 крад в аэробных и при 50 крад в аноксических условиях облучения. Вследствие уменьшения эффекта облучения на деградацию ДНК при более высоких дозах нельзя сравнивать кислородный эффект в экспериментах по деградации ДНК с эффектом кислорода на выживаемость клеток (см. рис. 7—11). Однако для диапазона небольших доз (0—40 крад) очевидно, что процесс деградации ДНК менее чувствителен к кислороду, чем репродуктивная способность клеток.

Влияние сенсибилизаторов на пострадиационную деградацию ДНК у *A. nidulans* изучали при облучении в аэробных условиях, поскольку в аноксических условиях облучения деградация ДНК была очень слабой [30]. На рис. 15 представлены данные о деградации ДНК у аэробно облученных в дозе 45 крад клеток *A. nidulans* в присутствии сенсибилизаторов. У клеток необлученного контроля в течение инкубации в питательной среде при 32° происходит дальнейшее включение радиоактивной метки в ДНК. При этом, по всей вероятности, продолжается синтез ДНК с использованием эндогенных предшественников, образующихся в результате метаболической деградации РНК и накапливаемых клеткой в ходе культивирования. После аэробного облучения дозой 45 крад и пострадиационной инкубации на протяжении 10 ч ДНК в клетках деградирует до 65% первоначального содержания. В присутствии во время облучения МИА (3×10^{-4} М), нингидрина (10^{-4} М), метилгидразина (10^{-4} М) или ИБК (2×10^{-4} М) происходило значительно ингибирование деградации ДНК даже после инкубации при 32° в течение 18 ч. ПХМБ (10^{-5} М) слабее всех других сенсибилизаторов подавлял радиационный распад ДНК.

В настоящее время влияние радиосенсибилизаторов на уровень индуцированной ионизирующей радиацией деградации ДНК с образованием кислотонерастворимых продуктов однозначно не определено [27, 55, 59]. Так, Ногути и соавт. [55] показали, что у клеток *B. subtilis*, сенсибилизированных KIO_3 , уровень гамма-индуцированной деградации ДНК с образованием кислотонерастворимых продуктов ниже, чем в необработанных сенсибилизаторами клетках. В клетках же *E. coli* В/г инданетрион почти полностью подавлял деградацию ДНК, а N-этилмалеимид вызывал незначительный эффект ингибирования [27].

В наших экспериментах установлено, что МИА, нингидрин, метилгидразин и ИБК почти полностью подавляли деградацию ДНК у *A. nidulans*. Такой общий эффект позволяет предполагать, что как высокоэффективные (МИА, метилгидразин), так и слабые сенсибилизаторы (нингидрин, ИБК) могли иметь общий механизм действия. Например, они могли либо препятствовать действию

деградирующих ферментов, либо прямо сенсибилизировать ДНК к радиационному повреждению таким образом, что облученная ДНК не имела бы слабых связей для взаимодействия с ферментом [62].

Известно, что пострадиационная деградация ДНК — активный процесс, энергетически сопряженный с фотосинтезом и зависящий от факторов среды, определяющих процессы биосинтеза в клетке. Можно предположить, что гамма-индуцированная деградация ДНК в клетках *A. nidulans* осуществляется при помощи нуклеаз, атакующих участки ДНК с измененной структурой. С какими нуклеазами связана пострадиационная деградация ДНК у *A. nidulans* — пока неясно.

Гамма-индуцированную пострадиационную деградацию ДНК у *A. nidulans* нельзя прямо сравнивать с клеточной выживаемостью (см. рис. 7—11), поскольку потеря ДНК происходит, вероятно, как в выживших клетках, так и в клетках, повреждаемых радиацией в разной степени. Однако тот факт, что ПХМБ оказывал слабое действие на деградацию ДНК, но являлся эффективным сенсибилизатором клеточной выживаемости (рис. 8), позволяет предполагать, что либо он действует по механизму, альтернативному для других сенсибилизаторов, либо же деградация ДНК в данном случае не является фактором, определяющим потерю клетками репродуктивной способности.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между выживаемостью гамма-облученных клеток *A. nidulans* и пострадиационной деградацией в них ДНК. Проведенная работа показала, что изменения в картине пострадиационной деградации ДНК у сенсибилизованных клеток не могут служить информативным тестом на нарушения в системах reparации. Поэтому для выяснения влияния сенсибилизаторов на способность клеток синезеленых водорослей ликвидировать радиационные повреждения в ДНК мы исследовали влияние сенсибилизаторов на выход и восстановление однонитевых разрывов ДНК, индуцированных гамма-облучением.

ВЛИЯНИЕ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ВЫХОД И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

В качестве сенсибилизаторов были использованы МИА и ПХМБ — как наиболее эффективные при сенсибилизации клеток *A. nidulans* к гамма-облучению. Вследствие незначительного включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК растущих клеток *A. nidulans*, а также потому, что лизис клеток *A. nidulans* на поверхности градиента, как например в опытах с культурами *E. coli* [51], в данном случае невозможен, был использован модифицированный метод, разработанный С. В. Шестаковым и соавт. [13].

Мы изучали седиментацию денатурированной щелочью ДНК, выделенной из аэробно облученных клеток (рис. 16). Среднее поло-

жение пика ДНК в центрифужной пробирке после центрифугирования служило показателем размеров молекулы ДНК (табл. 13). Мы не проводили расчета молекулярного веса ДНК на основании данных седиментации, так как прямая оценка изменений, наблюдаемых в профилях седиментации после облучения, является в достаточной степени информативной, а также по причинам, которые будут обсуждаться ниже.

Таблица 13
Влияние радиосенсибилизаторов на образование
и репарацию однонитевых разрывов в ДНК клеток
A. nidulans

	Доза облучения, крад	
	0	120
Среднее положение пика ДНК * (0 ч)		
Контроль	0,55	0,32
Контроль +ФЛП	0,66	—
МИА	0,49	0,26
ПХМБ	0,49	0,21
Среднее положение пика ДНК (1 ч)		
Контроль	0,53	0,50
МИА	—	0,29
ПХМБ	—	0,22

* Среднее положение пика ДНК показывает относительное расстояние, на которое продвинулась меченая ДНК от верха центрифужной пробирки.

Профиль седиментации ДНК, выделенной из необлученных клеток, очень широк, что свидетельствует либо о гетерогенности ДНК у клеток *A. nidulans*, либо о комплексировании ДНК в клетках с другими молекулами, в частности с липидами. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что обработка клеток во время лизиса фосфолипазой приводит к сдвигу профиля седиментации ДНК из необлученных клеток в сторону более тяжелых фракций. Можно предполагать, что ДНК в клетках *A. nidulans* находится в комплексе с липидами и обработка фосфолипазой вызывает, по-видимому, частичное разрушение этого комплекса. Облучение клеток в дозе 120 крад приводит к сдвигу профиля седиментации ДНК в область более легких фракций (низкого молекулярного веса), что свидетельствует о появлении однонитевых разрывов в ДНК.

В другой серии экспериментов изучали влияние радиосенсибилизаторов на выход и восстановление однонитевых разрывов в ДНК. Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 17. МИА (3×10^{-4} М) и ПХМБ (10^{-5} М) добавляли к клеткам за 10 мин

до облучения. Присутствие МИА во время облучения приводило к некоторому увеличению выхода однонитевых разрывов (рис. 17, табл. 13). Аналогичная картина наблюдалась при облучении клеток в присутствии ПХМБ, причем этот сенсибилизатор вызывал существенное увеличение числа однонитевых разрывов в ДНК (рис. 17, табл. 13).

Пострадиационная инкубация облученных без радиосенсибилизаторов клеток при 32° приводит к воссоединению однонитевых

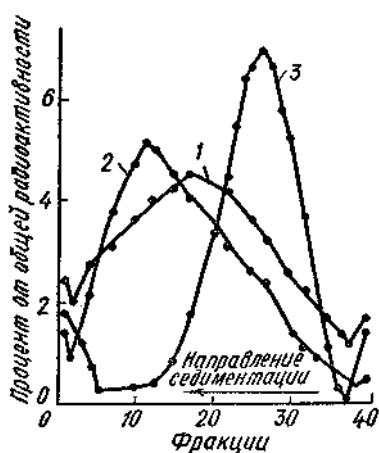


Рис. 16. Действие гамма-облучения в дозе 120 крад на ДНК клеток *A. nidulans*:

1 — необлученные клетки; 2 — необлученные клетки, обработанные во время лизиса фосфолипазой (50 мкг/мл); 3 — облучение в дозе 120 крад.

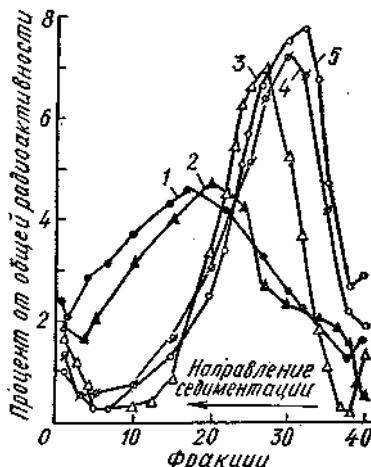


Рис. 17. Влияние радиосенсибилизаторов (МИА и ПХМБ) на ДНК при облучении в дозе 120 крад:

1 — необлученные клетки; 2 — облучение 120 крад + пострадиационная инкубация (1-4); 3 — облучение 120 крад; 4 — облучение 120 крад в присутствии МИА (3×10^{-4} М); 5 — облучение 120 крад в присутствии ПХМБ (10^{-5} М)

разрывов ДНК (рис. 17). За один час пострадиационной инкубации в питательной среде происходит, по-видимому, почти полная репарация однонитевых разрывов. Эта репарация полностью подавлялась, когда МИА или ПХМБ присутствовали только во время облучения, а затем отмывались (табл. 13). В контрольных экспериментах было установлено, что добавление МИА или ПХМБ сразу же к облученным клеткам не предотвращало процесса репарации однонитевых разрывов.

Механизм, с помощью которого МИА и ПХМБ ингибируют репарацию однонитевых разрывов в ДНК клеток *A. nidulans*, в настоящее время неизвестен. Однако известно, что у *E. coli* синтез белка сильно подавляется после облучения в присутствии щелочных галоидов [46]. Подобный эффект установлен также на дрожжевых клет-

ках и эритроцитах крови [53]. По-видимому, одним из главных сайтов действия радиосенсибилизаторов и продуктов их радиолиза является клеточная мембрана [59]. Для МИА твердо установлено, что его радиосенсибилизирующее действие связано с токсичным действием радикала иода и инактивацией внутриклеточных тиолов. Эффекты радиосенсибилизации, вызываемые ПХМБ, менее изучены, однако есть некоторые основания полагать, что и при действии ПХМБ могут повреждаться белки, входящие в состав клеточной мембраны [25]. Повреждение белков, входящих в состав клеточной мембраны или каким-то образом ассоциированных с нею, в дальнейшем может вызвать нарушение регуляции различных биохимических процессов. Вероятно, подавление сенсибилизаторами репарации ДНК могло быть вторичным следствием повреждения клеточной мембраны. Относительно действия ПХМБ можно предположить, что как агент, эффективно связывающий SH-группы, он мог увеличивать выход однонитевых разрывов ДНК у клеток *A. nidulans*, по-видимому, путем удаления эндогенных тиолов [4] и (или) посредством инактивации систем репарации [24].

Недавно было показано, что ПХМБ оказывает сенсибилизирующее действие на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках *E. coli* 15 T-, облученных гамма-лучами [43]. Поскольку инкубация клеток с ПХМБ до облучения и последующее отмытие приводят к увеличению выхода однонитевых разрывов, авторы приходят к заключению, что ПХМБ действует, вероятно, не через образование токсичных продуктов радиолиза — атомов хлора и ртути, а посредством какого-то иного механизма воздействия на клетку.

По поводу влияния радиосенсибилизаторов на выход однонитевых разрывов ДНК в настоящее время нет однозначных результатов. Например, Када и соавт. [45] не наблюдали существенного влияния йодидов на инактивацию трансформирующей ДНК и на выход однонитевых разрывов ДНК в клетках *B. subtilis*. К такому же заключению пришел Майерс [54], который показал, что присутствие иодацетамида и иодита калия почти не оказывается на числе однонитевых разрывов ДНК в клетках *E. coli* B/r.

С другой стороны, в экспериментах на клетках *E. coli* 15 T- было установлено, что такие радиосенсибилизаторы, как ПХМБ и цианид натрия, существенно увеличивают выход однонитевых разрывов ДНК, причем ПХМБ вызывает увеличение числа однонитевых разрывов в 10 раз при облучении в аноксических условиях и приблизительно в 20 раз — в аэробных условиях облучения [43]. Другие исследователи на клетках китайского хомячка показали, что количество однонитевых разрывов в ДНК хорошо коррелирует с выживаемостью клеток в идентичных условиях облучения [38]. Эти же авторы обнаружили, что относительная эффективность таких сенсибилизаторов, как паранитроацетофенон, кислород и некоторые производные нитрофурана, отражается на выходе однонитевых разрывов ДНК.

В настоящее время метод седиментации является, по-видимому, основным для изучения одноднитевых разрывов ДНК, вызываемых облучением в различных системах. Однако ввиду того, что ДНК крайне чувствительна к силам сдвига, воспроизводимость и чувствительность метода во многом зависят от того, каким способом выделяют ДНК из клеток и наносят ее на градиент. Очень удобен и эффективен метод Мак-Граса и Вильямса [51], когда клетки лизируют прямо на поверхности щелочного градиента сахарозы, избегая большинства механических повреждений молекул ДНК. Однако некоторые исследователи обнаружили, что выделенная таким способом ДНК проявляет аномальную седиментацию, и какие-то иные ее свойства, а не молекулярный вес играют определенную роль в скорости седиментации [36, 50]. Особенno это относится к ДНК, выделенной из необлученных клеток.

Следует отметить, что при изменении состава лизирующей среды, времени лизиса и скорости центрифугирования могут получаться совершенно различные профили седиментации. Кроме того, профили седиментации зависят от температуры, при которой проводится лизис или же вращение во время центрифугирования, а также от наличия или отсутствия рассеянного света во время лизиса [36, 57]. Очевидно, невозможно прямо использовать картину седиментации для определения молекулярного веса ДНК и подсчета числа одноднитевых разрывов.

Причины аномальной седиментации ДНК обсуждались рядом исследователей. Некоторые авторы предполагают, что вся ДНК из клеток китайского хомячка первоначально освобождается в виде комплекса, который седиментирует совместно с большой фракцией клеточных липидов [18, 37]. Другие исследователи пришли к выводу, что денатурированная щелочью ДНК из необлученных клеток является свободно агрегированной и лишь частично одноцепочечной [50]. При исследовании характера разделения нитей ДНК в обработанных щелочью клетках *Microtus agrestis* было показано, что разделение нитей и их реассоциация сложным образом зависят от времени инкубации в щелочи [18]. Были получены экспериментальные данные о присутствии обогащенной липидами ДНК в синхронных культурах клеток HeLa [38], а также о наличии комплекса липиды — ДНК в изолированных лимфоцитах [40]. Все эти данные свидетельствуют о существовании комплексов ДНК с липидами в клетках различных биологических объектов. Следует учитывать, однако, что ДНК по-разному экстрагируется из клеток при использовании различных методов выделения, и поэтому аномальная седиментация во многих случаях связана, по-видимому, с условиями выделения ДНК.

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании комплекса ДНК—липиды в клетках синезеленых водорослей. При этом не исключена возможность комплексирования ДНК в клетках синезеленых водорослей также с белковыми и полисахаридными компонентами. Предполагается, что такое комплексирование генетиче-

ского материала играет определенную роль в радиорезистентности клеток синезеленых водорослей и, в частности, в репарации радиационных повреждений [12]. Можно полагать, что действие радиосенсибилизаторов у *A. nidulans* обусловлено не только нарушениями в ферментативных этапах механизмов эксцизионной и пострепликативной репарации [3], но и дефектами в синтезе и свойствах различных белково-липидных компонентов. По всей вероятности, повреждения этих компонентов, необходимых для сборки ДНК-мембранных комплексов и поддержания структурной и функциональной целостности генетического аппарата клетки, также могут приводить к увеличению радиационной гибели клетки.

Таким образом, нами установлено, что радиосенсибилизаторы (МИА и ПХМБ) увеличивают выход однонитевых разрывов в ДНК клеток синезеленых водорослей и ингибируют процесс последующей репарации однонитевых разрывов, если присутствуют во время облучения. Следовательно, они действуют как на уровне первичной повреждаемости, так и на уровне восстановления повреждений. Логично предположить, что если большинство однонитевых разрывов не будет репарировано, то в процессе репликации ДНК они могут превратиться в двойные разрывы и явиться причиной гибели клеток. Однако, если изложенные соображения в какой-то степени объясняют эффекты радиосенсибилизации, полученные при гамма-облучении клеток синезеленых водорослей, то по-прежнему весьма загадочной остается природа исключительной радиорезистентности этих организмов. Поэтому наши дальнейшие исследования были направлены на поиски новых механизмов внутриклеточных процессов, которые могут лежать в основе радиоустойчивости *Cyanophyta*.

ВОЗМОЖНЫЙ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ УЧАСТИИ ПРОЦЕССА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

При изучении причин исключительной радиорезистентности синезеленых водорослей нам казалось логичным предположить, что вряд ли для обеспечения такой высокой радиорезистентности достаточно одного лишь механизма репаративного синтеза ДНК. По всей вероятности, репаративный синтез ДНК, осуществляющий коррекцию нормальной репликации и транскрипции, является процессом непрерывным, поддерживающим целостность генетического аппарата клетки. А при действии экстремальных факторов (к числу которых относится гамма-облучение), по-видимому, могут включаться какие-то дополнительные механизмы репарации.

Открытие явления обратной транскрипции и последовавший за ним ряд исследований показали, что передача генетической информации от РНК к ДНК выходит далеко за рамки проблем онкологии и имеет широкое биологическое значение [2, 21]. Это навело

нас на мысль, что обратная транскрипция могла бы участвовать в обеспечении высокой радиорезистентности у синезеленых водорослей. Каким образом она осуществляется у этих организмов — совершенно не ясно, но в этом процессе, вероятно, должны были бы участвовать соответствующие ферменты. Если это так, то использование специфических ингибиторов РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы) помогло бы выяснить роль этого фермента в процессе пост-радиационного восстановления. Поэтому мы использовали в качестве модификатора лучевой реакции у синезеленых водорослей производное антибиотика рифампицина — диметилбензилрифампицин (ДМБ) (2'-6'-диметил-N(4')-бензил-N(4')-диметил-рифампицин), один из наиболее эффективных ингибиторов обратной транскриптазы, любезно предоставленный нам проф. Г. Ланчини и Р. Крихио. Поскольку ДМБ подавляет также РНК-полимеразы некоторых бактерий [17], то для сравнения исследовали модифицирующее действие актиномицина Д — ингибитора синтеза РНК.

На рис. 18 представлены данные о влиянии ДМБ и актиномицина Д на выживаемость гамма-облученных клеток *A. nidulans*. При добавлении ДМБ или актиномицина Д до облучения эффекта радиосенсибилизации не наблюдали. Добавление облученных растворов этих веществ к необлученным клеткам также было неэффективно (на рис. 18 не показано). Если облученные клетки обрабатывали ДМБ на протяжении 1 ч до посева в чашки, то происходила заметная сенсибилизация (ФИД — 1,5). Актиномицин Д вызывал менее эффективную пострадиационную сенсибилизацию у *A. nidulans* (ФИД — 1,1). При продолжительном инкубировании с облученными клетками ДМБ значительно больше усиливала гибель клеток *A. nidulans*, чем актиномицин Д (рис. 19).

Известно, что актиномицин Д является сильным ингибитором ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Поэтому его радиосенсибилизирующее действие у *A. nidulans* можно рассматривать как результат прекращения синтеза РНК и, следовательно, ингибирования синтеза белка. Эти процессы, вероятно, могут приводить к нарушению репарации потенциально летальных повреждений в клетке, если предположить, что для репарации потенциально летальных повреждений необходим синтез белка de novo при участии коротко-

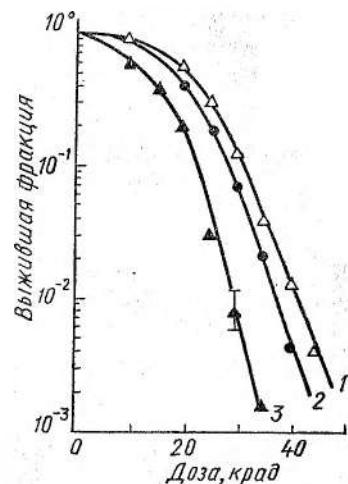


Рис. 18. Пострадиационная сенсибилизация клеток *A. nidulans* диметилбензилрифампицином (ДМБ) и актиномицином Д: 1 — необработанные клетки, 2 — актиномицин Д (10 мкг/мл), 3 — ДМБ (20 мкг/мл).

живущей мРНК. Активомицин Д одновременно может прекращать синтез рибосомальной и тРНК, но, по-видимому, не будет тормозить активность долгоживущей мРНК.

Что касается долгоживущей мРНК, то в настоящее время высказываются предположения о том, что время транскрипции и время трансляции данного гена не связаны между собой непосредственно [56, 61], т. е. мРНК поступают в цитоплазму клетки в форме, в общем, устойчивой к разрушению внутри клетки, и сохраняются в ней длительное время. Механизм, с помощью которого такая мРНК сохраняется от деградации, так же как и место ее нахождения в клетке, пока мало изучены. Инициация, регуляция и репрессия синтеза белка на этих в высшей степени стабильных матрицах может осуществляться различными ферментами. Не исключена возможность, что среди этого комплекса ферментов находится и обратная транскриптаза. Заманчиво предположить, что существование у синезеленых водорослей таких стабильных долгоживущих мРНК и обратной транскриптазы предоставляет возможность для синтеза копий ДНК на матрице РНК с целью замещения поврежденной облучением ДНК. Возможно, что такой дополнительный механизм пострадиационного восстановления участвует в обеспечении высокой радиорезистентности *Cyanophyta*.

Радиосенсибилизирующее действие ДМБ на клетки *A. nidulans* могло быть результатом ингибирования РНК-полимеразы или же действия ДМБ на какие-то иные процессы в клетке. Последнее предположение подтверждается тем фактом, что активомицин Д при использовании в концентрации, оказывающей примерно одинаковый эффект на выживаемость, обладал значительно менее выраженным эффектом пострадиационной сенсибилизации. Если же ДМБ ингибирует обратную транскриптазу, то он будет останавливать синтез ДНК на матрице долгоживущей РНК. Таким образом, пострадиационное действие ДМБ можно объяснить, предполагая, что ДМБ ингибирует РНК-зависимую ДНК-полимеразу и, следовательно, предотвращает процесс обратной транскрипции. В какой степени обратная транскрипция определяет высокую радиорези-

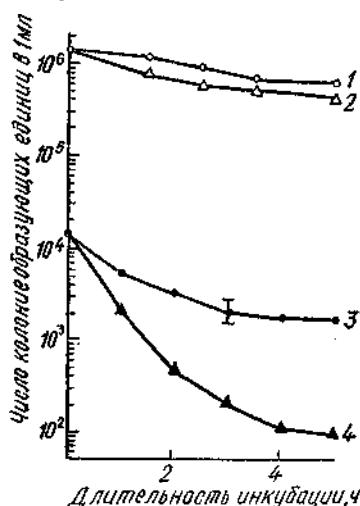


Рис. 19. Пострадиационная обработка клеток *A. nidulans* ДМБ (20 мкг/мл) и активомицином Д (10 мкг/мл):

1 — активомицин Д, 2 — ДМБ, 3 — 40 крат + обработка активомицином Д, 4 — 40 крат + обработка ДМБ. Фракция выживших клеток (число КОЕ/мл) изображена как функция времени инкубации с ДМБ или активомицином Д после гамма-облучения.

становления участвует в обеспечении высокой радиорезистентности *Cyanophyta*.

Радиосенсибилизирующее действие ДМБ на клетки *A. nidulans* могло быть результатом ингибирования РНК-полимеразы или же действия ДМБ на какие-то иные процессы в клетке. Последнее предположение подтверждается тем фактом, что активомицин Д при использовании в концентрации, оказывающей примерно одинаковый эффект на выживаемость, обладал значительно менее выраженным эффектом пострадиационной сенсибилизации. Если же ДМБ ингибирует обратную транскриптазу, то он будет останавливать синтез ДНК на матрице долгоживущей РНК. Таким образом, пострадиационное действие ДМБ можно объяснить, предполагая, что ДМБ ингибирует РНК-зависимую ДНК-полимеразу и, следовательно, предотвращает процесс обратной транскрипции. В какой степени обратная транскрипция определяет высокую радиорези-

стентность синезеленых водорослей и свойственна ли она иным типам клеток, остается неясным.

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные о присутствии сравнительно долгоживущих мРНК в клетках *A. nidulans* [41] и существовании у некоторых синезеленых водорослей многочисленных копий генома в клетке [39] позволяют рассматривать высказанное нами предположение о возможном дополнительном механизме пострадиационного восстановления [31] как стимулирующее дальнейшие эксперименты по обнаружению и изучению процесса репарации, связанного с обратной транскрипцией и имеющего определенное значение в обеспечении исключительной радиорезистентности синезеленых водорослей к ионизирующей радиации.

В заключение следует подчеркнуть, что решение проблемы направленного увеличения радиочувствительности клеток, по-видимому, должно заключаться в поиске новых внутриклеточных механизмов, на которые можно будет влиять соответствующим образом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бак З. Химическая защита от ионизирующей радиации. М., «Атомиздат», 1968.
2. Гершензон С. М. Обратная транскрипция и ее значение для общей генетики и онкологии. — Усп. совр. биол., 1973, 75, 323.
3. Глазер В. М., Еланская И. В., Грошев В. В., Жевнер В. Д., Жукас К. И., Карбышева Е. А. Репарация индуцируемых ионизирующей радиацией повреждений в клетках синезеленых водорослей. — В кн.: Тез. докл. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация». М., 1973, 95.
4. Граевский Э. Я., Тарасенко А. Г. «Гиольная» концепция радиочувствительности. — Радиобиология, 1972, 12, 483.
5. Дмитриев А. П., Гродзинский Д. М. Комбинированное действие химических соединений и гамма-облучения на клетки синезеленой водоросли *Anacystis nidulans*. — Микробиология, 1973, 42, 307.
6. Дмитриев А. П., Гродзинский Д. М. Влияние радиосенсибилизатора (моноиодоцетата) на восстановление сублетальных повреждений у клеток синезеленой водоросли *Anacystis nidulans*. — Радиобиология, 1974, 14, 382.
7. Парнбок В. П. Пострадиационное восстановление клеток млекопитающих. — Цитология, 1967, 9, 137.
8. Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г. О возможности повышения радиочувствительности клеток химическими соединениями. — Усп. совр. биол., 1969, 68, 55.
9. Романцев Е. Ф. Радиация и химическая защита. М., «Атомиздат» 1968.
10. Тарасенко А. Г., Некрасова И. В., Граевский Э. Я. О механизме радиосенсибилизирующего эффекта. — Радиобиология. 1970, 10, 198.
11. Тарасенко А. Г., Савватеев В. И., Некрасова И. В. Исследование механизма радиосенсибилизирующего действия иодоцетата и КІ на развивающейся икре морских ежей. — ДАН СССР, 1972, 202, 1438.
12. Шестаков С. В., Жевнер В. Д. Введение в генетику синезеленых водорослей. — В кн.: Биология синезеленых водорослей, вып. 2. М., изд-во МГУ, 1969, 110.

13. Шестаков С. В., Глазер В. М., Еланская И. В. Личное сообщение, 1972.
14. Шестаков С. В., Глазер В. М., Жевнер В. Д. Индуцированные ультрафиолетовыми лучами включение тимина и тимидина в ДНК синезеленых водорослей. — Биол. науки, 1973, 5, 107.
15. Шестаков С. В. Мутационная изменчивость синезеленых водорослей. — В кн.: Актуальные проблемы биологии синезеленых водорослей. М., «Наука», 1974, 18.
16. Яремоненко С. П. Противолучевая защита организма. М., «Атомиздат», 1969.
17. Adaman R., Schultz L. D., Hall B. D. Transcription in yeast: separation and properties of multiple RNA polymerases. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1802.
18. Ahnström G., Erixon K. Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. — Intern. J. Radiat. Biol., 1973, 23, 285.
19. Asato Y. Photorecovery of gamma-irradiated cultures of blue-green alga, *Anacystis nidulans*. — Radiat. Bot., 1971, 11, 313.
20. Baccetti S., Elli R., Falchetti R., Sacchi A. Recovery from X-ray-induced sublethal damage in *Saccharomyces cerevisiae* cells of different ploidy. — Intern. J. Radiat. Biol., 1966, 10, 213.
21. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. — Nature, 1970, 226, 1209.
22. Boyce R. P., Howard-Flanders P. Genetic control of DNA breakdown and repair in *Escherichia coli* K12 treated with mitomycin or ultraviolet light. — Z. Vezelungsl., 1967, 95, 345.
23. Boyle J. M., Paterson M. G., Setlow R. B. Excision-repair properties of an *Escherichia coli* mutant deficient in DNA polymerase. — Nature, 1970, 226, 708.
24. Bridges B. A. Sensitization of organisms to radiation by sulphydryl-binding agents. — Advan. Radiat. Biol., 1969, 3, 123.
25. Bruce A. K. Extraction of the radioresistant factor of *Micrococcus radiodurans*. — Radiat. Res., 1964, 22, 155.
26. Clark A. J., Chamberlin M., Boyce R. P., Howard-Flanders P. Abnormal metabolic response to ultraviolet light of recombination deficient mutant of *E. coli* K12. — J. Mol. Biol., 1966, 19, 442.
27. Cramp W. A., Watkins D. K. The modification of post-irradiation DNA degradation in *Escherichia coli* B/r. — Radiat. Res., 1970, 41, 312.
28. Dean C. J., Alexander P. Sensitization of radio-resistant bacteria to X-rays by iodoacetamide. — Nature, 1962, 196, 1324.
29. Dean C. J., Alexander P. The sensitization of bacteria to X-rays by iodoacetamide and some related compounds. — Progr. Biochem. Pharmacol., 1965, 1, 46.
30. Dmitriev A. P., Grodzinsky D. M. Influence of some radiosensitizers on gamma-ray-induced degradation of DNA in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Radiat. Bot., 1974, 14, 11.
31. Dmitriev A. P., Grodzinsky D. M. Post-irradiation sensitization to gamma-rays in the blue-green alga *Anacystis nidulans* by a rifamycin derivative (DMB) which is active on RNA-directed DNA polymerase. — Z. Pilanzphysiol., 1974, 73, 89.
32. Doolittle W. F. Ribosomal ribonucleic acid synthesis and maturation in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — J. Bacteriol., 1972, 111, 316.
33. Dugle D. L., Charman J. D., Gillespie C. J., Borsa J., Webb R. G., Mecker B. E., Reuvers A. P. — Intern. J. Radiat. Biol., 1972, 22, 545.
34. Elder R. L., Beers R. F. Jr. Nonphotoreactivating repair of ultraviolet light damage in *Micrococcus lysodeikticus* and *Hemophilus influenzae* transforming DNA — Federal. Proc., 1964, 23, 373.
35. Elkind M. M., Sinclair W. K. Recovery in X-irradiated mammalian cells. — Current Topics in Radiat. Res., 1965, 1, 165.

36. Elk kind M. M., Kamper C. Two forms of repair of DNA in mammalian cells following irradiation.— *Biophys. J.*, 1970, 10, 237.
37. Elk kind M. M., Chang-Liu C. M. Actinomycin D inhibition of repair of a DNA complex from Chinese hamster cells.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1972, 22, 313.
38. Friedman D. L., Mueller G. C. Studies on the nature of replicating DNA of HeLa cells.— *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 174, 253.
39. Fuhs G. W. The nuclear structures of protocaryotic organisms (bacteria and Cyanophyceae).— *Protoplasmatologia*, 1959, 5, 1.
40. Gottlieb A. L., Taylor L., Leinsheimer F. Replication of deoxyribonucleic acid in lymphoid cells. An unusual effect of bromo-deoxyuridine.— *Biochemistry*, 1970, 9, 4322.
41. Hayashi F., Ishida M. R., Kijuchi T. Macromolecular synthesis in a blue-green alga *Anacystis nidulans* in dark and light phases.— *Ann. Repts. Res. Reactor Inst. Kyoto Univ.*, 1969, 2, 56.
42. Hilleva J., Drasil V. The inhibitory effect of iodoacetamide on recovery from sublethal damage in *Chlamidomonas reinhardtii*.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1967, 12, 201.
43. Ho S. K., Ho Y. L. The modification of the yields of single-strand breaks in DNA of gamma-irradiated *Escherichia coli*.— *Radiat. Res.*, 1972, 51, 142.
44. Kada T. Radiosensitization of *E. coli* to 137 Cs gamma-irradiation with KIO_3 and related compounds.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1969, 15, 271.
45. Kada T., Noguti T., Namiki M. Radiosensitization with iodine compounds. I. Examination of damage in deoxyribonucleic acid with *Bacillus subtilis* transformation system by irradiation in the presence of potassium iodide.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1970, 17, 407.
46. Kaneko I. Protein synthesis in *Escherichia coli* after gamma-irradiation in the presence of alkali halides.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1969, 16, 79.
47. Kraus M. Resistance of blue-green algae to ^{60}Co gamma-irradiation.— *Radiat. Bot.*, 1969, 9, 481.
48. Kumar H. D. Effect of radiation on blue-green algae.— *Ann. Bot.*, 1964, 28, 555.
49. Lee J. S., Anderson A. W., Elliker P. R. The radiation-sensitizing effects of N-ethylmaleimide and iodoacetamide acid on a radiation-resistant *Micrococcus*.— *Radiat. Res.*, 1963, 19, 593.
50. McBurney M. W., Graham F. L., Whitmore G. F. Sedimentation analysis of DNA from irradiated and unirradiated L-cells.— *Biophys. J.*, 1972, 12, 369.
51. McGrath R. A., Williams R. W. Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoicing of broken pieces.— *Nature*, 1966, 212, 534.
52. Mullenger L., Ormerod M. G. The radiosensitization of *Micrococcus sodonensis* by N-ethylmaleimide.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1969, 15, 259.
53. Myers D. K., Slade D. E. Radiosensitization of mammalian cells by iodoacetamide and related compounds.— *Radiat. Res.*, 1967, 30, 186.
54. Myers D. K. DNA repair in *E. coli* B/r after X-irradiation in the presence of iodide or iodoacetamide.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1971, 19, 293.
55. Noguti T., Sadaie H., Kada T. Radiosensitization with iodine compounds. III. Macromolecular synthesis and repair in *Bacillus subtilis* irradiated in the presence of iodoacetic acid, potassium iodide or potassium iodate.— *Intern. J. Radiat. Biol.*, 1971, 19, 305.
56. Roth R., Ashworth J. M., Sussman M. Periods of genetic transcription required for the synthesis of three enzymes during cellular slime mold development.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 1235.
57. Sedwick S. G., Bridges B. A. Survival, mutation and capacity to repair single strand DNA breaks after gamma-irradiation in different Exr-strains of *Escherichia coli*.— *Mol. Gen. Genet.*, 1972, 119, 93.
58. Shenoy M. A., Singh B. B., Gopal-Aengar A. K. Iodine incor-

- porated in cell constituents during sensitization to radiation by iodoacetic acid.— *Science*, 1968, 160, 999.
59. **S h e n o y M. A., J o s h i D. S., S i n g h B. B., G o p a l - A e n g a r A. K.** Role of bacterial membranes in radiosensitization.— *Adv. Biol. Med.*, 1970, 13, 255.
60. **S i n g h H. N.** Effect of acriflavine on ultraviolet sensitivity of normal, ultraviolet sensitive and ultraviolet resistant strains of a blue-green alga *Anacystis nidulans*.— *Radiat. Bot.*, 1968, 8, 355.
61. **S u s s m a n M., S u s s m a n R. R.** The regulatory program for UDP galactose polysaccharide transferase activity during slime mold cytodifferentiation: requirement for specific synthesis of ribonucleic acid.— *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 108, 463.
62. **S z y b a l s k i W.** Molecular events resulting in radiation injury, repair and sensitization of DNA — *Radiat. Res., Suppl.* 7, 1967, 145.

ГЛАВА III

РЕПАРАЦИЯ ДНК В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И ЕЕ РОЛЬ В РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ

Открытие темновой репарации ДНК в бактериальных клетках после ультрафиолетового облучения [39, 71, 72] повлекло за собой массовые исследования на других объектах, облученных как УФ, так и ионизирующей радиацией. Было установлено, что многие бактерии, водоросли, некоторые животные ткани обладают способностью репарировать повреждения, вызванные в молекуле ДНК облучением. Первые попытки обнаружить темновую репарацию ДНК в растительных клетках окончились безуспешно [67, 70, 78]. Однако В. Н. Сойфером и К. К. Циеминис [32] в эмбрионах чинки посевной, облученных УФ-радиацией, были установлены два первых этапа темновой репарации ДНК, идущей по типу «выщеление—замещение» и заканчивающейся вырезанием димеров тимина из ДНК. На основании этого авторы считают, что и растения, у которых раньше не удавалось обнаружить темновую репарацию, обладают этим важнейшим для жизнедеятельности ферментативным аппаратом. Восстановление молекулярного веса ДНК в постлучевой период наблюдали и в клетках хлореллы [42], овса [79, 80]. По мнению Д. М. Гродзинского [10], репарация ДНК в высших растениях имеет место, однако она, «видимо, играет вспомогательную роль, обеспечивая «доброкачественность» клетки для репопуляционного восстановления организма от лучевого поражения».

Темновая репарация ДНК состоит из последовательно идущих процессов, контролируемых определенными энзимами [5, 77]: инцизии — разрыв фосфоэфирной связи вблизи повреждения; эксизии — поврежденный участок удаляется благодаря второму разрыву по другую сторону повреждения. Оба этих процесса осуществляются в результате действия эндо- и экзонуклеаз. Затем происходит деградация вырезанного участка ДНК разного рода ДНКазами и выброс продуктов деградации в цитоплазму, репаративный синтез — заполнение пробела с использованием противоположной цепи ДНК в качестве матрицы при участии ДНК-полимераз и, наконец, воссоединение вновь синтезированного участка с исходной нитью ДНК ковалентной фосфодиэфирной связью. Последний этап осуществляется лигазами.

Роль репарации ДНК в восстановлении живых систем, стоящих на разных уровнях организации живой материи, по-видимому,

не одинакова. У бактерий за счет репарации ДНК может произойти полное восстановление системы от лучевого поражения. Для животных и растительных организмов восстановление может осуществляться различными путями (регенерация, репопуляция, восстановление поврежденных хромосом и т. д.), в число которых входит и репарация генетических структур [9]. Доля участия каждого из этих процессов в общем восстановлении организма от лучевого поражения, неизвестна. По всей вероятности, между репарационными процессами и радиоустойчивостью существует некоторая связь.

Для выяснения молекулярных механизмов радиоустойчивости растений мы провели исследования, целью которых было изучение процессов, дающих возможность судить о том, происходит ли темновая репарация ДНК в растениях, различающихся по радиоустойчивости: маше, горохе (Рамонский 77), конских бобах (Уладовский). Критерием восстановительных процессов служили относительные скорости роста корней (ОСР) и накопление сухой массы проростков в пострадиационный период. О темновой репарации ДНК судили по уменьшению активности ДНК, которую предварительно метили радиоактивным тимидином, и по изменению включения меченого тимидина в ДНК в постлучевой период.

СПОСОБНОСТЬ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ И РАДИОУСТОЙЧИВОСТЬ

Прежде чем приступить к изучению процессов, затрагивающих молекулу ДНК в постлучевой период, были проведены эксперименты по определению способности к восстановлению растений, характеризующихся различной радиоустойчивостью. Семена растений замачивали в водопроводной воде и прорачивали в термостате при 22—24° в течение 2—3 суток. Затем проростки облучали гамма-лучами ^{60}Co * в дозах 400, 800, 1500 и 3000 рад, мощность дозы 17 рад/сек. После облучения проростки высаживали в водные культуры на питательную смесь Гельригеля и выращивали 7—10 дней, после чего определяли вес сухого вещества и ОСР (рис. 20). Определение ОСР облученных корней проводили по методике, описанной нами в работе [8]. Влияние облучения на накопление сухой массы в растениях спустя 7 дней после облучения, в граммах на 100 растений представлено ниже:

Доза облучения, rad	Маш	Горох	Конские бобы
0	3,23	6,21	13,27
400	3,05	5,72	4,91
800	2,89	3,94	3,08
1500	2,53	2,54	2,24
3000	2,26	1,36	1,87

* Во всех последующих экспериментах также использовали гамма-лучи ^{60}Co , мощность дозы облучения 17—25 рад/сек. Облучение проводили в Институте физической химии им. Писаржевского АН УССР.

Из приведенных данных и рис. 20 видно, что облучение в большей степени оказывает отрицательное воздействие на конские бобы, у которых наблюдалось резкое угнетение накопления сухой массы проростков, а также необратимое подавление ростовых процессов — не восстанавливается рост корня. У гороха также происходит ингибирование накопления сухой массы и ОСР, однако при облучении проростков небольшими дозами рост корня восстанавливается. И наконец, ингибирование сухой массы и ОСР у маша мы наблюдали только при облучении в дозе 3 крад. Как видно из рис. 20, способность к восстановлению ростовых процессов у растений маша проявляется в большей степени, чем у гороха и, в особенности, у конских бобов. LD_{50} было равным: для маша — 1350, для гороха — 800 и для конских бобов — 400 рад [11].

Природа радиоустойчивости растений определяется многими причинами и остается до сих пор не выясненной окончательно. Некоторые авторы пытаются связать радиоустойчивость растений с размером ядра, размером хромосом, количеством ДНК в ядре, экологическим фактором и т. д. [4, 21, 27, 74, 75]. Несомненно, большую роль в радиоустойчивости играет способность того или иного организма к восстановлению от радиационного поражения [4]. Приведенные выше экспериментальные данные показывают, что маш, отличающийся высокой радиоустойчивостью, характеризуется также и высокой способностью к восстановлению. Высокочувствительные конские бобы, наоборот, не обладают такой способностью. Горох занимает промежуточное положение: в отличие от конских бобов он способен к восстановлению ростовых процессов, однако последние происходят не столь интенсивно, как у маша. Таким образом, радиоустойчивость растений в какой-то степени связана с восстановительными процессами. В дальнейшем мы попытались оценить интенсивность reparационных процессов в этих растениях и связать их с радиоустойчивостью.

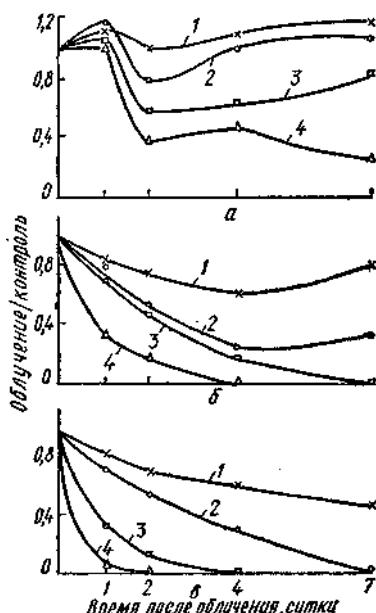


Рис. 20. ОСР облученных корней:
а — маш, б — горох, в — конские бобы;
1 — 400 рад, 2 — 800 рад, 3 — 1500 рад, 4 — 3000 рад.

ПОСТЛУЧЕВАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ДНК

Постлучевая деградация ДНК в облученных клетках охватывает первые этапы темновой репарации ДНК, идущей по типу «выщелачивание — замещение»: инцизию, экцизию и собственно деградацию вырезанного участка с помощью ДНКаз. Для ее изучения мы использовали метод, состоящий в определении активности ДНК, которую перед облучением метили радиоактивным тимидином. С этой целью 3—4-дневные отрезки корней маша, гороха и конских бобов инкубировали 24 ч в питательной среде (2%-ная сахароза и 10^{-4} М цитрата аммония, содержащей ^3H -тимидин в количестве 1 мкК/мл, уд. активность 4,3 К/мМ), в стерильных условиях. Затем корни переносили в среду без ^3H -тимидина на 12 ч, после чего облучали гамма-лучами. После облучения корни вновь инкубировали в тех же условиях в течение 3, 6 и 24 ч, после чего определяли их радиоактивность. Для этого корни растирали в холодной трихлоруссной кислоте (ТХУ), центрифугировали, осадок обрабатывали последовательно этанолом, смесью этанола и эфира (3 : 1, 1 : 1, 1 : 3), серным эфиром, высушивали, затем гидролизовали KOH 1 ч при 37°. KOH нейтрализовали HClO_4 и осадок гидролизовали 1 ч. HClO_4 1 ч при 90°. HClO_4 нейтрализовали KOH, и в водном гидролизате определяли активность ^3H -ДНК на сцинтилляционном радиометре SL-40 с использованием сцинтилляционной жидкости ЖС-7а (Харьков) *.

Таблица 14

Уменьшение активности ^3H -ДНК в корнях маша и гороха в постлучевой период, амп/мин $\times 10^2$

Доза облучения, рад	Постлучевой период, ч			
	3	6	3	6
М а ш				
0	52,4 \pm 7,6		59,2 \pm 8,2	
0,5	51,9 \pm 10,5		54,6 \pm 0,6	
1,0	51,9 \pm 6,1		50,6 \pm 4,1	
1,5	49,8 \pm 0,7		48,6 \pm 6,6	
5,0	41,7 \pm 3,2		37,3 \pm 1,3	
10,0	37,6 \pm 2,4		32,7 \pm 4,9	
Г о р о х				

Полученные нами данные о снижении активности предварительно меченой ^3H -ДНК для маша и гороха представлены в табл. 14. В корнях конских бобов, облученных только в дозе 800 рад, наблюдали следующее уменьшение активности ^3H -ДНК:

* Во всех приведенных ниже экспериментах методика определения активности ДНК аналогична описанной в этом разделе.

Время, ч	Активность, $\text{амп}/\text{мин} \times 10^2$
0	48,5 ± 9,3
3	47,4 ± 2,2
6	40,3 ± 3,3
9	35,6 ± 1,8
24	26,9 ± 7,8

Как видно из приведенных данных, активность предварительно меченной ^3H -ДНК в облученных корнях снижается во всех культурах. Уменьшение активности наблюдается уже спустя 3 ч после облучения и возрастает к 6 ч постлучевого периода. Активность ^3H -ДНК в необлученных корнях за это время несколько возрастает, что, по-видимому, объясняется включением ^3H -тимидина, оставшегося в пуле предшественников ДНК. В корнях конских бобов, облученных в дозе 800 рад, мы наблюдаем отчетливое снижение активности меченной ^3H -ДНК в зависимости от времени пострадиационного периода. К 24-му часу в ДНК остается около 55% ее первоначальной активности.

Таблица 15

Снижение активности ^3H -ДНК через 24 ч после облучения в корнях исследуемых растений, $\text{амп}/\text{мин}$ на 1 г сырого вещества $\times 10^2$

Доза облучения, рад	Маш	Горох	Конские бобы
0	37,14 ± 0,36	31,97 ± 2,29	84,31 ± 1,34
400	30,20 ± 4,18	25,00 ± 0,63	80,96 ± 4,31
800	27,39 ± 8,79	21,98 ± 1,44	76,03 ± 8,93
1500	25,99 ± 4,76	20,95 ± 0,71	67,13 ± 1,75
3000	24,06 ± 5,47	18,86 ± 3,44	51,13 ± 0,71

Результаты проведенных нами исследований зависимости снижения активности предварительно меченной ^3H -ДНК в корнях бобовых от дозы облучения представлены в табл. 15. Во всех культурах мы наблюдали снижение активности предварительно меченной ^3H -ДНК в зависимости от дозы облучения. При облучении корней в дозе 3 крад ДНК теряет около 35—40% первоначальной активности.

На рис. 21 представлены кривые распада предварительно меченной ^3H -ДНК, выполненные в полулогарифмическом масштабе. В радиобиологических экспериментах часто используют подобные кривые для определения ударности процесса. В нашем эксперименте кривые распада

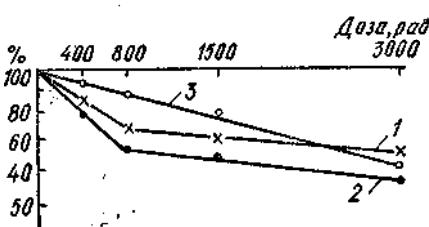


Рис. 21. Распад предварительно меченной ^3H -ДНК в корнях маша (1), гороха (2) и конских бобов (3) в зависимости от дозы облучения.

^3H -ДНК в корнях маша и гороха имеют типичный двухфазный характер, свидетельствующий о том, что за распад ДНК в постлучевой период ответственны два процесса. Распад ^3H -ДНК в облученных корнях конских бобов представлен в виде прямой, что свидетельствует о наличии только одного процесса. Мы полагаем, что первый участок кривой, более радиочувствительный, обусловлен повышением активности ДНКаз. Вторая, более пологая часть кривой, возможно, характеризует распад ^3H -ДНК, происходящий за счет репарационных процессов. Для конских бобов более вероятен распад ^3H -ДНК, происходящий за счет активации ДНКаз.

Повышение активности ДНКаз в облученных клетках связывают с увеличением проницаемости мембран и выходом из поврежденных лизосом ферментов. С. В. Аргунинской и Р. И. Салгаником [1] было установлено, что при инкубации изолированных ядер, выделенных из облученных тканей животных, в них происходит гидролиз ДНК и повышение активности ДНКаз. Авторы полагают, что это, по-видимому, в большей степени связано с проникновением фермента из цитоплазмы, чем с активацией собственных ДНКаз в ядре. Об этом свидетельствует также и последовательность повышения ДНКазной активности: вначале в цитоплазме, затем в ядре. При облучении непосредственно ядер значительного повышения активности ДНКаз авторы не обнаружили. Имеются предположения, что увеличение активности ДНКаз может быть связано с активацией ингибитора ДНКаз в облученных клетках [17]. Не исключено, что за повышение активности ДНКаз ответственно также и состояние матрицы ДНК. В необлученных клетках ДНК связана с белком, что делает ее значительно устойчивее к действию ДНКаз. При облучении происходит депротеинизация ДНК, что приводит к большей атакуемости ее ферментами.

По нашему мнению, в этих экспериментах наметилась некоторая связь между радиоустойчивостью растений и тенденцией к деградации ДНК в постлучевой период. Для экспериментальной проверки этого предположения нами были проведены опыты, в которых одновременно изучали включение меченых предшественников в ДНК и процесс распада ^3H -ДНК в пострадиационный период. С этой целью 2—3-дневные отрезки корней инкубировали 24 ч в среде, содержащей ^3H -тимидин, 12 ч — в среде без ^3H -тимидина, после чего облучали в дозах 400, 800, 1500 и 3000 рад. После облучения от корней отделяли апикальную часть и инкубировали 6 ч в среде, без сахарозы. В последние 3 ч в питательную смесь добавляли ^{14}C -тимидин в количестве 10 $\mu\text{К}/\text{мл}$, уд. активность 73 $\text{мК}/\text{мМ}$. Инкубацию и облучение корней проводили в стерильных условиях. Активность определяли на радиометре SL-40 в двух каналах. В обоих случаях учитывалась степень гашения. Использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-8и (Харьков). Для характеристики ДНК, меченной по ^3H , использовали общую активность (расп/мин), а по ^{14}C — удельную активность, выраженную в расп/мин · A_{260} , где A_{260} представляет собой оптическую плотность гидролизата

ДНК, измеренную на спектрофотометре СФ-4а, при длине волны, равной 260 нм.

Полученные данные представлены на рис. 22, из которого видно, что для всех трех культур, облученных гамма-радиацией, через 5 ч после облучения наблюдается уменьшение активности предварительно меченной ^{3}H -ДНК, которое зависит от дозы облучения. При облучении дозой 3000 рад активность ^{3}H -ДНК для всех культур уменьшается приблизительно на 40%. В опытах по включению ^{2-14}C -тимидина в ДНК отрезков корней спустя 5 ч после облучения мы обнаружили повышение удельной активности ^{14}C -ДНК только для маша и гороха, которое зависело от дозы облучения: с увеличением дозы удельная активность ДНК повышалась, но при облучении в дозе 3000 рад происходило резкое снижение удельной активности ДНК. Таким образом, в корнях более радиоустойчивых растений (маша и гороха) мы наблюдали распад предварительно меченной ^{3}H -ДНК и повышение включения ^{2-14}C -тимидина в отрезки корней, лишенных меристемы; в корнях конских бобов происходила только потеря активности предварительно меченной ^{3}H -ДНК.

Методом гибридизации РНК на матрице ДНК мы попытались оценить повреждения матрицы ДНК при облучении и ее возможное восстановление в постлучевой период. Ранее [7] нами было показано, что облучение вызывает нарушения в кодирующих последовательностях ДНК, которое выражается в изменении гибридизационной способности ее при связывании с РНК, выделенной из необлученных корней гороха. Исходя из этого, мы предположили, что при наличии в растительных тканях систем репарации ДНК, исправляющих матрицу ДНК в постлучевой период от повреждений, вызванных облучением, гибридизационная способность ДНК

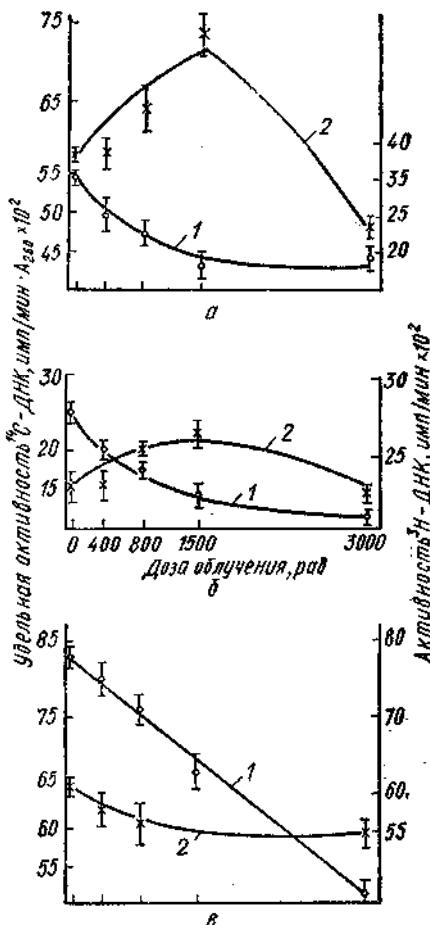


Рис. 22. Распад предварительно меченной ^{3}H -ДНК (1) и пострадиационное включение ^{2-14}C -тимидина (2) в ДНК облученных корней маша (а), гороха (б) и конских бобов (в) в зависимости от дозы облучения.

с необлученной РНК должна возрастать до уровня необлученных растений.

Опыты проводили с корнями гороха, облученными в дозах 800, 1000, 5000, 10 000 и 25 000 рад. После облучения часть корней гороха сразу же фиксировали жидким азотом, остальные — после инкубации в течение 5 и 24 ч. Выделение ДНК и РНК проводили методом, описанным в работе [7]. Гибридизацию вели по Спигельману [52] или по Г. П. Георгиеву и В. Я. Арион [2]. РНК метили по 2^{14}C -урацилу (100 $\mu\text{K}/\text{мл}$ питательной смеси, уд. активность 21 $\mu\text{K}/\text{мМ}$) или по ^{32}P -ортофосфату, вносимому в питательную смесь в виде ортофосфорной кислоты без носителя (активность 20 $\mu\text{K}/\text{мл}$, уд. активность 2,88 $\text{К}/\text{мг}$). Время инкубации 1 ч. Активность определяли на торцовом счетчике БФЛ-Т25. Ошибка измерения не превышала 7%.

Время выделения ДНК после облучения, ч	Активность гибридов ДНК _{обл} /РНК _{кон} при облу- чении дозой 800 рад, имп/мин
ДНК _{кон}	349 \pm 40
0	260 \pm 16
5	288 \pm 48
24	341 \pm 37
48	396 \pm 39

Представленные выше и в табл. 16 данные показывают, что активность гибридов, в которых матрицей была ДНК, выделенная из облученных корней (ДНК_{обл}), сразу же после облучения, была ниже активности гибридов, у которых матрицей служила ДНК, выделенная из контрольных корней (ДНК_{кон}). Отмечена зависимость уменьшения активности гибридов от дозы облучения: чем выше доза, тем ниже способность ДНК_{обл} комплементарно связываться с РНК_{кон}. После 5 ч инкубации мы наблюдали увеличение активности гибридов для всех использованных доз по сравнению с неинкубированными корнями. Через 24 ч после облучения происходило увеличение активности гибридов только для ДНК_{обл}, выделенной из облученных в дозе 800 рад корней гороха. Во всех остальных случаях активность гибридов ДНК_{обл}/РНК_{кон} снижалась. При этом была обнаружена следующая закономерность: чем выше доза облучения, тем ниже активность образовавшихся гибридов.

Мы полагаем, что в результате облучения на матрице ДНК возникают повреждения в комплементарных последовательностях, вследствие чего происходит уменьшение гибридизационной способности ДНК, выделенной из облученных корней с РНК_{кон}. Наблюдаемое нами повышение активности гибридов спустя 5 ч после облучения, по-видимому, можно объяснить репарационными процессами, восстанавливающими матрицу ДНК. Об этом свидетельствуют данные, полученные в работе [32]. В экспериментах на растениях чины, облученной УФ-радиацией, авторы исследовали скорость вырезания димеров тимина из ДНК и установили, что этот процесс полностью заканчивается к 6-му часу постлучевого периода.

При интерпретации полученных данных мы, конечно, не отбрасываем полностью и другие возможности повышения гибридизационной способности ДНК_{обл} в постлучевой период, например увеличение количества ДНК с ненарушенными последовательностями за счет вступления в деление клеток «центров покоя» [9, 45]. Усиление повреждений в матрице ДНК, выделенной из облученных корней через 24 ч после облучения, оцениваемое нами по уменьшению ее гибридизационной способности, вызвано, по-видимому, наложением вторичных процессов, усиливающих действие радиации, например атакуемость молекулы ДНК свободными радикалами или радиотоксинами [28].

Таблица 16
Активность гибридов ДНК_{обл}/РНК_{кон} в разные сроки
после облучения, амп/100 сек

Доза облучения, рад	Время после облучения, ч		
	0	5	24
0	531 ± 15		507 ± 32
1	387 ± 32	462 ± 17	306 ± 10
5	338 ± 7	400 ± 17	299 ± 23
10	296 ± 45	361 ± 28	135 ± 30
25	169 ± 50	231 ± 97	97 ± 38
Шум	19 ± 6		

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в растениях происходят процессы, напоминающие темновую репарацию ДНК, обнаруженную в бактериях и тканях некоторых животных, в результате чего в пострадиационный период происходит исправление матрицы ДНК, поврежденной облучением. Возможно, это способствует восстановлению растительного организма в постлучевой период и в какой-то мере обуславливает радиостойчивость растения.

ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРАЦИИ ДНК МЕТОДОМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ В ГРАДИЕНТЕ ЩЕЛОЧНОЙ САХАРОЗЫ

Метод центрифугирования в градиенте щелочной сахарозы, впервые примененный для изучения репарации ДНК после X-облучения бактерий Мак-Грассом и Вильямсом [63], основан на том, что при облучении молекулярный вес ДНК понижается вследствие образования одиночных разрывов. При постлучевой инкубации наблюдается восстановление молекулярного веса ДНК облученных клеток. Метод привлек внимание исследователей, и вскоре на многих объектах, облученных УФ и ионизирующей радиацией, а также обработанных различными химическими веществами, была продемонстрирована темновая репарация ДНК, идущая по типу

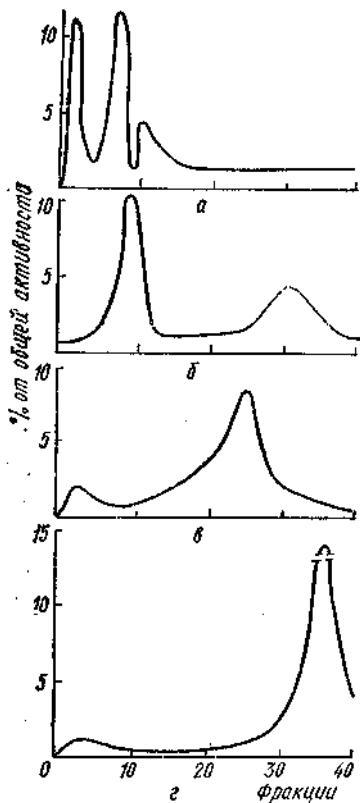


Рис. 23. Профили седиментации, полученные при центрифугировании в градиенте щелочной сахарозы ^3H -ДНК, выделенной из облученных корней гороха:
 а — контроль, б — 1 крад, в — 5 крад,
 г — 10 крад.

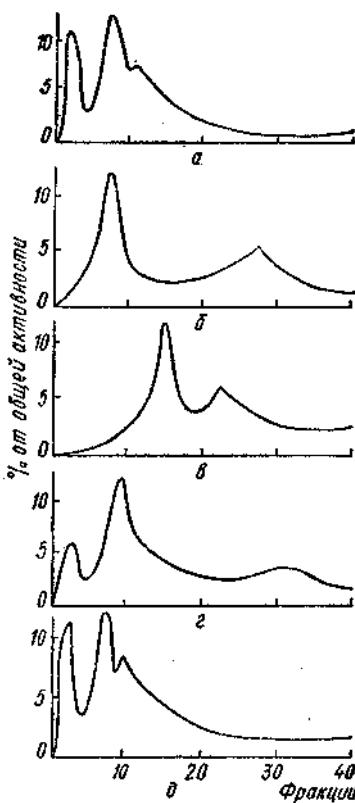


Рис. 24. Профили седиментации, полученные при центрифугировании в градиенте щелочной сахарозы ^3H -ДНК, выделенной из облученных в дозе 1 крад корней гороха в разные сроки постлучевого периода:
 а — контроль, б — 0 ч, в — 1 ч, г — 2,5 ч, д — 5 ч.

«выщелачивание—замещение». На растениях, как и на других объектах, было показано возникновение одиночных разрывов в ДНК при гамма-облучении и центрифугировании ее в градиенте плотности щелочной сахарозы [49, 50]. При увеличении дозы количество одиночных разрывов в ДНК возрастало.

Мы изучали изменения в профиле седиментации ДНК в зависимости от дозы облучения (рис. 23) и от времени постлучевой инкубации корней (рис. 24 и 25). С этой целью отрезки корней гороха инкубировали 12 ч в питательной среде, содержащей 25 мкК/мл ^3H -тимидина, уд. активность 4,3 мК/мМ. Затем корни отмывали и облучали в дозах 1,5 и 10 крад. После облучения часть корней сразу же использовали для анализа, остальные инкубировали еще

1, 2,5, 5 и 24 ч. ДНК выделяли фенольным методом [8] и в количестве до 20 мкг насыпывали на верхушку 4,8 мл 5—20%-ного сахарозного градиента, приготовленного на 0,1 М NaCl, 0,003 М ЭДТА, 0,9 М NaCl, pH 12,2—12,6. ДНК перед нанесением денатурировали 1 ч в 1 н NaOH, содержащей 0,5% додецилсульфата натрия (ДС) и 0,003 М ЭДТА. Центрифугирование проводили на центрифуге ВАС-601, в бакет-роторе при 37 000 об/мин, 18°, в течение 2 ч. После центрифугирования собирали по 5 капель, добавляли ДНК-носитель, осаждали 5%-ной ТХУ, отстаивали 1 ч, осадок собирали на мембранные фильтры Ф-1 или Ф-2 (Мытищи). Активность определяли на сцинтилляционном радиометре «Nuclear Chicago»; сцинтиллятор был приготовлен на основе толуола.

Как видно из приведенных седиментограмм, ДНК, выделенная из необлученных корней, представлена двумя пиками, что, возможно, характеризует наличие двух форм ДНК. В литературе имеются указания на то, что ДНК из животных тканей может седиментировать в виде двух пиков. Один пик, по-видимому, обусловлен тяжелым ДНК-липидно-белковым комплексом [48, 61] или представляет собой не денатурированную (двойную) спираль ДНК [73]. Второй, более легкий пик, представляет собой денатурированную ДНК без липидно-белковых примесей. Из седиментограмм, приведенных на рис. 23, видно, что ДНК, выделенная из облученных корней, через 1 ч после облучения (корни содержались при 0°) представлена в основном одним пиком, положение которого зависит от дозы облучения. При облучении в дозе 10 крад основная активность (около 75%) сосредоточена на поверхности градиента, тогда как при облучении в дозе 1 крад — у дна пробирки, аналогично необлученной ДНК. Это свидетельствует о том, что в результате облучения проростков в ДНК возникают одиночные разрывы, которые уменьшают молекулярный вес ДНК, вследствие чего проис-

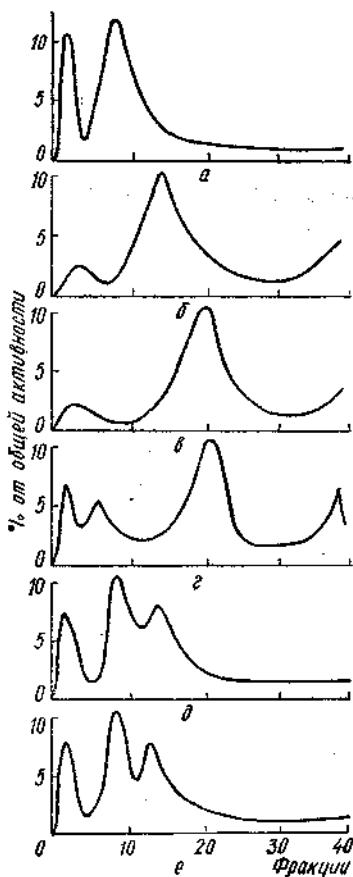


Рис. 25. Профили седиментации, полученные при центрифугировании в градиенте щелочной сахарозы ^{3}H -ДНК, выделенной из облученных в дозе 5 крад корней гороха в разные сроки постлучевого периода:
 а — контроль, б — 0 ч, в — 1 ч,
 г — 2,5 ч, д — 5 ч, е — 24 ч.

ходит сдвиг пика активности на седиментограмме в сторону более низких концентраций сахарозы. Ценность этого метода заключается еще и в том, что по изменению положения пика радиоактивности ДНК, выделенной из облученных клеток в разные сроки пострадиационного периода, можно судить о том, происходит ли восстановление молекулярного веса, т. е. репарация ДНК. Если происходит, то пик радиоактивности смещается сначала в сторону верхушки градиента, а затем возвращается к пику, который получен для ДНК из необлученных клеток.

При центрифугировании ^3H -ДНК, выделенной из облученных в дозе 1 крад корней гороха в разные сроки постлучевого периода, мы обнаружили, что сразу же после облучения исчезает пик, представляющий собой тяжелую фракцию ^3H -ДНК. Смещение пика в сторону более легких фракций незначительно. Спустя 2,5 ч происходило восстановление обоих пиков (рис. 24). При центрифугировании ^3H -ДНК, выделенной из облученных в дозе 5 крад корней гороха, мы наблюдали несколько иную картину: полное исчезновение первого пика и лишь частичное восстановление его спустя 5 ч после облучения. Отмечено также смещение второго пика к верхушке градиента в первые часы постлучевой инкубации корней. Но к 2,5 ч происходило его восстановление (рис. 25).

Исходя из приведенных выше данных, можно утверждать, что при облучении корней гороха в ДНК возникают одиночные разрывы, которые репарируются в течение 2,5 ч. При облучении корней в дозе 1 крад в ДНК происходят другие повреждения, которые выражаются в исчезновении тяжелой формы ДНК. Эта форма ДНК также восстанавливается, но спустя 5 ч после облучения.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ДНК В ПОСТЛУЧЕВОЙ ПЕРИОД

Другим важным этапом темновой репарации ДНК является ее репарационный синтез, осуществляемый ДНК-полимеразой. При репарационном синтезе происходит задельвание «брешей» в молекуле ДНК. Если в качестве предшественника ДНК использовать меченный тимидин, то повышение включения метки в молекулу ДНК у облученных клеток может свидетельствовать о наличии репарационного синтеза, особенно при условии, если эксперименты проводятся на неделяющихся клетках или же клетках, находящихся вне стадии синтеза ДНК. Мы сравнивали включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней гороха в разное время после облучения. В опытах были использованы отрезки корней, лишенные апикальной меристемы (от 5 до 15 мм). Отрезки облучали в дозах 400, 800, 1500 и 3000 рад . Спустя 2, 5 и 20 ч после облучения в инкубационную смесь добавляли $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидин в количестве 25 $\mu\text{К}/\text{мл}$, уд. активность 29,1 $\text{МК}/\text{мМ}$ и инкубировали еще 1 ч. После инкубации корни отмывали немеченым тимидином и определяли количество и активность ДНК.

Результаты опытов, представленные на рис. 26, показывают, что в первые 3 ч постлучевого периода не происходило повышения включения радиоактивного тимицина в ДНК. К 6-му часу постлучевого периода активность ДНК в облученных корнях по сравнению с необлученными повышается и достигает наибольшей величины при облучении корней в дозе 1500 рад спустя 21 ч после облучения.

В дальнейшем мы провели исследования с более дробным взятием проб и, кроме того, изучили включение меченого тимицина в ДНК зоны деления (0—3 мм) и зоны растяжения и начала дифференциации (5—15 мм) корней гороха. Корни облучали в дозе 2 крад, а затем инкубировали при одновременном постоянном и импульсном введении 2^{14}C -тимицина (1 мкК/мл , уд. активность $29,1 \text{ мК/ММ}$) и 6^{3}H -5-бромдезоксиуридина (^{3}H -БдУ) (1 мкК/мл , уд. активность $23,3 \text{ мК/ММ}$, ЧССР). Применение этих предшественников ДНК обусловлено тем, что исследованиями на бактериях было установлено, что ДНК-полимераза, осуществляющая репаративный синтез, отличается от ДНК-полимеразы, ответственной за репликативный синтез ДНК. Одно из существенных различий в их функционировании — большая избирательность ДНК-полимеразы репарационного синтеза. Независимо от соотношения в питательной среде тимицина и его аналога БдУ репаративный синтез вовлекает лишь 10% БдУ, а репликативный — 42—46% [5, 40, 55, 56]. Однако не всегда опыты по включению меченого тимицина и БдУ давали четкие результаты [41].

При импульсном введении радиоактивных предшественников корни инкубировали при максимальном подавлении репликативного синтеза ДНК, которое достигалось путем исключения из питательной среды сахарозы. Время импульсного введения предшественников — 1 ч. После инкубации корни отмывали немечеными тимицином и БдУ, ДНК выделяли описанным выше методом. Количество ДНК определяли на спектрофотометре СФ-4а при длине волны 260 нм (A_{260}), активность на сцинтилляционном радиометре «Nuclear Chicago» с использованием сцинтилляционной жидкости ЖС-8и (Харьков).

При постоянном введении меченых предшественников мы наблюдали повышение удельной активности ДНК как в зоне деления, так и в зоне растяжения и начала дифференциации. В облученных корнях удельная активность ДНК была значительно ниже удельной активности ДНК необлученных корней (рис. 27, 28). Наибольший интерес, с нашей точки зрения, представляют данные по им-

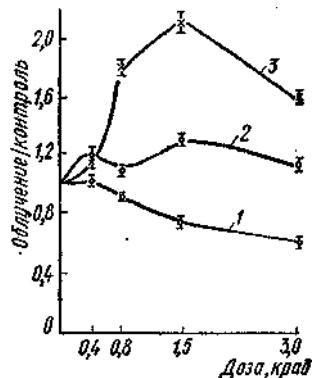


Рис. 26. Включение 2^{14}C -тимицина в ДНК облученных корней гороха, лишенных апикальной меристемы, спустя 3 ч (1), 6 ч (2) и 24 ч (3) после облучения.

пульсному введению радиоактивности. В зоне деления при неоптимальных условиях для полуконсервативной репликации ДНК включение меченого ^3H -БдУ происходит так же, как и в необлученных корнях. Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в облученные корни отличается от включения в необлученные. Как видно из рис. 27, активность ^{14}C -ДНК из облученных корней начиная с 6-го часа пост-

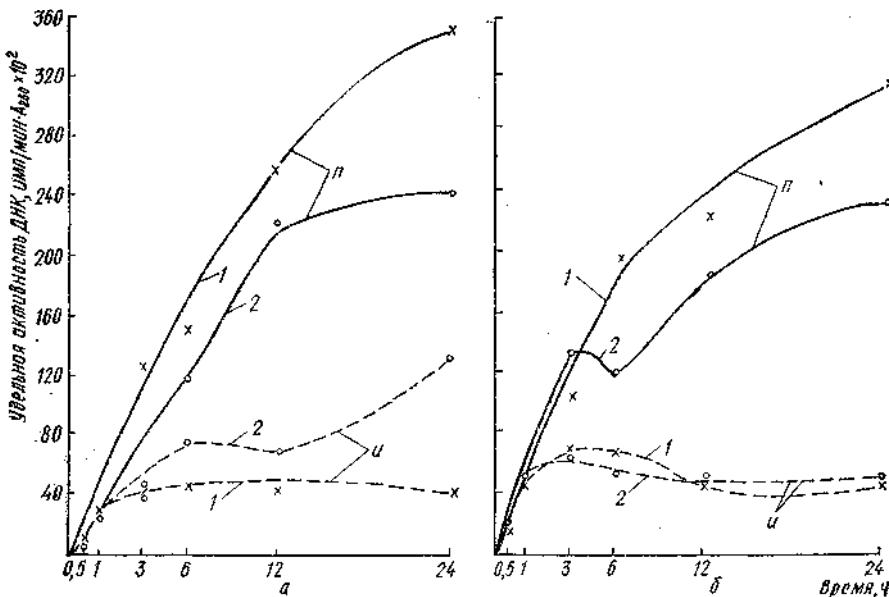


Рис. 27. Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина (а) и $6\text{-}^3\text{H}$ -БдУ (б) в отрезки корней зоны деления в разные сроки постлучевого периода:

1 — необлученные корни, 2 — облучение в дозе 2 крад; *n* — постоянное, *u* — импульсное включение радиоактивности.

лучевого периода возрастает и к 24 ч инкубационного периода уже значительно превышает активность ^{14}C -ДНК из необлученных корней. Подобное различие в поведении $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина и $6\text{-}^3\text{H}$ -БдУ можно объяснить наличием репарационного синтеза.

В зоне растяжения и начала дифференциации характер включения этих предшественников различается в первые 6 ч инкубации: активность ^{14}C -ДНК в облученных корнях выше, чем в необлученных, а активность ^3H -ДНК, наоборот, в облученных корнях ниже. Спустя 24 ч после облучения активность ДНК, меченной по ^{14}C и по ^3H , была значительно выше у облученных корней по сравнению с необлученными (рис. 28). Допуская существование репарационных систем в корнях гороха, различие в поступлении $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина и $6\text{-}^3\text{H}$ -БдУ спустя 6 ч после облучения можно объяснить репарацией ДНК, идущей по типу «выщелачивание — замещение»; спустя 24 ч после облучения увеличение включения меченых

предшественников в облученные корни происходит, по-видимому, за счет других восстановительных процессов.

В связи с этим перед нами встала задача определить, в какой мере наблюдаемое нами повышение включения радиоактивности в ДНК спустя 24 ч после облучения зависит от радиоустойчивости. С этой целью нами была изучена зависимость включения 2^{14}C -тимидина в ДНК корней маша, гороха и конских бобов, лишенных апикальной меристемы, от дозы облучения (рис. 29). Как видно из приведенного рисунка, интенсивность повышения включения радиоактивного тимидина в ДНК облученных корней была значительно выше у высокоустойчивого маша, чем у гороха; активность ДНК облученных корней конских бобов по сравнению с необлученными не повышалась. Наиболее сильное включение наблюдали при облучении в дозах до 1500 рад.

Наши данные свидетельствуют о том, что в корнях растений, облученных гамма-радиацией, спустя 24 ч после облучения включение радиоактивности в ДНК значительно превышает включение в необлученные корни. Интенсивность этого процесса зависит от радиоустойчивости растения. Природа наблюдаемого гамма-индуцированного дополнительного включения радиоактивности в ДНК облученных корней разных зон, по-видимому, различна. Ее определению посвящен следующий раздел.

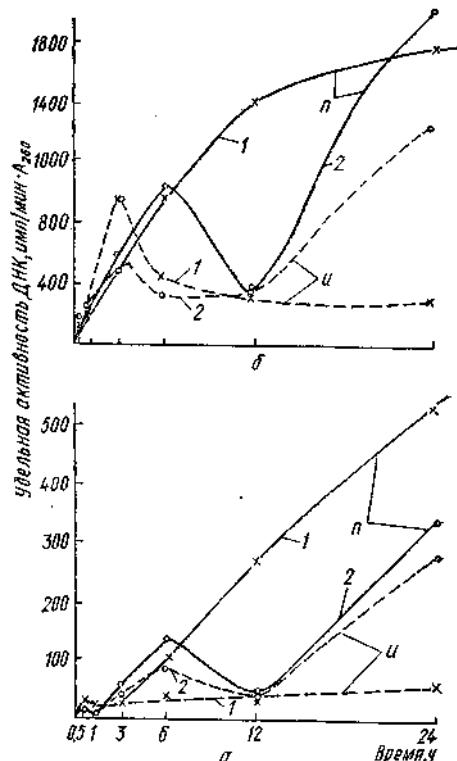


Рис. 28. Включение 2^{14}C -тимидина (а) и 6^{3}H -5БдУ (б) в отрезки корней гороха зоны растяжения и начала дифференциации в разные сроки постлучевого периода. Обозначения такие же, как и на рис. 27.

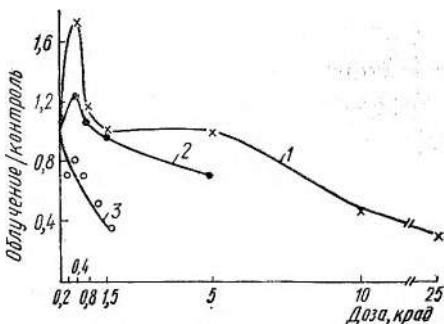


Рис. 29. Зависимость изменения удельной активности ДНК, выделенной из корней маша (1), гороха (2) и конских бобов (3), от дозы облучения спустя 24 ч после облучения.

ПРИРОДА ГАММА-ИНДУЦИРОВАННОГО ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО СИНТЕЗА ДНК

Включение меченого тимидина в ДНК облученных корней не дает однозначного ответа на вопрос, происходит ли в этих корнях репарационный синтез ДНК. Это связано с тем, что включение меченых предшественников в ядерную ДНК может быть обусловлено разными причинами: обычной репликацией ДНК, которая происходит не только в меристемной зоне корня, но и в зоне растяжения и дифференциации, поскольку в них также имеются делящиеся клетки. Не исключено, что облучение приводит к частичной синхронизации клеточных делений, и интенсивное включение меченого тимидина отражает репликативный синтез ДНК в синхронной популяции клеток. Повышенное включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК может быть также вызвано полиплоидизацией, характерной для некоторых делящихся клеток, репликацией, обусловленной дедифференциацией клеток, которые уже вступили на путь дифференциации, и амплификацией. Кроме этого, повышенное включение радиоактивности может происходить и за счет репарационного синтеза, а также за счет увеличения обмениваемости метаболической фракции ДНК.

Все это заставило нас более осторожно интерпретировать полученные данные по включению $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней и попытаться использовать подходы, которые помогли бы устранить некоторые из перечисленных выше процессов и получить репарацию в «чистом» виде. Для этого мы использовали ингибиторы репликативного синтеза ДНК и инкубацию корней в пострадиационный период при температуре $+5^\circ$ или в среде, лишенной сахараозы.

Кливером [43] было показано, что включение меченого предшественника в ДНК животных клеток, растущих в культуре, линейно варьирует в зависимости от температуры в пределах $(+4) - (+40)^\circ$. При низких температурах включение резко снижается, достигая 5% от уровня включения при 37° [66]; репарационный синтез при этом не ингибируется. Смысл экспериментов с исключением сахараозы из питательной среды заключается в том, что в этих условиях, по данным Вант-Гоффа [81], происходит блокирование перехода клеток из предсинтетической фазы в синтетическую. Синтез ДНК при этом прекращается.

Мы использовали такие ингибиторы репликации ДНК: оксимо-чевину (10^{-2} М) и митомицин С (10 мкг/мл); ингибиторы, подавляющие и репликацию, и репарацию ДНК: акрифлавин (20 мкг/мл) и актиномицин Д (20 мкг/мл), а также ингибитор репарации ДНК — кофеин ($2,5$ мг/мл). Эксперименты проводили по следующей схеме: отрезки корней зоны деления и зоны растяжения и начала дифференциации облучали в дозах 400 — 3000 рад. После облучения корни инкубировали 20 ч с тем или иным ингибитором либо, модифицируя условия постлучевой инкубации, в стерильных условиях.

В последние три часа в питательную смесь добавляли 10 $\mu\text{K}/\text{мл}$ 2- ^{14}C -тимидина, уд. активность 29,1 $\mu\text{K}/\text{ММ}$. После инкубации корни отмывали немеченым тимидином и выделяли ДНК описанным выше методом. Активность определяли на торцовом счетчике БФЛ-Т25.

Включение 2- ^{14}C -тимидина в ДНК облученных корней разных зон неодинаково: в апикальной меристеме происходит резкое сни-

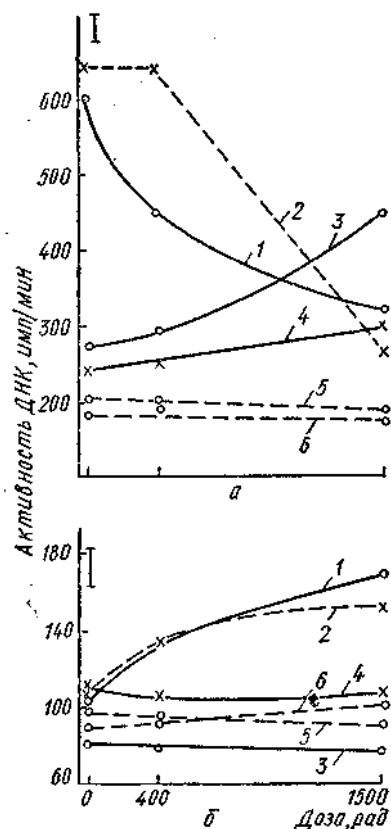


Рис. 30. Влияние ингибиторов репарации и репликации ДНК на включение 2- ^{14}C -тимидина в ДНК облученных корней гороха спустя 24 ч после облучения:

а — зона деления, б — зона растяжения и начала дифференциации; 1 — необработанные корни, 2 — обработанные кофеином, 3 — матомицином С, 4 — оксимочевиной, 5 — акрифлавином, 6 — актиноцином Д.

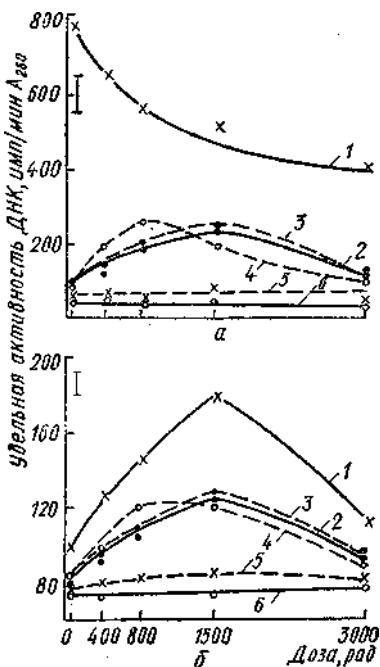


Рис. 31. Влияние модификации условий постлучевой инкубации и ингибиторов репарации и репликации на включение 2- ^{14}C -тимидина в ДНК отрезков корней гороха зоны деления (а) и зоны растяжения и начала дифференциации (б):

1 — полная питательная смесь без ингибиторов, 2 — сахароза; 3 — сахароза + оксимочевина, 4 — +5°, 5 — сахароза + кофеин, 6 — сахароза + акрифлавин.

жение активности ДНК, зависящее от дозы облучения, а в зоне растяжения и начала дифференциации обнаруживается дополнительное включение 2- ^{14}C -тимидина в ДНК, максимум которого наблюдается при облучении в дозе 1500 рад (рис. 30, 31).

В последнее время в радиобиологических экспериментах для устранения репликативного синтеза чаще всего используется оксимочевина. Ее ингибирующее действие проявляется при восстановлении рибозы до дезоксирибозы, происходящем, по всей вероятности, на уровне дифосфатов [44]. Репарационный синтез при этом не тормозится. Митомицин С ингибирует репликацию ДНК, так как вызывает сшивки между цепями, которые удаляются из ДНК при репарации [5]. Ингибирующее действие акрифлавина и высоких концентраций актиномицина Д связано с тем, что оба этих вещества связываются с молекулой ДНК, преимущественно с гуанином, в результате чего ДНК становится недоступной для действия ферментов репарации и репликации. И наконец, кофеин в бактериальных клетках ингибирует репарацию ДНК на уровне выщелачивания [26]. Есть данные, что в клетках эукариотов кофеин может ингибировать и пострепликативную репарацию [69]. Таким образом, использованные нами ингибиторы репликативного и репарационного синтеза обладали довольно высокой специфичностью.

Как видно из рис. 30, в зоне деления облученных корней все использованные нами ингибиторы, за исключением кофеина, более чем на 50% ингибировали включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК. Кофеин вызвал незначительную стимуляцию этого процесса. В зоне растяжения и начала дифференциации все использованные вещества не оказали заметного влияния на включение радиоактивности в ДНК. В облученных корнях акрифлавин и актиномицин Д, как в зоне деления, так и в зоне растяжения, сильно тормозили включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК, причем активность ДНК при облучении в дозе 400 и 1500 рад была одинаковой и равной активности ДНК в необлученных корнях. С нашей точки зрения, эти результаты могут свидетельствовать о том, что данные вещества полностью ингибировали включение меченого тимидина в ДНК, осуществляющее как репликативным, так и репарационным путем. Кофеин в облученных в дозе 400 рад корнях не оказал заметного влияния на поступление $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК, однако при облучении в дозе 1500 рад наблюдалось его ингибирующее действие в обеих зонах. Оксимочевина и особенно митомицин С почти полностью ингибировали дополнительный синтез ДНК в облученных корнях в зоне растяжения. В зоне деления при общем подавлении репликации ДНК наблюдалось небольшое повышение активности ДНК при использовании оксимочевины. Митомицин С вызывал более значительное повышение по сравнению с тем, которое мы наблюдали для оксимочевины. Возможно, это происходит за счет дополнительной репарации повреждений, вызванных действием митомицина С. Возможность репарации таких повреждений для бактерий доказана [5].

Результаты экспериментов по изменению включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных и необлученных корней спустя 24 ч после облучения при температуре $+5^\circ$ или в среде, лишенной сахара-зы, представлены на рис. 31. Оба фактора резко тормозили включение меченого тимидина в ДНК необлученных корней зоны деле-

ния и незначительно — в зоне растяжения. В облученных корнях зоны деления при инкубации последних в условиях заторможенной репликации наблюдалось повышение интенсивности включения меченого предшественника в ДНК, зависящее от дозы облучения: при повышенных дозах включение было более существенным, однако при облучении в дозе 3000 рад происходило снижение включения. В облученных корнях зоны растяжения и начала дифференциации при оптимальных для репликации ДНК условиях

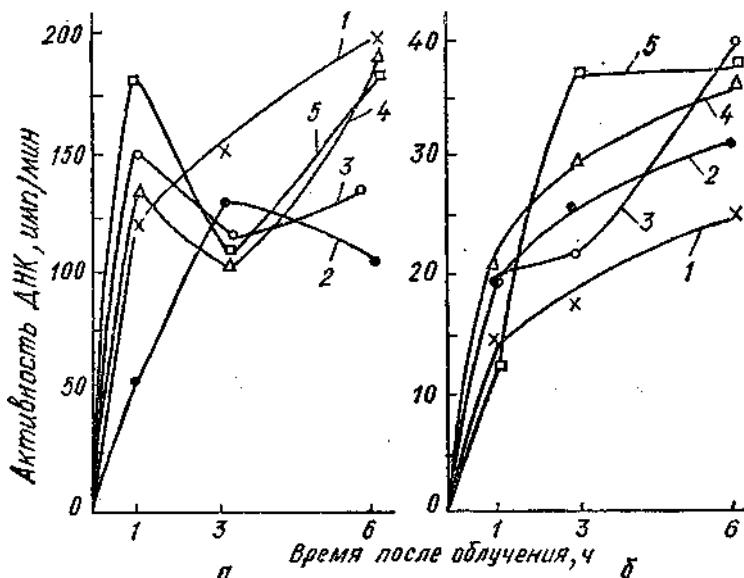


Рис. 32. Влияние исключения сахараозы из питательной среды на включение ^{3}H -тимидина в ДНК изолированных корней гороха:
 а — + сахараоза, б — — сахараоза; 1 — необлученные корни, 2 — 400 рад.
 3 — 800 рад, 4 — 1250 рад, 5 — 3000 рад.

наблюдалось значительное добавочное включение, которое резко снижалось, если корни инкубировали при $+5^{\circ}$ или в среде без сахараозы.

Для определения природы добавочного синтеза ДНК, идущего в неоптимальных для репликации условиях в гамма-облученных корнях гороха, были использованы ингибиторы репликации и репарации ДНК (кофеин, акрифлавин и оксимочевина) при постлучевой инкубации корней в бессахараозной среде (рис. 31). Как видно из рисунка, оксимочевина не оказывает влияния на включение 2^{14}C -тимидина в ДНК облученных корней обеих зон, если их инкубировать без сахараозы. Кофеин и особенно акрифлавин почти полностью подавляли гамма-индуцированный дополнительный синтез ДНК, проявляющийся при неоптимальных условиях инкубации.

Из приведенных выше данных можно сделать следующее предположение. Во-первых, в зоне деления возможен гамма-индуцированный дополнительный синтез ДНК, наблюдаемый лишь при торможении репликативного синтеза. Этот дополнительный синтез не ингибируется оксимочевиной, но тормозится при действии кофеина и акрифлавина, что свидетельствует в пользу того, что за него ответственны репарационные процессы. Во-вторых, в зоне растяжения и начала дифференциации гамма-индуцированный дополнительный синтез ДНК обусловлен, по крайней мере, двумя процессами: репликацией, которая ответственна за его большую часть, и репарацией, наблюдавшейся нами лишь при торможении полуконсервативного синтеза ДНК.

Мы изучили также включение ^3H -тимидина в состав ДНК меристемы корней проростков гороха при торможении репликативного синтеза ДНК в начальные часы после облучения (рис. 32). В случае заторможенной репликации включение ^3H -тимидина в ДНК было выше, чем у необлученных корней. Повышение интенсивности включения меченого тимидина в ДНК зависело от дозы гамма-облучения: при повышенных дозах оно было более существенным.

Одно из предположений о природе добавочного гамма-индуцированного синтеза ДНК состоит в том, что он может быть обусловлен увеличением обмениваемости метаболической фракции ДНК в результате действия на растения ионизирующей радиации. Функциональная особенность этой фракции ДНК в настоящее время исследуется и дискутируется [62]. Метаболическая фракция ДНК бы-

ла обнаружена в различных животных клетках (мозг, печень, мышцы) в условиях «митотического покоя», когда наблюдался синтез ДНК не сопровождался делением клеток [64, 68]. Обобщая известные в этом направлении работы, можно предположить, что метаболически активная ДНК локализована в диффузной части интерфазных хромосом и, по всей вероятности, входит в состав хроматина, играющего роль при транскрипции генетической информации. Обнаружено также, что метаболическая активность ДНК проявляется в случае, когда необходим усиленный синтез белков. При этом происходит добавочное умножение определенных копий,

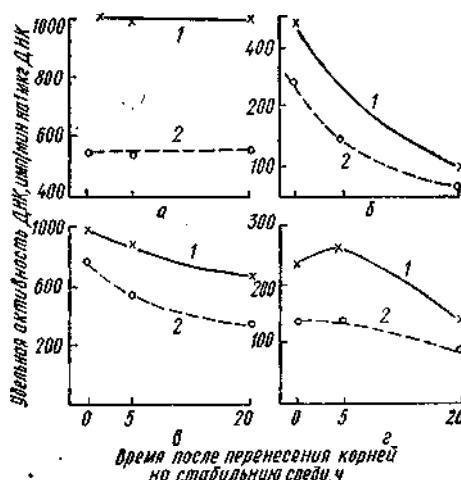


Рис. 33. Удельная активность фракций ДНК, выделенных из зоны деления облученных корней гороха:

а — стабильная, б — лабильная, в — остаточная, г — цитоплазматическая фракция;
1 — необлученные корни, 2 — облучение в дозе 2 крад.

чаще всего рибосомальных. Процесс известен под названием амплификации рибосомальных генов [38, 68]. В последнее время обсуждается еще одна возможная функция этой ДНК — информационная, т. е. перенос генетической информации из ядра в цитоплазму непосредственно самой ДНК [62], а также образование микросомальной ДНК.

Данные о действии излучений на метаболическую фракцию ДНК весьма незначительны. В работах, проведенных на тканях животных, было показано, что действие радиации всего лишь на несколько процентов угнетало включение меченых предшественников в метаболическую фракцию ДНК. Спустя 24 и 48 ч после облучения происходило восстановление ее обмениваемости, однако медленно и неполностью (цит. по [18]). Мы попытались определить влияние облучения на включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в разные фракции ДНК облученных и необлученных корней зоны деления и зоны растяжения и начала дифференциации. Доза облучения 2 крад, мощность дозы 20 rad/сек. После облучения корни инкубировали 12 ч в стерильных условиях, затем 5 ч в среде, содержащей 25 мкК/мл $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина, уд. активность 29,1 мК/мМ. После насыщения корни отмывали стерильной водой и продолжали инкубировать еще 5 и 24 ч. ДНК фракционировали по методу, описанному в работе [19]. ДНК выделенных фракций осаждали 10%-ной холодной ТХУ, собирали осадок на мембранных фильтрах Ф-2 (Мытищи) и определяли активность на торцовом счетчике БФЛ-Т25.

Согласно примененной методике было получено 4 фракции ДНК: а) цитоплазматическая; б) лабильная — не связана с гистонами, имеет локальные денатурационные участки, связана с РНК и метаболически активна; в) стабильная фракция ДНК — прочно связана с гистонами и локализована в компактном хроматине; г) остаточная фракция — ДНК ядрышкового аппарата и фрагментов хроматина, контактируемого с мембранами; также лабильна и высоко обмениваема. Результаты наших исследований приведены на рис. 33 и 34. Наиболее высокая удельная активность была у стабильной и остаточной фракций ДНК из зоны деления, наименьшая — у цитоплазматической. Эта фракция имела наименьшую активность

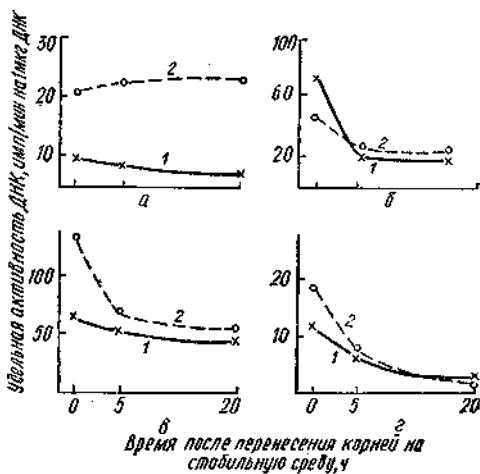


Рис. 34. Удельная активность фракций ДНК, выделенных из зоны растяжения и начала дифференциации облученных корней гороха. Обозначения такие же, как и на рис. 33.

и в зоне растяжения. Удельная активность стабильной фракции из зоны растяжения также была очень низкой по сравнению с удельной активностью лабильной и остаточной фракций. Кинетика изменения удельной активности всех фракций ДНК после перенесения отрезков корней из активной среды на стабильную показала, что лабильная и остаточная фракции ДНК относительно быстро теряли активность из своих фондов как в отрезках зоны деления, так и в отрезках зоны растяжения и начала дифференциации.

Удельная активность всех фракций ДНК из зоны деления в облученных корнях была значительно ниже удельной активности этих же фракций ДНК в необлученных корнях. В зоне растяжения мы наблюдали повышенную удельную активность стабильной, цитоплазматической и остаточной фракций у облученных корней по сравнению с необлученными корнями. Возможно, повышенное включение меченого тимидина в стабильную и цитоплазматическую ДНК обусловлено репарационными процессами, а в остаточную (которая характеризуется как ДНК ядрышкового аппарата) включение меченого тимидина происходит в результате амплификации. Однако для подобного утверждения требуются дальнейшие исследования.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ДОБАВОЧНОГО СИНТЕЗА ДНК В ПОСТЛУЧЕВОЙ ПЕРИОД

Большое значение в развитии лучевого поражения клетки имеет интенсивность различных биосинтетических процессов, и в частности синтеза белка и РНК, которые могут влиять на степень повреждения ДНК и репарационные процессы. Исследования такого типа обычно проводят с использованием ингибиторов того или иного процесса. Было установлено, что ингибитор синтеза белка — хлорамфеникол усиливает действие ионизирующей радиации на рост проростков [14], на выживаемость бактериальных клеток [53]. Однако использование различных ингибиторов синтеза РНК и белка с целью выяснения зависимости темновой репарации ДНК от этих процессов показало, что для нормального осуществления темновой репарации ни синтез белка, ни синтез РНК не играют никакой роли [26]. Это позволило сделать вывод, что ферменты репарации не синтезируются, а находятся в клетке в неактивном состоянии и имеют относительно длительный период жизни [51]. Однако ингибирование процесса окислительного фосфорилирования 2,4-дinitрофенолом (2,4-ДНФ) не только сенсибилизирует выживаемость бактерий, а также некоторых животных клеток, растущих в культуре, но и подавляет процесс темновой репарации ДНК [16, 34, 46]. Это свидетельствует о том, что для нормального осуществления темновой репарации необходима энергия, поставляемая окислительным фосфорилированием.

Исходя из сказанного выше, мы использовали следующие ингибиторы метаболических и энергетических процессов, чтобы выяснить зависимость пострадиационного включения меченого

предшественника в ДНК от этих процессов: хлорамфеникол (100 мкг/мл) — ингибитор синтеза белка, актиномицин Д (0,5 мкг/мл) — ингибитор синтеза РНК, 2,4-ДНФ ($5 \cdot 10^{-5}$ М), натрий фтористый ($3 \cdot 10^{-2}$ М), параклормеркурибензоат (ПХМБ) ($5 \cdot 10^{-5}$ М) — ингибиторы энергетических процессов. Натрий фтористый ингибирует гликолиз, подавляет активность альдолазы; ПХМБ — ингибитор пентозофосфатного пути дыхания. Он тормозит активность глюкоз-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [3, 15]. Есть предположение, что ПХМБ оказывает влияние на ферменты репарации. 2,4-ДНФ считается специфическим ингибитором окислительного фосфорилирования, разобщающим процессы дыхания и образования АТФ. Окончательное действие его еще не расшифровано. Предполагают: а) 2,4-ДНФ вызывает гидролиз образовавшегося АТФ, б) препятствует его образованию, одновременно давая возможность идти дыханию без фосфорилирования [30]. Приведенные ниже эксперименты проводили согласно условиям, описанным выше.

Таблица 17

Влияние ингибиторов синтеза РНК и белка на включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней гороха, $\mu\text{мк/мин} \cdot \text{A}_{260}$

Ингибитор	Доза облучения, рад					
	0	400	1500	0	400	1500
	+ сахароза			— сахароза		
Зона деления						
Без ингибитора	592 ± 18	449 ± 37	316 ± 49	145 ± 34	186 ± 22	207 ± 33
Актиномицин Д	279 ± 23	282 ± 33	185 ± 20	154 ± 19	207 ± 7	198 ± 24
Хлорамфеникол	198 ± 3	179 ± 2	184 ± 38	134 ± 24	176 ± 21	218 ± 9
Зона растяжения* и начала дифференциации						
Без ингибитора	292 ± 0	358 ± 33	474 ± 30	216 ± 35	267 ± 17	325 ± 9
Актиномицин Д	360 ± 17	267 ± 14	348 ± 6	254 ± 15	274 ± 31	317 ± 11
Хлорамфеникол	173 ± 16	133 ± 9	170 ± 3	199 ± 54	282 ± 25	337 ± 18

* В инкубационную смесь вносили по 75 мкК/мл $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина.

В зоне деления при инкубации корней в оптимальных условиях мы наблюдали резкое снижение активности ДНК как в облученных, так и необлученных корнях, свидетельствующее о том, что репликация ДНК происходит с участием этих процессов (табл. 17). Если репликативный синтез заторможен из-за отсутствия сахарозы в инкубационной смеси, то наблюдаемый дополнительный синтез ДНК не изменяется, если корни инкубируются с хлорамфениколом и актиномицином Д. Это дает возможность сделать заключение, что гамма-индуцированное дополнительное включение радиоактивного предшественника в ДНК не нуждается в синтезе белка и РНК.

В зоне растяжения и начала дифференциации хлорамфеникол

почти не влиял на включение меченого тимидина в ДНК облученных корней, однако в значительной мере тормозил включение радиоактивности в ДНК в облученных корнях. При инкубации корней в среде, лишенной сахарозы и содержащей антибиотики, добавочное включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней не изменяется.

Таблица 18

Влияние ингибиторов энергетических процессов на включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней гороха, $\text{pm}/\text{мин} \cdot \text{A}_{260}$

Ингибиторы	Доза облучения, рад					
	0	400	1500	0	400	1500
	+ сахароза			— сахароза		
Без ингибитора	592 \pm 18	449 \pm 37	316 \pm 49	145 \pm 34	186 \pm 22	207 \pm 33
Натрий фтористый	350 \pm 4	312 \pm 41	229 \pm 6	168 \pm 19	197 \pm 7	213 \pm 8
ПХМБ	285 \pm 21	217 \pm 19	152 \pm 11	134 \pm 22	175 \pm 6	198 \pm 32
2,4-ДНФ	1170 \pm 50	528 \pm 77	370 \pm 61	122 \pm 5	134 \pm 18	115 \pm 14

Зона деления

Без ингибитора	592 \pm 18	449 \pm 37	316 \pm 49	145 \pm 34	186 \pm 22	207 \pm 33
Натрий фтористый	350 \pm 4	312 \pm 41	229 \pm 6	168 \pm 19	197 \pm 7	213 \pm 8
ПХМБ	285 \pm 21	217 \pm 19	152 \pm 11	134 \pm 22	175 \pm 6	198 \pm 32
2,4-ДНФ	1170 \pm 50	528 \pm 77	370 \pm 61	122 \pm 5	134 \pm 18	115 \pm 14

Зона деления и начала дифференциации

Без ингибитора	292 \pm 0	358 \pm 33	474 \pm 30	216 \pm 35	267 \pm 17	325 \pm 9
Натрий фтористый	574 \pm 10	745 \pm 13	692 \pm 105	231 \pm 44	287 \pm 51	317 \pm 38
ПХМБ	270 \pm 0	335 \pm 55	302 \pm 53	198 \pm 23	243 \pm 16	275 \pm 46
2,4-ДНФ	372 \pm 15	625 \pm 19	578 \pm 23	205 \pm 22	197 \pm 15	174 \pm 27

Не менее важно, с нашей точки зрения, определить, за счет какого источника энергии происходит дополнительное гамма-индцированное включение меченого тимидина в ДНК отрезков корней гороха зоны деления и зоны растяжения и начала дифференциации. Как видно из полученных нами данных (табл. 18), ингибиторы различных энергетических процессов по-разному влияли на поступление $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК необлученных корней зоны деления: ингибитор гликолиза натрий фтористый и ингибитор пентозофосфатного пути дыхания ПХМБ тормозили этот процесс, а ингибитор окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ резко его стимулировал. По-видимому, участие этих процессов в делении клеток и полуконсервативном синтезе ДНК неодинаково и основными источниками их являются гликолиз и пентозофосфатный цикл. Значительное повышение включения в ДНК меченого тимидина при ингибировании образования АТФ в результате окислительного фосфорилирования, возможно, происходит вследствие того, что гликолиз и окислительное фосфорилирование в какой-то мере конкурируют за субстрат. Возможно, таким субстратом является АДФ. Поэтому ингибирование окислительного фосфорилирования поставляет гликолизу добавочное количество АДФ, которое стимулирует деление клеток и репликацию ДНК.

В облученных корнях примененные ингибиторы тормозили включение радиоактивного предшественника в ДНК. Удаление сахара-зы из питательной смеси, а также использование того или иного ингибитора показало, что натрий фтористый не оказал никакого влияния на добавочное включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина, некоторое тормозящее действие оказал ПХМБ, $2,4\text{-ДНФ}$ полностью ингибиравал это включение. Становится ясным, что для добавочного синтеза ДНК в облученных корнях необходима энергия, поставляемая окислительным фосфорилированием.

Обработка корней ингибиторами в зоне растяжения не оказала существенного влияния на включение меченого тимидина в ДНК необлученных корней. В облученных корнях наиболее ингибирующее действие оказали натрий фтористый и ПХМБ. Если репликативный синтез был заторможен, то и в этом случае наиболее эффективным оказался $2,4\text{-ДНФ}$.

Таким образом, изучение метаболической и энергетической обеспеченности процессов включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК облученных корней показало, что дополнительный гамма-индуцированный синтез ДНК, проявляющийся при ингибиравании репликативного синтеза, не зависит от синтеза белка и РНК и обеспечивается энергией за счет окислительного фосфорилирования. Изменения, которые мы наблюдали в зоне растяжения, также подтверждают наше предположение о наличии двух процессов, ответственных за включение радиоактивности в ДНК. Один из них зависит от синтеза белка и РНК и обеспечивается энергией за счет гликолиза и пентозофосфатного дыхания, другой не зависит от синтеза РНК и белка и обеспечивается энергией за счет окислительного фосфорилирования.

ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА И ББУ НА ОБЛУЧЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

С целью исследования связи репарационных процессов со способностью к восстановлению в разных по радиоустойчивости культурах было проведено изучение восстановительной способности облученных растений и процессов, которые дают возможность судить, происходит ли репарация ДНК в этих растениях после облучения. В исследованиях такого рода ценную информацию может дать использование ингибиторов репарации ДНК, а также сенсибилизаторов радиационного поражения.

Одни из наиболее интересных ингибиторов репарации ДНК — кофеин. В последние годы кофеин привлекает большое внимание исследователей и как мутагенный фактор, и как соединение, усиливающее действие радиации [65]. Последнее было установлено на бактериальных клетках [26, 24], животных тканях [12], а также на клетках синезеленых водорослей [76]. Модифицирующее действие на бактериальные клетки изучено довольно хорошо. Предполагается, что кофеин ингибирует процессы темновой репарации ДНК,

блокируя выщелачивание поврежденных участков, вследствие чего не происходит деградации ДНК, но на репарационный синтез, идущий с участием ДНК-полимераз, он не оказывает действия [26]. Относительно молекулярного механизма его действия на клетки эукариотов пока еще нет единого мнения. Однако проведенные исследования позволяют предположить, что кофеин в клетках эукариотов, в отличие от прокариотов, в основном действует на пострепликативную репарацию ДНК [65].

В высших растениях изучали главным образом модифицирующее действие кофеина на уровне хромосомного аппарата. Было показано, что пострадиационная обработка кофеином усилила радиационное повреждение хромосом в боковых корнях *Vicia faba* [13]. Установлено, что это усиление происходит в *S*- и *G₂*-фазах [6, 35]. Однако имеются сведения и о том, что пострадиационная обработка кофеином не изменила количество хромосомных аберраций в *X*-облученных проростках *Vicia faba* [58].

В связи с проблемой пострадиационного восстановления растений от ионизирующих излучений и участия в нем репарационных процессов, мы изучили модифицирующее действие кофеина на синтез ДНК, РНК и белка, а также на ростовые процессы в гамма-облученных проростках гороха. Доза облучения — 400 рад, мощность дозы 17 рад/сек. Сразу же после облучения проростки обрабатывали кофеином в концентрациях $0,13 \times 10^{-2}$ и $1,3 \times 10^{-2}$ М. Затем проростки выращивали еще 24 ч и определяли прирост корня и накопление сухой массы растения за это время. Кроме того, определяли скорость включения ^{2-14}C -тироцина в общий белок и ^{8-14}C -аденина в РНК и ДНК отрезков корней зоны деления (3 мм), зоны растяжения и начала дифференциации (5—10 мм). ^{2-14}C -тироцин использовали в количестве 10 мкК/мл, уд. активность 3,2 мК/г; ^{8-14}C -аденин — 10 мкК/мл, уд. активность 28 мК/г. Корни с ^{2-14}C -тироцином инкубировали 1 ч, с ^{8-14}C -аденином — 3 ч. После инкубации отрезки корней отмывали соответствующими стабильными соединениями и определяли активность так, как описано выше. Для этого использовали торцовий счетчик БФЛ-Т25.

В табл. 19 приведены данные о влиянии кофеина на прирост длины корня и накопление сухой массы вещества облученными и

Таблица 19

Влияние кофеина на прирост корня и накопление сухого вещества у облученных и необлученных проростков гороха за 24 ч постлучевого периода

Кофеин, М	Прирост сухого вещества, г/20 растений		Прирост длины корня, мм	
	необлученные	облученные	необлученные	облученные
0	0,1160	0,0873	11,68 ± 1,79	10,68 ± 1,36
$0,13 \cdot 10^{-2}$	0,0850	0,0820	14,93 ± 1,06	9,63 ± 0,38
$1,3 \cdot 10^{-2}$	0,0253	0,0004	5,74 ± 0,36	0,28 ± 17

необлученными проростками гороха. Средняя длина корня перед облучением была равна $15,07 \pm 0,74$ мм, средний вес сухого вещества 20 проростков — 0,021 г. Результаты исследований показывают, что кофеин ингибирует оба процесса как у облученных, так и у необлученных проростков. Наблюдается концентрационная зависимость: с увеличением концентрации кофеина увеличивается степень ингибирования, причем у облученных растений ингибирующее действие кофеина проявляется в большей степени, чем у необлученных.

Таблица 20

Влияние кофеина на включение меченых предшественников в белок РНК и ДНК отрезков корней гороха, облученных гамма-радиацией, мкг/мл на 1 г сырого вещества $\times 10^3$

Кофеин, М	Зона деления		Зона растяжения	
	необлученные	облученные	необлученные	облученные
Включение $2\text{-}^{14}\text{C}$-тиrozина в общий белок				
0	$29,13 \pm 1,27$	$52,51 \pm 1,36$	$26,90 \pm 0,99$	$26,20 \pm 1,62$
$0,13 \cdot 10^{-2}$	$34,35 \pm 2,22$	$48,66 \pm 0,60$	$20,97 \pm 0,78$	$24,95 \pm 0,90$
$1,3 \cdot 10^{-2}$	$47,47 \pm 3,52$	$20,55 \pm 0,60$	$17,23 \pm 1,56$	$13,23 \pm 0,45$
Включение $8\text{-}^{14}\text{C}$-аденина в РНК				
0	$21,0 \pm 0,1$	$32,0 \pm 7,9$	$5,7 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,7$
$0,13 \cdot 10^{-2}$	$18,5 \pm 2,1$	$16,6 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,5$	$5,2 \pm 1,0$
$1,3 \cdot 10^{-2}$ М	$15,0 \pm 0,1$	$13,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$
Включение $8\text{-}^{14}\text{C}$-аденина в ДНК				
0	$9,8 \pm 0,8$	$10,8 \pm 1,2$	$2,6 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,2$
$0,13 \cdot 10^{-2}$	$8,1 \pm 0,1$	$6,9 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,5$
$1,3 \cdot 10^{-2}$	$8,2 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,6$

Данные о модифицирующем действии кофеина на включение меченых предшественников в ДНК, РНК и белок облученных и необлученных корней гороха представлены в табл. 20, из которой видно, что в отрезках корней, включающих преимущественно зону деления (0—3 мм), у облученных проростков происходит повышенное включение меченых предшественников в РНК и белок; включение $8\text{-}^{14}\text{C}$ -аденина в ДНК было в пределах ошибки. Ранее [8] нами было показано, что при облучении отрезков корней гороха в дозе 100 рад в первые часы после облучения происходит увеличение ОСР корня, а также усиленный синтез ДНК и белка. Мы предположили, что вследствие высокой радиочувствительности клетки зоны деления теряют способность к триггерованию в сторону деления и растягиваются. Происходит нарушение соотношения между делящимися клетками и растягивающимися, вследствие чего в деление вступают клетки «центра покоя», обнаруженные Клоузом [45]. В результате этого в них происходит усиление синтетических процессов. Возможно, именно это и вызывает наблюдаемое нами уве-

личение включения меченых предшественников в ДНК, РНК и белков.

В растягивающихся и дифференцирующихся клетках корня (5—10 мм), характеризующихся высокой радиостойчивостью, мы наблюдали повышенное включение $8\text{-}^{14}\text{C}$ -аденина в ДНК и РНК отрезков корней облученных проростков; включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тирофиллина в белок облученных отрезков не отличалось от такового в необлученных. Мы предположили, что повышенное включение меченого предшественника в ДНК может быть обусловлено репарационными процессами, а в РНК — дерепрессией генома для синтеза некоторых видов РНК [25, 33].

Обработка кофеином необлученных проростков вызвала уменьшение включения $8\text{-}^{14}\text{C}$ -аденина в РНК и не оказала значительно го влияния на включение меченого предшественника в ДНК. Уменьшение включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тирофиллина в белок обработанных кофеином проростков гороха мы наблюдали только для зоны растяжения, тогда как в зоне деления было отмечено увеличение включения радиоактивности в белок, зависящее от концентрации кофеина. Возможно, последнее связано с усилением обмениваемости белкового фонда в делящихся клетках. Специфическое действие кофеина на растения изучено слабо. Кофеин в растительных клетках ингибирует образование клеточной оболочки, в результате чего прекращается деление клеток, но не затрагивает деление ядер, поэтому синтез ДНК остается неповрежденным. Возможно появление би- и полиядерных клеток. В работе [82] показано, что кофеин ингибирует синтез РНК и белка в корнях *Vicia faba*. Синтез ДНК в обработанных кофеином клетках не замедляется, однако длина цепей значительно уменьшается [59].

Пострадиационная обработка кофеином отрезков корней облученных проростков уменьшила включение меченых предшественников в ДНК, РНК и белок. При этом наблюдалось усиление действия радиации (см. табл. 19, 20). Можно предположить, что наблюдаемое усиление действия радиации в обработанных кофеином отрезках корней связано с его способностью ингибировать восстановительные процессы [65]. Наше предположение основано также и на полученных данных о включении меченого аденина в ДНК отрезков корней зоны растяжения (5—10 мм), когда в необлученных клетках кофеин не влиял на включение меченого аденина в ДНК, а в облученных — уменьшал это включение, при этом наблюдалось увеличение включения $8\text{-}^{14}\text{C}$ -аденина в ДНК у облученных отрезков по сравнению с необлученными. По-видимому, кофеин ингибирует это добавочное включение.

На основании приведенного экспериментального материала можно предположить, что кофеин в необлученных тканях, помимо действия на клеточную оболочку, в силу своей способности связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами [82], оказывает влияние на транскрипцию и протеиновый синтез. Однако, в отличие от работы [82], в наших экспериментах кофеин в большей

степени ингибировал синтез РНК, чем синтез белка. Усиление действия радиации в облученных корнях, по-видимому, связано с ингибированием репарационных процессов.

В дальнейшем мы изучили влияние предварительной инкубации проростков с 5БУ на восстановительные процессы в постлучевой период, а также на пострадиационную деградацию ДНК и включение меченого предшественника в молекулу ДНК у различных по радиочувствительности растений. Радиосенсибилизирующий эффект 5БУ объясняется тем, что в результате инкорпорации 5БУ в молекулу ДНК вместо тимина в последней происходит перераспределение в электронной плотности, и атом бора обуславливает электростатическое отталкивание между фосфатными остатками сахарабофосфатной цепи и галогензамещенным основанием. Такая ДНК становится очень неустойчивой, и после облучения происходит более сильная ее деградация [31, 36, 77]. Как правило, разрывы, вызванные облучением в местах с инкорпорированным 5БУ, не репарируются [31, 36, 77, 29, 37], поэтому в организмах, обладающих высокой репарирующей способностью, эффект радиосенсибилизации выражен гораздо сильнее, чем в организмах с пониженной репарирующей способностью.

Таблица 21

Влияние предварительной инкубации проростков бобовых растений с 5БУ на накопление сухой массы в течение 10 дней пострадиационного периода, г/100 растений

Доза, рад	Маш		Горох		Конские бобы	
	— 5БУ	+ 5БУ	— 5БУ	+ 5БУ	— 5БУ	+ 5БУ
0	3,23	3,07	6,21	6,58	13,27	10,96
400	3,05	2,83	5,72	4,58	4,91	4,99
800	2,86	2,66	3,94	2,89	3,08	3,14
1500	2,53	2,10	2,54	1,46	2,24	2,33
3000	2,26	1,36	1,36	0,67	1,78	2,07

В наших экспериментах предварительная инкубация в течение 12 ч проростков маша, гороха и конских бобов с 5БУ ($5 \cdot 10^{-5}$ М) оказала разный сенсибилизирующий эффект на накопление сухой массы проростков за 10 дней постлучевого периода (табл. 21) и ОСР (рис. 35). Наиболее сильный эффект сенсибилизации наблюдался в облученных проростках высокоустойчивого маша, наименее сильный — в высокочувствительных конских бобах. Горох занимал промежуточное положение.

В дальнейшем мы изучили влияние инкорпорирования 5БУ перед облучением в молекулу ДНК на пострадиационную деградацию ДНК у тех же растений. Отрезки корней инкубировали 12 ч с $5 \cdot 10^{-5}$ М 5БУ и ^3H -тимидином (5 мкК/мл, уд. активность 4,3 мК/ММ), затем облучали в дозах 400, 800, 1500 и 3000 рад. После облучения корни инкубировали еще 24 ч, после чего определяли активность ^3H -ДНК. Полученные данные представлены на рис. 36,

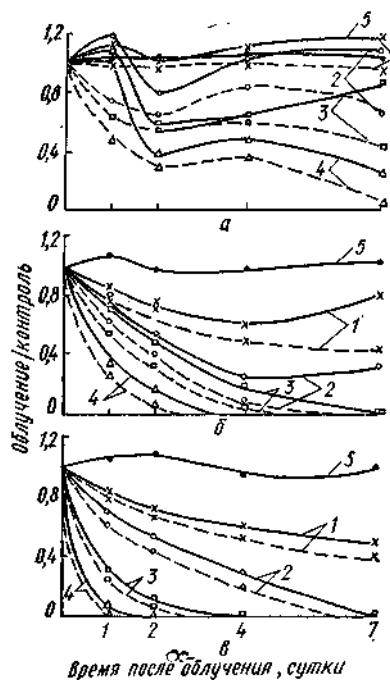


Рис. 35. Влияние обработки проростков перед облучением 5БУ на ОСР корней маша (а), гороха (б) и конских бобов (в):

1 — 400 рад, 2 — 800 рад, 3 — 1500 рад, 4 — 3000 рад, 5 — контроль, обработанный 5БУ.

ках связывается с ферментами этап «выщепления», и таким образом препятствует деградации ДНК. Полученные нами данные, представленные на рис. 36, пока-

из которого видно, что включение 5БУ в молекулу ДНК перед облучением усилило деградацию ДНК в облученных корнях. Сенсибилизирующий эффект 5БУ на постлучевую деградацию ДНК был различным: наиболее сильное действие 5БУ оказал на растения маша, наименее сильное — на конские бобы.

Приведенные данные дают возможность заключить, что обработка растений перед облучением 5БУ повышает радиочувствительность растений к действию ионизирующей радиации, а также усиливает постлучевую деградацию ДНК. Радиосенсибилизирующий эффект 5БУ как на восстановительные процессы, так и на деградацию ДНК наиболее сильно проявляется у высокорадиоустойчивых растений.

Чтобы показать, в какой степени постлучевая деградация ДНК является ферментативным процессом, мы инкубировали облученные корни, содержащие в молекуле 5БУ, с кофеином (2,5 мг/мл) в течение 24 ч. По данным (цит. по [31]), кофеин в бактериальных клетках связывается с ферментами, ответственными за репарацию ДНК, таким образом препятствуя деградации ДНК. Полученные нами данные, представленные на рис. 36, пока-

Таблица 22

Влияние предварительной обработки 5БУ корней бобовых растений на включение ^{3}H -тимидина в ДНК спустя 24 ч после облучения, $\text{дпн}/\text{мин}\cdot\text{A}_{260}$

Концентрация 5БУ, М	Зона деления		Зона растяжения	
	необлученные	облученные	необлученные	облученные

Маш (доза облучения 1500 рад)

0	7684 \pm 319	5484 \pm 51	2411 \pm 253	4148 \pm 37,7
$5 \cdot 10^{-5}$	7423 \pm 812	2951 \pm 480	292,0 \pm 56,4	210 \pm 46,2

Горох (доза облучения 800 рад)

0	23449 \pm 846	14740 \pm 976	2630,3 \pm 53,8	3860,7 \pm 69,7
$5 \cdot 10^{-5}$	23523 \pm 785	7210 \pm 726	2614,7 \pm 12,9	2072,7 \pm 45,9

зывают, что постлучевая инкубация с кофеином в не обработанных 5БУ корнях полностью подавила деградацию ДНК у маша и гороха, но не оказала влияния на деградацию в конских бобах. Это лишний раз подтверждает наше предположение, что в корнях конских бобов деградация ДНК вряд ли обусловлена репарационными процессами. Одновременное действие кофеина и 5БУ в корнях маша и гороха уменьшило деградацию ДНК по сравнению с деградацией, оказываемой действием только 5БУ. В корнях конских бобов такого эффекта обнаружено не было.

Предварительная обработка 5БУ корней маша и гороха отрицательно сказала также и на постлучевом включении ^{3}H -тимидина в ДНК отрезков корней зоны деления и зоны растяжения спустя 24 ч после облучения (табл. 22). В необлученных корнях обработка 5БУ не оказала влияния на включение меченого тимидина в ДНК как в зоне деления, так и в зоне растяжения и начала дифференциации. В облученных корнях наблюдалось резкое снижение включения ^{3}H -тимидина в ДНК в зоне деления и повышение — в зоне растяжения. Предварительная обработка 5БУ приводила к еще большему снижению включения радиоактивности в ДНК в зоне деления и полностью ингибиравала добавочное включение в зоне растяжения.

На основании изложенного выше можно предположить, что кофеин и 5БУ в облученных растениях усиливают отрицательное действие радиации. Это усиление прежде всего сказывается на подавлении ростовых процессов и накоплении сухой массы. В обоих случаях происходит подавление включения меченого предшественника в ДНК. Предварительная обработка 5БУ вызывает сенсибилиза-

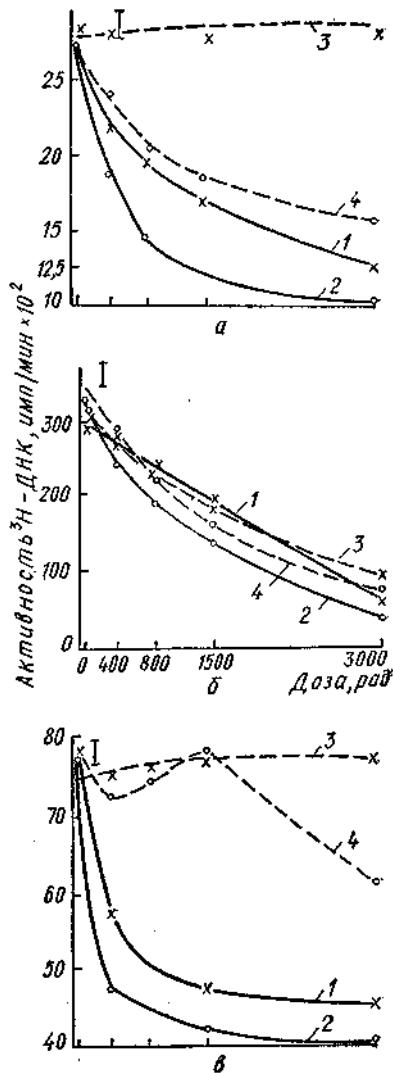


Рис. 36. Влияние предварительной обработки проростков 5БУ на постлучевую деградацию ^{3}H -ДНК в корнях маша (а), конских бобов (б) и гороха (в):

1 — необработанные корни, 2 — + 5БУ, 3 — + кофеин, 4 — 5БУ + кофеин.

цию постлучевой деградации ДНК, кофеин препятствует ее осуществлению. Все эти процессы наиболее ярко выражены в радиоустойчивых растениях. С этим связан эффект повышения радиочувствительности в устойчивых к действию радиации растениях. С нашей точки зрения, ингибирование процессов, затрагивающих молекулу ДНК, в какой-то мере определяет повышение радиочувствительности.

* * *

В настоящее время считаются расшифрованными такие механизмы репарации ДНК, как фотопрививка, репарация, идущая по типу «выщелачивание — замещение», пострепликативная репарация, куда входит и рекомбинационная репарация. Первый тип репарации — фотопрививка, узкоспецифичен и характерен только для повреждений, вызванных УФ-облучением. Репарация, идущая по типу «выщелачивание — замещение», и пострепликативная репарация относятся к темновой репарации ДНК, и последняя, по всей вероятности, неспецифична, так как происходит исправление повреждений, возникающих в ДНК не только при действии УФ-лучей, но и при действии ионизирующей радиации и некоторых химических веществ.

Действие на ДНК гамма-облучения отличается от действия УФ-лучей. Последние вызывают образование димеров пиримидиновых оснований в ДНК, главным образом димеров тимина. В результате прямого действия на ДНК гамма-лучей в ней происходят одиночные и двойные разрывы. Кроме того, образуются модифицированные основания и разного рода сшивки. Образовавшиеся при гамма-облучении одиночные разрывы с 5'-РО₄- и 3'-ОН-концами могут сшиваться непосредственно ДНК-лигазами, минуя предыдущие этапы темновой репарации ДНК [20]. При облучении клеток умеренными дозами (0,5—1,0 крад) лигазами устраняется около 80% таких разрывов. При облучении в больших дозах (20—40 крад) происходит накопление разрывов, не репарируемых этими ферментами. Установлено также, что лигазы конкурируют за эти концы с экзонуклеазой, действие которой приводит к образованию бреши, и для репарации уже требуется участие ДНК-полимеразы. Наличие поврежденных оснований или дефектов в молекуле ДНК ведет к репарации ДНК, осуществляющейся по типу «выщелачивание — замещение» или по типу пострепликативной репарации.

Для бактерий, облученных гамма-радиацией, установлено три типа репарационных процессов, отличающихся скоростью протекания. I тип — «сверхбыстрая репарация», завершающаяся в течение 1 мин. Предполагается, что за нее ответственны ДНК-лигазы, которые устраняют одиночные разрывы, возникающие, как мы указывали выше, в результате прямого действия ионизирующей радиации. II тип — репарация, протекающая с участием ДНК-полимераз и заканчивающаяся в течение 2—5 мин. III тип —

репарация, протекающая в течение 40—50 мин. К этому типу относят пострепликативную репарацию [57].

В многоклеточных организмах также имеется несколько типов репарации [61]. В работе [54] было показано, что репарация одиночных разрывов в ДНК, вызванных действием ионизирующих излучений и химических мутагенов, происходит аналогично и состоит из двух этапов: быстрого воссоединения, совершающегося в относительно короткое время, и медленного процесса восстановления одиночных разрывов, которое завершается к 24 ч пострадиационного периода. Характер этих процессов еще окончательно не выяснен, однако, по мнению авторов, можно высказать следующие предположения: 1) быстрый процесс воссоединения одиночных разрывов является не ферментативным, второй происходит с участием ферментов репарации; 2) более быстрый процесс происходит за счет воссоединения одиночных разрывов, второй характеризует воссоединение двойных разрывов; 3) эти процессы катализируются различными ферментативными системами. Авторы работы склонны считать более правильным третье предположение. Кроме того, по их данным, полученным с использованием некоторых ингибиторов метаболических процессов (оксимочевины, актиномицина Д, пуромицина), эти репарационные ферменты инициируются в клетке после облучения. При воздействии на клетку пуромицином происходит сильное подавление воссоединения одиночных разрывов в ДНК.

Было также обнаружено наличие двух процессов (быстрого и медленного) при включении ^3H -тимидина в ДНК при внеплановом синтезе ДНК (цит. по [54]). Один из них — быстрый, происходит в течение 1 ч после облучения, второй — более длительный — требует для своего завершения около 7 ч. Субстратом в обоих случаях являются радиационно-индуцированные повреждения ДНК.

Элкинд и сотр. [48, 61] в клетках млекопитающих установили две формы репарации ДНК. Первая форма возникает при облучении клеток малыми дозами рентгеновского облучения; при этом происходит нарушение сложного ДНК-липидно-белкового комплекса. В ходе пострадиационной инкубации они восстанавливаются. При облучении большими дозами в ДНК возникают одиночные и двойные разрывы, которые также репарируются, но сложный ДНК-липидно-белковый комплекс при этом не восстанавливается.

По мнению Летта [60], ДНК млекопитающих состоит из «субъединиц специфического размера», которые связываются молекулами в мультикомпоненты. При воздействии рентгеновскими лучами в низких дозах такие связи разрушаются и образуются разрывы. И те, и другие восстанавливаются.

В настоящее время большое внимание уделяется роли репарации ДНК в восстановлении хромосом. В работах В. М. Михельсон [22], а также В. М. Михельсон и Г. Ф. Крупновой [23] представлены данные, свидетельствующие о том, что в клетках эукариотов,

облученных УФ-лучами или обработанными химическими мутагенами, репарация хромосом тесно связана с репарацией ДНК. Однако при действии ионизирующей радиации такой связи не наблюдалось, что дало возможность авторам говорить об «ограниченной роли репарации ДНК в восстановлении хромосом, пораженных ионизирующей радиацией». По мнению В. М. Михельсон [22], причиной этого является факт, что ионизирующие излучения повреждают в хромосомах высших организмов не только ДНК внутри репликона, но и гипотетические участки другого строения, связывающие репликоны. Если репарация ДНК, протекающая внутри репликона, происходит довольно быстро и легко, то пострадиационное восстановление участков, связывающих репликоны, значительно менее эффективно или даже невозможно.

Нельзя отрицать факт, что о путях и механизмах восстановления ДНК еще многое неизвестно. Недавно Д. М. Гродзинским и А. П. Дмитриевым [47] было высказано предположение, что в процессах постлучевого восстановления синезеленых водорослей может играть роль синтез ДНК, осуществляемый РНК-направленной ДНК-полимеразой. Свое предположение они обосновали использованием ингибитора этого фермента (производного рифампицина), который значительно сильнее, чем актиномицин Д, сенсибилизировал лучевое поражение клеток. Мы использовали этот ингибитор при изучении включения 2^{14}C -тимидина в ДНК спустя 24 ч после облучения и получили результаты, приведенные в табл. 23.

Как видно из полученных данных, в зоне деления ингибитор не оказал влияния на постлучевое включение 2^{14}C -тимидина в ДНК, тогда как в зоне растяжения и начала дифференциации мы наблюдали тенденцию к торможению дополнительного включения меченого предшественника в ДНК.

Таблица 23

Доза, рад	Активность ДНК, имп/мин · А ₂₆₀			
	Зона деления		Зона растяжения	
	— ингибитор	+ ингибитор	— ингибитор	+ ингибитор
0	665 ± 32	639 ± 20	106 ± 6	113 ± 4
400	546 ± 26	650 ± 59	134 ± 20	111 ± 4
1500	322 ± 16	530 ± 30	170 ± 22	130 ± 7

На основании изложенного выше можно сказать, что процессы репарации многоклеточных организмов значительно сложнее, чем у прокариотов. Больше того, в них не прослеживается корреляция между радиоустойчивостью и способностью к восстановлению [61]. Однако в результате экспериментов мы обнаружили, что у высокоустойчивых растений способность к восстановлению, оцениваемая нами по ОСР и накоплению сухой массы, значительно выше, чем у растений с более низкой радиоустойчивостью. В этом же высокоустойчивом растении — маше более интенсивно протекают

процессы, по которым мы судим о репарации ДНК: постлучевая деградация и гамма-индуцированное дополнительное включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК. По-видимому, эти процессы играют определенную роль в формировании радиоустойчивости растений. Наши данные подтверждаются тем, что ББУ, известный радиосенсибилизатор, в значительной мере подавлял восстановительные процессы у маша, при этом наблюдалась и более сильная деградация ^{3}H -ДНК и ингибирование включения предшественника в ДНК, по сравнению с горохом, и особенно с конскими бобами, в которых эффект радиосенсибилизации был выражен слабее.

В экспериментах по включению $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК корней гороха, проводимых в условиях, не оптимальных для репликативного синтеза ДНК, наиболее высокую удельную активность ДНК мы наблюдали спустя 24 ч после облучения как в зоне деления, так и в зоне растяжения. Однако природа дополнительного гамма-индуцированного включения меченого тимидина в ДНК этих зон различна. В зоне деления при значительном ингибировании полуконсервативного синтеза ДНК добавочное включение ингибируется кофеином — ингибитором темновой репарации ДНК, но не ингибируется оксимочевиной и митомицином С. Кроме того, оно не зависит от синтеза РНК и белка, а также тормозится при введении в питательную смесь 2,4-ДНФ. Это может свидетельствовать о том, что в зоне деления добавочный синтез ДНК происходит за счет репарационных процессов.

В зоне растяжения и начала дифференциации, в клетках которых репликативный синтез ДНК не происходит, и без дополнительных условий мы наблюдали гамма-индуцированное добавочное включение меченого предшественника в ДНК. Если корни инкубировать в среде без сахарозы или с ингибиторами репликации ДНК, то лишь незначительная часть добавочного синтеза обусловлена теми же процессами, которые мы наблюдали для зоны деления. Другая часть, которая ингибируется оксимочевиной и митомицином С, не ингибируется кофеином, зависит от синтезов РНК и белка, а также использует энергию, вырабатываемую гликолизом и пентозофосфатным циклом дыхания. Больше того, наши опыты показали, что наиболее активной фракцией ДНК в этой зоне корней, облученных в дозе 2 крад, является фракция, в которую, в основном, входит ДНК ядрышкового аппарата. Все это заставляет предположить, что в зоне растяжения у гамма-облученных корней происходит усиленный синтез ДНК, идущий репликативным путем. Возможно, увеличение количества ДНК является защитной функцией, ведущей к восстановлению от лучевого поражения.

Таким образом, на основании рассмотренного материала мы полагаем, что в растениях, так же как и в других живых организмах, происходят процессы, связанные с постлучевой репарацией ДНК. Наиболее интенсивны эти процессы у высокоустойчивых растений, что, по-видимому, в какой-то мере и обуславливает их способность к восстановлению и радиоустойчивость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аргутинская С. В., Салганик Р. И. Исследования дезоксирибонуклеазной активности в клеточных ядрах и цитоплазме после облучения. — Радиобиология, 1965, 5, 6, 815—821.
2. Арион В. Я., Георгиев Г. П. О функциональной гетерогенности хромосомной информационной рибонуклеиновой кислоты. — ДАН СССР, 1967, 172, 3, 716—719.
3. Белозерова Л. С. Влияние некоторых ингибиторов на дыхание и содержание пиронинградной кислоты в листьях *Bryophyllum daigremontianum* в темноте. — Вестн. ЛГУ, 1974, 9, 103—107.
4. Валеева С. А. Проблема радиочувствительности растений. — В кн.: Современные проблемы радиационной генетики. М., Атомиздат, 1969, 280—301.
5. Вальдштейн Э. А. Механизмы репарации ДНК. — В кн.: Пострадиационная репарация. М., Атомиздат, 1970, 25—71.
6. Ганасси Е. А., Зайчкова С. И., Аптикаев Г. Ф. Изучение модифицирующего действия кофеина и хлорамфеникола на лучевое поражение хромосом *Vicia faba*. — Радиобиология, 1973, 13, 4, 606—610.
7. Голикова О. П., Гродзинский Д. М. Нарушение ДНК-матрицы и лучевое поражение растений. — ДАН СССР, 1971, 198, 5, 1207—1210.
8. Голикова О. П., Гродзинский Д. М. Особенности обмена ДНК корней облученных проростков гороха в процессе пострадиационного восстановления. — Радиобиология, 1971, 11, 5, 664—668.
9. Гродзинский Д. М., Гудков И. Н. Защита растений от лучевого поражения. М., Атомиздат, 1973.
10. Гродзинский Д. М. Репарация лучевых повреждений ДНК в растительных клетках. — Информ. бюл. Науч. совета по проблеме «Радиобиология» АН СССР, 1974, 16, 10—14.
11. Гудков И. Н. Годовые отчеты Отдела биофизики и радиобиологии Института физиологии растений АН УССР за 1970 г. 1971.
12. Дубинин Н. П., Магусевич Л. Л., Горошкина Г. И., Засухина Г. Д. Изучение закономерностей работы системы вырезания одноднитевых поражений ДНК в клетках высших организмов. — ДАН СССР, 1972, 203, 3, 693—695.
13. Зайчкова С. И. Изучение модифицирующего действия кофеина на лучевое поражение *Vicia faba* на разных стадиях клеточного цикла. — В кн.: Влияние ионизирующей радиации на регуляторные процессы клетки и организма. Тез. докл. II Всесоюзной конференции молодых ученых по радиобиологии; 5—7 октября 1971 г. Пущино-на-Оке, 1971, 42—43.
14. Иванов В. Б. Действие хлорамфеникола на рост корней проростков, облученных высокими дозами рентгеновских лучей. — ДАН СССР, 1967, 173, 1, 217—220.
15. Ингеветомова Н. И. Влияние ингибиторов на дыхание листьев топинамбура (*Helianthus tuberosus*). — Вестн. ЛГУ, 1973, 9, 95—102.
16. Карабаев Э. М., Цзю В. Л. О влиянии молибдата натрия, *n*-хлормеркурий бензоата и цистеина на пострадиационное восстановление дрожжевых клеток. — В кн.: Биол. науки, в. 4. Алма-Ата, 1972, 124—128.
17. Керова Н. И., Пухова Г. Г., Чеботарев Е. Е. Естественные ингибиторы нуклеаз. Киев, «Наукова думка», 1974.
18. Комар В. Е., Хансон К. П. Информационные макромолекулы при лучевом поражении клеток. М., Атомиздат, 1972.
19. Конарев В. Г., Тютерев С. Л., Алексеев В. Г. Структура и функциональная активность ДНК в проростках пшеницы. — Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, т. 47, в. 1. Л., 1972, 203—216.
20. Кузин А. М. Молекулярная радиобиология клеточного ядра. М., Атомиздат, 1973.
21. Лучник Н. В., Царалкин Л. С. Об обратимости цитогенетических лучевых повреждений. — ДАН СССР, 1959, 124, 1, 213—216.
22. Михельсон В. М. Ограниченная роль репарации ДНК в восстанов-

- лении хромосом, пораженных ионизирующей радиацией. — Цитология, 1971, 13, 8, 932—945.
23. Михельсон В. М., Крупнова Г. Ф. О роли восстановления ДНК в радиочувствительности хромосом. — В кн.: Информ. бюл. Науч. совета по проблеме «Радиобиология» АН СССР, вып. 15. 1973, 87—89.
24. Парыбок В. П., Касинова Г. В., Бандас Е. Л. Влияние ингибиторов репарации на частоту обратимых мутаций у полиакнотрофного штамма *E. coli* при УФ-облучении. — Цитология. 1967, 9, 12, 1496—1502.
25. Паскевич И. Ф., Лиходед В. С. Радиационные нарушения биосинтеза рибонуклеиновых кислот. — Усп. совр. биол., 1973, 75, 3, 340—356.
26. Пострадиационная репарация. М., Атомиздат, 1970.
27. Преображенская Е. И. Радиостойчивость растений и филогенез. — ДАН СССР, 1967, 177, 1, 243—245.
28. Радиотоксины М., Атомиздат, 1966.
29. Скавронская А. Г., Покровский В. Н., Лиходед Л. Я., Гольдинс Л. Р. Изменение мутатного эффекта УФ-лучей при включении 5-бромурицила в бактериальную ДНК. — Генетика, 1968, 4, 4, 99—104.
30. Слейтер Е. С. Механизмы разобщения окислительного фосфорилирования нитрофенолами. — В кн.: Труды V МБК Симпозиум V. М., Изд-во АН СССР, 1962, 343—367.
31. Сойфер В. Н. Молекулярные механизмы мутагенеза. М., «Наука», 1969.
32. Сойфер В. Н., Циенинис К. К. Темновая репарация в высших растениях. — ДАН СССР, 1974, 215, 5, 1261—1264.
33. Токарская В. И. Анализ комплекса ДНК-РНК из зародышей семян в градиенте хлористого цезия в норме и после облучения. — ДАН СССР, 1970, 191, 2, 464—467.
34. Фоменко Л. А., Газиев А. И., Манцыгин Ю. А. Роль АТФ в репарации ДНК в облученных клетках китайского хомячка. — В кн.: Биология и научно-технический прогресс. Пущино-на-Оке, 1974, 337—339.
35. Шалумашвили М. А. Влияние кофеина на выход aberrаций хромосом в перевиваемой культуре клеток китайского хомячка после облучения У-лучами в G₂-фазе. — Генетика, 1972, 8, 8, 73—78.
36. Alexander P. DNA repair and radiosensitivity. — In: Radiat. Damage and sulphydryl compounds. Vienna, 1969, 63—81.
37. Aoki D., Boys R. P., Howard-Flanders P. Sensitization of *E. coli* to radiation by bromouracil: excessive post-irradiation breakdown of DNA without concomitant synthesis. — Nature, 1966, 209, 5024, 686—688.
38. Avanzi S., Maggini F., Innocenti A. M. Amplification of ribosomal cistrons during the maturation of metaxylen in the root of *Allium cepa*. — Protoplasma, 1973, 76, 2, 197—210.
39. Boys R. P., Howard-Flanders P. Release of Ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 51, 2, 293—300.
40. Brunk C. F., Hanawalt P. C. The nature of the excision-repair region in the DNA from a eucaryotic organism *Tetrahymena pyriformis*. — Radiat. Res., 1969, 38, 2, 285—295.
41. Brunk C. T. The time sequence of events during excision repair in *Tetrahymena pyriformis*. — Photochem. and photobiol., 1972, 15, 4, 349—360.
42. Cabela E., Wawra E., Altmann H. Untersuchungen über die Reparatur von DNS-Strangbrüchen in Chlorellazellen nach Gamma-Bestrahlung. — Biophys. J., 1971, 7, 3, 200—205.
43. Cleaver J. E. The relationship between the rate of DNA synthesis and its inhibition by ultraviolet light in mammalian cells. — Radiat. Res., 1967, 30, 4, 795—810.
44. Cleaver J. E. Repair replication of mammalian cell DNA: effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair. — Radiat. Res., 1969, 37, 2, 334—348.
45. Clowes F. A. L. Meristems and the effect of radiation on cells. — Endeavour, 1965, 24, 91, 8—12.

46. Dalrymple G. V., Baker M. L., Sanders J. L., Moss A. J., Jr., Nash J. C., Wilkinson K. P. Do mammalian cells repair radiation injury by the "cut-and-patch" mechanisms. II. An extension of the original model.—J. Theor. Biol., 1970, 28, 1, 124—142.
47. Dmitriev A. P., Grodzinsky D. M. Post-irradiation sensitization to gamma-rays in the blue-green alga, *Anacystis nidulans* by a rifamycin derivative (DMB) which is active on RNA-directed DNA-polymerase.—Z. Pflanzenphysiol., 1974, 73, 1, 89.
48. Elkind M. M., Kamper C. Two forms of repair of DNA in mammalian cells following irradiation.—Biophys. J., 1970, 10, 3, 237—245.
49. El-Metainy A., Takagi M., Tano S., Yamaguchi H. Radiation-induced single-strand breaks in the DNA of dormant barley seeds.—Mut. Res., 1971, 13, 4, 337—344.
50. El-Metainy A., Tano S., Yano K., Yamaguchi H. Chemical nature of radiation-induced single-strand breaks in the DNA of dormant barley seeds in vivo.—Radiat. Res., 1973, 55, 2, 324—333.
51. Gautschi J. R., Young B. R., Cleaver J. E. Repair of damaged DNA in the absence of protein synthesis in mammalian cells.—Exp. Cell Res., 1973, 76, 1, 87—94.
52. Gillespie D., Spiegelman S. A quantitative assay from DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membranes.—J. Mol. Biol., 1965, 12, 829—842.
53. Green M. H. L., Gray W. J. H., Sedgwick S. G., Bridges B. A. Repair of DNA damage produced by gamma-radiation in *E. coli* K-12 and radiation sensitive *exrA* derivative during inhibition of protein synthesis and normal DNA replication by chloramphenicol.—J. Gen. Microbiol., 1973, 77, 1, 99—108.
54. Horikawa M., Fukuhara M., Suzuki F., Nikaido E., Sugahara T. Comparative studies on induction and rejoining of DNA single-strand breaks by radiation and chemical carcinogen in mammalian cells in vitro.—Exp. Cell Res., 1972, 70, 2, 349—359.
55. Jleckett P. I., Hanawalt P. Selectivity for thymine over 5-bromouracil by a thymine-requiring bacterium.—Biochem. Biophys. Acta, 1966, 123, 356.
56. Kanner L. S., Hanawalt P. C. Efficiency of utilization of thymine and 5-bromouracile for normal and repair DNA synthesis in bacteria.—Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, 532—545.
57. Kaplan H. S. Radiation-induced strand scission in bacterial DNA and their enzymatic repair.—Isr. J. Chem., 1972, 10, 6, 1229—1239.
58. Kihlman B. A., Sturelid S., Hartley-Asp B., Nilsson K. Caffeine potentiation of the chromosome damage produced in bean root tips and in Chinese hamster cells by various chemical and physical agents.—Mut. Res., 1973, 17, 2, 271—275.
59. Lehmann A. R. Effect of caffeine on DNA synthesis in mammalian cells.—Biophys. J. 1972, 12, 10, 1316—1325.
60. Lett J. T., Klucis E. S., Sun C. On the size of the DNA in the mammalian chromosome structural subunits.—Biophys. J., 1970, 10, 3, 277—292.
61. Lohman P. H., Bootsma D. Repair mechanism in mammalian cells.—Mut. Res., 1974, 23, 1, 147—156.
62. Mares V., Lordin L. Existuje metabolická DNA.—Čs. fysiol., 1971, 20, 2, 81—122.
63. McGrath R. A., Williams R. W. Reconstruction in vivo of irradiated *E. coli* deoxyribonucleic acid the rejoining of broken pieces.—Nature, 1966, 212, 5061, 534—535.
64. Morin G. A., Zavdala F., Costerouss O. Is Metabolic heterogeneity of mouse liver DNA? — Exp. Cell Res., 1957, 13, 203.
65. Mut. Res., 1974, 26, 2. (Спец. выпуск по кофеину).
66. Ooka T., Girgis A., Daillie J. Synthese d'ADN a basse temperature dans les cellules HeLa.—Exp. Cell Res., 1973, 81, 1, 207—213.

67. Rainter R. B., Wolff S. Apparent absence of repair replication in *Vicia faba* after X-irradiation.—*Mut. Res.*, 1973, **19**, 1, 133—137.
68. Petc S. R. Turnover of DNA and function.—*Nature* 1968, **219**, 5150, 162.
69. Roberts J. J., Sturrock J. E., Ward K. N. The enhancement by caffeine of alkylation-induced cell death, mutations and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells as a result of inhibition of postreplication DNA repair.—*Mut. Res.*, 1974, **26**, 2, 129—143.
70. Wolff S., Cleaver J. E. Absence of DNA repair replication after chemical mutagen damage in *Vicia faba*.—*Mut. Res.*, 1973, **20**, 1, 71—76.
71. Setlow R. B., Carrier W. L. The disappearance of thymine dimers from DNA; an error-correcting mechanism.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1964, **51**, 1, 226—231.
72. Setlow R. B., Swenson P. A., Carrier W. L. Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells.—*Science*, 1963, **142**, 3598, 1464—1466.
73. Simpson J., Nagle W. A., Belli J. A. The basis for anomalous sedimentation of mammalian cell DNA direct and indirect evidence.—*Radiat. Res.*, 1973, **55**, 3, 517.
74. Sparrow A. H., Woodwell. Prediction of the sensitivity of plants to chronic gamma-irradiation.—*Radiat. Bot.*, 1962, **2**, 1, 9—26.
75. Sperrrow A. H., Schairer L. A., Sparrow R. C. Relative ship between nuclear volumes, chromosome numbers and relative radiosensitivity.—*Science*, 1963, **141**, 3576, 163—166.
76. Srivastava B. S., Kumar H. D., Singh H. N. The effect of caffeine and light on killing of the blue-green alga *Anabaena dolomitum* by UV-radiation.—*Arch. für mikrobiologie*, 1971, **78**, 2, 139—144.
77. Strybalski W. Molecular events resulting in radiation injury repair and sensitization of DNA.—*Radiat. Res.*, 1967, sup. 7, 147—159.
78. Trosco J. E., Mansur V. H. Response of tobacco and *Haplopappus* cells to ultraviolet irradiation after post-treatment with photoreactivating light.—*Radiat. Res.*, 1968, **36**, 333—343.
79. Veleminsky J., Zadrazil S., Pokorný V., Gichner T., Svačhalová J. Storage effect in barley changes in the amount of DNA lesions induced by methyl and ethyl methanesulphonates.—*Mut. Res.*, 1973, **19**, 73—81.
80. Zadrazil S., Veleminsky J., Pokorný V., Gichner T. Repair of DNA lesions in barley induced by monofunctional alkylating agents.—*Studia biophys.*, 1973, **36**—37, 271—277.
81. Van't Hot J., Hoppin D. P., Yagi S. Cell arrest in G_1 and G_2 of the mitotic cycle of *Vicia faba* root meristems.—*Amer. J. Bot.*, 1973, **60**, 9, 889—895.
82. Zuk J., Swietlinska L. Effect of caffeine on nucleic acids and protein synthesis in *Vicia faba*.—*Mut. Res.*, 1973, **17**, 2, 207—212.

ГЛАВА IV

ЗАВИСИМОСТЬ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОМА

Выяснение общих закономерностей изменения радиочувствительности живых организмов представляет двоякий интерес: во-первых, оно способствует разработке общей теории механизма биологического действия ионизирующих излучений, во-вторых, помогает поиску новых путей защиты. Бергонье и Трибондо [8] на основании экспериментальных данных еще в 1906 г. пришли к выводу, что клетки тем более чувствительны к облучению, чем больше у них способность к размножению, чем продолжительнее их образование путем кариокинеза и чем менее выражены их морфология и функция. Таким образом, в основе радиочувствительности лежат особенности функционального состояния организма (ткани) в момент облучения. Следовательно, должна существовать прямая зависимость между физиологической активностью организма (ткани) и его чувствительностью к облучению.

Характерной чертой процесса развития является то, что клетка (или клетки), встав однажды на определенный путь направления развития, в дальнейшем все время следует по этому пути до тех пор, пока новый сигнал (или сигналы) не заставит ее перейти на другой путь. Известен и тот факт, что для каждого органа (ткани) можно установить сроки, когда только начинается формирование соответствующей ткани (процесс дифференциации) и облучение в эти сроки ионизирующей радиацией, даже в небольших дозах, может привести к полной остановке ее формирования. В более поздние сроки, когда дифференциация клеток развивающейся ткани уже произошла и орган сформировался, облучение мало отражается на его жизнеспособности, орган становится более радиорезистентным.

Исходя из того, что в настоящее время под дифференциацией клетки или целого организма подразумевается последовательная дерепрессия или репрессия отдельных участков генома, мы предположили, что радиочувствительность в этом случае зависит от функционального состояния генома. Чем больше разрепрессирован геном, тем больше величина эффективного объема генома, тем большая степень поражения клетки или растительного организма в целом.

Так как растительные организмы — открытые системы, физические факторы и химические агенты являются обязательными участниками процессов саморегуляции, развития. Нам казалось вероятным, что, изменяя действующие на растительный организм факторы, можно влиять на регуляторные системы, от которых зависит функциональное состояние генома, а следовательно, и радиочувствительность растительного организма. Недостаточная изученность геномзависимых реакций в растительном организме не позволяла ранее экспериментально подойти к прямому исследованию зависимости поражения растений при различном функциональном состоянии генома. Возможность выбора геномзависимых реакций появилась в последние годы в связи с успехами, достигнутыми в изучении механизмов действия физических факторов (отдельных участков спектра светового излучения, фитогормонов) на уровне регуляции активности генов и всей системы, отвечающей за синтез белков в морфогенезе растительного организма. Поэтому цель нашей работы состояла в: 1) выборе объектов и подборе агентов, определяющих «включение» и «выключение» отдельных участков генома, 2) установлении зависимости радиочувствительности растительного организма от функционального состояния генома. Основные требования, предъявляемые к объекту, — возможно больший процент раскрытия генома при действии физических или химических агентов. В этом случае в эксперименте контрастнее проявляются различия между величиной эффективного объема в контрольных и опытных вариантах, наличие хорошо разработанных критериев лучевого поражения у исследуемого объекта.

Открытия последнего двадцатилетия показали, что управляющее световое воздействие на морфогенетические процессы (прорастание семян, рост и развитие растений, синтез ряда веществ, включая синтез белка и многие др.) осуществляется через фоторецепторные системы фотоморфогенеза. Одна из них — система красного дальнего — красного света, или фитохромная система, активная при действии красного света (КС), влияние которого может быть снято последующим облучением дальним красным светом (ДКС) более высокой интенсивности.

Гипотезу о действии света на морфогенез растений через общий генетический контроль выдвинул Мор [17]. В основе ее лежит известная концепция о том, что все клетки растительного организма имеют одинаковый геном. Однако в клетках различной специализации активны различные части этого генома. В связи с этим все гены данного генома по своей активности должны делиться на три группы: 1 — неактивные гены, 2 — активные гены, 3 — потенциально активные гены. Регуляция активности генов осуществляется у растений, как предполагает Мор, по принципу, предложенному в 1964 г. Жакобом и Моно [3].

Из гипотезы Мора о действии света на морфогенез через общий генетический контроль следует, что в клетках растений фитохром каким-то образом связан с индуктором. Конформационные пре-

вращения молекул фитохрома при облучении красным (660 нм) и дальним красным (730 нм) светом приводят к изменению формы индуктора, который, в свою очередь, может менять положение репрессора ДНК. Измененная форма репрессора не может комбинироваться с опероном, в результате чего снимается блокирование активности генов. Активированные гены через промежуточный переносчик — информационную РНК — вызывают изменение направленного обмена веществ и, следовательно, переход к новому этапу морфогенеза. Гипотезу подтверждают результаты исследований Вейдиера [24] по увеличению содержания РНК и белка в проростках горчицы при активации фитохрома, Холдгейта и Гудвина [14] по увеличению количества РНК, ДНК и белка в органоидах клеток папоротника, а также результаты опытов с применением специфического ингибитора РНК — актиномицина Д (10 и 100 мкг/мл) после освещения проростков горчицы белой КС. Обработка актиномицином Д не оказывала влияния на рост семядолей в темноте, но снимала стимулирующее действие освещения [18], вызываемое активной формой фитохрома, что свидетельствует о дерепрессировании ингибитором потенциально активных генов.

Изменяя физиологическое состояние растительного организма путем активации фитохрома КС или дезактивации ДКС, мы попытались проследить за изменением радиочувствительности некоторых известных фитохромзависимых реакций. Намоченные семена салата-латука (Гранд репидс) до или после облучения гамма-лучами $^{60}\text{Со}$ в дозах от 1 до 150 крад освещали 5 мин КС или 10 мин ДКС при длинах волн соответственно 660 и 730 нм и интенсивности потока $18 \cdot 10^3$ эрг/см² в 1 сек. Учитывали процент проросших семян через 48 ч после обработки, когда наиболее четко проявляется антигенистическое действие стимулирующих прорастание (90—95%) красных и задерживающих прорастание (12—17%) дальних красных лучей. Дозы 100 крад и выше полностью подавляли прорастание семян. Если семена обрабатывали КС за 4 ч перед облучением гамма-радиацией, они не прорастали уже при дозе 75 крад. Освещение семян ДКС перед облучением ослабляло повреждающее действие последнего на 6—8% по сравнению с контролем (темнота). При чередовании освещения КС и ДКС перед облучением у-радиацией повреждающее действие, хотя и в меньшей степени, чем при однократном освещении, зависело от последнего светового воздействия. Таким образом, радиочувствительность семян по тесту прорастания существенно зависит от физиологического состояния в момент облучения.

Аналогичные данные были получены и при изучении радиочувствительности другой фитохромзависимой реакции — разворачивании первого листа четырехдневных этиолированных проростков пшеницы. Кратковременное (10 мин) освещение красным светом вызывало разворачивание листа у 40% проростков через 14 ч (табл. 24), в темноте и при освещении ДКС на это время только у 3% проростков отмечено прохождение данного этапа морфогенеза.

При чередовании КС и ДКС эффект зависит от последнего воздействия. Облучение гамма-лучами в дозе 2000 рад задерживало прохождение фазы развития у 68% проростков. Если же за 2 ч до облучения гамма-лучами проростки освещали красным светом, то на 14-й день только у 18% проростков отмечено разворачивание первого листа.

Таблица 24

Зависимость радиочувствительности процесса разворачивания первого листа у этиолированных проростков пшеницы от функционального состояния фитохромной системы

Вариант опыта	Процент развернутых листьев к общему количеству проростков
Контроль (проращивание в темноте)	3,3 ± 1,3
Облучение гамма-лучами в дозе 2000 рад	32 ± 4,6
КС, 8000 эрг/см ² в 1 сек	40,8 ± 5,1
ДКС, 16 000 эрг/см ² 1 сек	3,1 ± 1,8
КС + 2000 рад, через 2 ч	18,4 ± 1,7

Различия в радиочувствительности указанной выше фитохром-зависимой реакции при активировании или дезактивировании фитохромной системы перед облучением гамма-лучами при дозе 2000 рад выражены еще более четко, чем тест прорастания семян, что связано, по-видимому, с тем фактом, что при освещении этиолированных проростков светом происходит переключение на новый этап развития и разрепрессирование большого участка генома.

Нами обнаружен и исследован светозависимый эффект образования антоцианов у растений при действии гамма-радиации, который может служить хотя и косвенным, но очень четким показателем поражения генома. Суть эффекта заключается в том, что при облучении в интервале доз 10—100 крад отмечается четкая корреляция между дозой и накоплением антоцианов при последующем экспонировании проростков на свету (рис. 37). Содержание антоцианов в эпидермисе и в субэпидермисе 4-дневных проростков горчицы белой определяли по величине экстинкции метанольных экстрактов с 1%-ной HCl через 30 ч после начала освещения. Хроматографическое изучение красных пигментов в различных системах растворителей показало, что пятна пигментов из облученных и контрольных растений имеют одинаковые R_f . Это свидетельствует о том, что при облучении происходит нарушение систем, связанных с контролем количественной стороны синтеза соединений типа $C_6 - C_3 - C_6$, но не наблюдается качественных изменений в их скелетах или же в ориентации гидроксилирования.

Изучение спектра действия света на синтез антоцианов показало (рис. 38), что наиболее вероятными фоторецепторными системами, контролирующими образование красных пигментов, являются низкоэнергетическая фитохромная и высокоэнергетическая си-

стемы. В пользу участия фитохромной системы свидетельствуют и данные о низком пороге насыщения этой реакции и зависимость ее от длины светового и темнового периодов. Нами было установлено, что фотопрерцепторные системы в этом случае играют роль пусковых механизмов реакции синтеза антоцианов, которая в дальнейшем мо-

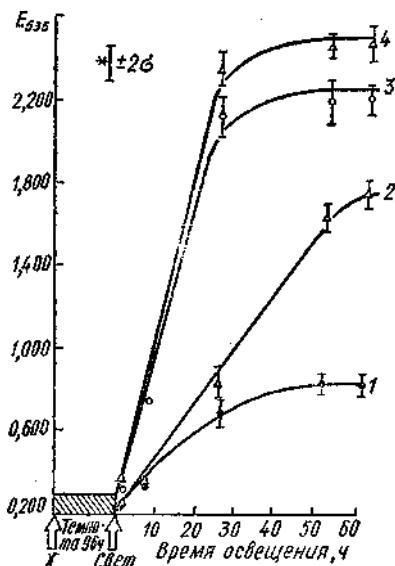


Рис. 37. Эффект образования антоцианов в этиолированных проростках горчицы белой при облучении различными дозами гамма-радиации:

1 — 10 крад, 2 — 25 крад, 3 — 50 крад,
4 — 100 крад.

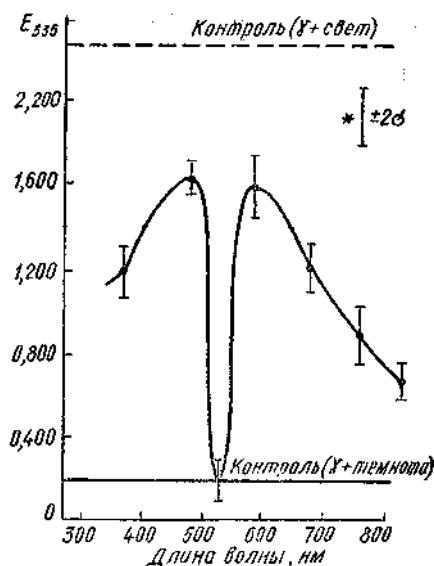


Рис. 38. Спектр действия образования антоцианов у гамма-облученных в дозе 50 крад проростков горчицы белой.

жет происходить в темноте и носит ферментативный характер ($Q_{10} = 1,7$). В отсутствие света эффект нарушения синтеза антоцианов у проростков горчицы белой при облучении не проявляется. Таким образом, морфогенетическое действие света создает как бы потенциальную возможность для реализации эффекта действия радиации.

Интерес к изучению синтеза антоцианов объясняется тем, что образование их в растении при действии света приурочено к определенным этапам морфогенеза растений [2, 11], т. е. красные пигменты в какой-то степени являются индикаторами процессов обмена и физиологического состояния растительного организма.

Исследованиями многих авторов показано, что накопление флавоноидных соединений в растительных тканях в значительной мере определяется состоянием белкового обмена [6, 7, 12], причем изменения интенсивности синтеза белков, как правило, вызывают обратные изменения интенсивности образования флавоноидов.

В наших опытах активация фитохромной системы в проростках горчицы белой приводила к активации белоксинтезирующей системы (табл. 25), по сравнению с вариантами, где фитохромная система находилась в неактивном состоянии (температурный контроль, освещение ДКС). Актиномицин Д и пуромицин, влияющие на разные звенья в цепи биосинтеза белков, а также облучение гамма-радиацией в дозе 50 крад ингибировали активность белоксинтезирующей системы. Параллельно получены данные о накоплении антоцианов при действии КС, ДКС и гамма-облучении. Рассчитанный нами коэффициент корреляции между содержанием белков и антоцианов при действии указанных выше факторов в среднем равен $-0,75$. Это свидетельствует о сопряженном отклонении от средних значений по обоим признакам.

Таблица 25

Содержание общего белка в 4-дневных этиолированных проростках горчицы белой, мг/г сырого вещества

№ опыта	Контроль (темнота)	Освещение КС	Облучение, 50 крад	КС + гамма-облучение	ДКС + гамма-облучение
1	8,9 \pm 0,174	13,9 \pm 0,174	6,2 \pm 0,150	5,0 \pm 0,191	7,2 \pm 0,158
2	9,1 \pm 0,134	14,0 \pm 0,212	7,1 \pm 0,184	4,8 \pm 0,174	7,6 \pm 0,225
3	7,8 \pm 0,201	13,7 \pm 0,193	6,0 \pm 0,128	6,0 \pm 0,207	6,2 \pm 0,138
4	9,0 \pm 0,183	14,1 \pm 0,202	7,3 \pm 0,205	5,1 \pm 0,201	7,3 \pm 0,205

Результаты опытов, приведенные в табл. 25, дают основания предполагать, что при действии КС происходят разрепрессирование генома и активация белоксинтезирующей системы, что приводит к увеличению эффективного объема и снижению радиочувствительности. Из данных табл. 25 видно, что в случае разрепрессированного генома (освещение КС) белоксинтезирующая система повреждается больше, чем при зарепрессированном геноме (освещение ДКС).

Можно предположить, что ингибирование синтеза белков, вызванное радиацией, приводит к увеличению в клетках фондов свободного фенилаланина, который является одним из предшественников флавоноидного скелета антоцианов, создаются благоприятные условия для усиленного формирования красных пигментов, что в конечном итоге и проявляется в повышенном их накоплении. В основе данного феномена, по-видимому, лежит конкуренция за общий предшественник — фенилаланин.

Согласно гипотезе Маргна [6], обратная зависимость между степенью ингибирования белоксинтезирующих систем и накоплением антоцианов имеет глубокий биологический смысл. Один из основных путей диссимиляции фенилаланина в растении происходит через стадию прямого дезаминирования ароматических кислот, которые в свободном состоянии токсичны для растений и в значительных количествах образуются как при действии антибиотиков, так и при облучении. Включение коричных кислот в молекулярные

структуры типа флавоноидов может явиться одним из эффективных способов нейтрализации этих токсических соединений.

Тесная связь биосинтеза антоцианов с реакциями морфогенеза и непосредственная зависимость его, подобно этим реакциям, от системы регуляции, четкая зависимость образования антоциана от дозы воздействия ионизирующей радиации делают биосинтез красных пигментов особенно удобным индикатором исследования зависимости радиочувствительности растительного организма от физиологического состояния.

Использование в качестве показателя радиочувствительности таких сложных суммарных процессов, как прорастание семян, разворачивание первого листа хотя и является доказательством изменения радиочувствительности при различном функциональном состоянии генома, однако не позволяет получить количественных данных о пораженной части генома, так как составные части этих процессов сами по себе могут в широком интервале выражать различную чувствительность к облучению. В дальнейшем мы попытались для доказательства зависимости радиочувствительности растительного организма от функционального состояния генома подобрать модельную систему, в которой все составляющие были бы под экспериментальным контролем.

Современные представления о механизмах регулирования активности генов в хромосомах многоклеточных организмов предполагают наличие в них веществ, способных специфически блокировать отдельные участки ДНК. В последнее время установлено [15, 22], что многие низкомолекулярные соединения могут быть генетическими индукторами. Установлено также, что различные низкомолекулярные соединения индуцируют синтез отличающихся молекул информационных РНК, следовательно, синтез разных ферментов.

Ярким примером индуцированного низкомолекулярным соединением синтеза фермента является синтез α -амилазы в алейроновом слое семян ячменя при обработке гибберелловой кислотой (ГК). С помощью высокоспецифического иммунохимического метода [13] были получены данные, что в покоящихся семенах α -амилаза отсутствует. При прорастании семян происходит резкое увеличение количества фермента. Было высказано предположение, что в клетках алейронового слоя семян ячменя содержится ген, контролирующий синтез α -амилазы в эндосперме семян. До прорастания семян этот ген остается полностью зарепрессированным. Когда семя прорастает, растущий зародыш посыпает в эндосперм сигнал, дерепрессирующий ген α -амилазы. Криссон и Поллок [16] показали, что веществом, движущимся от зародыша к эндосперму в прорастающем ячмене, является гибберелловая кислота. В последние годы показано, что индуцировать синтез α -амилазы можно и через активацию фитохромной системы [10].

Варнер и Чандра [23], изучая синтез α -амилазы в алейроновом слое ячменя под действием гибберелловой кислоты, установили,

что обработка фитогормоном почти немедленно приводила к удвоению скорости синтеза РНК в клетках алейронового слоя. Этот синтез блокировался актиномицином Д, следовательно, он происходил на ДНК-матрице. Синтезируемая в алейроновом слое под влиянием ГК рибонуклеиновая кислота обнаруживала седиментационные свойства, характерные для РНК. Синтез α -амилазы, который активировался иРНК, также блокировался актиномицином Д. Фермент был выделен в чистом виде из обработанного ГК алейрона, к которому одновременно с ГК добавляли меченую аминокислоту, фермент также оказался меченым, следовательно, α -амилаза была синтезирована *de novo*. С помощью изотолного и иммунохимического методов другие исследователи подтвердили тот факт, что молекулы α -амилазы, которые образуются при индукции ГК, оказываются новыми как по специфической структуре, так и по происхождению своих элементов. Таким образом, в этой системе ГК действует как фактор, контролирующий активность генов, ответственных за синтез α -амилазы.

Используя систему, предложенную Варнером и Чандра, и основные положения принципа попадания Ли [5], мы попытались оценить применимость данной системы для исследования зависимости радиочувствительности растительного организма от функционального состояния генома, а также получить данные, характеризующие величину участка генома, ответственного за синтез α -амилазы. Активность α -амилазы определяли спектрофотометрическим методом и выражали в относительных единицах оптической плотности, в процентах к общему контролю (за общий контроль принимали активность индуцированной α -амилазы в целых необлученных семенах ячменя) или в относительных единицах ингибирования облучением синтеза фермента по формуле:

$$A\Phi = \frac{A_D - A_{GK}}{A_K - A_{GK}},$$

где $A\Phi$ — активность фермента, A_D — активность α -амилазы при определенной дозе γ -облучения D , A_{GK} — активность α -амилазы при введении ГК, A_K — активность фермента в контроле.

В первой серии опытов мы убедились, что удаление зародыша семян полностью прекращает синтез α -амилазы, а введение в среду ГК восстанавливает его до контрольного уровня (необлученные семена с зародышем). Полученная кривая зависимости фермента от концентрации ГК свидетельствует о том, что концентрация 400 $\mu\text{г}/\text{л}$ полностью снимает репрессию с генов α -амилазы. Именно эту концентрацию использовали в дальнейших экспериментах. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [4, 14].

Целью следующей серии опытов было снятие динамики разрепрессирования генома при введении ГК. В последние годы опубликованы работы [21], указывающие на возможность прямой дезактивации ГК при облучении ионизирующей радиацией. Проведение ука-

занной выше серии опытов позволяет выбрать такие условия, при которых можно разграничить действие радиации непосредственно на геном и на систему синтеза эффектора. Результаты проведенных экспериментов при различных экспозициях половинок семян с удаленными зародышами в ГК свидетельствуют о том, что уже через 70 мин после введения эффектора синтез α -амилазы достигает максимума (рис. 39), т. е. за указанный период времени происходит полное дерепрессирование участка генома, ответственного за синтез фермента. В пользу этого предположения говорят и данные опытов по изучению синтеза α -амилазы при введении различных концентраций ГК.

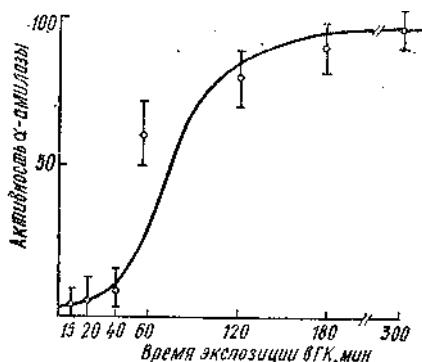


Рис. 39. Динамика дерепрессирования участка генома, ответственного за синтез α -амилазы, при введении ГК (400 мкг/л). Активность α -амилазы выражена в % к общему контролю.

ется усиленный синтез α -амилазы. Таким образом, выдерживая половинки семян в растворе ГК в течение 70–80 мин, можно получить систему с полностью дерепрессированным геномом, и следовательно, при определенных условиях введения ГК расчленить эффекты, связанные с инактивацией эффектора, и, непосредственно, с поражением участка генома, ответственного за синтез α -амилазы, так как при последующем облучении гамма-радиацией прямая инактивация ГК существенно не влияет на геномзависимый синтез фермента.

Экспериментальные данные для построения кривых зависимости поражения репрессированного и дерепрессированного участков генома, ответственных за синтез α -амилазы, от дозы облучения были получены в опытах с облучением указанной выше системы в дозах 5, 30, 40, 80, 100, 120 крад после выдерживания семян в растворе ГК в течение 100 мин. Полученные кривые доза — эффект (рис. 40) при различном функциональном состоянии генома представляют собой не простые экспоненты, но, несомненно, содержат экспоненту с большим значением LD_{90} . При вычитании медленно затухающей экспоненты с высоким значением LD_{90} из суммарной дозовой кривой мы получили составляющую, которая характеризуется экспонентой I' , величина LD_{90} у которой больше, чем у экспоненты I . Если предположить, что компонента I' характеризует радиочув-

сигмоидальная форма кривой зависимости синтеза α -амилазы от времени экспозиции в ГК (или концентрации) свидетельствует о том, что взаимодействие ГК с репрессором характеризуется кооперативностью. Рассчитанный нами для данной системы коэффициент Хилла равен 3. Это можно интерпретировать таким образом, что при связывании трех молекул ГК с репрессором начина-

ствительность генетической кодирующей системы, включая код ДНК, дерепрессирование гена, синтез на нем мРНК и последующий синтез α -амилазы на рибосомах, то компонента I' , по-видимому, характеризует радиочувствительность эффектора.

Полученные данные свидетельствуют о том, что система, ответственная за синтез α -амилазы (если к ее оценке подходить с позицией принципа попадания), может быть рассмотрена как совокупность двух компонент, различающихся по радиочувствительности. При сравнении компонент I' и $2'$ видно, что система синтеза α -амилазы с дерепрессированным участком генома более радиочувствительна, чем система с репрессированным участком. Пользуясь кривыми дозовых зависимостей, мы установили, что значения LD_{50} для компонент I' и $2'$ составляют соответственно 72 и 258 крад.

Учитывая, что дозовые кривые синтеза α -амилазы

могут быть сведены к двум экспонентам и что ингибирование синтеза фермента не зависит от мощности дозы (по нашим данным, не обнаружено различий при 7,7; 56; 570 рад/сек), мы имели основание для применения расчетов Ли эффективных объемов. В этом случае подразумевается участок генома, ответственный за синтез α -амилазы. Для расчетов размеров мишени применяли метод присоединительных объемов Ли и рассчитанные им номограммы. По номограмме зависимости между 90%-ной дозой и диаметром мишени была найдена величина дерепрессированного участка генома, ответственного за синтез α -амилазы, которая составила 250 \AA . Из приведенных данных следует, что при облучении происходит поражение приблизительно 71 пары нуклеотидов.

Мы попытались получить дополнительные данные о конфигурации мишени, сравнивая действие различных по плотности ионизации типов излучений и мягких рентгеновских лучей (плотность ионизации соответственно 0,1 и 0,01 \AA) в дозах облучения 5, 25, 30, 100, 150, 200 крад. Относительная биологическая активность, найденная из соотношения LD_{50} : LD_{50}^0 , составила 1,27. Следовательно, на изучаемую геномзависимую реакцию синтеза α -амилазы плотность ионизирующей радиации в используемом нами диапазоне доз практически не влияет. Полученные данные мы объяс-

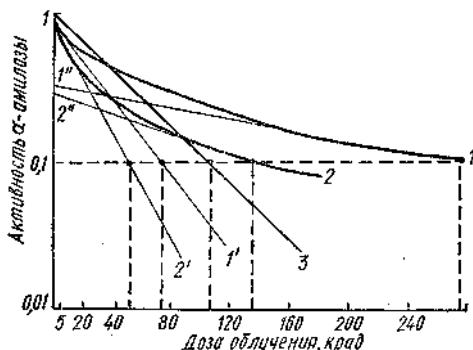


Рис. 40 Дозовые кривые поражения дерепрессированного и зарепрессированного участка генома, ответственного за синтез α -амилазы: 1 — семена с зародышами (эффектор эндогенный); 2 — семена без зародышей, выдержаные в растворе ГК (эффектор экзогенный); 3 — семена без зародышей, без ГК; 1', 1'', 2', 2'' — соответственно составляющие компоненты кривых 1 и 2. Активность α -амилазы выражена в относительных единицах ингибирования облучением синтеза фермента.

няем тем, что возникающие вдоль пути ионизирующие частицы отделены значительными, по сравнению с размерами мишени, расстояниями.

Большой интерес представляют исследования, направленные на изучение возможности восстановления синтеза фермента путем введения эффектора в пострадиационный период. Для выяснения воз-

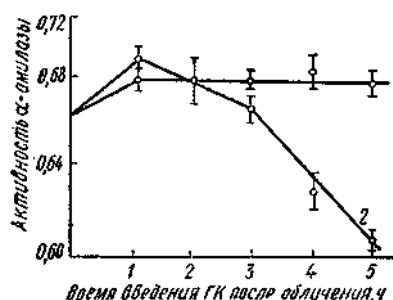


Рис. 41. Зависимость синтеза α -амилазы от времени введения ГК в пострадиационный период:

1 — половинки семян без зародышей, выдержанные в растворе ГК и облученные гамма-лучами в дозе 50 крад; 2 — то же, но повторно выдержанные в ГК после облучения. Активность α -амилазы выражена в относительных единицах оптической плотности стандартного раствора крахмала.

можности восстановления синтеза α -амилазы мы вводили ГК в разное время после облучения в вариантах с зарепрессированным и дедрепрессированным геномом. Из рис. 41 видно, что добавление ГК после облучения системы в дозе 50 крад приводит к восстановлению синтеза α -амилазы. Причем, чем больше поражен участок генома (рис. 41, 1), тем интенсивнее восстанавливается синтез фермента. По-видимому, в этом случае происходит активация дублирующих участков генома, ответственных за синтез α -амилазы. Аналогичные данные получены и другими исследователями в опытах с восстановлением синтеза α -амилазы, подавленного рентгеновским [1,20] и гамма-облучением [1].

Характер кривых, представленных на рис. 41, свидетельствует о том, что ГК эффективна только при введении в систему через 3-4 часа после момента облучения. Возможно, за этот период происходят репарационные процессы в системе синтеза фермента. Кроме того, не исключено, что ГК является эффектором не только в системе синтеза α -амилазы, но и в системе репарационных ферментов. В первые часы после облучения и введения ГК наблюдается небольшой пик, который характеризует увеличение поражения синтеза фермента, что, по-видимому, можно объяснить реализацией скрытых потенциальных повреждений в клетке.

Подводя итоги, следует подчеркнуть, что в связи с достигнутыми успехами в области изучения участия системы регуляции в механизме морфогенеза возможно использование геномзависимых реакций для доказательства зависимости радиочувствительности растительного организма при различном функциональном состоянии генома. В пользу этого представления в настоящее время можно привести не только сведения о разнообразии, специфичности и генотипической обусловленности реакций растительного организма на действие радиации и об изменении радиочувствительности при различном функциональном состоянии генома, но и первые данные о количественном повреждении генома высших растений. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности поиска нового

метода, снижающего радиационное поражение растительного организма в пред- и пострадиационный период путем регуляции активности генома физическими и химическими факторами.

ЛИТЕРАТУРА

- Гребинский С. О., Заярюк Е. Н., Гаргола М. С. Последействие гамма-облучения семян ячменя и гороха на способность гиббереллина индуцировать биосинтез альфа-амилазы. — Физиол. и биохим. культурных растений, 1973, 5, 3, 260—263.
- Ермолаева Е. А., Щеглова О. А. Антоциан и развитие растений. — ДАН СССР, 1948, 60, 5, 901—903.
- Жакоб Ф., Моно Ж. — В кн.: Регуляторные механизмы клетки. М., «Мир», 1964, 278—307.
- Кузин А. М., З. Таги-заде. О механизме радиационного угнетения синтеза альфа-амилазы в семенах ячменя. — Радиобиология, 1971, 11, 1, 124—128.
- Ли Д. Е. Действие радиации на живые клетки. М., Госатомиздат, 1968.
- Маргна У. О биологическом значении образования флавоноидов в растениях. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1971, 20, 3, 242—248.
- Оттер М., Маргна У. — Изв. АН ЭССР, Биол., 1967, 16 (4), 340—351.
- Bergonia I., Tribondeau L. Aktion des rotons X sur le testicule. — Arch. l'électric. med., 1906, 14, 779—823.
- Chalutz E. Ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in carrot roots. — Plant. Physiol., 1973, 51, 6, 1033—1036.
- Drumm H., Elehinger I., Möller. Induction of amylase in mustard seedlings by Phytochrome. — Planta, 1971, 99, 3, 265.
- Eberhard F. Ober die Beziehung zwischen Atmung und Anthocyan synthese. — Planta, 1954, 43, 4, 253—287.
- Faust M. — Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci., 1965, 87, 10—20.
- Grabar P., Daussant J. — Cereal Chemistry, 1964, 41, 523.
- Holdgate D. P., Goodwin T. W. The effect of red and far-red light on nucleic acid metabolism in rye seedlings shoots. — Photochem., Photobiol., 1965, 4, 1, 1—6.
- Karow H., Mohr H. — Naturwissenschaften, 1969, 56, 2, 94—97.
- Krissop B. H., Pollock J. K. Studies in barley and malt. XII. Interaction between the embryo and endosperm of barley during malting. — J. Inst. Brew., 1958, 64, 227—235.
- Mohr H. Differential gene activation as a mode of action of phytochrome 730. — Photochem., Photobiol., 1966, 5, 469—483.
- Mohr H., Schlickewei I., Lange H. Die Hemmung des Phytochrome-induzierten Kotyledonenwachstums durch Actinomycin D. — Z. Naturforsch., 1965, 206, 819—821.
- Paleg L. G. Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. — Plant. Physiol., 1960, 35, 293—293.
- Paleg L. G., Sparrow D. H. B., Jennings S. Physiological effects of gibberellic acid. IV. On barley grain with normal X-irradiated excised embryos. — Plant. Physiol., 1962, 37, 5, 579—583.
- Sideris E. G., Kleinhofs A., Nilan R. A. Destruction of a biological activity of gibberellic acid by low doses of ionizing radiation. — Radiat. Bot., 1969, 9, 4, 349—351.
- Verner S. E. et al. Gibberellic acid-controlled synthesis of α -amilase in barley endosperm. — J. Cell Compar. Physiol., 1965, 66, 55—68.
- Verner S. E., Chandra G. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 52, 1, 100—106.
- Weidnor M. Regulation of RNA synthesis by phytochrome in the mustard seedling (*Sinapis alba* L.) — In: Europ. Photobiol. Symp., to be held HVAR, Yugoslavia, Island of HVAR, 1967, 117.

РОЛЬ АСИНХРОННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ДЕЛЕНИЙ И ГЕТЕРОГЕННОСТИ МЕРИСТЕМЫ В РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Радиоустойчивость высших цветковых растений определяется устойчивостью к радиации активно делящихся клеток образовательных тканей — меристем. Одним из основных компонентов системы радиоустойчивости является способность к пострадиационному восстановлению, оцениваемая по степени нормализации функций клеток, поврежденных радиацией. Для многоклеточной системы, какую представляет собой меристема высшего растения, можно выделить два основных пути пострадиационного восстановления: поклеточную репарацию, обусловленную непосредственным восстановлением молекул ДНК и приводящую к ликвидации сублетальных повреждений, и репопуляцию, при которой восстановление происходит за счет перераспределения функций отдельных клеток и тканей и размножения клеток, сохранивших способность к делению. Роль каждого из этих путей в восстановлении меристемы изучена недостаточно хорошо, несмотря на то, что доля нарушений, возникающих при действии радиации, существенно зависит от того, по какому механизму осуществляется пострадиационное восстановление. Так, генетическое повреждение при репопуляции будет меньше, чем при репарации, так как при этом типе восстановления нормализация функций меристемы осуществляется преимущественно за счет неповрежденных либо слабоповрежденных клеток.

Возможность репарационного восстановления четко показана в основном для одноклеточных организмов (в том числе растительного происхождения) и для культуры клеток. О репаративном восстановлении клеток образовательных тканей растений получено меньше прямых экспериментальных доказательств. И хотя в общем восстановлении меристемы репарация, по-видимому, играет определенную роль, временные характеристики процессов пострадиационного восстановления, полученные нами в опытах по изучению кинетики размножения клеток в растущей части корня при облучении [7], свидетельствуют о том, что основным путем является репопуляция: если для поклеточного восстановления необходим период времени, измеряемый несколькими часами, то для восстановления

нормальной способности к делению клеток меристемы требуется несколько суток, т. е. несколько циклов деления.

В настоящей главе рассматриваются основные факторы, обусловливающие процессы репопуляционного восстановления в меристематических тканях высших растений.

АСИНХРОННОСТЬ ДЕЛЕНИЙ КЛЕТОК МЕРИСТЕМ И ИХ СИНХРОНИЗАЦИЯ

Для осуществления в меристематической ткани восстановительных процессов по типу репопуляции меристема должна быть гетерогенной в отношении индивидуальной радиоустойчивости клеток. Такая гетерогенность, в первую очередь, обусловливается асинхронностью клеточных делений меристемы, следствием которой является наличие клеток на различных фазах митотического цикла в активно делящейся популяции.

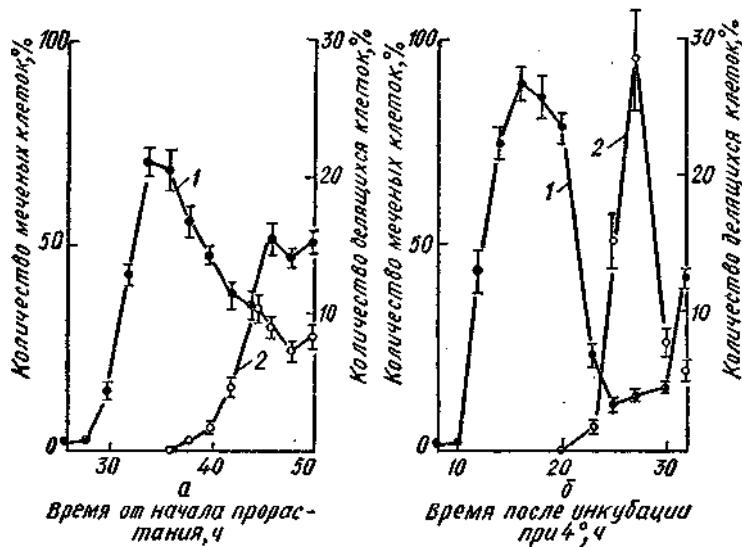


Рис. 42. Наступление и прохождение фазы синтеза ДНК (1) и митоза (2) в меристеме корней проростков гороха в норме (а) и при предварительной инкубации при 4° (б).

Синхронный тип деления неизвестен для популяций образовательных клеток высших растений. При искусственном либо естественном образовании блока в какой-либо фазе цикла и накоплении клеток в этой фазе в результате последующих делений всегда происходит полная десинхронизация.

Так, известно, что в меристемах зародышей покоящихся семян до 90—96% клеток могут находиться в пресинтетической фазе (G_1). При набухании и прорастании семян эти клетки начинают готовиться к делению, последовательно проходя фазу синтеза ДНК

(S), постсинтетическую фазу (G_2) и вступая в митоз. Однако, несмотря на то что период между началом прорастания семян и появлением первых митозов занимает менее, чем один митотический цикл, в наших опытах с горохом в первую S-фазу одновременно вступало не более 70%, а в митоз — около 10—12% клеток, что превышало уровень в последующих циклах соответственно не более чем на 20 и 2—4% (рис. 42, а).

По нашему мнению, основной причиной этого является, с одной стороны, неодновременное начало пролиферации клеток зародыша при набухании и прорастании семян и, с другой — распределение в зародыше клеток по различным периодам G_1 -фазы. Последнее вполне допустимо, так как наряду с G_1 -клетками в популяции клеток зародыша семян гороха мы обнаруживали до 10% клеток, находящихся в S- и G_2 -фазах. Исследованиями В. Г. Грифа [2], а также Н. Д. Тарасенко и Г. С. Майкевича [9] было показано, что для прохождения клетками отдельных фаз митотического цикла требуется различный уровень минимальных температур. Чтобы вызвать образование блока на начальных стадиях прорастания, мы намачивали сухие семена в течение 48 ч при 4°. При этой температуре семена полностью набухали, но не прорастали даже при более длительных экспозициях. После такой инкубации семена помещали в обычные условия прорастания при 22° и наблюдали одновременное вступление в S-фазу 90% клеток и в митоз — до 30% (рис. 42, б). Однако к концу второго цикла деления признаки частичной синхронности делений полностью исчезали.

Быстро наступает десинхронизация и у синхронизированных клеток меристем 2—5-суточных проростков, что подтверждают результаты наших опытов по изучению скорости десинхронизации клеток меристемы корня гороха, синхронизированных путем выдерживания в течение 24 ч на среде, содержащей 5-аминоурацил (0,07%) либо оксимочевину (0,03%). Указанные концентрации препаратов были минимальными из тех, которые индуцировали образование блока, но не вызывали необратимого прекращения митозов и роста корней; экспозиция заведомо превышала длительность митотического цикла. Митотическая активность в проростках в момент их извлечения из синхронизаторов практически равнялась нулю (рис. 43). После отмычки и помещения в чистый питательный раствор уже через несколько часов в меристеме начинали появляться первые митозы. Спустя 12 ч при использовании оксимочевины и 14 ч при использовании 5-аминоурацила количество митозов достигало максимума — соответственно 46 и 26%.

При использовании обоих синхронизаторов через 16 ч после первого максимума наступал второй, в котором митотический индекс был значительно ниже и составлял для оксимочевины 22% и для 5-аминоурацила — 18%. Через следующие 16—18 ч некоторое увеличение митотической активности по сравнению с асинхронно делящейся меристемой наблюдали только при использовании оксимочевины. Таким образом, полученные кривые с затухающими пика-

ми частично синхронизированных митозов, расстояние между которыми соответствует продолжительности митотического цикла, показывают, что через 2—3 цикла деления в меристеме наступает полная десинхронизация.

Основной причиной десинхронизации искусственно и естественно синхронизированных популяций клеток является, вероятно, различная длительность митотического цикла отдельных клеток. Вследствие такой гетерогенности, характерной для клеток меристем

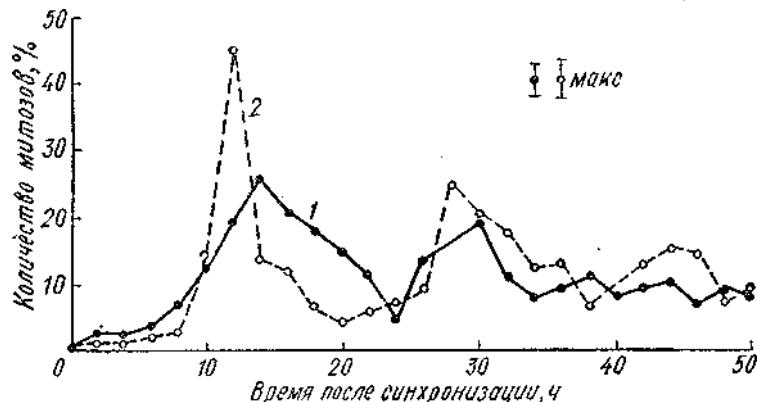


Рис. 43. Синхронизация и десинхронизация клеточных делений в меристеме корней проростков гороха после воздействия 5-аминоурацила (1) и оксимочевиной (2).

высших растений, даже при создании четкого блока в определенной фазе уже первый митотический цикл клетки заканчивают в различное время. С каждым последующим циклом деления эта разница возрастает, в результате чего и наступает полная десинхронизация.

Асинхронность клеточных делений и «стремление» синхронизированной популяции к десинхронизации следует рассматривать, по-видимому, как эволюционно сложившийся механизм, направленный на расширение экологических условий жизнеобитания растений и повышение устойчивости образовательных тканей к экстремальным воздействиям. Такая устойчивость является результатом различной резистентности к повреждающим факторам, в том числе и ионизирующей радиации, клеток, находящихся в различных фазах митотического цикла.

РАДИОУСТОЙЧИВОСТЬ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

В решении проблемы радиоустойчивости отдельных фаз клеточного или митотического цикла можно выделить два подхода: 1) изучение действия радиации на продолжительность отдельных фаз и 2) непосредственное изучение радиоустойчивости клеток, находящихся в определенных фазах. В опытах с конскими бобами и горохом нами

было показано [8], что с увеличением дозы радиации длительность митотического цикла возрастает. Но вклад отдельных фаз в увеличение его общей продолжительности неодинаков. Так, при облучении проростков этих культур в полулетальных дозах и увеличении длительности митотического цикла в 1,3—1,4 раза продолжительность S- и G₂-фаз возрастила всего в 1,1—1,2 раза; несколько в большей степени увеличивалась продолжительность митоза. Но зато длительность G₁-фазы возрастила в 1,5—1,7 раза. Эти данные свидетельствуют о различной реакции асинхронно делящихся клеток меристемы на облучение. Тем не менее они не могут дать правильный ответ на вопрос о радиоустойчивости той или иной фазы цикла. Ибо причин увеличения продолжительности фаз может быть несколько.

1. Не исключено, что увеличение продолжительности фазы действительно обусловлено высокой степенью ее повреждаемости. Например, низкая радиоустойчивость клеток, находящихся в конце G₁-фазы, в период, когда происходит синтез ферментов, обеспечивающих репликацию, и возрастают матричная активность ДНК, может приводить к задержке вступления клеток в S-фазу, т. е. к увеличению продолжительности G₁-фазы.

2. Увеличение продолжительности фазы может быть следствием повреждения клеток в какой-либо предшествующей фазе. Так, Ким и Ивенс [18] считают, что причиной увеличения длительности G₁-фазы при облучении является повреждение клеток в G₂-фазе.

3. Наконец, увеличение продолжительности фаз может происходить с целью задержки вступления клеток в последующий, более ответственный, этап цикла. Например, удлинение G₁-фазы с этой точки зрения можно трактовать «стремлением» клетки восстановить поврежденные радиацией элементы структуры матричной ДНК перед вступлением в S-фазу. Нами было показано, что выдерживание γ -облученных проростков в актиномицине D, индуцирующем блоки в G₁- и G₂-фазах и препятствующем вступлению клеток в наиболее ответственные этапы клеточного цикла — синтез ДНК и митоз, обусловливало увеличение степени восстановления [3].

В связи с этим мы предприняли попытку определить непосредственно радиоустойчивость клеток, находящихся в различных фазах митотического цикла, в меристеме корней проростков, синхронизированных оксимочевиной. Облучение проростков в данном случае проводили через различные промежутки времени после извлечения из синхронизатора, т. е. во время прохождения определенной фазы цикла. На рис. 44 приведены кривые выживаемости проростков гороха и кукурузы при облучении в полулетальной дозе (800 рад для гороха и 2000 рад для кукурузы) в различные фазы, а в табл. 26 значения ЛД_{50/10} для некоторых фаз.

Из приведенных данных видно, что несмотря на различия в длительности митотического цикла (16—17 ч у гороха и 12—13 ч у кукурузы), а также на различный вклад отдельных фаз в цикл, можно выделить несколько общих периодов, характеризующих

радиоустойчивость отдельных фаз. У обеих культур минимальной радиоустойчивостью обладали клетки, находящиеся в G_2 -фазе и митозе. Но у кукурузы, имеющей 5,5-часовую по сравнению с 2-часовой у гороха G_2 -фазу, высокая чувствительность к радиации была отмечена лишь для конца фазы. Высокой радиоустойчивостью клетки меристем обоих растений характеризовались также в конце

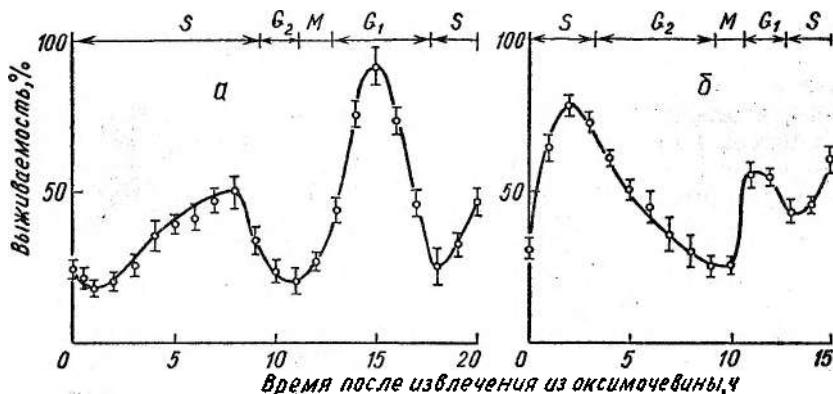


Рис. 44. Зависимость выживаемости проростков гороха (а) и кукурузы (б) от времени извлечения из оксимочевины.

G_1 -фазы. Наиболее высокой радиоустойчивостью отличались клетки, находящиеся в S-фазе и начале G_1 -фазы. Но у гороха наиболее высокой устойчивостью характеризовались клетки в начале G_1 -фазы, а у кукурузы — в S-фазе.

Таблица 26

$LD_{50/10}$ для проростков гороха и кукурузы при облучении в различные фазы митотического цикла

Фаза митотического цикла	Горох		Кукуруза	
	время после извлечения из оксимочевины, ч	$LD_{50/10}$, рад	время после извлечения из оксимочевины, ч	$LD_{50/10}$, рад
S	7	840 ± 30	2	2960 ± 110
$G_2 - M$	11	630 ± 20	10	1350 ± 90
Ранняя G_1	14	1550 ± 70	11	2100 ± 80
Поздняя G_2	18	660 ± 20	13	1640 ± 50

Таким образом, радиоустойчивость клеток, находящихся на различных фазах митотического цикла, различается в 2,2—2,5 раза. Это означает, что при репродуктивной гибели в результате облучения части клеток другая часть, находящаяся в радиоустойчивых периодах цикла, сохраняет способность к делению и обеспечивает процесс восстановления клеточной популяции за счет репопуляции.

ДЕЙСТВИЕ РАДИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ ИХ ВВЕДЕНИИ И ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

Для того чтобы дать достаточно полный анализ причин столь широкого варьирования радиоустойчивости клеток, необходимо четко представлять, что происходит в клетке на различных этапах митотического цикла и знать чувствительность к радиации этих процессов. Однако, как справедливо отмечает И. А. Алов [1], мы еще не располагаем достаточным количеством фактического материала для того, чтобы охарактеризовать состояние клетки и описать все те процессы, которые происходят в ней на протяжении цикла. Еще более скучны сведения об их радиочувствительности. Тем не менее очевидно, что отдельные периоды митотического цикла качественно различны и характеризуются различным уровнем метаболической активности. Поэтому следует ожидать, что действие экзогенных, вводимых в различные фазы митотического цикла, химических веществ, будет проявляться по-разному. По всей вероятности, от фазы митотического цикла должна зависеть и эффективность защитного действия химических радиопротекторов.

При изучении этого вопроса в наших опытах в качестве радиозащитных веществ были использованы соединения, обладающие четким радиопротекторным действием в опытах с растениями, но различающиеся по своей химической природе и механизмам действия: аминоэтилизотиуроний (АЭТ), β -меркаптоэтиламин (МЭА), аденоцинтрифосфорная кислота (АТФ) и гидролизат ДНК. Концентрации, при которых радиозащитный эффект проявлялся в максимальной степени, подобранные в предварительных опытах с асинхронно делящимися проростками гороха, составили: АЭТ — $5 \cdot 10^{-4}$ М, МЭА — 10^{-3} М, АТФ — 10^{-4} М и гидролизат ДНК — $2 \cdot 10^{-4}$ %. Проростки гороха через различные промежутки времени после экспозиции в оксимочевине и отмычки помещали на один

Таблица 27

Защитное действие радиопротекторов при γ -облучении асинхронно делящихся проростков гороха

Радиопротектор	Выживаемость, %	Коэффициент защиты
Вода	$48,4 \pm 2,3$	—
АЭТ	$92,3 \pm 4,7$	1,91
МЭА	$88,4 \pm 3,9$	1,83
АТФ	$74,6 \pm 3,7$	1,54
Гидролизат		
ДНК	$65,8 \pm 4,1$	1,36

Таблица 28

Выживаемость проростков гороха в зависимости от времени облучения после извлечения из оксимочевины

Время после извлечения из оксимочевины, ч	Фаза цикла	Выживаемость, %
0	G ₁ /S	$21,1 \pm 2,2$
3	Ранняя	$32,8 \pm 1,6$
7	Поздняя	$40,2 \pm 2,4$
10	G ₂	$20,7 \pm 1,0$
12	Митоз	$23,0 \pm 1,7$
14	Ранняя G ₁	$78,9 \pm 2,1$
71	Поздняя G ₁	$24,3 \pm 1,8$

час в раствор радиопротектора и облучали в дозе 800 рад. Степень лучевого поражения оценивали по выживаемости проростков, а степень защиты выражали в виде коэффициента защиты, представляющего собой отношение выживаемости в варианте с защитой и в контроле.

В условиях асинхронной культуры наиболее выраженным защитным действием обладали аминотиолы — АЭТ и МЭА и наименьшим — гидролизат ДНК (табл. 27). Радиоустойчивость синхронизированных проростков была наиболее высокой при облучении в ранней G_1 -фазе и наименьшей — в поздней G_1 -фазе, G_2 -фазе и митозе (табл. 28). Защитный эффект радиопротекторов при введении в различные фазы митотического цикла, как и ожидалось, был неодинаковым (рис. 45). Действие обоих аминотиолов, как и в асинхронной культуре, проявлялось примерно в равной степени и было наиболее высоким при облучении в конце G_1 - и S -фазе. Данные табл. 28 и рис. 44а свидетельствуют о том, что период интерфазы, предшествующий началу синтеза ДНК, характеризуется весьма низкой радиоустойчивостью. Имеются сведения о том, что этот период митотического цикла вообще является самым чувствительным к изменениям условий среды [12, 16]. По-видимому, это объясняется тем, что в этот период в клетке происходит подготовка к синтезу ДНК — высокочувствительный биохимический процесс, требующий определенной хронологической последовательности и координации различных ферментных систем. Согласно же гипотезе биохимического шока, или, как еще ее называют, метаболической защиты [10], радиопротекторное действие тиоловых соединений состоит именно в ингибировании отдельных звеньев метаболизма и, в первую очередь, систем, связанных с синтезом ДНК. Вероятно, поэтому введение АЭТ и МЭА в предшествующий синтезу ДНК период митотического цикла и собственно в фазу синтеза ДНК весьма эффективно.

Защитное действие АТФ в наибольшей степени проявлялось при введении и облучении в G_2 -фазу. Данные некоторых исследователей показывают, что именно в эту фазу цикла происходит наполнение «энергетического резервуара» клетки [15, 19]. И хотя вопрос о природе макроэргических соединений, обеспечивающих энергией



Рис. 45. Защитное действие радиопротекторов в зависимости от времени введения и облучения проростков гороха после извлечения из оксимочевины: 1 — АЭТ, 2 — МЭА, 3 — АТФ, 4 — гидролизат ДНК. Заштрихованные участки — время введения пропротекторов, стрелки — время облучения.

цикла, остается неизвестным, это несомненно усиливает защитное действие АТФ. Видно, что введение АТФ в G_2 -фазу приводит к максимальной радиоустойчивости проростков.

митотический цикл и собственно митоз, остается еще недостаточно выясненным, считается, что в большинстве случаев энергия накапливается в виде АТФ. По-видимому, с этим обстоятельством и связана высокая защитная эффективность экзогенной АТФ при введении в эту фазу цикла.

Защитное действие гидролизата ДНК проявлялось при облучении в G₁- и S-фазе и не отмечалось после окончания синтеза ДНК. По всей вероятности, защитное действие экзогенной ДНК состоит в поставке материала для обеспечения синтеза эндогенной ДНК и эффективно лишь при введении и облучении непосредственно в S-фазу и предшествующий ей период. Следует отметить, что при введении ДНК в конце S-фазы степень защиты резко снижалась, что также свидетельствует в пользу высказываемого предположения.

В наименьшей степени защитное действие всех использованных радиопротекторов проявлялось при введении и облучении в фазу митоза и в раннюю G₁-фазу. Как известно, митоз сравнительно меньше зависит от условий снабжения клетки, чем остальные фазы, и, начавшись, может идти практически при полном блокировании окислительного фосфорилирования, дыхания, притока углеводов и других систем [19]. Вероятно поэтому и экзогенное введение специфических синтетических радиопротекторов и неспецифических защитных веществ различной химической природы сравнительно слабо влияет на изменение его радиоустойчивости.

Ранняя G₁-фаза характеризуется, как уже упоминалось, самой высокой радиоустойчивостью, что, возможно, является следствием пониженной метаболической активности процессов, характерных для этого периода интерфазы, называемого некоторыми исследователями истинной интерфазой. Именно в этой фазе цикла находится большинство клеток зародышей покоящихся семян, клетки «центра покоя» меристемы корня, отличающиеся весьма высокой радиоустойчивостью. Низкой метаболической активностью тканей этого типа обычно объясняют почти полное отсутствие в них процессов восстановления при облучении [5]. Возможно, с этим связано и отсутствие защиты при облучении и введении протекторов в раннюю G₁-фазу.

Таким образом, радиопротекторы по-разному влияют на степень повышения радиоустойчивости клеток меристемы, находящихся в различных фазах митотического цикла. Но, несомненно, все противорадиационные вещества обеспечивают увеличение в популяции фракции радиоустойчивых клеток, обусловливая тем самым повышение устойчивости всей меристемы к повреждающему действию радиации.

МОДИФИКАЦИЯ РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ МЕРИСТЕМЫ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Если допустить, что радиоустойчивость асинхронно делящейся меристемы определяется соотношением клеток, находящихся в радиоустойчивых и радиочувствительных фазах митотического цикла, то, изменяя это соотношение, можно направленно изменять радиоустойчивость меристемы, а следовательно, и всего растения. Выше мы рассмотрели возможность изменения такого соотношения путем повышения поклеточной радиоустойчивости с помощью радиопротекторов. Но возможен и другой подход для модификации радиоустойчивости меристемы. Так, влияя на продолжительность отдельных фаз митотического цикла с помощью различных физических либо химических воздействий, можно изменять количество клеток, находящихся в отдельных фазах цикла, и следовательно, обладающих различной радиоустойчивостью. Такими свойствами могут обладать различные физиологически активные соединения, ускоряющие или замедляющие рост растений, температура, ингибиторы отдельных звеньев метаболизма и т. п.

В своих исследованиях, в первую очередь, мы стремились использовать для этих целей воздействия, механизмы действия которых на рост связаны с изменением скорости деления клеток. Из физиологически активных соединений мы испытывали активатор роста растений кинетин (6-фурфуриламинопурин) и ингибитор роста абсцизовую кислоту (\pm абсцизин II). Двухсуточные проростки гороха помещали в жидкий питательный раствор, содержащий кинетин в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М либо абсцизовую кислоту в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М. Подбирали такую концентрацию кинетина, которая в максимальной степени (в 1,3—1,4 раза) стимулировала бы среднесуточный прирост корней в течение первых трех суток выращивания проростков, а абсцизовой кислоты — напротив, такой, которая примерно в той же степени ингибировала бы его.

Таблица 29

Изменение продолжительности митотического цикла (Т) и отдельных его фаз в клетках меристемы проростков гороха при выращивании их на среде с кинетином и абсцизовой кислотой *

Вариант опыта	Количество клеток в фазе митоза, %	Пролиферативный пул, %	Длительность фаз, ч				Т, ч
			G ₁	S	G ₂	M	
Контроль	$8,62 \pm 0,57$	$98,59 \pm 0,44$	6,5	7,0	2,0	1,5	17,0
Кинетин	$13,58 \pm 3,26$	$98,79 \pm 0,53$	2,9	5,5	2,0	1,6	12,0
Абсцизовая кислота	$4,48 \pm 0,80$	$79,50 \pm 6,84$	18,8	7,8	5,0	1,9	33,5

* Определения проведены спустя 24 ч после помещения проростков на среду с ростовыми веществами.

Данные опытов, приведенные в табл. 29, показывают, что при выращивании проростков на среде с кинетином митотический цикл уменьшается с 17 до 12 ч, а на среде с абсцизовой кислотой увеличивается до 33,5 ч. Продолжительность фазы синтеза ДНК и митоза при этом изменялась весьма незначительно, практически в пределах точности метода (ошибка при определении длительности отдельных фаз составляла до 10%), хотя митотическая активность изменялась в весьма широких пределах: возрастала с 8,62 до 13,58% при действии кинетина и снижалась до 4,48% в абсцизовой кислоте. В основном изменения длительности цикла происходили за счет G_1 -фазы, продолжительность которой сокращалась более чем в 2 раза при действии кинетина и увеличивалась почти в 3 раза в абсцизовой кислоте. В варианте с абсцизовой кислотой также происходило увеличение продолжительности G_2 -фазы в 2,5 раза, хотя абсолютный вклад этой фазы в общее увеличение продолжительности цикла был не так уж велик.

Величина пролиферативного пула не изменялась при выращивании проростков на среде с кинетином, но снижалась с 98,5 до 79,5% при действии абсцизовой кислоты. По-видимому, под влиянием последней часть клеток меристемы либо вообще теряет способность к делению, либо их митотический цикл удлиняется в большей степени, чем у остальных клеток.

В результате избирательного изменения продолжительности различных фаз митотического цикла происходило изменение относительного количества клеток, находящийся в этих фазах. Так, доля митотических клеток, отличающихся довольно низкой радиоустойчивостью, в меристеме корней проростков контроля составляла 9%, увеличивалась до 13% под влиянием кинетина и снижалась до 5,5% при действии абсцизовой кислоты. Доля клеток, находящихся в S -фазе, начало и конец которой характеризуются высокой радиочувствительностью, а середина довольно устойчива, увеличивалась с 41 до 46% при выращивании проростков в кинетине и снижалась до 23% в абсцизовой кислоте. Доля G_2 -фазных клеток под влиянием фитогормонов изменялась весьма незначительно.

В наибольшей степени изменялось количество клеток, находящихся в G_1 -фазе, начало которой отличается наиболее высокой, а конец — наиболее низкой радиоустойчивостью. Под влиянием кинетина количество клеток, находящихся в этой фазе, уменьшалось с 38 до 24%, а под влиянием абсцизовой кислоты возрастало до 56%. Однако не ясно, продолжительность какого периода G_1 -фазы, т. е. доля каких клеток — радиоустойчивых или радиочувствительных — изменяется под влиянием фитогормонов. Чтобы ответить на этот вопрос, мы провели специальные исследования, в которых изучали радиоустойчивость отдельных фаз митотического цикла в проростках, выращиваемых на среде с кинетином и абсцизовой кислотой и синхронизированных оксимочевиной. Опытам предшествовало определение полулетальных доз для проростков, выращиваемых на чистой питательной среде, а также на средах с

ростовыми веществами, значения которых приведены в табл. 30. Данные дозы были использованы для облучения проростков в различные периоды после снятия блока. Результаты этих опытов приведены на рис. 46, из которого видно, что при некоторой общности характера кривых изменения радиоустойчивости фаз в течение цикла есть и существенные различия, характерные, в первую очередь, для G_1 -фазы. В контроле около половины этой фазы (примерно 3 ч) составляет радиоустойчивая часть (выживаемость проростков выше 50%). Это означает, что около 18% клеток популяции находятся в этом периоде G_1 -фазы. Под влиянием кинетина продолжительность радиоустойчивого периода G_1 -фазы резко сокращается, обусловливая уменьшение длительности фазы более чем в два раза. Повидимому, это связано с непосредственным переходом клеток после завершения очередного митоза к подготовке синтеза ДНК.

При действии же абсцизовой кислоты продолжительность радиоустойчивого периода G_1 -фазы возрастает до 14 ч, составляя почти 42% длительности всего цикла. Количество клеток, находящихся в этом периоде, по сравнению с контролем увеличивалось в 2,3 раза.

Кроме того, как уже упоминалось, под влиянием абсцизовой кислоты на $\frac{1}{5}$ уменьшалась величина пролиферативного пула. Если такое уменьшение обусловлено увеличением длительности митотического цикла у части клеток выше среднего, то это также означает увеличение доли клеток, находящихся в радиоустойчивом периоде G_1 -фазы. Если же оно связано с обратимой потерей способности к делению у части клеток (уход в состояние покоя), то это также свидетельствует об увеличении фракции радиоустойчивых клеток.

Таким образом, выращивание проростков на среде с кинетином способствовало уменьшению, а выращивание на среде с абсцизовой кислотой — увеличению соотношения клеток, находящихся в радиоустойчивых и радиочувствительных фазах митотического цикла. Если действительно изменение радиоустойчивости меристемы является следствием изменения в составе клеточной популяции по такому пути, то модифицирующий эффект фитогормонов должен зависеть от времени их воздействия. В самом деле, как свидетельствуют кривые, приведенные на рис. 47, при кратковременных экспозициях проростков на растворах кинетина и абсцизовой кислоты (до 3 ч) радиоустойчивость их практически не изменялась. Однако уже при 6-часовой экспозиции выживаемость проростков под влиянием кинетина уменьшалась до 45%, а при 15-часовой — до 17% и оставалась на этом уровне при более длительных экспозициях. Вы-

Таблица 30

Значения $LD_{50/10}$ для проростков гороха, выращиваемых на среде с кинетином и абсцизовой кислотой

Вариант опыта	$LD_{50/10}$, рад	Фид
Контроль	1140 ± 60	—
Кинетин	820 ± 40	0,72
Абсцизовая кислота	1630 ± 65	1,43

держивание проростков на среде с абсцизовой кислотой более 6 ч, напротив, оказывало защитное действие: при 9-часовой экспозиции выживаемость возрастала до 60%, а при 18—35-часовых достигала максимального уровня — 85%.

Как отмечалось в предыдущем разделе, значительная степень радиозащитного действия истинных химических радиопротекторов, механизм действия которых

связан с изменением поклеточной

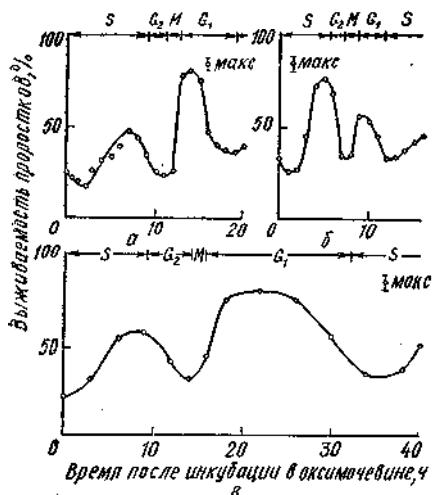


Рис. 46. Радиоустойчивость фаз митотического цикла клеток меристемы корней проростков гороха, выращиваемых в чистой питательной среде (a), а также на среде с кинетином (b) и абсцизовой кислотой (c).

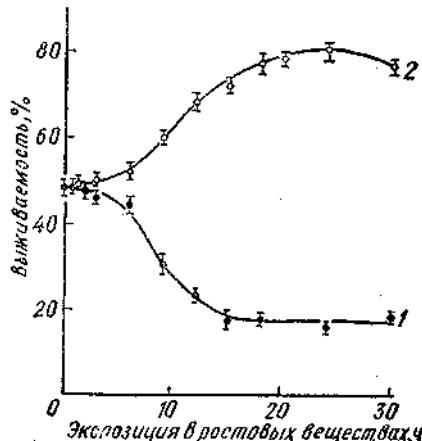


Рис. 47. Влияние экспозиции проростков гороха на среде с кинетином (1) и абсцизовой кислотой (2) на их выживаемость при облучении в дозе 1140 рад.

радиоустойчивости, в опытах с горохом достигалась уже при одночасовой экспозиции. Примерно при таких же экспозициях проявляется максимальная эффективность радиосенсибилизаторов [4]. В данных же опытах максимальная степень модифицирующего действия достигалась при 15—20-часовых периодах выдерживания проростков на среде с физиологически активными веществами, т. е. при экспозициях, соизмеримых с продолжительностью митотического цикла. Если предположить, что действие кинетина связано со снятием блока, наступающего в клетках после завершения очередного митоза (об этом свидетельствует сокращение длительности G_1 -фазы), то для осуществления этого процесса необходимо, чтобы все клетки меристемы прошли через эту фазу, что займет время, равное длительности цикла. Напротив, если действие абсцизовой кислоты связывать с индуцированием блоков в G_1 - и G_2 -фазах (длительность их увеличивалась в 2,5—2,9 раза), то для осуществления этого необходим период времени, больший длительности митотического цикла в норме, но меньшей, чем его длительность при действии абсцизовой кислоты.

Таким образом, действие данных фитогормональных препаратов, модифицирующее радиоустойчивость проростков, по всей вероятности, обусловлено изменениями, происходящими на уровне популяции клеток меристемы, хотя данный механизм и не исключает возможности их влияния на индивидуальную радиоустойчивость отдельных клеток.

Таблица 31

Влияние температуры выращивания на продолжительность митотического цикла (T) и отдельных его фаз в клетках меристемы корней проростков гороха

Температура, °С	Количество клеток в фазе митоза, %	Пролиферативный пул, %	Длительность фаз, ч				T, ч
			G ₁	S	G ₂	M	
11	8,44 ± 0,43	97,17 ± 1,56	23,1	10,6	6,0	4,0	43,7
16	8,46 ± 0,52	97,70 ± 0,94	10,3	8,5	4,4	2,2	25,4
22	7,78 ± 0,50	98,09 ± 1,22	5,5	7,3	2,3	1,3	16,4
27	8,67 ± 0,35	93,41 ± 2,14	4,0	6,7	2,0	1,3	14,0
33	8,60 ± 0,52	64,99 ± 3,87	1,3	5,0	1,5	1,2	9,0

По-разному влияет на длительность фаз митотического цикла, а следовательно, и на соотношение клеток, находящихся в различных фазах, температура выращивания проростков. Данные, представленные в табл. 31, показывают, что при снижении температуры с 22° (оптимальная) до 11° длительность цикла возрастала более чем в 2,5 раза. При этом длительность S-фазы увеличивалась в 1,5, G₂-фазы — в 2,5, митоза — в 3, G₁-фазы — в 4 раза. При повышении температуры до 33° продолжительность цикла сокращалась в 1,8 раза. Длительность G₁-фазы при этом уменьшалась более чем в 4 раза, в то время как остальных фаз — лишь в 1,1—1,5 раза.

Таким образом, при изменении температуры выращивания происходит перераспределение доли клеток, находящихся в отдельных фазах. Так, если количество клеток, находящихся в G₁-фазе, при 22° составляло 33,5%, то при 11° оно возросло до 53%, а при 33° уменьшилось до 14,5%; количество клеток, находящихся в S-фазе, при 22° составило около 45%, при 11°—25 и при 33°—61%. Но, как видим, при изменениях температуры колебания длительности митотического цикла в основном происходят за счет увеличения или уменьшения продолжительности G₁-фазы, обусловливая резкие изменения количества клеток, находящихся в этой фазе. Однако и в данном случае возникает вопрос о том, как изменяется при повышении либо понижении температуры соотношение радиоустойчивого и радиочувствительного периодов этой фазы. Мы ответили на него с помощью следующих двух экспериментов.

В первом мы облучали прорастающие при 11, 22 и 33° семена гороха, синхронизированные предварительной инкубацией в течение 48 ч при 5°, в различные периоды перед вступлением в S-фазу. Данные по изменению радиоустойчивости первой G₁-фазы, приведен-

ные на рис. 48, показывают, что в первые часы после инкубации семян на холода ЛД_{50/10} составила около 8,5 крад. Через несколько часов после выращивания растений при 22° она резко уменьшалась и к 9—12 ч, т. е. к началу синхронного вступления клеток в фазу синтеза ДНК, составила около 3,5 крад. Примерно такая же степень уменьшения радиоустойчивости отмечалась нами и при синхронизации делений оксимочевиной (см. табл. 26), когда ЛД_{50/10} для начала G₁-фазы составила 1550, а для конца — 660 рад.

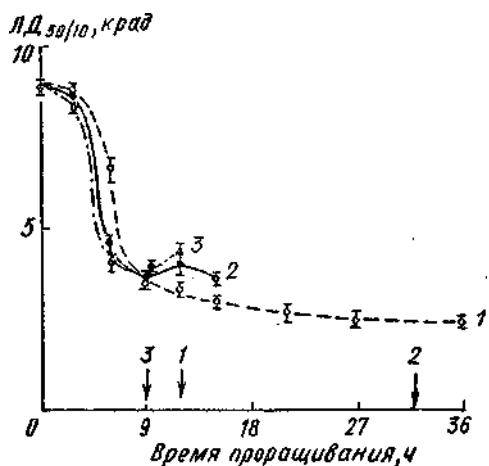


Рис. 48. Изменение радиоустойчивости прорастающих семян гороха при облучении в различные периоды выращивания после низкотемпературной инкубации:
1 — 11°, 2 — 22°, 3 — 33°. Стрелками указано время вступления S-фазы.

Во втором эксперименте проростки, выращиваемые при различных температурах, синхронизировали оксимочевиной, а затем облучали в разные периоды после извлечения из синхронизатора. Результаты опыта, приведенные на рис. 49, также свидетельствуют о том, что изменение длительности G₁-фазы при изменении температуры выращивания происходит исключительно за счет ее радиочувствительного периода.

Таким образом, под влиянием низких температур увеличивается, а высоких — уменьшается доля клеток меристемы, находящихся в радиочувствительных G₂-, в конце G₁-фазы и митозе, в то время как доля клеток, находящихся в радиоустойчивых S-фазе и начальном периоде G₁-фазы изменяется весьма незначительно. Поэтому следует ожидать, что при низких температурах радиоустойчивость должна снижаться, а при высоких — повышаться. При этом, если действие температур, как и в случае с фитогормонами, связано с изменением доли клеток, находящихся в радиоустойчивых и в радиочувствительных фазах цикла, кратковременные температурные воздействия не должны отражаться на радиоустойчивости проростков. Действительно, выдерживание проростков, выращенных при 22°, в течение 1—6 ч при 11° не влияло на их радиоустой-

чивость. Но за счет увеличения продолжительности G₁-фазы при 11° и уменьшения ее при 33° соответственно возрастила или сокращалась длительность ее радиочувствительного периода.

чивость. Но с увеличением времени инкубации радиоустойчивость снижалась и при 48-часовой достигала минимума, оставаясь на этом уровне и при более продолжительных экспозициях (рис. 50).

Следует отметить, что 48-часовая экспозиция соизмерима с продолжительностью митотического цикла при 11° (44 ч). По-видимому, в течение этого периода происходит постепенная перестройка популяции, состоящая в перераспределении доли клеток,

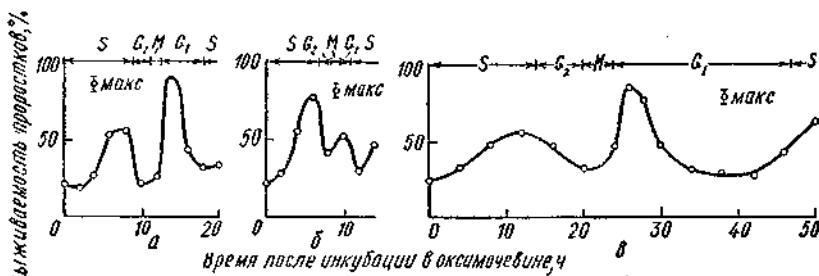


Рис. 49. Радиоустойчивость фаз митотического цикла клеток меристемы корней проростков гороха, выращиваемых при 22° (a), 33° (b) и 11° (c). Дозы облучения полулетальные — соответственно 855, 820 и 650 рад.

находящихся в отдельных фазах цикла. Через 44 ч она завершается. Именно поэтому более продолжительное выдерживание проростков при этой температуре уже не влияет на радиоустойчивость.

При повышении температуры выращивания мы не наблюдали ожидаемого увеличения радиоустойчивости. Кроме того, несмотря на то, что продолжительность митотического цикла существенно сокращалась, увеличения скорости роста корней, как в случае с кинетином, не происходило. Напротив, она снижалась с 13,6 при 22° до 12,2 и 8,8 $\text{мм}/\text{сутки}$ соответственно при 27 и 33° . Возможно, это связано с потерей репродуктивной способности у части клеток, о чем свидетельствует уменьшение величины пролиферативного пула.

Отсутствие повышения радиоустойчивости при 33° может быть следствием того, что при перераспределении доли отдельных фаз в цикле может происходить компенсация в соотношении радиоустойчивых и радиочувствительных состояний клеток. Например, при увеличении доли клеток, находящихся в S-фазе, следовало бы ожидать повышения радиоустойчивости. Но при этой же температуре, несмотря на некоторое уменьшение продолжительности радио-

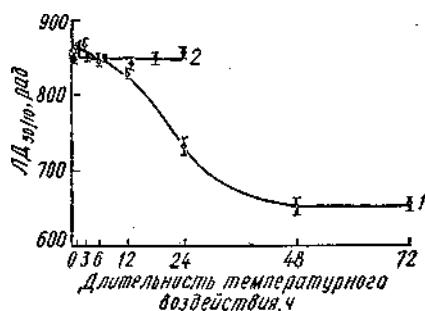


Рис. 50. Влияние длительности температурного воздействия на радиоустойчивость проростков гороха при 11° (1) и 33° (2).

чувствительных G_2 -фазы и митоза, происходит относительное увеличение их длительности, а следовательно, увеличение доли клеток, находящихся в этих фазах.

При рассмотрении данных, изложенных в этом разделе, может возникнуть вопрос, почему при изменении длительности G_1 -фазы под влиянием физиологически активных веществ и температуры соотношение между продолжительностью периода ее радиоустойчивости и продолжительностью радиочувствительного периода изменяется столь по-разному. Так, при действии абсцизовой кислоты увеличение длительности фазы происходит за счет радиоустойчивого периода, а при действии низких температур — за счет радиочувствительного. Безусловно, это связано с различной природой воздействия данных факторов на G_1 -фазу. Действие фитогормонов, как уже отмечалось, может обусловливать возникновение (снятие) блока в G_1 -фазе, приводящее к увеличению (сокращению) радиоустойчивого периода покоя. Температура на этот период не влияет, но низкие температуры могут замедлять, а высокие — ускорять скорость биохимических процессов, связанных с подготовкой к синтезу ДНК и происходящих в радиочувствительном периоде G_1 -фазы, обусловливая увеличение либо уменьшение его продолжительности.

Как видим, с помощью данных факторов, по-разному влияющих на продолжительность отдельных фаз митотического цикла и изменяющих соотношение в меристеме клеток, находящихся в радиоустойчивых и радиочувствительных периодах, можно эффективно изменять радиоустойчивость всего корня. Данный подход к модификации радиоустойчивости принципиально отличается от истинной радиозащиты и радиосенсибилизации, так как предусматривает не изменение радиоустойчивости отдельных клеток, а количественное изменение фракции радиоустойчивых клеток, обеспечивающих восстановление по пути репопуляции.

ДЕЙСТВИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ДЛЯТЕЛЬНОСТЬ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА И ОДНОИХ ЕГО ФАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ЗОНАХ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ. КИНЕТИКА ЦЕНТРА ПОКОЯ

В литературе имеются сведения о том, что длительность митотического цикла клеток в различных зонах меристемы корня неодинакова [11, 17]. Более того, по данным ряда исследователей, эти различия в продолжительности цикла обусловлены преимущественно изменениями длительности G_1 -фазы. Естественно предположить поэтому, что вероятность повреждения радиацией клеток в различных зонах меристемы неодинакова, и такая гетерогенность, несомненно, должна вносить определенные корректиры в механизм репопуляции, обеспечивающей радиоустойчивость меристемы и ее пострадиационное восстановление.

Определение продолжительности митотического цикла в отдельных зонах меристемы корня с помощью используемого обычно метода Квастлера — Шермана связано с большими методическими трудностями. Более того, кинетика размножения клеток в меристемах облученных проростков в различные часы пострадиационного периода существенно различается [7], поэтому использование данного метода, требующее для определения длительности цикла периода времени, превышающего его длительность, может привести к существенным погрешностям. В связи с этим для определения длительности митотического цикла нами был использован метод, в основе которого лежит идея Торре и соавт. [20] о так называемом клеточном потоке. Величина клеточного потока (C) определяется как процент меристематических клеток, проходящих через определенную точку митотического цикла в единицу времени. Продолжительность митотического цикла (T) и величина клеточного потока обратнопропорциональны и их связь может быть выражена простым соотношением $T = 100/C$. Величину клеточного потока мы определяли с помощью ^3H -тимидина путем применения двух перемежающихся импульсов. При этом проростки гороха через сутки после облучения помещали на 0,5 ч в среду, содержащую изотоп (4 мкюри/мл). После отмычки от изотопа корни одной части проростков фиксировали, а вторую часть выдерживали 0,5 ч в чистой питательной среде, а затем вновь помещали на 0,5 ч в ^3H -тимидин. Наadioавтографах продольных медиальных срезов Алексов корней подсчитывали процент меченых клеток. Разница между их количеством при сумме двух импульсов (N_2) и первом импульсе (N_1) дает искомую величину клеточного потока. Зная продолжительность митотического цикла, количество меченых клеток за один импульс, а также подсчитав количество клеток в митозе (M_i), рассчитывали продолжительность фазы синтеза ДНК (t_s)

$$t_s = \frac{N_1 \cdot T}{100} - t_e,$$

где t_e — экспозиция проростков в ^3H -тимидине (0,5 ч) и митоза (t_m)

$$t_m = \frac{M_i \cdot T}{100}.$$

При расчете продолжительности цикла митоза и S-фазы вносили поправку на величину пролиферативного пула (P). Это имело особый смысл в вариантах с облучением, где значительная часть клеток меристемы теряла способность к делению. Продолжительность G₂-фазы определяли в отдельном опыте также при введении импульсной метки и оценивали ее как период времени, в течение которого в популяции отсутствовали меченные митозы. По разнице между длительностью всего цикла и суммарной продолжительностью S-, G₂-фазы и митоза определяли продолжительность G₁-фазы. Подсчет меченых и делящихся клеток проводили на продольных

срезах корней по зонам шириной 250 мкм вдоль корня, а также отдельно в зоне коры и центрального цилиндра (рис. 51).

Результаты опыта, приведенные в табл. 32, свидетельствуют о том, что в варианте без облучения длительность митотического цикла была минимальной (12,7 ч) в зоне, соответствующей нахождению клеток корневого чехлика и инициалей. В следующей от кончика корня зоне, в которой находился центр покоя, составляющий

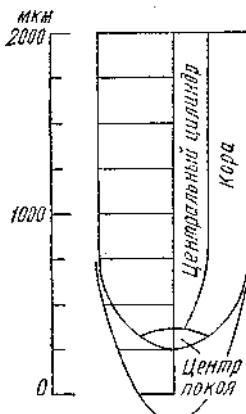


Рис. 51. Схематическое изображение меристемы корня проростка гороха и зон, в которых проводилось определение продолжительности митотического цикла и отдельных его фаз.

лась до 88% в апикальной и базальной зонах. Обращает на себя внимание уменьшение размера пула до 82% в зоне нахождения центра покоя, что действительно свидетельствует о наличии фракции клеток с более продолжительным чем у других митотическим циклом.

При облучении продолжительность митотического цикла во всех зонах меристемы, за исключением зоны, в которой находился центр покоя, резко возрастила. В наибольшей степени это происходило в апикальной зоне, где она увеличивалась с 12,7 до 23,5 и 31,3 ч соответственно при дозах 400 и 800 рад. В остальных зонах длительность цикла возрастила на 1,5—3 ч при 400 рад и на 3,5—5 ч при 800 рад. Характерно, что и в данном случае при весьма существенных изменениях длительности цикла в клетках отдельных зон они в основном касались G_1 -фазы, что согласуется с полученными ранее данными о влиянии облучения на длительность отдельных фаз в среднем по всей меристеме [8].

При облучении во всех зонах происходило уменьшение количества митотических клеток. В наибольшей степени — в апикальной,

не менее 1/5 этой зоны по количеству клеток в нем, продолжительность цикла составила 17,9 ч. В последующих зонах она снижалась до 15,4 ч и с продвижением по зонам к базальной части меристемы оставалась практически на этом же уровне вплоть до зон, непосредственно примыкающих к зоне растяжения, где вновь возрастила до 18—21 ч. Характерно, что при таких колебаниях в длительности митотического цикла в апикальной и базальной частях меристемы продолжительность митоза, S - и G_2 -фаз изменялась весьма незначительно, в то время как G_1 -фазы колебалась от 3,4 до 8,3 ч. Это соответствует упоминавшимся данным других исследователей.

Количество делящихся клеток в основной части меристемы также было постоянным — 7,9—8,5%. Но оно увеличивалось до 8,8% в апикальной зоне и снижалось до 7% в базальной. Величина пролиферативного пула была максимальной (95—98%) в центральных зонах меристемы и уменьша-

Таблица 32

Влияние У-облучения на продолжительность митотического цикла (T) и отдельных его фаз в клетках различных зон вдоль меристемы корня

Зона от кончи- ка корня, мкм	N_1 , %	N_2 , %	C_1 , %	ρ , %	M_1 , %	T_1 , ч	Длительность фаз, ч			
							S	M	G_1	G_2
Без облучения										
0—250	44,5 ± 2,6	53,4 ± 3,2	8,9	88,0 ± 0,6	8,8 ± 0,2	12,7	6,0	1,3	3,0	3,4
250—500	36,3 ± 1,9	43,1 ± 2,2	6,8	82,3 ± 3,1	8,3 ± 0,3	17,9	7,4	1,8	3,0	5,7
500—750	48,1 ± 2,0	54,7 ± 2,7	6,6	96,7 ± 0,3	8,5 ± 0,6	15,7	7,3	1,4	3,0	4,0
750—1000	45,0 ± 3,2	51,3 ± 3,0	6,2	97,4 ± 0,5	8,3 ± 0,2	16,6	7,2	1,4	3,0	5,0
1000—1250	45,2 ± 1,9	51,3 ± 2,6	6,1	97,8 ± 0,5	8,1 ± 0,2	16,8	7,3	1,4	3,0	5,1
1250—1500	44,2 ± 2,6	50,2 ± 1,7	6,0	95,5 ± 0,9	8,2 ± 0,2	17,5	7,6	1,5	3,0	5,4
1500—1750	38,4 ± 1,8	44,5 ± 2,3	6,1	90,7 ± 0,9	7,9 ± 0,5	18,1	7,2	1,6	3,0	6,3
1750—2000	36,6 ± 2,3	41,9 ± 2,1	5,3	88,4 ± 1,5	7,0 ± 0,3	21,3	8,3	1,7	3,0	8,3
Облучение в дозе 400 рад										
0—250	31,6 ± 2,5	36,7 ± 2,7	5,1	83,6 ± 1,8	8,0 ± 0,5	23,5	8,4	2,2	3,0	9,9
250—500	38,0 ± 2,9	45,3 ± 3,1	7,3	82,4 ± 1,9	8,1 ± 0,3	16,6	7,2	1,6	3,0	4,8
500—750	39,8 ± 2,6	47,2 ± 2,8	7,4	78,4 ± 1,8	7,2 ± 0,4	17,3	8,3	1,6	3,0	4,4
750—1000	31,8 ± 3,5	38,2 ± 2,4	6,4	76,3 ± 1,6	7,2 ± 0,4	20,5	8,0	1,9	3,0	7,6
1000—1250	29,7 ± 1,6	35,5 ± 2,1	5,8	77,4 ± 2,5	5,6 ± 0,3	22,3	8,1	1,6	3,0	9,6
1250—1500	32,0 ± 3,0	37,7 ± 2,2	5,7	76,7 ± 3,8	5,4 ± 0,4	22,9	9,1	1,6	3,0	9,2
Облучение в дозе 800 рад										
0—250	22,4 ± 0,5	27,5 ± 0,8	5,1	62,7 ± 2,5	3,8 ± 0,5	31,3	10,7	1,9	3,0	15,7
250—500	36,0 ± 2,3	43,4 ± 3,6	7,4	73,8 ± 2,0	5,7 ± 0,6	18,3	8,4	1,4	3,0	5,5
500—750	30,5 ± 2,9	38,0 ± 2,7	7,5	66,4 ± 2,8	5,4 ± 0,3	20,1	8,7	1,6	3,0	6,8
750—1000	28,2 ± 2,0	35,6 ± 2,2	7,4	60,1 ± 3,1	4,9 ± 0,4	22,5	10,1	1,8	3,0	7,6
1000—1250	22,8 ± 1,7	30,1 ± 2,1	7,2	66,3 ± 2,4	3,7 ± 0,3	24,7	9,5	1,6	3,0	10,6

в наименьшей — в зоне с центром покоя. Более того, в последней она была наиболее высокой. При дозе 400 рад сглаживалось характерное для зоны центра покоя снижение пролиферативной активности и наблюдалось постепенное уменьшение этой величины с 83 до 77% с продвижением от апикальной к базальной части меристемы. При дозе 800 рад в зоне с центром покоя, напротив, отмечалось резкое увеличение количества пролиферирующих клеток.

Таблица 33

Влияние γ -облучения на продолжительность митотического цикла (7) и отдельных его фаз в клетках коры и центрального цилиндра меристемы корня гороха

Зона корня	N_1 , %	N_2 , %	C , %	P , %	M_i , %	T , ч
Без облучения						
Кора	48,7 \pm 3,1	54,3 \pm 2,6	5,6	96,8 \pm 1,4	8,2 \pm 0,2	18,5
Центральный цилиндр	49,8 \pm 2,5	56,4 \pm 3,2	6,2	95,4 \pm 2,4	8,0 \pm 0,2	16,9
Облучение в дозе 400 рад						
Кора	37,5 \pm 2,8	42,9 \pm 3,0	5,4	85,5 \pm 2,2	6,2 \pm 0,2	21,7
Центральный цилиндр	33,2 \pm 1,7	39,1 \pm 1,9	5,9	78,6 \pm 2,0	6,1 \pm 0,3	21,6
Облучение в дозе 800 рад						
Кора	32,7 \pm 2,1	38,1 \pm 2,3	5,4	79,5 \pm 3,2	5,0 \pm 0,3	23,3
Центральный цилиндр	25,9 \pm 1,7	31,7 \pm 2,4	5,8	67,3 \pm 3,7	4,4 \pm 0,2	25,6
Зона корня	Длительность фаз, ч					
	S	M	G_1	G_2		
Кора	8,8	1,6	3,0	5,1		
Центральный цилиндр	8,3	1,4	3,0	4,2		
Кора	9,0	1,6	3,0	8,1		
Центральный цилиндр	8,6	1,7	3,0	8,3		
Кора	9,1	1,5	3,0	9,7		
Центральный цилиндр	9,4	1,7	3,0	11,5		

800 рад уменьшение продолжительности цикла и всех фаз в зоне центрального цилиндра было выражено более четко, чем в зоне коры.

Как видим, при облучении проростков радиацией происходит неодинаковое повреждение различных зон меристемы, о чем свидетельствует различная степень увеличения митотического цикла и его фаз отдельных групп клеток. Так, если в необлученном

При определении продолжительности цикла и отдельных его фаз в коре и центральном цилиндре (табл. 33) было отмечено лишь некоторое уменьшение всех этих параметров в последнем. При облучении проростков в дозе 400 рад при некотором увеличении продолжительности фаз цикла происходило выравнивание их в обеих зонах. При дозе

800 рад уменьшение продолжительности цикла и всех фаз в зоне центрального цилиндра было выражено более четко, чем в зоне коры.

контроле минимальная длительность цикла наблюдалась в апикальной зоне меристемы и была почти в 1,7 раза меньше таковой клеток базальной зоны, то при облучении в дозе 400 *рад* и общем увеличении продолжительности цикла во всех зонах они практически выравнивались, а при дозе 800 *рад* длительность цикла клеток апикальной зоны почти на 7 ч превосходила длительность цикла базальных.

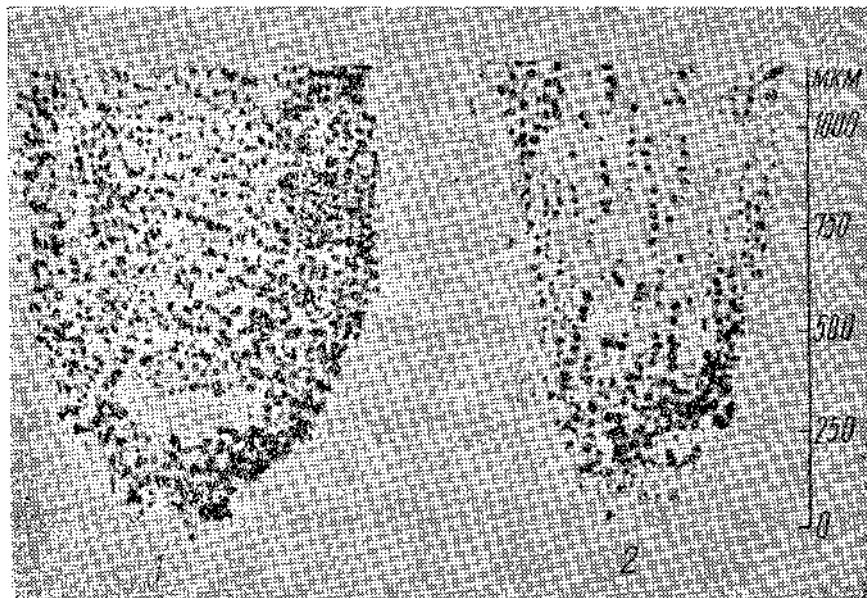


Рис. 52. Радиоавтографы меристемы корня необлученного (1) и облученного в дозе 800 *рад* (2) проростков гороха. Экспозиция в ^{3}H -тимидине в течение 24 ч через сутки после облучения. Срезы не окрашены, $\times 200$.

По всей вероятности, клетки этой зоны, характеризующиеся самой высокой пролиферативной активностью, в наибольшей степени повреждаются радиацией.

Напротив, длительность цикла в зоне, к которой принадлежит центр покоя, практически не изменилась. Увеличение пролиферативной и митотической активности в этой части меристемы при облучении свидетельствует о том, что определенная группа ее клеток (несомненно, это клетки центра покоя) отличается высокой радиоустойчивостью. При гибели части активно делящихся клеток они начинают пролиферировать, обусловливая стабильность деятельности меристемы в этой зоне. На рис. 52 приведены радиоавтографы меристемы корня в норме и при облучении. Как видим, на контрольном автографе четко выделяется зона центров покоя, в которой можно насчитать до 1—1,5 тысяч клеток (1—1,5% клеток всей меристемы). При облучении проростков в дозе 800 *рад* и

потере способности к делению у значительного числа клеток, обнаружить центр покоя через 24 ч после облучения (плюс 24 ч экспозиции на ^3H -тимидине) не удавалось. Напротив, в предполагаемой зоне наблюдали большее по сравнению с другими количество клеток, включающих изотоп, т. е. сохранивших способность к делению. И хотя в остальной части меристемы длительность цикла увеличивалась примерно в равной степени (особенно четко это видно из данных табл. 33), чем более коротким был митотический цикл в норме, тем в большей степени происходило увеличение его длительности при облучении. В наименьшей степени длительность цикла изменялась в базальной части меристемы, где в норме она была наибольшей.

При изменении продолжительности митотического цикла как по различным зонам меристемы, так и при различных дозах облучения от 12,7 до 31,3 ч продолжительность G_2 -фазы оставалась постоянной, митоза — колебалась в пределах от 1,3 до 2,2 ч и S -фазы — от 6 до 10,7 ч. Продолжительность же G_1 -фазы в норме изменялась от 3,4 до 8,3 и при облучении до 15,7 ч. Трудно понять, почему при относительной стабильности продолжительности фазы синтеза ДНК требуется столь разное время для ее подготовки. Вполне возможно, что определенную часть митотического цикла, которая авторадиографически идентифицируется как G_1 -фаза и у клеток центра покоя может достигать нескольких десятков и даже сотен часов [17], составляют клетки, находящиеся вне митотического цикла, в так называемой G_0 -фазе. Мы разделяем мнение Буллоу [14] о том, что клетка после завершения очередного деления не сразу приступает к подготовке следующего. Этому может предшествовать период («фаза выбора пути» по Буллоу), в течение которого решается участок клетки: деление или дифференциация. По всей вероятности, участок клеток апикальной зоны меристемы — инициалей и первых их производных однозначна — деление и G_0 -фаза («дигофаза» по Буллоу) у них отсутствует либо очень кратка, и, разделившись, клетка сразу же вступает в пресинтетическую фазу. Именно поэтому продолжительность G_1 -фазы в клетках этой зоны весьма незначительна. С приближением клеток к базальной части меристемы возрастает вероятность их ухода в зону растяжения и дифференциации, что сопровождается увеличением продолжительности дигофазы, приводящим к увеличению длительности периода, определяемого как G_1 -фаза.

Геном клеток, находящихся в G_0 -фазе, которая нередко олицетворяется с фазой покоя, по всей вероятности, зарепрессирован, в связи с чем они могут обладать высокой радиустойчивостью. Не исключено также, что клетки с более продолжительной пресинтетической фазой успевают более полно репарировать повреждение молекул ДНК до вступления клеток в фазу репликации. Именно вследствие этого клетки меристемы, отличающиеся более продолжительным по сравнению с другими митотическим циклом, повреждаются радиацией в меньшей степени.

Таким образом, в меристематической ткани существует сложная организация гетерогенных субпопуляций клеток, с различной продолжительностью митотического цикла и радиоустойчивостью. Такая гетерогенность определяется положением клеток в меристеме и является результатом взаимодействия между клетками как отдельных зон самой меристемы, так и клеток зоны растяжения. Несомненно, она влияет на радиоустойчивость всей меристемы и вносит определенные поправки в процессы репопуляции. Особая роль в данном случае принадлежит клеткам центра покоя, обладающим чрезвычайно продолжительным митотическим циклом и наиболее высокой радиоустойчивостью.

КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК, НЕОБХОДИМОЕ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕРИСТЕМЫ

При анализе кинетики размножения клеток растущей части корня в пострадиационный период мы отмечали [6], что количество клеток в меристеме уже через 24—48 ч после облучения достигает минимального значения, но затем при нелетальных дозах радиации начинает быстро увеличиваться и через несколько суток восстанавливается до первоначального уровня. При облучении в летальных дозах количество меристематических клеток прогрессивно уменьшается и быстро достигает постоянного минимального значения, определяющегося количеством мумифицированных клеток у кончика корня, которые по каким-то причинам не переходят в зону растяжения и не лизируют. По-видимому, можно считать, что количество меристематических клеток в данной ситуации равно нулю.

Наряду с уменьшением общего количества меристематических клеток мы отмечали также снижение их репродуктивной способности. Об этом свидетельствовало уменьшение величины пролиферативного пула, который также достигал минимума через 24—48 ч после облучения, но затем восстанавливался до уровня нормы.

Механизмы такого поведения меристематических клеток в облученных корнях понятны, и они подробно обсуждались нами в упомянутой работе. Очевидно, для обеспечения нормального роста корня меристема должна обладать определенным количеством клеток, обладающих способностью делиться. При гибели либо потере способности к делению части клеток в результате повреждения радиацией оставшиеся неповрежденными и восстановившие способность к делению клетки начинают активно делиться, стремясь восстановить нормальный объем меристемы. Об этом свидетельствовало резкое увеличение скорости деления в пострадиационный период.

Не вызывает, однако, сомнений, что для обеспечения восстановления первоначального объема в меристеме должно сохраняться неповрежденным (способных делиться) определенное минимальное количество клеток, которое мы назвали критическим количеством. Мы проводили специальные исследования для определения его по количественному подсчету в меристеме корней облучен-

ных проростков клеток, сохранивших способность к делению. Исследования подобного типа, однако, осложняются тем, что проростки весьма гетерогенны по своей индивидуальной радиоустойчивости, в связи с чем при облучении в одной и той же дозе радиации часть проростков может погибать и количество способных к делению клеток в их меристемах снижаться до нуля, в то время как у другой части клетки меристемы могут репопулировать и меристема восстанавливаться. Исследуя в разные моменты пострадиационного периода различные корни, невозможно получить истинную картину кинетики репопуляции.

В связи с этим мы использовали полулетальные дозы радиации — дозы, при которых в наших опытах на 10-й день после облучения погибало $50 \pm 2\%$ проростков. Эти дозы составили 820 *рад* для 48-часовых проростков гороха и 2030 *рад* для 72-часовых проростков кукурузы. В двух параллельных опытах определяли абсолютное количество меристематических клеток в корнях по методу Брауна [13], а также количество клеток, сохранивших способность к делению (пролиферативный пул). Для каждого определения ежедневно в течение 6 дней пострадиационного периода фиксировали корни 40 проростков. Предварительно проростки по длине корней разделяли на две равные группы: более длинные — предполагалось, что в последующем они выживут, и более короткие — те, которые погибнут. Если в первые два дня после облучения такое разделение носило чисто условный характер, то в дальнейшем различия между этими группами проростков становились очень четкими. Параллельно подсчитывали количество клеток в меристемах проростков, облученных в дозах, ингибирующих прирост корня примерно в два раза (100%-ная выживаемость), и в дозах, полностью летальных. Полученные данные приведены на рис. 53.

Как видим, у обеих культур при всех дозах через сутки после облучения происходило резкое уменьшение объема меристемы и количества пролиферирующих клеток. При облучении в полулетальной дозе на вторые сутки после облучения кривые раздавались, отражая участок выживших и погибших проростков. Одна кривая после достижения определенного минимума поднималась вверх, свидетельствуя об увеличении количества меристематических клеток и восстановлении способности к делению. Вторая отражала уменьшение количества клеток.

В опытах с горохом минимальное количество клеток в меристеме, при котором в дальнейшем было возможно восстановление половины проростков, равно 28—30 тыс., что составляет около 30% общего количества меристематических клеток в норме. Из этого количества около 45—50% клеток включали ^3H -тимидин, т. е. сохраняли способность к делению. Таким образом, критическое количество клеток меристемы гороха, т. е. минимальное, которое необходимо для восстановления, можно определить как 15% объема меристемы в норме. Для меристемы кукурузы это количество, определенное таким же путем, несколько меньше — около 10%.

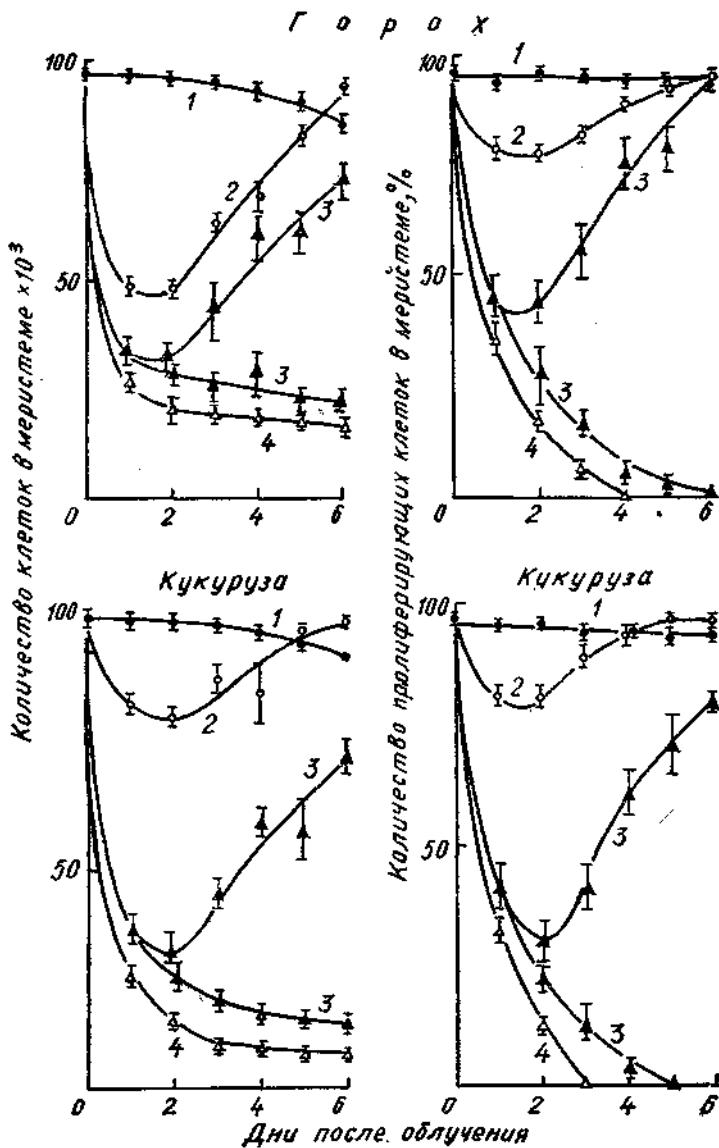


Рис. 53. Кинетика изменения количества меристематических и пролифицирующих клеток в корнях проростков гороха и кукурузы после облучения:

для гороха: 1 — контроль, 2 — 400, 3 — 820, 4 — 1200 рад; для кукурузы: 1 — контроль, 2 — 1000, 3 — 2030, 4 — 2500 рад.

К интерпретации полученных данных можно подойти с двух позиций. С одной стороны, действительно можно предположить, что для восстановления меристемы корня по пути репопуляции необходимо, чтобы не менее 15% клеток у гороха и 10% у кукурузы сохраняли способность к делению. В таком случае, не отрицая возможной роли в пострадиационном восстановлении клеток центра покоя, следует считать, что самостоятельно эти клетки, количество которых не превышает 1—2 тыс., обеспечить восстановление не могут.

С другой стороны, вполне возможно, что механизмы репопуляционного восстановления начинают работать задолго до того, как наступит репродуктивная гибель поврежденных клеток (а она может наступить лишь через несколько делений). Об этом свидетельствует тот факт, что уже через 12 ч после облучения нам удавалось отметить включение ^3H -тимидина отдельными клетками центра покоя. В этом случае процессы опустошения меристемы и репопуляционного замещения могут идти параллельно, и зарегистрировать критическое количество клеток в такой ситуации, по-видимому, невозможно.

Не исключено также, что отмечаемые нами критические уровни клеток, которые составляют 10—12 тыс. клеток у обеих культур и регистрируются на 48-й час после облучения, могут быть производными клеток центра покоя (длительность митотического цикла клеток меристемы корня гороха составляет 16—17 ч, у кукурузы — 13—14 ч). Тем не менее можно заключить, что уменьшение количества клеток ниже отмеченных уровней в меристеме корня проростков гороха и кукурузы через 48 ч после облучения влечет за собой невозможность восстановления меристемы по пути репопуляции и приводит через несколько делений к репродуктивной гибели всех клеток.

Изложенные в данной главе результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что радиоустойчивость и пострадиационное восстановление многоклеточных систем, какие представляют собой меристемы корней высших растений, обусловлены функциональной гетерогенностью их клеток, являющейся следствием асинхронности клеточных делений и различной радиоустойчивости клеток, находящихся на различных фазах митотического цикла. Такая гетерогенность обусловливает неодинаковую повреждаемость клеток при облучении и обеспечивает восстановление образовательной ткани за счет репопуляции клеток, сохранивших способность к делению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М., «Медицина», 1972.
2. Гриф В. Г. О возможности синтеза нуклеиновых кислот и белка при низких температурах. — Цитология, 1966, 8, 5, 659.
3. Гродзинский Д. М., Гудков И. Н. О противолучевом действии актиномицина Д в опытах с растениями. — Радиобиология, 1970, 10, 3, 453.

4. Гродзинский Д. М., Гудков И. Н. Основы защиты растений от лучевого поражения. — В кн.: Фотосинтез, рост и устойчивость растений. Киев, «Наукова думка», 1971, 394.
5. Гудков И. Н. Эффект мощности дозы при облучении семян гороха в различные фазы прорастания. — Радиобиология, 1969, 9, 5, 772.
6. Гудков И. Н. Нарушения митотических циклов и кинетики клеточных популяций при облучении растений. — В кн.: Противолучевая защита и пострадиационное восстановление растений. Киев, «Наукова думка», 1972, 107.
7. Гудков И. Н., Гродзинский Д. М. Кинетика размножения клеток в растущей части корней проростков гороха при γ -облучении. — Радиобиология, 1972, 12, 4, 566.
8. Гудков И. Н., Гродзинский Д. М., Групина С. А. Метод авторадиографии в изучении кинетики клеточных циклов меристем высших растений при гамма-облучении. — Физиол. и биохим. культурн. раст. 1971, 3, 2, 115.
9. Тарасенко Н. Д., Майкевич Г. С. Синхронизация популяции клеток в проростках растений воздействием пониженной температуры и 5-аминоурацилом. — В кн.: Теория химического мутагенеза. М., «Наука», 1971, 55.
10. Vacq Z.-M., Goutier R. Mechanisms of action of sulfur-containing radioprotectors. — In: Recovery and repair mechanisms in radiobiology. Upton, Brookhaven Natl Lab., 1967, 20, 241.
11. Barlow P. W., Macdonald P. D. M. An analysis of the mitotic cell cycle in the root meristem of *Zea mays*. — Proc. R. Soc. Lond. B, 1973, 183, 385.
12. Benbouis M.-C., Levy F., Pagueure C. Méthode de détermination directe de la durée de la période G_1 du cycle cellulaire dans les méristèmes radiculaires. — C. r. Acad. sci., 1971, D 273, 3, 352.
13. Brown R. The effects of temperature on the durations of the different stages of cell division in roottip. — J. Exp. Botany, 1951, 2, 1, 96.
14. Bulloough W. S. Analysis of the life — cycle in mammalian cells. — Nature, 1963, 199, 4896, 859.
15. Bulloough W. S., Rytmoma T. Mitotic homeostasis. — Nature, 1965, 205, 4971, 573.
16. Burholt R., Van't Hof J. Quantitative thermal-induced changes in growth and cell population kinetics of *Helianthus* roots. — Amer. J. Bot., 1971, 58, 5 (1), 386.
17. Clowes F. A. L. The duration of the G_1 phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity. — New phytologist, 1965, 64, 3, 355.
18. Kim J. H., Evans T. C. Effects of X-irradiation on the mitotic cycle of Ehrlich ascites tumor cells. — Radiation Res., 1964, 21, 1, 129.
19. Mazia D. Mitosis and the physiology of cell division. — In: The cell, V. 3. New York — London, Acad. Press, 1961.
20. Torre C. de la, González-Fernández A., Giménez-Martín G. Cell flow and its application to the estimate of cell cycle parameters in meristems. — Biol. Zbl., 1971, 90, 6, 707.

ИЗУЧЕНИЕ РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ ВОДОРОСЛЕЙ

Изучение радиоустойчивости синезеленых водорослей, представляющих собой одну из древнейших филогенетических групп растений, в последнее время привлекает многих исследователей. Вызвано это тем, что синезеленые водоросли обладают очень высокой радиоустойчивостью не только по сравнению с высшими растениями, но и среди многих низших.

Об отношении объекта к излучению судят по характеру падения кривой выживаемости объекта с увеличением дозы облучения. А анализ кривых доза—выживаемость является одним из основных методов исследования природы радиационно-генетического поражения клеток, облученных ионизирующей радиацией. Для таких объектов, как водорослевые клетки, этот метод является фактически единственным, так как использование цитогенетического анализа невозможно.

Как было показано [4, 5], при облучении клеточной популяции водорослей различными дозами гамма-излучения происходит замедление развития популяции, которое выражается в удлинении лаг-фазы, более сжатой во времени фазе логарифмического роста и в пониженном общем количестве биомассы в фазе стационарного роста.

Кинетику роста популяции синезеленых водорослей можно проследить на основе построения кривых роста, которые представляют собой кривую изменения численности популяции во времени. Как и всякая другая популяция, водорослевая популяция при наличии благоприятных условий произрастания проходит три стадии своего развития: лаг-фазу, фазу логарифмического роста и фазу стационарного роста.

Лаг-фаза наблюдается при пересеве клеток культуры на свежую питательную среду. Клетки посевного материала — инокулята приспосабливаются к новым условиям питания на всем протяжении лаг-фазы, и постепенно происходит увеличение темпа размножения клеток, максимум которого находится уже в фазе логарифмического роста. Длительность лаг-фазы зависит от многих причин,

и в первую очередь от количества вносимого инокулята. Для роста клеток в накопительной культуре нужен определенный минимум количества вносимого в свежую среду инокулята для того, чтобы популяция начала расти. Если инокулята будет слишком мало — культура погибнет, если несколько больше — лаг-фаза будет удлинена и развитие популяции замедлено, если же, наоборот, очень много — лаг-фаза может отсутствовать вообще, а развитие популяции ускорится.

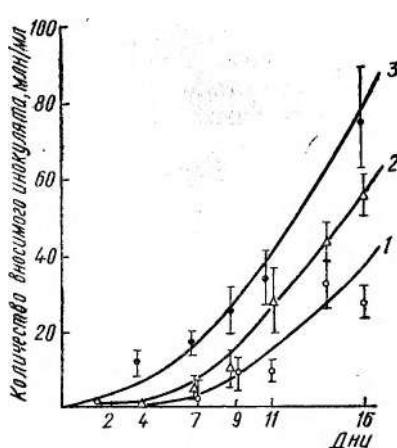


Рис. 54. Зависимость роста популяции *Anacystis nidulans* от количества вносимого инокулята:

1 — 1,0 млн/мл, 2 — 3,5 млн/мл, 3 — 5,0 млн/мл.

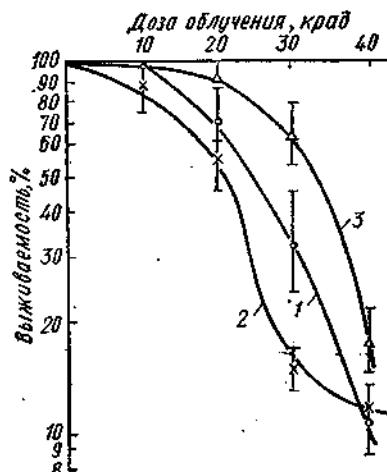


Рис. 55. Кривые доза—выживаемость *Anacystis nidulans* в зависимости от количества вносимого инокулята:

1 — 1,0 млн/мл, 2 — 3,5 млн/мл, 3 — 5,0 млн/мл.

Мы изучали рост популяции синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* при различном количестве вносимого инокулята. Опыт проводили следующим образом. В колбы со 100 мл жидкой питательной среды Фицжеральда № 11 вносили по 1, 3,5 и 5 мл инокулята (сусpenзия клеток плотностью 30 млн. клеток в 1 мл среды). Колбы ставили в стандартные условия выращивания (температура 24—27°, 16 ч освещения и 8 ч темноты); через равные промежутки времени проводился отбор проб для определения плотности сусpenзии на ФЭК-57. Как видно из рис. 54, кривая 3 характеризуется сравнительно небольшой лаг-фазой продолжительностью 3—4 дня, к 16-му дню культивирования водорослей биомасса достигла величины 80 млн. клеток в 1 мл питательной среды. В то же время кривая 1 имеет лаг-фазу продолжительностью в 8—9 дней и биомассу только 40 млн. клеток на 1 мл среды. Кривая 2 занимает промежуточное положение.

В зависимости от условий эксперимента основные параметры кривых доза—выживаемость довольно сильно варьируют. Мы изу-

чили зависимость этих параметров для синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* от количества вносимого в среду инокулята. В колбы со 100 мл жидкой среды вносили различное количество инокулята, ставили в стандартные условия выращивания, через сутки облучали в дозах 10, 20, 30 и 40 крад гамма-радиацией ^{60}Co и снова ставили на 10 дней в те же условия. Затем на ФЭК-57 измеряли плотность культуры во всех вариантах опыта. Полученные данные выражали в процентах по отношению к необлученному контролю и обрабатывали статистически с нахождением среднеквадратичного отклонения и доверительных интервалов. Повторность каждого варианта и самого опыта была трехкратной. Полученные данные представлены на рис. 55. Для всех кривых характерна S-образная форма, но при большем количестве инокулята (кривая 3) появляется больший резистентный участок, кроме того, средняя полулетальная доза значительно больше, чем у кривой 1 (33 вместо 21), а при самой большой дозе облучения — 40 крад и самое большое значение выживших клеток — 1,8%.

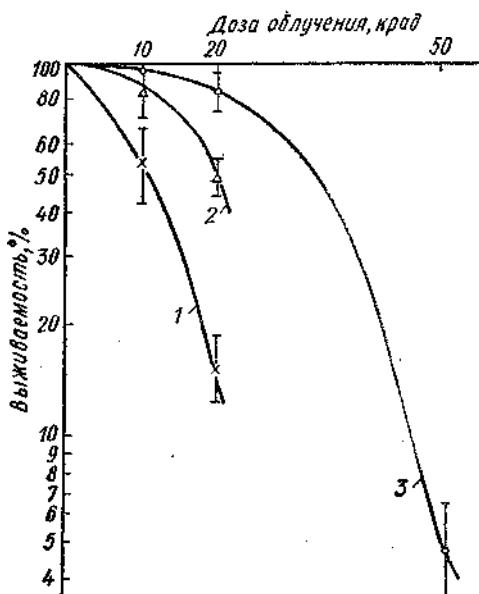


Рис. 56. Кривые доза — выживаемость, построенные в разные сроки после облучения водоросли *Mycrocystis pulvnea*: 1 — 5-й, 2 — 7-й, 3 — 10-й день.

При выращивании накопительной культуры синезеленых водорослей очень важно знать оптимальный срок снятия опыта, так как при раннем сроке не проявляются все особенности культуры. На рис. 56 показаны кривые выживаемости водоросли *Mycrocystis pulvnea*, снятые в разные сроки после облучения. Кривая 1 построена на основании данных о накоплении биомассы водорослей на 5-й день культивирования после облучения, кривая 3 — на 10-й день. Характер кривых сильно различается. Если кривая 1 имеет почти экспоненциальную форму, обусловленную максимальной дозой в 20 крад, при которой еще растут клетки, то у кривой 3 ясно выраженная S-образная форма с большим резистентным участком, и максимально переносимая доза равна 50 крад.

Очевидно, клетки, пораженные большой дозой облучения, требуют довольно продолжительного времени для проявления своей способности к размножению.

Таким образом, внесение различных количеств инокулята в свежую питательную среду играет существенную роль в дальнейшем развитии и поведении популяции как в норме, так и при облучении.

Как уже указывалось, популяции в своем развитии проходят три стадии. Мы провели определение чувствительности популяции к действию гамма-радиации на всех стадиях. Для этого водоросль *Plectonema bogyanum* выращивали в колбах в накопительной куль-

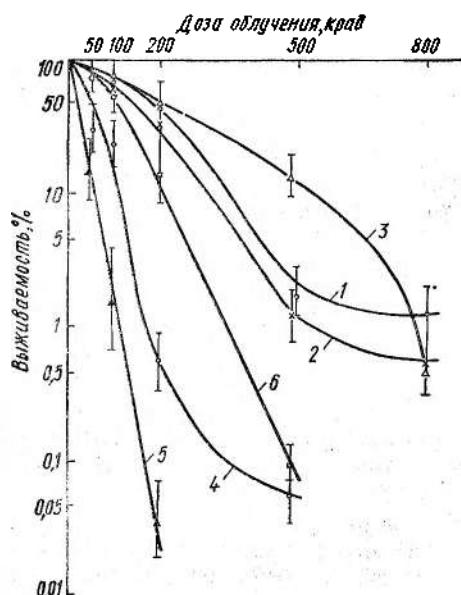


Рис. 57. Кривые доза—выживаемость для различных фаз развития популяции *Plectonema bogyanum*:

1, 4 — лаг-фаза; 2, 5 — фаза логарифмического роста; 3, 6 — фаза стационарного роста.

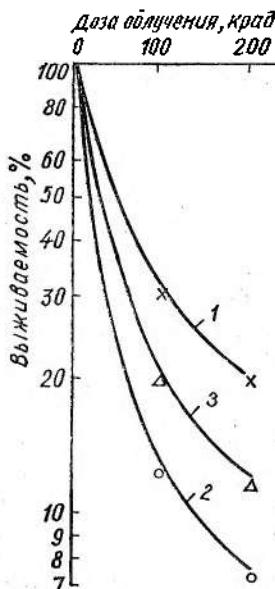


Рис. 58. Кривые доза—выживаемость для разных периодов лаг-фазы у *Plecto петя bogyanum*:

1 — начальный, 2 — промежуточный, 3 — заключительный период лаг-фазы.

туре и по мере прохождения ею определенной стадии развития отбирались образцы для облучения гамма-лучами ^{60}Co в дозах от 50 до 800 крад. После облучения половину проб выращивали до снятия опыта в стандартных условиях, а вторую половину высевали в чашки Петри на агаризованную среду Фишеральда № 11 и тоже помещали в стандартные условия для выращивания макроколоний. Полученные данные представлены на рис. 57. Как уже указывалось [4], рост отдельных клеток и их устойчивость отличаются от роста и устойчивости популяции. Кривые 1, 2, 3 характеризуют чувствительность *Plectonema bogyanum* к облучению при выращивании ее в условиях жидкой среды (популяционный эффект), а кривые 4, 5, 6 — при выращивании на агаризованной среде (поклеточный эффект). Популяция характеризуется большей устойчи-

востью к повреждающему действию облучения, чем отдельные клетки, что, возможно, связано с ослаблением межклеточного взаимодействия. Несмотря на это общие закономерности поведения при облучении у них одни. Так, и в одном и в другом случае самой радиочувствительной фазой развития популяции оказалась фаза логарифмического роста (кривые 2 и 4), что, очевидно, объясняется тем, что в этой фазе максимальный рост и наибольшая скорость деления клеток популяции. Несколько более радиоустойчивой оказалась лаг-фаза (кривые 1 и 4), а самой радиоустойчивой — фаза стационарного роста (кривые 3 и 6). По-видимому, при этой фазе популяция достигает зрелости, в ней наступает примерное равновесие между количеством образующихся и отмирающих клеток, и, очевидно, защитный центр популяции тоже уже вполне сформирован [6].

Более подробно мы изучали лаг-фазу развития популяции *Plectonema bogdanii*, которую условно разбили на три периода и определяли радиоустойчивость ее в каждый из них. Представленные на рис. 58 данные показывают, что самым радиоустойчивым оказался начальный период лаг-фазы. Мы объясняем этот факт тем, что при внесении инокулята в питательную среду кроме других клеток были внесены и клетки защитного центра популяции, которые при облучении обеспечили большую выживаемость популяции. Следующий период лаг-фазы оказался наиболее радиочувствительным, потому что клетки защитного центра для закрепления популяции в новых условиях тоже начинают расти и пополнять фонд активно живущих клеток, которые являются более уязвимыми. И, наконец, последний период, уже переходный к следующей фазе — фазе логарифмического роста. Здесь клетки популяции не только растут, но и делятся, и в силу этого защитный центр пополняется новыми клетками, и радиочувствительность этого периода лаг-фазы несколько увеличивается.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ РАДИОУСТОЙЧИВОСТЬ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

В настоящее время большой интерес представляет использование термофильных организмов как в хозяйственной практике, так и в теоретических исследованиях. Группа термофильных организмов очень интересна с общебиологической точки зрения в связи с тем, что живут и размножаются они в диапазоне температур от 40° до 80°, вызывающих гибель обычных мезофильных микроорганизмов. Кроме того, термофилы обладают очень широкой амплитудой скрытой жизни в условиях низких температур [7, 13]. В процессе приспособления к существованию в необычных условиях выработались специфические особенности организации клеток [11], одной из которых является их ускоренный обмен. При высоких температурах биохимические процессы в клетках протекают очень быстро, клетки энергично делятся, наблюдается хороший рост попу-

ляции, но одновременно происходит быстрое старение и отмирание клеток [18].

Основные исследования, проведенные с термофильными организмами, касаются различных групп, выделенных из природы [3, 12], и очень мало исследований по экспериментальному их получению [18]. По-видимому, термофилы, являясь весьма своеобразными организмами, генетически связаны с мезофилами, и, возможно,

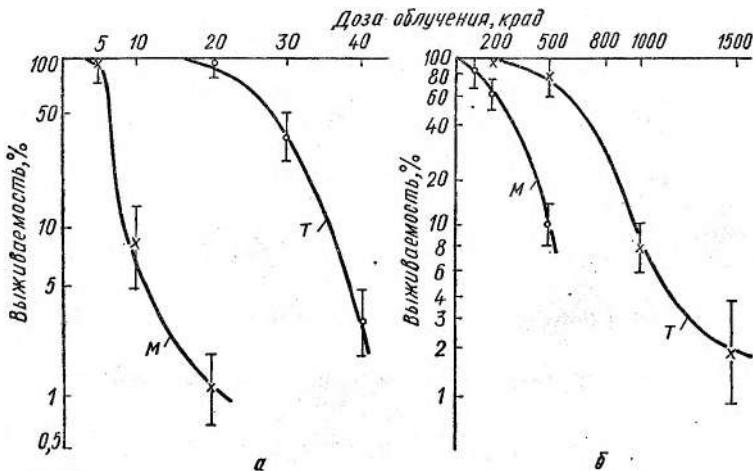


Рис. 59. Кривые доза-эффект для термофильной (T) и мезофильной (M) форм *Anacystis nidulans* (а) и *Plectonema boryanum* (б).

наследственная перестройка их к существованию при высоких температурах происходит очень медленно и требует длительного времени.

При изучении термофильных организмов было замечено, что они характеризуются большей радиорезистентностью к высоким дозам рентгеновых лучей, к некоторым ингибиторам ферментов и другим воздействиям [9, 19]. Нашей задачей было изучение чувствительности к гамма-радиации термофильных форм некоторых синезеленых водорослей. Были выбраны *Anacystis nidulans* и *Plectonema boryanum*. Термофильные формы их любезно предоставил нам Б. В. Громов из коллекции Ленинградского биологического института. Перед облучением клетки водоросли *Anacystis nidulans* выращивали в колбах с жидкой средой Фишжеральда № 11. Взвесь клеток облучали гамма-лучами ^{60}Co в дозах от 5 крад до 1,5 Мрад и после облучения высевали на чашки Петри с агаризованной средой. Чашки помещали в стандартные условия выращивания. По числу выросших макроколоний определяли долю выживших клеток по отношению к выжившим в необлученной пробе. Водоросль *Plectonema boryanum* выращивали в колбах с жидкой средой Фишжеральда № 11 не только до облучения, но и после, а кривые строили на основании нарастания биомассы водорослей, которое определяли

на ФЭК-57. Показателем радиоустойчивости мезофильных и термофильных форм служили кривые доза—эффект. Результаты изучения радиоустойчивости исследованных водорослей представлены на рис. 59. В случае *Anacystis nidulans* (рис. 59, а) у термофильной формы сильно увеличился резистентный участок кривой, что свидетельствует о большой способности популяции к восстановлению от повреждений. Кроме того, средняя полулетальная доза у нее выше примерно в три раза и она способна переносить большую дозу облучения — 40 крад. У *Plectonema boryanum* (рис. 59, б) кривые еще более различны: если для мезофила характерна экспоненциальная форма кривой выживаемости, то для термофила она S-образная. Средняя полулетальная доза для нее больше в 3,5 раза, а некоторые клетки переносят дозу облучения в 1,5 Мрад и способны к размножению.

Таким образом, при сравнительном изучении термофильных и мезофильных форм синезеленых водорослей было обнаружено, что все термофильные формы в несколько раз более радиорезистентны, чем мезофильные. Очевидно, устойчивость к температуре как экстремальному фактору коррелирует с устойчивостью к другому экстремальному фактору — гамма-радиации.

ПРОЦЕССЫ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ У СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Высокая радиоустойчивость синезеленых водорослей к гамма-радиации обусловлена, по-видимому, не только наличием популяционного восстановления, но и существованием эффективных механизмов восстановления индивидуальных клеток. Пострадиационное восстановление — это результат reparации процессов, происходящих во времени в облученной клетке. При пострадиационном восстановлении уже через несколько минут выдерживающая облученной популяции в условиях, задерживающих первое пострадиационное деление, выживаемость ее начинает увеличиваться по сравнению с выживаемостью той части популяции, которая была высажена сразу же после облучения. Для определения кинетики процесса пострадиационного восстановления популяцию облучают, а затем высевают через определенные промежутки времени. Если пострадиационное восстановление имеет место, то уже через 1—2 ч выживаемость облученной популяции начинает увеличиваться, она растет до определенного предела, а затем переходит в стационарное состояние — плато. С повышением дозы облучения уровень плато снижается. Часто фактором, задерживающим размножение клеток, является вода, в которую помещают облученные клетки. Работая с синезелеными водорослями, мы отказались от этого приема, так как клетки, помещенные в воду даже через 5 ч, не показали достоверного роста процесса восстановления, а у клеток, помещенных в привычную питательную среду, но при пониженных температуре и освещении, процент выживших клеток через 5 ч с 10 увеличился до 30%. Для выяснения кинетики процесса

пострадиационного восстановления мы проводили облучение популяции водорослей в питательной среде, затем помещали их в условия пониженной температуры и меньшей интенсивности освещения. Отборы проб для выращивания макроколоний в чашках Петри на агаризованной среде производили сразу же после облучения и через различные промежутки времени. На рис. 60, *a* показан рост восстановления водорослей *Anacystis nidulans* и *Plectonema boryanum*.

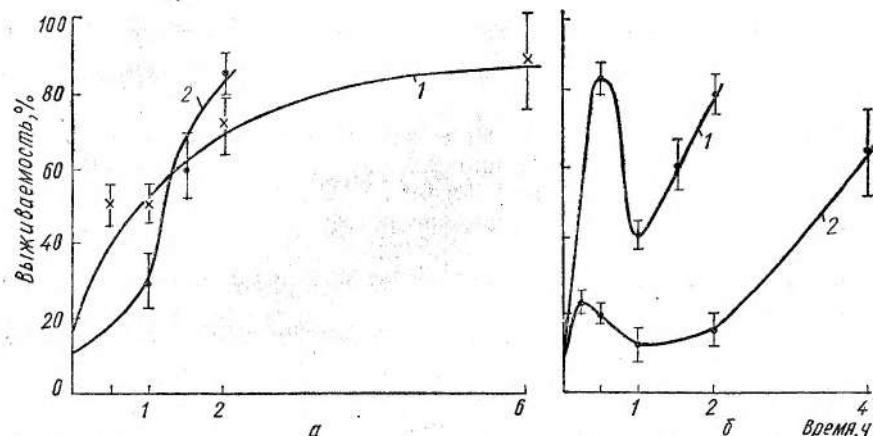


Рис. 60. Кривые роста восстановления водорослей *Anacystis nidulans* (1) и *Plectonema boryanum* (2) при выдерживании их в условиях пострадиационного восстановления (*a*) и при фракционировании дозы облучения (*б*).

пим после гамма-облучения. *Anacystis nidulans* была облучена дозой, вызывающей гибель 83% клеток, через 2 ч выдерживания клеток после облучения процент выживших клеток увеличился до 70%, через 6 ч — почти до 90% и, фактически, кривая вышла на плато. *Plectonema boryanum* характеризуется значительно большей радиостойчивостью к гамма-облучению, чем *Anacystis nidulans*. Вполне возможно, что это связано с большей индивидуальной способностью к восстановлению облученных клеток. Как видно из рис. 60, уже через 2 ч выдерживания клеток этой водоросли в условиях пострадиационного восстановления количество восстановившихся клеток достигло 85%.

Принято считать, что восстанавливаются при выдерживании клеток после однократного облучения летальные повреждения, так как они окончательно формируются не в момент облучения, а значительно позже, в результате взаимодействия сублетальных повреждений. Поскольку полное восстановление всех пораженных клеток невозможно, то количество выживших клеток всегда будет меньше 100%, плато будет идти ниже, причем чем больше доза облучения, тем ниже уровень плато.

Вторым способом изучения процесса восстановления является фракционирование дозы облучения. Различные промежутки вре-

мени между двумя облучениями, во время которых клетки выдерживаются в условиях пострадиационного восстановления, позволяют идти процессам восстановления пораженных клеток. А увеличение выживаемости клеток объясняется исключительно восстановлением сублетально пораженных клеток, выживших после первого облучения. Наличие же плато выживаемости в этом случае объясняется полным восстановлением сублетально пораженных клеток [1, 2, 10].

Нами было проведено фракционирование дозы облучения (LD_{90}) для водорослей *Anacystis nidulans* и *Plectonema boryanum*. Водоросли облучали в жидкой питательной среде, выдерживали различные промежутки времени в условиях восстановления, а затем высевали на агаризованную среду в чашки Петри. По количеству выросших макроколоний строили кривые восстановления, представленные на рис. 60, б. Как и на рис. 60, а, кривая восстановления *Plectonema boryanum* намного опережает кривую восстановления *Anacystis nidulans*. Однако необходимо отметить, что для обеих водорослей характерен большой подъем кривой восстановления в начальные промежутки времени после облучения (до 30 мин), а в последующие 1—1,5 ч наблюдалось угнетение этого процесса. Возможно, это вызвано тем, что первая доза облучения вызывает синхронизацию клеток, а воздействие второй дозой происходит как раз в то время, когда синхронизированные клетки вступили в более радиочувствительную фазу своего развития. В дальнейшем происходит рассинхронизация популяции и процесс восстановления идет обычным путем.

МУТАНТЫ СИНЕЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Существование в клетках водорослей системы восстановления подтверждается получением у них радиочувствительных мутантов. В последнее время много исследований проводится с помощью мутантов синезеленых водорослей [16, 17]. В генетическом отношении, однако, синезеленые водоросли изучены сравнительно слабо. В немногочисленных работах, посвященных изучению устойчивости спонтанных и индуцированных мутантов к различным ядам и антибиотикам (в основном к стрептомицину) [21, 23], было показано, что возвратные мутации происходят чаще, чем прямые, и именно это явление обусловливает высокую генетическую стабильность, присущую синезеленым водорослям, например *Anacystis nidulans* [15, 22]. Большее количество работ посвящено выделению и изучению мутантных линий *Anacystis nidulans* [14, 20, 24], имеющих различную чувствительность к УФ-излучениям. Причем изучаются как радиорезистентные, так и радиочувствительные мутанты. С помощью этих мутантов успешно изучаются репарационные процессы, происходящие в клетках водорослей.

Нами была проведена работа по получению мутантов синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* с различной радиочувстви-

тельностью к гамма-облучению. Для этого использовали два метода. Первый — острое однократное облучение супензии клеток исходного штамма сублетальной дозой 60 крад с последующим выращиванием макроколоний на агаре в стандартных условиях. Выросшие колонии через 10—12 дней переносили для подращивания на свежую агаризованную среду и через 7—10 дней проводили определение их чувствительности к облучению по сравнению с исходным штаммом. Второй метод заключался в многократном последовательном облучении этой же дозой колоний, выросших после предыдущего облучения. В результате были получены мутанты, отличающиеся от исходной формы *Anacystis nidulans* как повышенной радиорезистентностью, так и повышенной радиочувствительностью к гамма-облучению. Для полученных радиорезистентных штаммов форма кривой доза—выживаемость, как правило, S-образная и повторяет форму исходного штамма. Но наклон резистентного участка кривой уменьшается, а плечо его увеличивается. Радиорезистентность клеток этих штаммов увеличилась в 1,2—1,5 раза.

Для радиочувствительных штаммов формы полученных кривых доза — выживаемость не всегда повторяют форму исходного штамма. В большинстве случаев она S-образная с укороченным резистентным участком и различной степенью наклона его. Но иногда встречаются и штаммы с почти экспоненциальной формой кривой. Радиочувствительность клеток полученных радиочувствительных штаммов увеличилась в 1,3—1,8 раза.

При сравнении кривых, представленных на рис. 61, видно, что резистентный участок у радиорезистентного штамма стал больше, хотя форма всей кривой близка к форме кривой исходного штамма. Резистентность на уровне LD_{50} увеличилась в 1,2 раза. Форма дозовой кривой у радиочувствительного штамма, напротив, резко изменилась — стала экспоненциальной, что говорит об увеличении

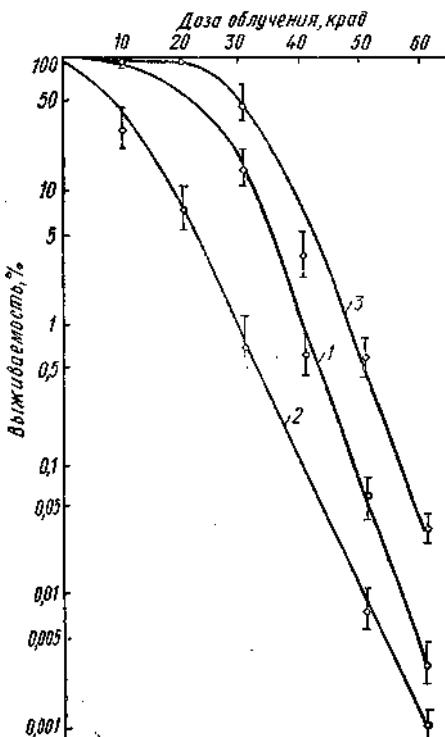


Рис. 61. Кривые доза—выживаемость для исходной формы *Anacystis nidulans* (1) и ее радиочувствительного (2) и радиорезистентного (3) мутантов.

чувствительности популяции, так же, как и величина LD_{90} , которая уменьшилась по сравнению с таковой для исходного штамма в 1,9 раза.

Как уже указывалось, с помощью различных мутантов изучаются репарационные процессы, происходящие в клетках после облучения. Наиболее интересны с этой точки зрения радиочувствительные мутанты, так как снижение чувствительности у клеток, возможно, связано с потерей ими способности к пострадиационному восстановлению.

Исходя из этого допущения, мы провели определение скорости восстановления для полученных радиочувствительных и радиорезистентных штаммов (рис. 62). В результате высева через различные промежутки времени после облучений исходного и полученных штаммов было заме-

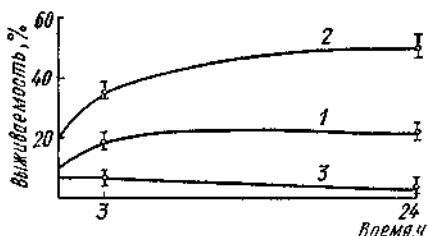


Рис. 62. Кривые роста восстановления мутантных форм *Anacystis nidulans*:

1 — исходная форма, 2 — радиорезистентная, 3 — радиочувствительная.

ченено, что у радиорезистентного облученных клеток происходит достаточно быстро, и к 24 ч восстановившихся клеток у него больше, чем в исходном, в 2,5 раза. Радиочувствительный штамм, как мы и предполагали, ведет себя совершенно одинаково, независимо от времени выдерживания в условиях пострадиационного восстановления, и к 24 ч количество выживших клеток у него такое же, как и количество клеток, полученных при высеве непосредственно после облучения. Следовательно, можно говорить о том, что у этого штамма система восстановления клеток не работает.

Таким образом, у синезеленых водорослей, как и у других организмов, можно получать радиорезистентные и радиочувствительные штаммы, с помощью которых становится возможным изучение механизмов пострадиационного восстановления этих водорослей после γ -облучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков В. С., Малиновский О. В., Митюшова Н. М. К вопросу о природе необратимой компоненты при поражении дрожжей гамма-лучами. — ДАН СССР, 1966, 167, 5, 1162.
2. Барсуков В. С., Малиновский О. В., Митюшова Н. М. О природе пострадиационного восстановления дрожжевых клеток от доминантных леталей при временной задержке размножения. — Генетика, 1966, 4, 136.
3. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Жукова Т. С., Коновалова Е. С. Сравнительное изучение зависимости роста и фитосинтетической продуктивности мезофильного и термофильного штаммов хлореллы от интенсивности света и температуры. — В кн.: Управляемый биосинтез. М., 1966, 93.

4. Голубкова М. Г., Викторова Н. В. Пострадиационное восстановление клеточных популяций. — В кн.: Противоволновая защита и пострадиационное восстановление растений. Киев, «Наукова думка», 1972, 87.
5. Голубкова М. Г., Гродзинский Д. М. Радиочувствительность деякіх синевозелених водоростей. — В кн.: Мат-ли IV з'їзду Укр. бот. товариства. Київ, «Наукова думка», 1969, 102.
6. Гродзинский Д. М., Гудков И. Н. Защита растений от лучевого поражения. М., Атомиздат, 1973.
7. Гусев М. В. Синевозеленые водоросли. — Микробиология, 1961, 30, 6, 1108.
8. Логинова Л. Г., Головачева Р. С., Егорова Л. А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. М., 1968.
9. Лозина-Лозинский Л. К. Устойчивость к различным внешним агентам парамеций, адаптированных к жизни в горячем радиоактивном источнике. — Цитология, 1961, 3, 2, 154.
10. Малиновский О. В., Самойленко Л. М. Форма кривой доза—выживаемость при повторном гамма-облучении дрожжевых клеток. — Цитология, 1971, 13, 9, 1184.
11. Мишустин Е. Н. Термофильные микроорганизмы в природе и практике. М.—Л., 1950.
12. Никитина В. Н. Синевозеленые водоросли некоторых терминальных источников Кавказа. — Вестн. ЛГУ, 1974, 9, 56.
13. Пратт С., Кубин Ш. Ассимиляция и дыхание термофильных синевозеленых водорослей. — Физиол. раст., 1956, 3, 6, 508.
14. Asato Yukio. Isolation and characterization of ultraviolet light-sensitive mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — J. Bacteriol., 1972, 110, 3.
15. Barloy J.-J. Aspect actuels de la génétique des populations. — Sci. progr.— Nature, 1968, 3398, 211.
16. Herdman M., Carr N. G. The isolation and characterization of mutant strains of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — J. Gen. Microbiol., 1972, 70, 213.
17. Herdman M., Dolaney S. F., Carr N. G. A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — J. Gen. Microbiol., 1973, 79, 2, 233.
18. Holton R. W. Isolation, growth and respiration of a thermophilic blue-green algae. — Amer. J. Bot., 1962, 49, 1.
19. Kaney A. R., Dolack M. P. Temperature-sensitive mutants of *Anacystis nidulans*. — Genetics (USA), 1972, 71, 3, 465.
20. Kumar H. D. Effect of radiations on blue-green algae. I. The production and characterization of a strain of *Anacystis nidulans* resistant to ultraviolet radiation. — Ann. Bot., 1963, 27, 108, 723.
21. Sinha B. D., Kumar H. D. Forward and reverse mutation in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Indian J. Exp. Biol., 1972, 10, 5, 397.
22. Sinha B. D., Kumar H. D. Spontaneous and induced mutation frequencies in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Proc. Indian. Nat. Sci. Acad., 1973, 39, 2, B, 143.
23. Van Baalen C. Mutation of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Science, 1965, 149, 70.
24. Zhevner V. D., Schestakov S. V. Studies on the ultraviolet-sensitive mutants of blue-green alga *Synechocystis aquatilis* Sanv. — Arch. Microbiol., 1972, 86, 4, 349.

ГЛАВА VII

МОДИФИКАЦИЯ РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ МНОГОКЛЕТОЧНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА ВИДИМЫМ СВЕТОМ

В радиобиологии растений как разделе частной радиобиологии проявляются и действуют закономерности, общие для любых радиобиологических процессов. Эти закономерности часто значительно проще выявить на растениях, чем на животных. Вместе с тем у растений удается обнаружить такие закономерности, которые невозможно выявить на микроорганизмах, особенно те, которые отличают радиобиологические реакции многоклеточных систем от одноклеточных. По нашему мнению, проблема перенесения данных, полученных на одноклеточных организмах, на многоклеточные организмы представляет для радиобиологии значительный интерес. Изучение реакций растений на действие ионизирующих излучений необходимо не только для развития радиобиологических представлений — в ряде случаев оно оказывается полезным как метод раскрытия общебиологических закономерностей.

По мнению ряда авторов [2, 20, 22], в проблеме радиоустойчивости многоклеточных растений системы популяционного восстановления играют значительную, если не решающую роль в обеспечении радиоустойчивости популяции клеток и многоклеточного организма. Важным вопросом в исследовании природы радиоустойчивости организма является изучение возможностей и способов ее модификации.

МОДИФИКАЦИЯ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ ВИДИМЫМ СВЕТОМ

Возможность модификации радиобиологического эффекта помогает изучать механизмы его развития и обнаруживать пути защиты от действия радиации. В процессах модификации лучевого поражения можно выделить следующие основные уровни: локальный, когда модифицируются результаты повреждения отдельных органелл клетки и их структур, т. е. результат действия отдельных элементарных событий попадания; поклеточный уровень, когда модифицируются последствия всех элементарных событий попадания в

клетке; на популяционном уровне модификация затрагивает состояние клеточной популяции в целом. Если модификация на локальном и клеточном уровнях успешно изучается [13], то проблема модификации на популяционном уровне только начинает разрабатываться.

Целью настоящей работы было исследование модификации радиоустойчивости растений видимым светом, изучение феноменологических особенностей для того, чтобы подойти к изучению механизмов, обеспечивающих радиоустойчивость растений. Для модификации лучевого поражения применяют различные факторы. Физические факторы как модификаторы имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с химическими соединениями. Химические модификаторы лучевого поражения — радиопротекторы и радиосенсибилизаторы обычно токсичны, они нарушают нормальный ход клеточных процессов, оказывая подчас необратимое действие. Физические факторы не имеют такого побочного действия. Физические модифицирующие воздействия — свет различных участков спектра, температура являются древними эволюционными факторами, влияние которых было особенно значительным на ранних этапах эволюции, когда земная поверхность подвергалась повышенному действию солнечной радиации и резким температурным скачкам [2].

Остановимся кратко на феноменологических особенностях и механизмах таких различных фотомодифицирующих воздействий, как фотопрививка [ФР], фотозащита [ФЗ] и фотодинамический эффект [ФДЭ]. Наиболее изученным является механизм ФР [19], который состоит в том, что поражающее действие УФ-излучения может значительно уменьшаться, если УФ-облученные клетки осветить видимым светом. Обнаружен специальный фермент ФР, который ремонтирует УФ-повреждения ДНК. Эффект ФЗ состоит в том, что поражающее действие УФ заметно снижается, если клетки перед облучением осветить видимым светом [18]. ФДЭ — необратимое повреждение видимым светом клеток или организмов в присутствии кислорода, сенсибилизированное красителями [7]. Для описания процесса ФР применяют математические модели: Новика — Сцилларда [23] и модель ФР, предложенную Е. Н. Кабаковым и В. И. Корогодиным [5]. Идеи этих моделей мы использовали при интерпретации полученных нами экспериментальных результатов и поэтому остановимся на них подробнее ниже. Следует подчеркнуть, что описанные механизмы модификации действуют при поражении УФ-излучением. Опубликовано очень мало данных о возможности модификации видимым светом поражения от ионизирующих излучений [17, 15].

НИТЧАТЫЕ ВОДОРОСЛИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОДИФИКАЦИИ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА

Для изучения модификации лучевого поражения видимым светом мы избрали объектом исследования нитчатую синезеленую микроводоросль *Plectonema boryanum* (*P. b.*) [4]. Особи этого простейшего многоклеточного организма представляют собой трихомы — нити, состоящие из цепи клеток (от 1 до 100 и более). За период эволюции синезеленые водоросли, по-видимому, сохранились малоизмененными, несмотря на действие мутагенных факторов, особенно сильных на ранних этапах эволюции. Причины высокой стабильности прокариотов — синезеленых водорослей мало изучены. Возможно, стабильность данного типа отражается в чрезвычайно высокой радиоустойчивости этих организмов [21]. Поэтому изучение природы радиоустойчивости синезеленых водорослей заслуживает, по нашему мнению, особого внимания. Высокая радиоустойчивость синезеленых водорослей может обеспечиваться особой радиоустойчивостью генетического аппарата, функционированием репарирующих систем [14], а также системой популяционного восстановления, высокоэффективной у данного объекта [1]. Следует заметить, что в данной работе термин «популяция» употребляется в широком смысле, для обозначения группы, сформировавшейся в процессе отбора особей данного вида, населяющих определенное местообитание и имеющих сходную наследственность, но с индивидуальными различиями [11] в отличие от определения менделевских популяций [3]. Популяционное восстановление в случае данного объекта проявляется в том, что под действием радиации происходит элиминация наиболее поврежденных трихомов. Восстановление популяции происходит за счет размножения выживших трихомов.

Недавно была опубликована работа Асато [15], в которой описана возможность модификации видимым светом гамма-индивидуированного лучевого поражения одноклеточной синезеленой водоросли *Anacystis nidulans*. Ранее нами [8] были опубликованы данные об эффективной модификации лучевого поражения у *Plectonema boryanum*. Вербин [24] обнаружил у *P. b.* эффективную ФР после облучения УФ, чем подтвердил возможность использования видимого света для модификации лучевого поражения у синезеленых водорослей. Этот эффект мы впоследствии назвали фотомодификацией (ФМ) [9, 10]. Вместе с тем радиобиологические исследования такого простейшего многоклеточного организма, как *P. b.*, позволяют получать данные, характеризующие различие между радиобиологическими реакциями многоклеточных и одноклеточных организмов.

Нами исследованы феноменологические особенности и механизмы модификации лучевого поражения *P. b.* видимым светом [9, 10]. Исследования проводились на нитчатой синезеленой микроводоросли *Plectonema boryanum* (штамм IV 594, коллекция Левина),

полученной от Л. А. Сиренко. Культуру водорослей выращивали на жидкой среде Фицжеральда 11 в люминотермостате при температуре 30° и освещенности 1500 люкс. Длина дня и ночи составляла соответственно 16 и 8 ч. Трихомы *P. b.* представляют собой цепочку из разного числа клеток, что имеет немаловажное значение при оценке выживаемости водоросли. Для облучения использовали культуру, находящуюся в начале логарифмической фазы роста при концентрации клеток 2 млн/мл. Концентрацию клеток определяли по оптической плотности на ФЭК-М. Культуру облучали гамма-радиацией ^{60}Co в дозе 200 крад (ЛД₅₀) при мощности дозы 200—300 рад/сек. В опытах по фотомодификации (ФМ) воздействовали видимым светом до, во время либо после гамма-облучения. Суспензию освещали с помощью лампы накаливания (300 ватт), создавая освещенность на поверхности пробирок с культурой около 16 000 люкс. Для предотвращения нагревания суспензии свет пропускали через водяной фильтр. Спектр действия ФМ изучали, используя набор стеклянных светофильтров. Постоянство интегральной интенсивности света в разных вариантах опыта обеспечивали соответствующим выбором интенсивности и времени освещения. При изучении температурной зависимости ФМ облучение и освещение суспензии производили в терmostатированных условиях в интервале температур от 5 до 45° (± 1). Выживаемость водоросли определяли по методу макроколоний при посеве суспензии в чашки Петри на двуслойный агар внутрь верхнего слоя (плотность агара 0,75%). Чашки Петри помещали на люминостат (освещенность 4000—5000 люкс) и спустя 6—10 дней производили подсчет числа макроколоний. Для исследования изменения состояния трихомов при облучении культуру водоросли наносили на агаре в камеру Фукса — Розенталя и фотографировали трихомы под микроскопом МБИ-6. По фотоснимкам одних и тех же трихомов до и после облучения судили об изменении их состояния. В специальных опытах изучали состав популяции по частоте встречаемости трихомов разной длины, т. е. состоящих из разного числа клеток. Из растущей культуры водорослей на разных этапах роста отбирали пробы и облучали. Суспензию различных вариантов наносили на камеры Фукса — Розенталя и фотографировали. Затем на микрофотоснимках производили обмер трихомов водоросли и подсчет числа клеток в них (не менее 1000 особей на вариант). На основании этих данных были построены частоты встречаемости трихомов водорослей, состоящих из разного числа клеток. В опытах по облучению на твердой среде трихомы, фиксированные в агаре, облучали и после прорацивания подсчитывали число выживших макроколоний. В опытах с лизоцимом изучали выживаемость и способность к ФМ при обработке водоросли препаратом лизоцима «Серва» в различных концентрациях.

**ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ФОТОМОДИФИКАЦИИ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ
У СИНЕЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ *PLECTONEMA BORYANUM***

Представление об эффективности процесса ФМ можно получить, изучая зависимость эффекта от интегральной интенсивности света. С этой целью мы проводили эксперименты, используя два подхода. При первом, поддерживая постоянную интенсивность света (16 000 люкс), изменяли время освещения (рис. 63). Кривая 1 характеризует кинетику ФМ в зависимости от времени воздействия видимого света, начиная с момента, когда было начато гамма-облучение и после него.

Как видно, с увеличением интегральной интенсивности

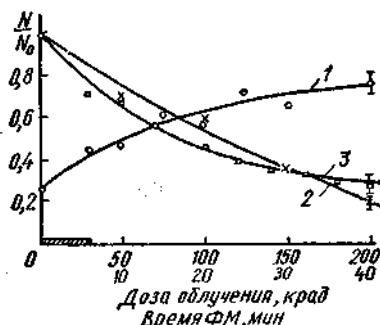


Рис. 63. Зависимость выживаемости от времени освещения (1), дозы (2), а также зависимость относительной эффективной дозы от времени освещения (3). Заштрихованная полоса — время гамма-облучения.

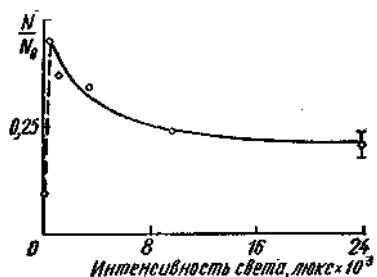


Рис. 64. Зависимость выживаемости от интенсивности освещения (время освещения 20 мин).

света выживаемость водоросли увеличивается и, достигая максимального уровня, выходит на плато, которое ниже уровня выживаемости необлученного контроля. Последнее обстоятельство говорит о наличии необратимого компонента лучевого поражения. Отметим, что наблюдаемая нами ФМ является процессом более быстрым, чем ФР; она полностью завершается за 60 мин, в то время как ФР у данного объекта завершается за 20 ч [24]. Форма кривой кинетики ФМ и наличие плато характерны также для кривой ФР [5], т. е. для процесса восстановления по типу уменьшения эффективной дозы (модель Новика — Сцилларда [23]), которая описывается уравнением

$$D_t^* = \frac{D_t}{D_0} = K + (1 - K) e^{-Bt}$$

где D_0 — доза гамма-облучения, D_t — эффективная доза, которой соответствует выживаемость после времени восстановления t , K — необратимый компонент лучевого поражения, B — скорость восстановления, D_t^* — относительная эффективная доза.

Условно применим данную модель к описанию процесса ФМ. Обработка кривой ФМ (рис. 63, 1) дает следующие параметры модели: скорость ФМ — $B = 0,07 \text{ мин}^{-1} = 4,2 \text{ ч}^{-1}$, а необратимый компонент ФМ — $K = 0,3$.

При втором подходе варьировали интегральную интенсивность света, сохраняя неизменной экспозицию. Как видно из рис. 64, в области малой интенсивности света с возрастанием ее до 2 000

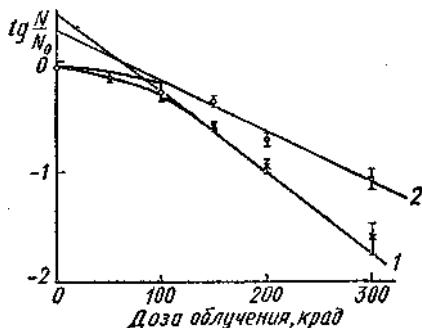


Рис. 65. Зависимость выживаемости синезеленой водоросли *Plectonema boryanum* от дозы гамма-радиации в темноте (1) и на свету (2).

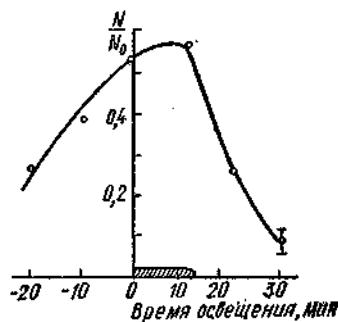


Рис. 66. Влияние позиции светового воздействия (20 мин) относительно периода гамма-облучения на выживаемость водоросли. «0» — начало гамма-облучения, заштрихованная полоса — время гамма-облучения в дозе 200 крад.

мукс наблюдалось резкое увеличение выживаемости, однако с дальнейшим ростом интенсивности света выживаемость плавно уменьшалась, достигая некоторого постоянного уровня, который расположен выше уровня выживаемости водорослей, облученных в темноте. Изменение интенсивности света не влияло на выживаемость необлученного контроля. Выявленный характер кинетики свидетельствует о наложении, по крайней мере, двух эффектов, один из которых является положительной ФМ, а другой представляет собой отрицательную ФМ.

Для понимания сущности эффекта ФМ многое дают радиобиологические характеристики процесса (рис. 65). Фактор уменьшения дозы (ФУД) для ФМ составляет 1,5. Сектор ФМ, равный 1—1/ФУД, по нашим данным, составил 0,4. Экстраполяционное число в случае ФМ — 2, для темновой выживаемости — 3. Полученные данные говорят о высокой эффективности процесса ФМ.

Ряд экспериментов был посвящен изучению оптимальных условий для наблюдения эффекта ФМ. В частности, исследовали, в какой момент времени следует воздействовать светом до, во время или после гамма-облучения, чтобы ФМ была максимальной. Результаты эксперимента приведены на рис. 66. Освещение начинали в определенный момент времени, указанный на графике, и продолжали в течение 20 мин. Как видно, ФМ наиболее существенная в том случае, когда действие света захватило период гамма-облуче-

ния. ФМ при воздействии света до, а особенно после гамма-облучения была неэффективной. Эти данные говорят о том, что необратимый компонент ФМ формируется непосредственно во время действия радиации. Видимо, при облучении возникают состояния

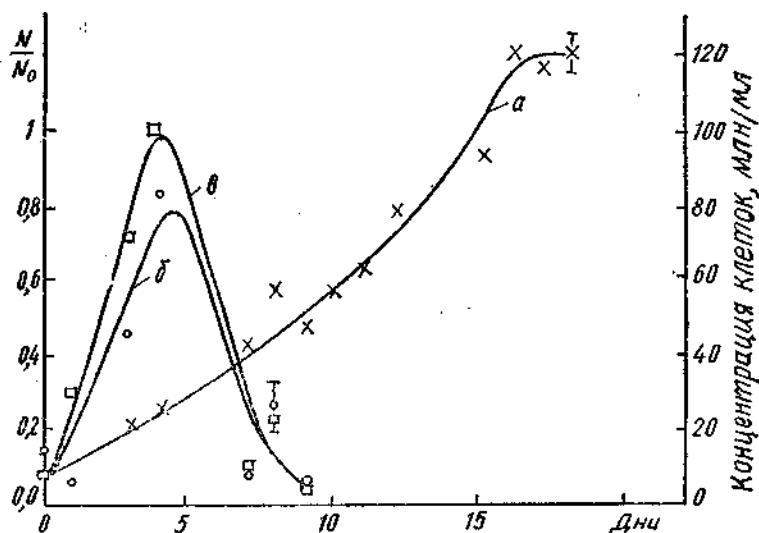


Рис. 67. Кинетика роста культуры (a), зависимость темновой выживаемости (b) и выживаемости после ФМ от возраста облучаемой культуры (g).

клеток или трихомов водоросли, которые могут быть фотомодифицированы, но могут и утрачивать эту способность.

Для выбора оптимальных условий ФМ необходимо знать, будет ли возраст культуры и связанное с ним физиологическое состояние объекта влиять на ход ФМ. В связи с этим мы изучали темновую выживаемость и способность к ФМ у культуры разного возраста (рис. 67). Выживаемость к ФМ оказалась наибольшей на 4—5-й день роста, что соответствует началу логарифмической фазы роста культуры. Поэтому все опыты проводили на культуре 4—5-дневного возраста.

Рис. 68. Зависимость выживаемости от температуры во время гамма-облучения в темноте (1) и на свету (2).

Мы изучали в условиях оптимальной ФМ спектр действия этого эффекта и обнаружили достоверный максимум в синей области спектра (340—400 нм). Небезынтересно, что максимум ФР у *P. b.* также имеет место в синей области спектра [24].

На рис. 68 приведены данные о зависимости эффекта ФМ и выживаемости в темноте от температуры. Выживаемость в темноте мало зависит от температуры в момент облучения. В диапазоне от 5 до 45° температурный коэффициент для нее составляет всего 1,1 (Q_{10}). При ФМ с повышением температуры от 5 до 16° выживаемость незначительно возрастила ($Q_{10} = 1,2$); при дальнейшем повышении температуры от 16 до 45° имел место резкий спад выживаемости, свидетельствующий о потере водорослями способности к ФМ. По нисходящему участку кривой можно оценить энергию активации перехода фотомодифицируемого состояния трихома в нефотомодифицируемое, которая составляет весьма скромную величину ($E = 7$ ккал/моль).

Таковы феноменологические особенности эффекта ФМ. Сравнивая ФМ с такими известными механизмами модификации лучевого поражения видимым светом, как ФР, ФЗ и ФДЭ [7], можно сделать вывод, что эффект ФМ нельзя свести ни к одному из них.

МЕХАНИЗМ ФОТОМОДИФИКАЦИИ ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ СИНЕЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ *PLECTONEMA BORYANUM*

Для объяснения наблюдаемого эффекта мы выдвигали гипотезу фрагментации трихомов, сущность которой состоит в допущении, что при действии радиации и света возникают «метастабильные» состояния трихомов, которые могут распадаться на жизнеспособные фрагменты, причем свет способствует этому. Вместе с тем трихомы могут утрачивать способность к фрагментации. Возникающие фрагменты могут сформировать отдельные макроколонии. Гипотеза фрагментации трихомов предполагает существование популяционного механизма ФМ. В соответствии с гипотезой должна существовать связь между выживаемостью водоросли при облучении в темноте и способностью к ФМ. Для проверки этого предположения мы изучали темновую выживаемость после облучения в дозе 200 крад и способность к ФМ при разных мощностях дозы (рис. 69). С возрастанием мощности дозы темновая выживаемость уменьшалась, выживаемость же варианта при максимальной ФМ практически не зависела от мощности дозы. Видимо, система ФМ дополняет своим действием то, что не успевает завершить темновая система обеспечения радиоустойчивости, действующая непосредственно во время гамма-облучения. Связь системы темновой модификации (ТМ) и ФМ представляется нам достаточно четко наметившейся. Эти данные хорошо согласуются с гипотезой фрагментации трихомов. Для наблюдаемого процесса ТМ мы считаем возможным применить модель, предложенную В. Г. Петиным [12] для описания процесса восстановления дрожжей, происходящего во время облучения и зависящего от мощности дозы. Модель В. Г. Петина представляет собой видоизмененную модель Новика — Сцилларда (модель уменьшения эффективной дозы) для случая, когда восстановление

происходит во время облучения, т. е. зависит от мощности дозы и описывается уравнением

$$D_t = (1 - K) \frac{I}{b} [1 - e^{-bt}] + KIt,$$

где I — мощность дозы, t — время гамма-облучения, K — необратимый компонент ТМ, b — скорость ТМ, $I \cdot t = D_0$ — доза гамма-облучения, D_t — эффективная доза, которой соответствует выжи-

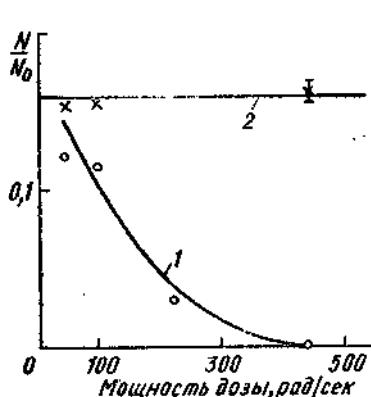


Рис. 69. Влияние мощности дозы гамма-радиации на выживаемость водоросли при облучении в темноте (1) и на свету (2).

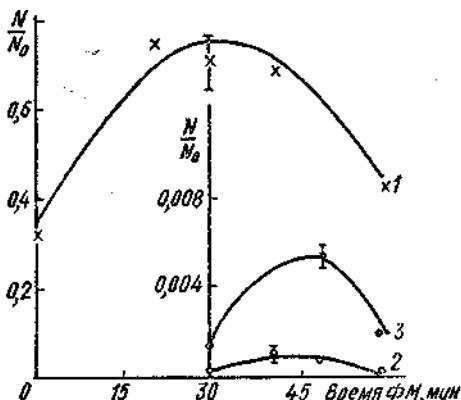


Рис. 70. Кинетика ФМ при гамма-облучении в дозе 250 крад (1) и 500 крад (2). Повторная ФМ после облучения второй дозой 250 крад (3).

ваемость после t -времени ТМ. Применение этой модели к нашим данным дает такие параметры ТМ: $k = 0,45$; $b = 0,5 \text{ ч}^{-1}$. ТМ менее эффективна, чем ФМ.

Согласно гипотезе, возникновение фрагментов трихомов при облучении должно изменять радиочувствительность популяции во время облучения и ФМ, так как способность к фрагментации, видимо, постепенно уменьшается. Для проверки этого предположения мы применили метод повторной ФМ. Если популяционное замещение по механизму фрагментации трихомов играет значительную роль в ФМ, то повторная ФМ в максимуме первой ФМ должна быть мало эффективной. Полученные данные (рис. 70) показывают, что после максимальной первой ФМ резко, примерно на два порядка, убывает радиоустойчивость водоросли к повторному облучению, а также уменьшается способность к повторной ФМ, т. е. резко увеличивается необратимый компонент ФМ. Видимо, в период максимума первой ФМ популяция приходит в состояние высокой радиочувствительности. Можно предположить, что при этом происходит сильная фрагментация трихомов, что резко повышает радиочувствительность водоросли к повторному облучению и снижает ее способность к ФМ. Изложенные выше факты полностью объясняются гипотезой фрагментации трихомов.

Мы провели ряд специальных экспериментов для изучения фрагментации трихомов. Для этого фиксированные на агаре в камере Фукса — Розенталя трихомы облучали и фотографировали под микроскопом. На микрофотографиях (рис. 71) видно, что спустя сутки появились фрагменты трихомов. Следовательно, под влиянием гамма-облучения трихомы действительно фрагментируются. Естественная фрагментация трихомов вследствие размножения (контроль) происходила значительно позже — на 6—8-день роста.

Результаты исследования частоты встречаемости трихомов разной длины в популяции водоросли представлены на рис. 72. На второй день роста (рис. 72, а) трихомы укорочены, и число одиночных клеток в популяции увеличено. Различия между световыми и темновыми вариантами, а также ФМ выживаемости не наблюдалось. На четвертый день роста (рис. 72, б) трихомы удлинились, число одиночных клеток уменьшилось. Различия вариантов, которые видны только в числе одиночных клеток, показывают, что гамма-облучение на свету заметно увеличивает число одиночных клеток по сравнению со световым контролем. В этом случае в популяции наблюдалась эффективная ФМ. На седьмой день роста (рис. 72, в)

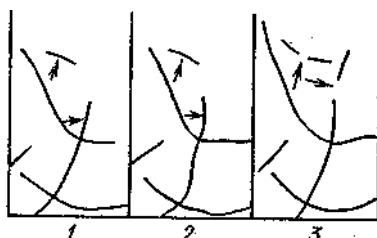


Рис. 71. Состояние трихомов водоросли (указанных стрелками) накануне (1), сразу после облучения (2) и на следующий день (3).

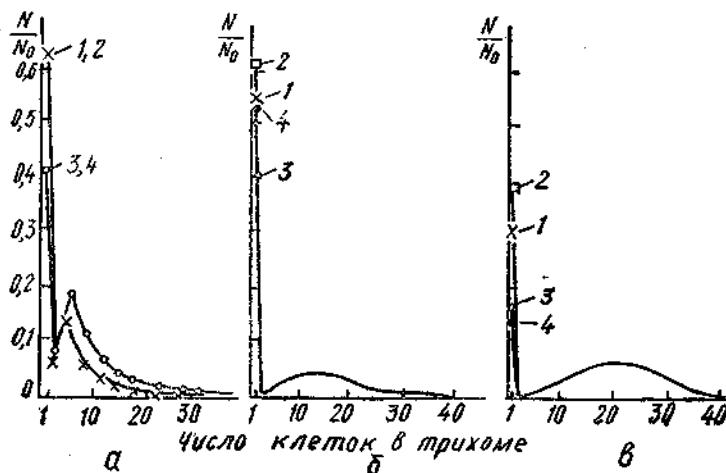


Рис. 72. Кривые частоты встречаемости трихомов водоросли с разным числом клеток в нити на 2-й (а), 4-й (б) и на 7-й (в) день роста культуры:

1 — облучение в темноте, 2 — облучение на свету, 3 — контроль на свету, 4 — контроль в темноте.

происходило дальнейшее удлинение трихомов популяции и уменьшение числа одиночных клеток. Свет и радиация способствовали увеличению числа одиночных клеток в составе популяции. Наблюдалась эффективная ФМ. Таким образом, свет и радиация заметно влияют на структуру популяции, вызывая увеличение числа коротких фрагментов и одиночных клеток. Данные являются прямым подтверждением гипотезы фрагментации трихомов.

Поскольку число макроколоний, возникающих от фрагментов трихомов, должно зависеть от плотности агара, этим можно воспользоваться для оценки вклада фрагментации трихомов в ФМ и радиоустойчивость водоросли. В специальных экспериментах мы изучали влияние плотности агара на способность к ФМ культуры, облучаемой на твердой среде. С увеличением плотности агара радиоустойчивость водоросли уменьшалась. При облучении на плотном агаре (0,75, 1, 1,5%) ФМ не наблюдалась. Только при плотности агара 0,5% наблюдали заметную ФМ, которая составляла 30% ФМ, регистрируемой у этой же культуры, облученной в жидкой супензии

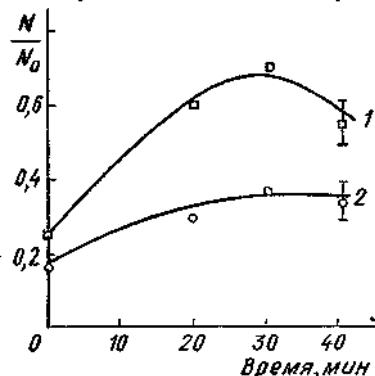


Рис. 73. Кинетика ФМ при облучении супензии водоросли (1) и при облучении водоросли на твердом агаре (0,5%) (2).

(рис. 73). Вероятно, плотный агар, препятствуя расхождению фрагментов, влияет на выживаемость водоросли при облучении в темноте и снижает ее способность к ФМ.

Известно, что обработка лизоцимом лишает клетки синезеленых водорослей оболочки [16]. Возможно, при этом повышается вероятность образования фрагментов трихомов. В связи с этим мы использовали лизоцим в различных концентрациях как фрагментирующий фактор. Из рис. 74 видно, что лизоцим имитирует эффект ФМ. Фотомодификация проявлялась при малых концентрациях лизоцима, при высоких концентрациях она оказалась неэффективной.

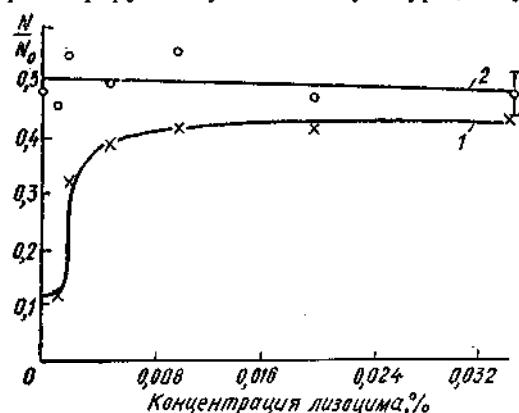


Рис. 74. Зависимость выживаемости водоросли при обработке супензии различными концентрациями лизоцима после облучения в дозе 250 крад в темноте (1) и при максимальной ФМ (2).

тирующий фактор. Из рис. 74 видно, что лизоцим имитирует эффект ФМ. Фотомодификация проявлялась при малых концентрациях лизоцима, при высоких концентрациях она оказалась неэффективной.

Таким образом, видимый свет и лизоцим при действии гамма-радиации и света конкурируют друг с другом за влияние на радиоустойчивость нитчатой синезеленой водоросли *Plectonema boryanum*.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФОТОМОДИФИКАЦИИ

Полученные нами данные позволяют считать, что эффект популяционного замещения, видимо, играет основную роль в обеспечении радиоустойчивости *Plectonema boryanum* и в эффекте ФМ. Наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим радиоустойчивость популяции и ее способность к ФМ, является индуцируемая гамма-радиацией и светом способность к образованию жизнеспособных фрагментов трихомов. На основании полученных данных, используя модели Новика — Сцилларда, В. Г. Петина и В. И. Корогодина, мы построили математическую модель ФМ и ТМ по механизму фрагментации трихомов. В модели предполагается, что гамма-индуцированные метастабильные состояния трихомов могут на свету с вероятностью P_4 фрагментироваться на M -жизнеспособных фрагментов и с вероятностью P_3 утратить эту способность к фрагментации. Проведенная нами формализация этих предположений дает такую формулу для эффективной дозы после t -времени ФМ:

$$D_t^{\text{ФМ}} = \left\{ \frac{n(P_2 + P_4)I}{(b + B)^2} (1 - e^{-(b + B)t_0}) + \right. \\ \left. + \left(1 - \frac{n(P_2 + P_4)}{b + B}\right) D_0 \right\} [K + (1 - K) \cdot e^{-B(t - t_0)}],$$

где: $D_t^{\text{ФМ}}$ — эффективная доза после t -времени ФМ; n — число фрагментов, приходящихся на один выживший трихом при ФМ во время облучения; D_0 — доза облучения; P_1 — вероятность фрагментации трихома при облучении в темноте; P_2 — вероятность утратить эту способность; P_3 — вероятность фрагментации во время ФМ; P_4 — вероятность утратить эту способность; $b = P_1 + P_2$ — скорость ТМ; $B = P_3 + P_4$ — скорость ФМ; $K = 1 - mP_4(P_3 + P_4)$ — необратимый компонент ФМ; m — то же самое во время ФМ в пострадиационный период; t_0 — время гамма-облучения; I — мощность дозы. Выражение в фигурных скобках представляет собой эффективную дозу, полученную в результате ТМ и ФМ за время гамма-облучения. Ниже представлены основные параметры ТМ и ФМ после обработки экспериментальных данных с позиций этой модели:

Темновая модификация

$$\begin{aligned} P_1 &= 0,3 \text{ ч}^{-1} \\ P_2 &= 0,2 \text{ ч}^{-1} \\ K &= 0,45 \\ b &= 0,5 \text{ ч}^{-1} \\ \text{ФУД} &= 2,2 \end{aligned}$$

Фотомодификация

$$\begin{aligned} P_3 &= 2,1 \text{ ч}^{-1} \\ P_4 &= 2,1 \text{ ч}^{-1} \\ K &= 0,3 \\ B &= 4,2 \text{ ч}^{-1} \\ \text{ФУД} &= 3,3 \end{aligned}$$

ФУД, ТМ и ФМ рассчитаны для популяции, полностью лишенной способности к фрагментации, и характеризуют скрытую эффективность процесса фрагментации трихомов.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ РЕПОПУЛЯЦИИ ПО МЕХАНИЗМУ ФРАГМЕНТАЦИИ В РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Изучение эффекта ФМ у *Plectonema boryanum* позволило обнаружить важную роль популяционного механизма — фрагментации трихомов в обеспечении ее радиоустойчивости на свету и в темноте. Оказалось, что простейший многоклеточный организм — синезеленая водоросль обладает быстрой и эффективной системой обеспечения радиоустойчивости. Возможно, подобные механизмы есть у многих биологических объектов. Фрагментация — способность многоклеточной биологической системы и популяции делиться функционально или морфологически на жизнеспособные подсистемы, гетерогенные по радиочувствительности, и с помощью этой гетерогенности резко увеличивать радиоустойчивость организма или популяции является, вероятно, достаточно универсальным способом защиты многоклеточного организма и популяции от действия экстремальных факторов, в том числе и от ионизирующей радиации. Ранее мы отмечали, что синезеленые водоросли являются, видимо, самыми радиоустойчивыми организмами на земле. По данным Краус [21], LD_{50} для них изменяется в пределах от 200 до 2000 крад (табл. 34). Выживаемость водорослей Краус определяла по при-

Таблица 34

Характеристика радиочувствительности различных видов синезеленых водорослей

Радиочувствительность	Вид	LD_{50} , крад	Морфологическая форма
Чувствительные $LD_{50} < 400$ крад	<i>Anacystis marina</i> (K) <i>Anacystis nidulans</i> IU 615 <i>Schizothrix calcicola</i> (BB), (K 7) <i>Microcystis aeruginosa</i> (K) <i>Cocccchloris peniocystis</i>		одноклеточная одноклеточная нитчатая одноклеточная одноклеточная
Среднечувствительные $400 \leq LD_{50} \leq 1200$ крад	<i>Scytonema hoffmannii</i> (K) <i>Phormidium autumnale</i> (K) <i>Cocccchloris stagnina</i> <i>Oscillatoria brevis</i> <i>Anabaena variabilis</i> (K) <i>Tolyphothrix tenuis</i> <i>Anacystis thermalis</i> <i>Tremyelia diplosiphon</i>	900 1200 1000	нитчатая нитчатая одноклеточная нитчатая нитчатая нитчатая одноклеточная нитчатая
Высокоустойчивые $LD_{50} > 1200$ крад	<i>Oscillatoria tenuis</i> <i>Phormidium luridum</i> <i>Plectonema calothricoides</i> <i>Schizothrix calcicola</i> (SF) <i>Plectonema boryanum</i> <i>Nostoc lunckia</i> (K) <i>Nostoc muscorum</i> (K) <i>Nostoc</i> sp. (Tex) <i>Lyngbyades tuvarei</i> (K) <i>Microcoleus vaginatus</i> [K]	1400 1700 1750 1600 1400 1950 1970	нитчатая нитчатая нитчатая нитчатая нитчатая нитчатая нитчатая нитчатая

ростам веса биомассы. Автор разбила исследованную группу водорослей по радиочувствительности на три класса: чувствительные ($LD_{90} < 400$ крад), среднеустойчивые (400 крад $< LD_{90} \leq 1200$ крад), устойчивые ($LD_{90} > 1200$ крад). Мы добавили графу, в которой дана характеристика организации и степени сложности исследованных организмов (одноклеточные, нитчатые). Из этой графы таблицы видно, что среди чувствительных видов нитчатая форма встречается один раз из пяти, в группе среднеустойчивых их шесть из восьми изученных, а среди высокоустойчивых все формы нитчатые. Представляет интерес синезеленая водоросль *Lyngbyades tuarii* (К), LD_{90} которой одно из самых высоких (1950 крад). Для нее характерны наличие специального механизма высвобождения фрагментов из оболочки трихома и гетерогенность клеток по длине трихома. По нашим данным, такая особенность морфологии должна существенно сказаться на ее радиоустойчивости. Самый радиоустойчивый из описанных организмов *Microcoleus vaginatus* (К) ($LD_{90} = 1970$ крад) имеет во влагалищах систему канатовидноскрученных трихом [6], что, видимо, должно влиять на его радиоустойчивость. На основании данных, полученных на *Plectonema bogdanum*, можно полагать, что радиочувствительность отдельных видов микроводорослей зависит от степени морфологической сложности, уровня организации и эффективности механизма защиты по типу фрагментации трихомов. Вероятно, замеченное нами повышение радиоустойчивости у различных видов синезеленых водорослей по мере их морфологического усложнения можно объяснить эффектами, подобными механизму фрагментации трихомов при облучении у синезеленой водоросли *Plectonema bogdanum*.

По нашему мнению, *Plectonema bogdanum*, являясь простейшим многоклеточным организмом, может служить объектом и моделью для изучения радиобиологических особенностей многоклеточных организмов по сравнению с одноклеточными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубкова М. Г., Гродзинский Д. М. Межклеточные взаимодействия и восстановление популяции синезеленой водоросли *Plectonema bogdanum* после гамма-облучения. — Радиобиология, 1972, 12, 1, 144—148.
2. Гродзинский, Д. М. Биофизика растения. Киев, «Наукова думка», 1972.
3. Дубинин Н. П. Общая генетика. М., «Наука», 1970.
4. Еленкин А. А. Синезеленые водоросли СССР. М., Изд-во АН СССР, 1938.
5. Кабаков Е. Н., Корогодин В. И. О природе плато фотопрекращения дрожжевых клеток. — В кн.: Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М., «Наука», 1966, 109—117.
6. Кондратьев Н. В. Визначник прісноводних водоростей УРСР. Вип. 1, ч. 2. Київ, «Наукова думка», 1968.
7. Конев С. В., Волотовский И. Д. Введение в молекулярную физиологию. Минск, «Наука и техника», 1971.
8. Кутлахмедов Ю. А. О возможной роли ОН-радикалов в радиобио-

- логическом эффекте у синезеленой водоросли *P. b.* — В кн.: Мат-лы I всесоюз. симп. по радиобиологии растительного организма. 12—16 мая 1970. Киев, «Наукова думка», 1970, 9—10.
9. Кутлахмедов Ю. А., Гродзинский Д. М. Фотомодификация лучевого поражения у синезеленой водоросли *Plectonema boryanum*. — В кн.: IV Междунар. биофиз. конгр. Тез. секционных докл., кн. I. М., 1972, 144—145.
10. Кутлахмедов Ю. А., Гродзинский Д. М. Феноменологические особенности фотомодификации лучевого поражения у синезеленой водоросли *Plectonema boryanum*. — Радиобиология, 1973, 13, 2, 448—451.
11. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. М., «Мир», 1968.
12. Петин В. Г., Полит В. 1969. Влияние мощности дозы излучения на выживаемость и восстановление у дрожжевых клеток. — Радиобиология, 1969, 9, 4, 492—499.
13. Тимофеев-Ресовский Н. В., Корогодин В. И., Иванов В. И. Применение принципа попадания в радиобиологии. М., «Атомиздат», 1968.
14. Шестаков С. В., Жевнер В. Д. 1969. Введение в генетику синезеленых водорослей. — В кн.: Биология синезеленых водорослей. Вып. 2. 1969, 110—124.
15. Asato Y. Photorecovery of gamma irradiated cultures of blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Rad. Bot., 1971, 11, 313—316.
16. Crespi H. L., Mandevill S. E., Katz J. J. 1962. The action of Lysozyme on several blue-green algae. BBRC, 1962, 9, 6.
17. Freifelder D., Uretz R. B. Dye-sensitized photoreactivation of X-ray damage in diploid yeast. — Rad. Res., 1960, 12, 4, 435.
18. Jagger J. Introduction to research in ultraviolet photobiology. N. Y.—London, Acad. Press, 1967.
19. Keleneg A. Photoreactivation of UV irradiated *E. coli* with special reference to the dose reduction principle and UV induced mutations. — J. Bacteriol., 1949, 58, 511—522.
20. Kiefer J. J. Theor. biol. 1968, 18, 3, 263. — Цит. по Гродзинский Д. М. Биофизика растений. Киев, «Наукова думка», 1972.
21. Kraus M. P. Resistance of blue-green algae to Co^{60} gamma radiation. — Rad. Botany, 1969, 9, 481—489.
22. Lajtha L. G. Radiation effects on Steady-state populations. — Rad. Res., 1968, 33, 3, 659—669.
23. Novick A., Szillard L. Experiments on light reactivation of ultraviolet inactivated bacteria. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1949, 35, 591—600.
24. Werbin H., Rupert C. S. Presence of photoreactivating enzyme in blue-green algae cells. — Photochem. Photobiol., 1968, 7, 225—230.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процессы, происходящие в облученных растительных клетках и многоклеточных организмах, характеризуются большим разнообразием. Они охватывают отдельные звенья метаболизма и регуляцию эпигенетических явлений. Ряд процессов связан с прогрессивным развитием лучевого поражения, которое приводит впоследствии к летальному исходу. Часть же процессов направлена на нормализацию всех функций растения, поэтому их можно рассматривать как составляющие сложного явления постстрадационного восстановления. Совокупность процессов, нормализующих функции клетки или организма, имеет прямое отношение к радиоустойчивости растений, их можно называть механизмами радиоустойчивости. Радиоустойчивость, характеризующаяся уровнем переносимых доз радиации, отражает эффективность действия отдельных процессов восстановления. Действительно, радиоустойчивость организма определяют не только факторы, которые восстанавливают возникшие при действии излучения молекулярные повреждения, но и такие, благодаря которым выход радиационно-химических нарушений оказывается заниженным. Следовательно, нужно отличать механизмы радиоустойчивости восстанавливающего характера от механизмов, обусловливающих низкий уровень первичных молекулярных повреждений. Несомненно, оба типа процессов, определяющих радиоустойчивость растения, в своем проявлении тесно связаны: если возникают потенциально летальные повреждения, то в последующие периоды жизни клетки они подвергаются элиминации благодаря функционированию систем восстановления. Факторы, модифицирующие радиоустойчивость, могут затрагивать условия, определяющие выход радиационно-химических повреждений, либо изменять интенсивность восстанавливающих процессов. Если факторы химической природы изменяют радиационные выходы первичных поражений, их относят к радиопротекторным или радиосенсибилизирующими. Если же изменяется напряженность восстанавливающих процессов, говорят о модификации лучевого поражения.

Сложность ситуации, определяющей уровень радиоустойчивости растения, не позволяет свести природу радиоустойчивости

к достаточно простому определению. Это и сказалось на структуре данной монографии, описываемые в которой факты и закономерности на первый взгляд могут показаться несколько разобщенными. Однако это — кажущаяся разобщенность: совокупность обнаруженных явлений свидетельствуют о четкой слаженности функционирования ряда систем, кооперация которых определяет возможные уровни переносимых доз радиации и пределы модифицируемости радиоустойчивости организма.

Радиационное поражение начинается с тех нарушений, которые порождаются молекулярными повреждениями ядра клетки и уникальных структур цитоплазмы. На этом этапе радиопротекторные и радиосенсибилизирующие агенты оказывают определяющее влияние на радиоустойчивость. Они могут иметь эндогенное происхождение или проникать к месту действия радиации в клетку извне. Конечно, основными восстанавливающими процессами на этом уровне является репарация ДНК и восстановление хроматина за счет его компонентов, синтезированных *de novo*. В связи с этим чрезвычайно важен установленный факт четкой зависимости радиоустойчивости растения от функционального состояния генома: в зависимости от того, пребывают ли гены в состоянии репрессии или дерепрессии, существенно изменяется радиоустойчивость растения.

Именно вследствие этого радиоустойчивость клетки на протяжении жизненного цикла подвержена существенному варьированию, причем наиболее устойчивым его периодом является первая половина пресинтетической фазы. Если считать, что выживаемость клеточной популяции определяется фракцией клеток, характеризующейся самой высокой радиоустойчивостью, то асинхронность клеточных делений, благодаря которой в клеточной популяции в любой момент времени имеются клетки пресинтетической фазы, является одним из существенных факторов, обуславливающих уровень радиоустойчивости растения.

В том случае, когда субклеточные системы, определяющие радиоустойчивость образовательной ткани, не приводят к ликвидации повреждений генетических управляющих систем клетки, последние могут элиминироваться. Форма инактивации поврежденной клетки определяет момент ее элиминации.

Особенно четко клеточные и тканевые процессы, определяющие радиоустойчивость организма, проявляются у водорослей, у которых в наиболее элементарной форме представлены основные механизмы пострадиационного восстановления клеток и восстановительные процессы клеточно-популяционного уровня.

Понимание существа процессов, определяющих радиоустойчивость растения, служит основой для построения определенной стратегии в управлении лучевыми реакциями, что имеет большое значение и для общей радиобиологии растений, и для решения многих задач прикладной радиобиологии.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Г л а в а I. Радиочувствительность ядра и его компонентов в растительной клетке (О. Д. Коломиец)	5
Г л а в а II. Радиосенсибилизация клеток к ионизирующей радиации (А. П. Дмитриев, Д. М. Гродзинский)	35
Г л а в а III. Репарация ДНК в растительных клетках и ее роль в радиоустойчивости (О. П. Голикова)	59
Г л а в а IV. Зависимость радиочувствительности растительного организма от функционального состояния генома (А. А. Булах)	98
Г л а в а V. Роль асинхронности клеточных делений и гетерогенности меристемы в радиоустойчивости растений (И. Н. Гудков, Д. М. Гродзинский)	110
Г л а в а VI. Изучение радиоустойчивости водорослей (М. Г. Голубкова)	138
Г л а в а VII. Модификация радиоустойчивости многоклеточного растительного организма видимым светом (Ю. А. Кутлахмедов, Д. М. Гродзинский)	150
Заключение	165

МЕХАНИЗМЫ РАДИОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

*Печатается по постановлению ученого совета
Института физиологии растений АН УССР*

Редактор *Н. С. Колосок*. Художественный редактор *Р. И. Калыш*. Оформление
художника *О. П. Омельянюка*. Технический редактор *И. А. Ратнер*.
Корректоры *З. П. Школьник*; *Л. Я. Постолова*

Сдано в набор 15.Х 1975 г. Подписано к печати 5.IV 1976 г. БФ 07903. Зак.
№ 5—2546. Изд. № 227. Тираж 1300. Бумага № 1. 60×90^{1/16}. Усл. печ. листов
10,5. Учетно-изд. листов 10,57. Цена 1 руб. 22 коп.

Издательство «Наукова думка», Київ, Реп'їна, 3.

Изготовлено Нестеровской городской типографией Львовского областного
полиграфиздата (г. Нестеров, ул. Горького, 8) с матриц Головного
предприятия республиканского производственного объединения «Полиграфкнига»
Госкомиздата УССР (г. Киев. Довженко, 3), зак.4043.