

6. Хамицаев Р.С., Буйлов С.В. Новые породы овец и методы их выведения // Обзорная информация ВНИИТЭИСХ. - М., 1981.- 59 с.

7. Vesely J.A., Swierstra E.E. Reproductive parameters of crossbred lambs sizes by Romanow, Finnish Landrace., Dorset and Western range rams // J.: Anim. Sci.- Vol. 620, № 6.- P. 11

8. Касымов К.М., Шауенов С.К., Мухатаев С. Плодовитость помес-ных овец разных долей кровности, полученных от использования бара-нов пород романовская и финский ландрас // Воспроизводство и выращивание молодняка в овцеводстве.- Алма-Ата, 1984.- С. 56-60.

9. Костиков И.М. Эффективность скрещивания маток породы прекос с баранами финский ландрас и ромни-марш // Научно-произ. конф. по овцеводству и козоводству. - Ставрополь, 1977.- С.8.

10. Осипов В.А., Иргашев Т.А. Результаты скрещивания // Овцевод-ство.- 1983. - № 6. - С. 21-22.

Тұжырым

Ғылыми зерттеу жұмысының нәтижесінде төлді аз беретін қой тұқымының төлдегіштігін тез арада арттыру жолдары жан-жақты қарастырылған.

Summary

As a result of research developed methods to improve fertility of local small fetal sheeps.

УДК 575:599:539.1.047

Чередниченко О.Г.

СТАБИЛЬНЫЕ АБЕРРАЦИИ ХРОМОСОМ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЛИМФОЦИТОВ И В ПРОЦЕССЕ СТАНОВЛЕНИЯ РАДИОАДАПТИВНОГО ОТВЕТА

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК)

Представлены результаты изучения частоты и спектра стабильных aberrаций хромосом, индуцированных различными дозами γ -излучения и в процессе становления адаптивного ответа. Также выявлены особенности изменения частоты стабильных и нестабильных aberrаций при длительном культивировании «молодых» и «старых» лимфоцитов периферической крови человека, облученных малыми и большими дозами γ -излучения.

Воздействие малых доз мутагенных факторов приводит к целому ряду эффектов, которые могут не являться прямым результатом начальных повреждений ДНК, вызванных облучением. К таким эффектам можно отнести адаптивный ответ, радиочувствительность, нестабильность генома, экспрессию генов, приводящую к индукции синтеза целого ряда белков, активации ферментов и др. Вероятно, при формировании адаптивного ответа факторы внешней среды запускают сигнал к смене генетической программы, т.е. они переводят клетки в состояние готовности к репарации повреждений ДНК после воздействия повреждающей дозы мутагена. Однако в зависимости от дозы и типа мутагенного воздействия, а также функционального состояния и устойчивости биологической системы в ней возникают различные структурные изменения и преобразования. Наиболее широко изученными в этом плане являются нестабильные хромосомные aberrации. В клеточных популяциях действует постоянный стабилизирующий отбор. Аберрантные хромосомы гетерохроматизируются и исключаются из системы работающих генов. В данной ситуации либо включаются механизмы самоуничтожения, либо ее функции нарушаются настолько, что она деградирует и погибает. Таким образом, клетки несущие избыточное количество спонтанных или индуцированных хромосомных aberrаций элиминируются. Для биологической системы в целом это наиболее легкий и безопасный путь сохранения своей генетической структуры. Однако, наряду с положительным эффектом малых доз мутагенных факторов способных вызывать реакцию адаптивного ответа их коварность заключается в том, что наряду с грубыми структурными нарушениями могут возникать хромосомные aberrации стабильного типа. В связи с этим мы предполагаем, изучить насколько различные дозы радиации способны индуцировать возникновение aberrаций стабильного типа и, как меняется их характер при формировании реакции адаптивного ответа, длительном культивировании и возраста облученных клеток.

Материалы и методы

Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов проводили по следующей методике: к 0,5 мл периферической крови добавляли к 4,5 мл среды культивирования, состоящей из 80% среды HAMs с глутамином (2мМ), 20% сыворотки КРС, пеницилина 100 ед/мл, стрептомицина 100 ед/мл. Деление лимфоцитов стимулировали 2% ФГА. Клетки инкубировали при 37° С в течение 48 часов. Для накопления метафазных пластинок в культуральную среду за 2 часа до фиксации вводили колхицин в конечной концентрации 0,8 мкг/мл. Для получения цитологических препаратов клетки гипотонизировали 0,075M KCl при 37°С 15 минут, фиксировали смесью метиловый спирт/ледяная уксусная кислота (3/1) и окрашивали 4% раствором красителя Гимза [1]. При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с aberrациями, а также число и тип aberrаций на 200 проанализированных метафаз. При анализе полученных данных использовали стандартные методы статистического анализа [2].

Радиационная обработка: γ -излучение - цельную кровь в стеклянных флаконах облучали γ -квантами на линейном электронном ускорителе ЭЛУ-2 с номинальной энергией ускоренных электронов 1,5 МЭВ при мощности доз 0,05 Гр – 50 сГр/мин, 2 Гр – 100 сГр/мин; R-излучение - цельную кровь в стеклянных флаконах подвергали воздействию рентгеновского излучения на медицинской рентгеновской установке в дозах 0,03 Гр; 0,07 Гр; 0,1 Гр; 0,13 Гр при мощности дозы 1 Гр/мин. Все виды облучений проводили в G₀-фазе клеточного цикла.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время, аберрации, при которых рекомбинация участков поврежденных хромосом произошла таким образом, что имеется полное соединение ацентрических фрагментов с центрическими, и они не связаны с осложнениями в процессе клеточного деления и могут передаваться в ряду клеточных поколений получили название стабильных. На данном этапе исследований мы изучали их частоту и характер в процессе становления радиоадаптивного ответа.

Согласно классификации учитывали следующие типы стабильных аберраций хромосом: реципрокные транслокации (t), терминальные делеции (ter-del) и интерстициальные делеции (int-del), парацентрические инверсии (inv-para) и кольцевые хромосомы [3].

Изучение контрольных образцов, источниками которых служили здоровые доноры Алматы, выявило наличие только терминальных делеций, частота которых составила 0,75%. При облучении образцов крови малыми дозами радиации 0,01Гр; 0,05 Гр обнаружено 3% стабильных аберраций хромосом, которые также как и в контроле были представлены терминальными делециями (2,25%), но в данном случае встречались также интерстициальные делеции (0,5%) и парацентрическая инверсия (0,25%).

Облучение большими дозами γ -излучения (2 Гр) привело к увеличению не только частоты ранее встречаемых типов аберраций, но и спектра самих нарушений (таблица 1).

Таблица 1- Изучение частоты аберраций стабильного типа при воздействии γ -радиации на лимфоциты периферической крови *in vitro*

Тип аберраций Вариант	Всего аберраций	ter-del	int-del	t	inv-para	кольцевые хромосомы
контроль	0,75±0,19	0,75±0,19	-	-	-	-
0,01-0,05 Гр	3,0±0,38	2,25±0,33	0,5±0,16	-	0,25±0,11	-
2 Гр	13,24±0,76	9,6±0,66	1,17±0,24	1,8±0,30	-	-
0,05/2 Гр	9,1±0,65	7,7±0,19	0,47±0,16	0,7±0,19	-	0,23±0,11

Общая частота стабильных аберраций хромосом составила 13,24% (ter-del – 9,6%; int-del – 1,17%; t – 1,8%; кольцевые хромосомы – 0,67%). Некоторыми исследователями также показано, что с увеличением дозы облучения индуцируются более сложные межхромосомные обмены с образованием инсерций, внутривхромосомных обменов и другие перестройки генетического материала, помимо дицентриков, сопутствующих транслокациям, которые могут быть летальны для клеток. Как правило это имеет место при остром облучении, в дозах, превышающих 1 Гр [4]. Формирование реакции адаптивного ответа, т.е. облучение сначала адаптирующей дозой, а через 4 ч. повреждающей дозой 2 Гр приводило, как и при учете общего числа хромосомных нарушений, к снижению частоты аберраций стабильного типа (9,1%), т.е. примерно на 30%. Причем значительно уменьшается частота сложных аберраций – транслокаций (0,7%), интерстициальных делеций (0,47%) и кольцевых хромосом (0,23%).

При анализе транслокаций, возникающих под воздействием повреждающих доз радиации (2 Гр или 0,05/2 Гр) обнаружено, что примерно треть реципрокных транслокаций затрагивают большие акроцентрические хромосомы, т.е. хромосомы групп 13-15. Кроме того, данные ряда авторов указывают на межиндивидуальные различия в радиочувствительности хромосом, зависимость от дозы облучения. Однако данные относительно того, какие хромосомы являются наиболее радиочувствительными или радиорезистентными неоднозначны и противоречивы. Особенно часто колебания в радиочувствительности наблюдали в хромосомах групп № 1, 2 и 4 по сравнению с другими хромосомами генома [5]. Анализ полного набора хромосом человека в одних работах не выявил существенных отклонений [6], в других они имели место как для транслокаций, так и дицентриков [7]. Обращается внимание на межиндивидуальные различия в гетерогенности радиочувствительности отдельных хромосом [8]. Представлены результаты оценки радиочувствительности хромосом 2, 8 и 14, причем вероятность участия хромосом в образовании транслокаций, не коррелировала с количественным содержанием в них ДНК [9]. Причины наблюдаемых различий в радиочувствительности отдельных хромосом могут быть объяснены несколькими предположениями – различной конденсацией хроматина, разным протеканием репарационных процессов в эухроматиновых и гетерохроматиновых районах, имеющих разное соотношение в отдельных хромосомах и содержанием интерстициальных и околоцентромерных теломерных последовательностей ДНК, которые могут реагировать на мутагенное воздействие как хрупкие сайты, особенно в районах интеркалярной локализации, что может влиять на повышенную радиочувствительность и спонтанную нестабильность отдельных хромосом генома [10].

В некоторых исследованиях показано, что число аберраций хромосом индуцируемых в лимфоцитах после облучения *in vitro*, уменьшается по мере увеличения времени их культивирования. Аналогичные данные

получены при анализе нестабильных aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови онкологических больных после проведения лучевой терапии, а также лиц, подвергшихся облучению в результате радиационных аварий [11]. Как и в случае облучения *in vitro*, увеличение интервала времени между облучением и проведением цитогенетических исследований приводило к снижению уровня aberrаций в лимфоцитах облученных людей. Необходимо выявить особенности характера и структуры хромосомных aberrаций возникающих под влиянием адаптирующих и повреждающих доз γ -радиации в G_0 молодых и «старых» ФГА-стимулированных лимфоцитах, при различных сроках их культивирования. В связи с этим проведен анализ частоты хромосомных aberrаций индуцируемых большими и малыми дозами γ -излучения в лимфоцитах человека и при формировании реакции адаптивного ответа в процессе длительного культивирования клеток, а также облученных в G_0 лимфоцитах и в течение 72 часов находящихся в состоянии покоя в поддерживающей среде, а затем стимулированных к делению раствором ФГА.

При анализе частот хромосомных aberrаций, индуцированных большими и малыми дозами γ -излучения в лимфоцитах периферической крови выявлено, что по мере увеличения срока культивирования происходит постепенная элиминация поврежденных хромосом (рисунок 1). Некоторое увеличение частоты aberrаций на 168 часу культивирования мы склонны объяснять старением культуры клеток, так как лимфоциты не относятся к длительно живущим или перевиваемым культурам. Существует несколько возможных объяснений снижения уровня этих хромосомных перестроек. Во-первых транслокации сами по себе могут быть летальными для клеток, во-вторых имеет место быть отбор клеток, содержащих, одновременно дицентрики и транслокации [12] и/или элиминация радиочувствительной фракции клеток. Поэтому уровень aberrаций определяемый во всех aberrантных клетках непосредственно после облучения в высоких дозах (свыше 1 Гр) и по прошествии длительного времени, будет различным [13]. При индукции формирования адаптивного ответа, как и ожидалось, происходит снижение частоты хромосомных aberrаций, однако их элиминация происходит медленнее, чем при 2 Гр и к 168 часу их величины практически находятся на одном уровне.

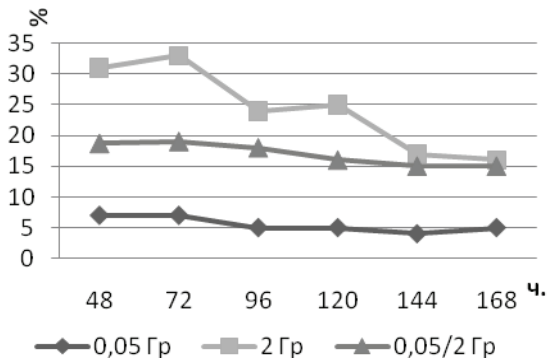


Рисунок 1 - Частота хромосомных aberrаций при длительном культивировании лимфоцитов

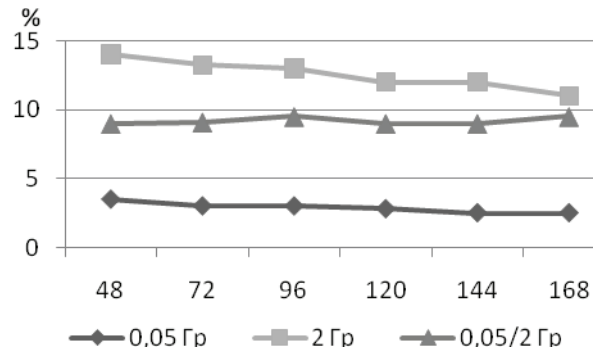


Рисунок 2 - Частота стабильных aberrаций хромосом при длительном культивировании лимфоцитов

Спектр хромосомных нарушений в основном представлен aberrациями хромосомного типа, анализ которых показывает, что в процессе культивирования происходит наибольшая элиминация aberrаций нестабильного типа – дицентриков, разрывов, ацентрических колец, фрагментов. Частота aberrаций стабильного типа, которые в основном были представлены терминальными делециями и реципрокными транслокациями остаются практически на одном уровне (рисунок 2). Полученные данные соответствуют современным тенденциям, согласно которым рекомендуется проводить учет полных и неполных транслокаций в стабильных клетках (не содержащих дицентриков, колец и других aberrаций нестабильного типа) [14]. Показано, что если ограничить анализ только этими клетками, то уровень транслокаций не меняется со временем и остается постоянным. Это основывается на том, что клетки с реципрокными транслокациями потенциально имеют большую жизнеспособность при прохождении циклов митотических делений, чем клетки с нестабильными хромосомными перестройками [15].

Таким образом, на определенном этапе частота хромосомных aberrаций выходит на плато, уровень которого поддерживают и формируют различные механизмы. С одной стороны элиминируются индуцированные aberrации и/или радиочувствительная фракция клеток. С другой поддержание определенного уровня стабильных aberrаций хромосомом и переход клеток в нестабильное состояние, результатом которого является возникновение хромосомных aberrаций *de novo*.

Как показано выше в зависимости от дозы радиационного воздействия возникают различные структурные изменения, и преобразования, часть которых составляют стабильные хромосомные aberrации, способные сохраняться в ряду поколений. Однако, остается открытым вопрос насколько различные дозы мутагенных факторов способны индуцировать явление генетической нестабильности в клетках человека различной функциональной активности и при длительном культивировании. При анализе хромосомных нарушений возникающих в G_0 облученных разными дозами лимфоцитах и в течение 72 часов находящихся в состоянии покоя (в культуральной среде, включающей питательную среду RPMI-1640, сыворотку КРС, L-

глутамин и антибиотики), а затем стимулированных ФГА («старые» лимфоциты) обнаружено, что в них выявляется меньшее число хромосомных aberrаций, чем в «молодых» лимфоцитах, стимулированных к делению через два часа после облучения (таблица 2).

Таблица 2 - Частота хромосомных aberrаций возникающая под воздействием γ -радиации в лимфоцитах, находящихся в на различной стадии функциональной активности

Время культив. Вариант	48 ч.		72 ч.		96 ч.	
	Клеток с aberrац.	Всего aberrац.	Клеток с aberrац.	Всего aberrац.	Клеток с aberrац.	Всего aberrац.
«Молодые лимфоциты»						
Контроль	2±0,9	2±0,9	1,89±0,43	1,89±0,43	1,5±0,8	1,5±0,8
0,05 Гр	7± 0,8	7± 0,8	7± 0,8	7±0,8	5± 1,5	5±1,5
0,1 Гр	11±2,2	12±2,3	10±2,1	12±2,3	8±1,9	9±2,0
0,5 Гр	15±2,5	19±3,9	14±2,4	17±2,6	10±2,1	10±2,1
1 Гр	20±2,8	22±2,9	19±3,9	23±4,2	16±2,6	19±2,8
2 Гр	25±1,37	29±1,4	31±1,46	33±1,5	20±2,8	24±3,0
«Старые» лимфоциты						
Контроль	3±1,2	3±1,2	1±0,7	1±0,7	1±0,7	1±0,7
0,05 Гр	3±1,2	3±1,2	2±0,9	2±0,9	2±0,9	2±0,9
0,1 Гр	4±1,9	5±1,5	4±1,9	4±1,9	2±0,9	2±0,9
0,5 Гр	7±1,8	10±2,1	6±1,7	6±1,7	3±1,2	3±1,2
1 Гр	15±2,5	26±3,1	13±2,4	18±2,7	3±1,2	3±1,2
2 Гр	20±2,8	26±3,1	5±1,5	14±2,4	3±1,2	4±1,9

Это обстоятельство можно объяснить несколькими причинами, во-первых, гибелью поврежденных клеток, либо клеток содержащих летальные транслокации, что подтверждается результатами теста на выживаемость лимфоцитов на момент их стимуляции ФГА (рисунок 3), во-вторых, достаточным временем для работы репаративных систем клеток, увеличение индукции которых подтверждено нашими предшествующими экспериментами. Вероятно, имеет место быть оба этих процесса. Т.е. в клеточных популяциях при адаптации к повреждающим факторам внешней среды действует постоянный стабилизирующий отбор. Абберрантные хромосомы гетерохроматизируются и исключаются из системы работающих генов. В данной ситуации либо включаются механизмы самоуничтожения, т.е. апоптоза, либо ее функции нарушаются настолько, что она деградирует и погибает.

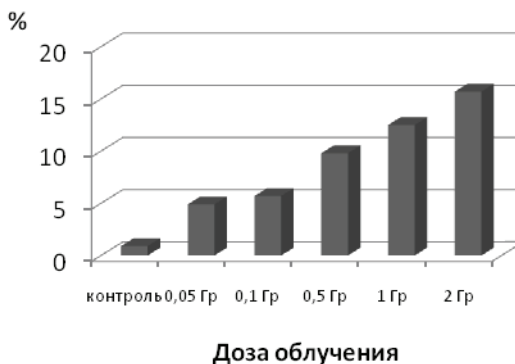


Рисунок 3- Процент гибели лимфоцитов под воздействием различных доз γ -излучения

Таким образом, клетки несущие избыточное количество спонтанных или индуцированных хромосомных aberrаций элиминируются. Для биологической системы в целом это наиболее легкий и безопасный путь сохранения своей генетической структуры. Однако происходит не только элиминация структурно поврежденных клеток, несущих различные геномные аномалии, но и активизация нормальных морфогенетических процессов, которые обеспечиваются определенными изменениями (структурное или пространственное) в генетическом аппарате при выработке адаптационной устойчивости. Полагают, что продукты этих генов принимают участие в различных процессах, связанных с выработкой адаптивной реакции. Т.е. изменения структуры генетического аппарата клетки вызывают изменения функционального состояния. Такие процессы как апоптоз, выживаемость, уровень внеклеточной ДНК, выделение клеткой продуктов реакций в ответ на мутагенное воздействие малых и больших доз являются основными функциональными проявлениями воздействия факторов внешней среды.

При увеличении срока культивирования клеток происходит изменение не только частоты, но и спектра хромосомных aberrаций. Тенденции уменьшения частоты, как в случае с «молодыми» лимфоцитами не

происходит под влиянием малых доз γ -радиации (контроль, 0,05-0,5 Гр), но наблюдается при использовании повреждающих доз (1, 2 Гр). Изучение спектра хромосомных aberrаций показало преобладание aberrаций хромосомного типа, что и следовало ожидать при радиационном воздействии. Однако, выявлена некоторая особенность - если при 48 и 72 часах культивирования обнаруживается большое количество дицентриков и транслокаций, то на 96 ч. в основном обнаруживаются двойные разрывы и фрагменты. Элиминация нестабильных aberrаций (дицентриков) не вызывает удивления, но то что в клетках на 96 часу культивирования продолжают формироваться нестабильные разрывы и фрагменты, которые должны элиминироваться в первую очередь может свидетельствовать о переходе клеток в нестабильное состояние вследствие влияния радиационного воздействия.

Таким образом, при длительном культивировании лимфоцитов периферической крови после острого облучения или в процессе формирования адаптивного ответа наблюдается снижение частоты хромосомных aberrаций, которое происходит за счет элиминации клеток с хромосомными нарушениями, причем элиминируются в основном aberrации нестабильного типа. Кроме того, в культурах лимфоцитов находящихся в состоянии покоя после острого облучения и до их стимуляции ФГА обнаруживается меньшая частота клеток с хромосомными aberrациями, что свидетельствует о способности культуры к восстановлению с помощью функциональных механизмов. Т.е. в зависимости не только от дозы радиационного воздействия, но также и функционального состояния и устойчивости биологической системы в ней возникают различные структурные изменения и преобразования.

Литература

1. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., e. a. // *Experimental Cell Research.*- 1960.- V. 20.- P. 613-616.
2. Плохинский Н.А. Алгоритмы в биометрии.- М.- 1967.- 82 с.
3. Захаров А.Ф. Хромосомы человека.- М.- Медицина. 1982.- 264 с.
4. Tucker J.D. Evaluation of Chromosome translocations by FISH for radiation biodosimetry: A view from one laboratory// *Radiat. Prot. Dosim.*- 2000.- V.88.- №1.- P.87-92.
5. Barquinero J. F., Knehr S., Braselmann H., Figel M., Bauchinger M. DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype // *J. Radiol. Prot.*- 1998.- V. 74.- № 3.- P.315 –323.
6. Luomahaara S., Lindholm C., Mustonen R., Salomaa S. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in human chromosomes 1, 2 and 4 // *J. Radiol. Prot.*- 1999.- V. 75.- № 12.- P. 1551 – 1556.
7. Braselmann H., Kulka U., Huber R., Figel H. M., Zitzelsberger H. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in all human chromosomes // *J. Radiol. Prot.*- 2003.- V. 79.- № 6.- P. 393 – 403.
8. Wojcik A. Comparison of radiation-induced aberration frequencies in chromosomes 1 and 2 of two human donors // *J. Radiol. Prot.* 1998.- V. 74.- № 5.- P. 573 – 581.
9. Sommer S., Buraczewska I., Wojewodzka M., Bouzyk E., Szumiel I., Wojcik A. The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors // *J. Radiol. Prot.*- 2005.- V. 81.- № 10.- P. 741 – 749.
10. Елисова Т.В. Стабильные и нестабильные aberrации хромосом у человека и других млекопитающих в связи с вопросами биологической дозиметрии// *Радиационная биология. Радиоэкология.*- 2008.- Том 48.- № 1.- С. 14-27.
11. Севаньяев А.В., Шкаврова Т.Т., Потетня О.И. и др. Сравнительное исследование структурных и генных соматических мутаций у работников ядерно-химических предприятий I Исследование нестабильных и стабильных aberrаций // *Радиационная биология. Радиоэкология.*- 2005.- Том 45.- № 2.- С. 149-161.
12. Gardner, Shea N; Tucker James D. The cellular lethality of radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes// *Radiation research*- 2002.-157(5).- P.- 539-52.
13. Нугис В.Ю., Дудочкина Н.Е. Закономерности элиминации aberrантных хромосом у людей после острого облучения по данным культивирования лимфоцитов периферической крови в отдаленные сроки // *Радиационная биология. Радиоэкология.*- 2006.- Том 46.- № 1.- С. 5-15.
14. Tawn E.J, Whitehouse C.A. Persistence of translocation frequencies in blood lymphocytes following radiotherapy: implications for retrospective radiation biodosimetry. // *J. Radiol. Prot.*- 2003.- V. 23.- P. 423–430.
15. Lindholm C., Edwards A. Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident// *J. Radiol. Prot.*- 2004.- V. 80.- № 6.- P. 559 – 566.

Тұжырым

Алынған нәтижелер тұрақты хромосома aberrацияларының спектрі мен жиілігін және әр түрлі дозадағы индуцирленген γ -сәулелендіру және адаптивті жауап үрдісінің басталуын зертеуге арналған. Сондай-ақ кіші және үлкен дозада γ -сәулелендірілген ұзақ уақыт дақылдандырылған адам перифериялық қанының «жаңа» және «ескі» лимфоциттеріндегі тұрақты және тұрақсыз aberrациялар ерекшеліктері анықталған.

Summary

The results of studying the frequency and spectrum of stable chromosome aberrations induced by different doses of γ -radiation and in the process of adaptive response. Also, peculiarities of changing the frequency of stable and unstable aberrations in long-term cultivation of "young" and "old" lymphocytes in human blood irradiated small and large doses of γ -radiation.