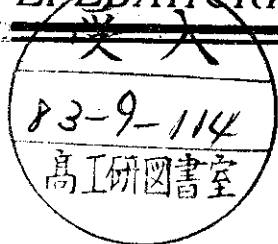


ԵՐԵՎԱՆԻ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ  
ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ



ЕФИ-63I(2I)-83

Р.Р. АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ЛУЧЕВЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

I. КРИВЫЕ ДОЗА-ЭФФЕКТ

ԵՐԵՎԱՆ 1983 ԵՐԵՎԱՆ

ЕФИ-63I(2I)-83

УДК.577.3:539.12.08

Р.Р.АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ЛУЧЕВЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

I. КРИВЫЕ ДОЗА-ЭФФЕКТ

На примере собственных и литературных данных показано важное значение кривых доза-эффект для понимания характера действия сопутствующих облучению факторов, модифицирующих выход радиобиологических реакций клеток.

Ереванский физический институт

Ереван 1983

R.R.ATAYAN

INFLUENCE OF TEMPERATURE  
ON RADIATION CYTOGENETIC DAMAGE

1. DOSE-EFFECT CURVES

The significance of dose-effect curves for the interpretation of effects of radiobiological modifying factors is considered.

Yerevan Physics Institute

Yerevan 1983

ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ФМ-631(21)-83

Р.Р. АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ЛУЧЕВЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

I. КРИВЫЕ ДОЗА-ЭФФЕКТ

Ереван 1983

© *Ереванский физический институт, 1983г.*

"Для получения убедительных данных о влиянии температуры на выход радиобиологических реакций клеток (кстати, это касается и всех других модифицирующих воздействий) необходимо иметь данные не по единичным дозам, а получать радиобиологические дозовые кривые". Эти слова цитируются из книги Тимофеева-Ресовского, Иванова, Корогодина "Применение принципа попадания в радиобиологии" [1]. Настоящее исследование посвящено детальному рассмотрению этого положения. Целесообразность такого рассмотрения продиктована необычностью создавшейся в общей радиобиологии и радиационной генетике ситуации: несмотря на обширную литературу, наши знания об относительном значении и механизмах действия различных сопутствующих облучению ионизирующими излучениями факторов все еще фрагментарны и неопределенны. Это в значительной мере обусловлено тем, что во многих работах о модифицирующем влиянии изучаемого фактора судят на основании данных, полученных при одной дозе облучения. В серии из трех статей будет проиллюстрирована исключительная важность кривых доза-эффект для понимания характера действия сопутствующих облучению факторов, модифицирующих выход радиобиологических

реакций клеток.

В настоящем сообщении приведем вначале несколько теоретических и типотетических кривых доза-эффект, наглядно демонстрирующих, что исследование влияния модифицирующих факторов следует проводить при достаточно широком диапазоне доз облучения. Затем покажем, что подобные "сложные" зависимости выхода изучаемой реакции от дозы вполне могут наблюдаться в конкретных экспериментальных ситуациях. И, наконец, на примере литературных данных покажем, что результаты, полученные при единичных дозах, могут приводить к дезинформации. Во втором и в третьем сообщениях представим детальный анализ модифицирующего влияния пред- и пострadiационных тепловых шоков на цитогенетические эффекты облучения.

В начале 20-х годов Блау и Альтенбургер вывели формулу, на основании которой рассчитываются кривые доза-эффект для реакций, обусловливаемых разным числом попаданий в чувствительный объем. На рис.1, взятом из [1], приводятся семейства кривых доза-эффект (а) и кривых выживаемости (б), соответствующих различным значениям числа попаданий. Тимофеев-Ресовский с соавторами, говоря о необходимости получения кривых доза-эффект, ссылаются, в частности, на этот рисунок. Они отмечают, что, исследуя действие только отдельных доз, можно прийти к прямо противоположным заключениям в зависимости от того, по какую сторону от точки пересечения кривых лежат выбранные дозы.

Необходимости получения радиобиологических дозовых кривых Альпер в своей книге "Клеточная радиобиология" посвятила специальную главу [2]. (Рис.2 и 3 взяты из этой книги). Пары кривых на рис.2 иллюстрируют эффекты радиации в чистом виде - правая кривая, и

при применении модифицирующего воздействия - левая кривая. В каждом случае наличие модифицирующего фактора уменьшает дозу, необходимую для достижения данного эффекта, вдвое. Хотя модифицирующий агент действует во всех случаях одинаково, отношения эффектов при данной конкретной дозе  $D$  для пар кривых а, б, в, г равны, соответственно, 2; 1,3; 4; 1.

Далее Альпер сравнивает эффективность двух модифицирующих агентов или процедур, увеличивающих способность клеток к репарации - рис.3. Кривая А - гипотетическая кривая доза-эффект, Б и В - модифицированные кривые. Очевидно, ни один из модифицирующих агентов нельзя описать как "более эффективный". Их относительная эффективность будет описываться по-разному в зависимости от того, была ли выбранная единичная доза меньше, равна или больше  $D$ .

Рассмотрим несколько конкретных примеров, взятых из радиобиологических опытов с семенами.

На рис.4 показана зависимость высоты растений (а) и процента зрелых растений (б) от дозы  $\gamma$  - лучей при облучении семян ячменя с различным содержанием воды [3]. Представленная картина в комментариях не нуждается: рассматривая выход реакций для единичных доз, можно было бы сделать практически любые мыслимые заключения о зависимости радиочувствительности семян от их влажности. Отметим, однако, что при постановке этих опытов были допущены два методических просчета: с целью высушивания семена нормальной влажности выдерживались при температуре от 40 до 70°C в течение одной недели; во-вторых, семена замачивались и проращивались через 24 часа после конца облучения. Таким образом, в схему опыта были введены два побочных фак-

тора - высокая температура как преирирадиационное воздействие и хранение как пострадиационное воздействие, - способных существенно изменить выход изучаемой реакции (см., например, [4]). Вопрос о зависимости радиочувствительности семян ячменя от их влажности остался, таким образом, открытым. Но тем не менее получены реальные данные, с которыми следует считаться. Ведь при наличии соответствующего контроля - доведение семян до нужной влажности в "сухой" атмосфере и намачивание семян сразу после облучения - полученные кривые доза-эффект дали бы богатую информацию о взаимовлиянии влажности, температуры и хранения в модификации биологических эффектов ионизирующей радиации. Картина, представленная на рис.4, являет собой прекрасную иллюстрацию положения о необходимости получения радиобиологических кривых доза-эффект.

Мы изучали влияние кислорода при пострадиационном намачивании семян гороха на выход хромосомных аберраций [5]. Для построения кривых доза-эффект по каждой дозе бралась последняя временная точка фиксации первого митоза. На рис.5 показана зависимость от дозы облучения семян процента поврежденных анафаз. Кривые К и А получены при пострадиационном замачивании семян в течение 4 часов в воде, насыщенной кислородом, и в воде, насыщенной азотом. На рис.6а приведены полученные в том же опыте кривые доза-эффект для числа фрагментов на одну клетку. Использование в опыте одной из малых доз привело бы к утверждению, что замачивание в кислороде предохраняет семена от части поражения, наблюдающегося при замачивании в отсутствие кислорода. Использование одной из больших доз привело бы к противоположному утверждению. И наконец, использование средней дозы,

около 20 кР, привело бы к утверждению, что тест-материал не чувствителен к условиям пострадиационного замачивания. Все три результата можно найти в литературе, но они получены, как правило, в опытах, в которых использовались лишь единичные дозы облучения. Конечно, представленную здесь картину не следует распространять на другие экспериментальные ситуации. Но подобные исследования дают основание считать, что результаты, полученные для единичных доз, тем более не следует распространять на широкий диапазон доз — такие результаты лишь увеличивают мозаичность наших знаний, не способствуя раскрытию общей картины.

В конце 50-х — начале 60-х годов появилась серия работ, изучавших способность растительных клеток восстанавливаться от цитогенетических последствий облучения [6]. Было показано, что в цитогенетических опытах критерием восстановления лучевых повреждений хромосом служит наклон кривых время-эффект. При этом оказалось, что восстановление цитогенетических повреждений у гороха происходит при облучении семян в дозах до 20 кР. Было ясно, таким образом, что в исследованиях, подобных нашему, наряду с установлением кривых доза-эффект, следовало учитывать для одной из относительно слабых доз кривые время-эффект.

На рис. 66 представлены кривые время-эффект, полученные для дозы 10 кР для числа фрагментов на клетку. Для получения кривых время-эффект исследовались пять равноотстоящих друг от друга временных точек фиксации, охватывающих основное плато первого пострадиационного митоза. Как видно из рис. 66, в наших опытах в начале первого деления кислород повышает выход хромосомных разломов, ближе к середине не влияет на него, а в конце снижает число наблюдаемых разрывов. Суть убывания со временем числа хро-

мосомных аберраций заключается в следующем: чем больше период времени между облучением и фиксацией материала, тем больше вероятность репарации потенциальных повреждений. Чем больше наклон кривой время-эффект, тем больше скорость репарации. Элиминация лучевых повреждений в результате физико-химических процессов допорожения отражается на начальном выходе аберраций, а не на наклоне кривых. Таким образом, мы наблюдали в пределах одного опыта как усиление поражения под влиянием кислорода - на стадии физико-химических процессов допорожения; так и ослабление поражения - на стадии репарации потенциальных повреждений.

Уже говорилось о том, что в литературе имеются противоречивые указания на эффективность кислорода в отношении хромосомных аберраций при его применении после облучения и что это обусловлено частично тем, что зависимость эффекта от дозы изучалась далеко не во всех случаях. Рис. 6б наглядно демонстрирует, что противоречивость литературных данных в значительной мере может быть обусловлена и тем, что почти во всех работах не снимаются кривые время-эффект, а исследуется лишь одна точка фиксации, которая в разных опытах, при разных дозах и у разных объектов может прийти на совершенно различные временные точки на протяжении первого пострадиационного митоза. Из сказанного ясно следует необходимость применения во всех "кислородных" опытах единой точной методики, включающей получение кривых доза-эффект и время-эффект.

На рис. 7 приведена зависимость высоты проростков от времени пострадиационного хранения семян пшеницы влажности 5% и 24% в условиях низкой и высокой относительной влажности атмосферы [7];

Зависимость длины проростков от дозы описывается обычно сигмоидной кривой вплоть до дозы, при которой длина составляет 10-20% относительно контроля, где начинается не зависящее от дозы плато. В зависимой от дозы области рост обусловлен делением клеток и удлинением их; в области плато - только удлинением [8]. Опыт проводился при дозе 20 кР. Сухие семена, замоченные немедленно после облучения, проросли всего на 12% относительно контроля, что свидетельствует о том, что доза была выбрана в области плато. Очевидно, что в такой ситуации невозможно было проследить возможное усиление поражения в процессе пострадиационного хранения. Безусловно, неудачный выбор дозы predeterminedли полученную картину. Вывод автора о том, что сухие семена не чувствительны к пострадиационному хранению как в сухой, так и во влажной атмосфере, нельзя считать экспериментально обоснованным. Вопрос о возможном влиянии пострадиационного изменения влажности на биологическое последствие в семенах был бы решен только при исследовании зависимости выхода изучаемой реакции от дозы в диапазоне 0-20 кР.

В многочисленных работах показано, что как начальное, так и пострадиационное поражение находится в обратной зависимости от влажности семян в момент облучения (см. например, [9]). В широко цитируемой работе [10] утверждается, однако, что начальная радиочувствительность от влажности не зависит. Попытаемся понять, чем вызвана такая противоречивость литературных данных.

Если в сухих семенах наблюдается усиление поражения в пострадиационный период, то на основании самых общих соображений можно считать, что уже в процессе облучения будет иметь место

развитие первичного поражения. Спэрман и Эренберги показали, что радиочувствительность семян ячменя в диапазоне влажностей 4-12% не зависит от содержания воды, если облучение осуществляется в присутствии поглотителя радикалов NO [11]. Из представленных ими данных следует, что обратная зависимость радиочувствительности семян от влажности обусловлена, по-видимому, различной, в зависимости от количества воды, скоростью развития поражения в процессе облучения. Кэртис и др. [10] обнаружили, что поражение, вызванное облучением семян ячменя в дозе 30 кР, не зависит от влажности, если семена замачивать сразу после облучения - рис. 8а, а разница в радиобиологическом эффекте проявляется лишь при пострadiaционном хранении за счет более сильного последствия в сухих семенах - рис. 8б. Они пришли к заключению, что удалось исключить развитие первичного поражения в процессе облучения и наблюдать "начальную" радиочувствительность в чистом виде. Важно разобраться, каким образом это было достигнуто, ибо если в принципе можно исключить затемняющее влияние развивающегося поражения в процессе облучения, то эту возможность желательно было бы учитывать в радиобиологических экспериментах.

Методическими особенностями работы [10] являются: (1) высокая мощность облучения - 672 кР/ч и (2) намачивание семян в условиях аноксии. Можно ли ими объяснить полученный результат? Обратимся к работе Натараджана и Марича, детально исследовавших при тех же условиях намачивания влияние мощности дозы на радиочувствительность семян [12]. Они показали, что начальное поражение влажных семян меньше, чем сухих, причем чувствительность первых не зависела от мощности, а чувствительность сухих

семян падала с увеличением мощности. Показано, в частности, что при облучении семян ячменя в дозе 10 кР при мощности 710 кР/ч сухие (4%) семена поражаются сильнее, чем влажные (16%). Таким образом, независимость начальной радиочувствительности семян от влажности не подтвердилась, и, следовательно, ни высокой мощностью, ни условиями намачивания объяснить результат работы [10] невозможно. Разобраться в создавшейся ситуации позволяют данные, представленные Калдекоттом и др [13]. Они наблюдали (при тех же условиях намачивания) большую радиочувствительность сухих семян, но при этом установили, что кривые доза-эффект для сухих семян и для влажных семян при высоких дозах приближаются друг к другу (рис.9). В частности, при дозе 30 кР разница в уровне поражения семян практически сходит на нет. Отсюда следует, что в работе [10] развитие первичного поражения в процессе облучения не было исключено на деле, а впечатление, будто была показана независимость начальной чувствительности семян от влажности, явилось результатом неудачного выбора дозы облучения. Таким образом, не особенности экспериментального подхода, а лишь выбор дозы определил частный результат, представленный в работе [10].

Нам кажется, что приведенных примеров вполне достаточно, чтобы продемонстрировать исключительно важное значение кривых доза-эффект в радиобиологических исследованиях. В процессе обсуждения литературных данных особое внимание обращалось на некоторые положения (правильный выбор контролей, учет возможного влияния побочных факторов, необходимость получения в определенных экспериментальных ситуациях кривых время-эффект), также имеющих первостепенное значение при исследовании модифициру-

шего влияния сопутствующих облучению факторов на радиобиологические реакции клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И. Применение принципа попадания в радиобиологии. М.: Атомиздат, 1968.
2. Alper T. Cellular radiobiology. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1979
3. Moes A. Water content, wave-length and sensitivity to X-rays in barley, In Effects of ionizing radiations on seeds, Vienna, IAEA, 1961, p.631-641.
4. Атаян Р.Р. Влияние температуры на цитогенетические лучевые повреждения. II. Предрадиационный тепловой шок. Препринт БФИ-632(22)-83, Ереван 1983.
5. Атаян Р.Р. Влияние кислорода при пострadiационном намачивании семян на выход хромосомных aberrаций. Радиобиология, 1968, т.8, № 5, с.708-716.
6. Лучник Н.В., Изможеров Н.А., Порядкова Н.А., Царапкин Л.С., Тимофеев-Ресовский Н.В. Обратимость цитогенетических повреждений, вызванных радиацией. М.: АН СССР, 1960.
7. Mostafa I.Y. Influence of water content on the delayed effect of irradiated wheat seeds. Naturwiss. 1965, vol.52, N.6, p.131-132.
8. Conger A.D. Biological after-effect and long-lived free radicals in irradiated seeds, J.Cell.Comp.Physiol., 1961, 58, (Suppl.I), p.27-32.

9. Atayan R.R., Gabrielian J.Y. The influence of postradiation moisture alteration on biological after-effect in *Crepis* seeds. *Environ. Exp. Bot.*, 1978, vol.18, p.9-17.
10. Curtis H.J., Delihias N., Caldecott R.S., Konzak C.F. Modification of radiation damage in dormant seeds by storage. *Radiat. Res.*, 1958, 8, 526-534.
11. Sparrman B., Ehrenberg L., Ehrenberg A. Scavenging of free radicals and radiation protection by nitric oxide in plant seeds. *Acta Chem. Scand.*, 1959, vol.13, p.199-200.
12. Natarajan A.T., Maric M.M. The time-intensity factor in dry seed irradiation. *Radiat.Bot.*, 1961, vol.I,N.I,p.1-9
13. Caldecott R.S., Jonson E.B., North D.N., Konzak C.F. Modification of radiation-induced injury by posttreatment with oxygen. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.*, 1957, vol.43, p.975-983.

Рукопись поступила 17 января 1983 г.

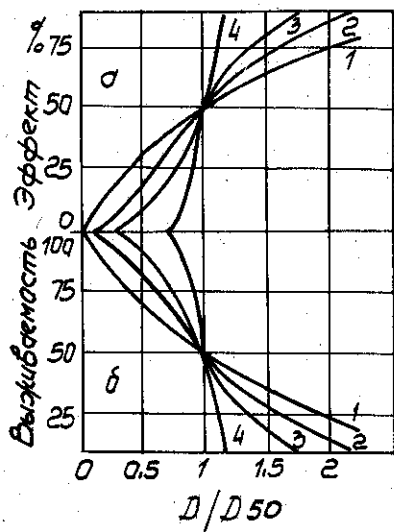


Рис. I

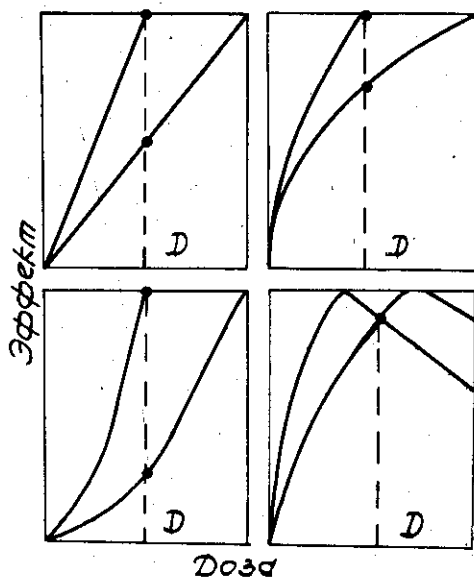


Рис. II

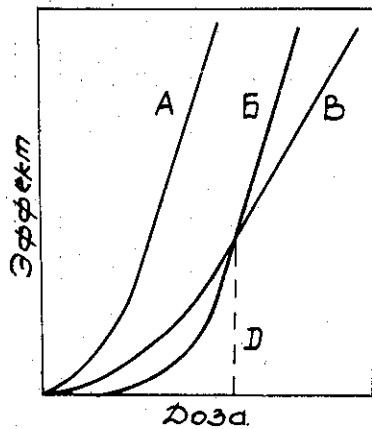


Рис. 3

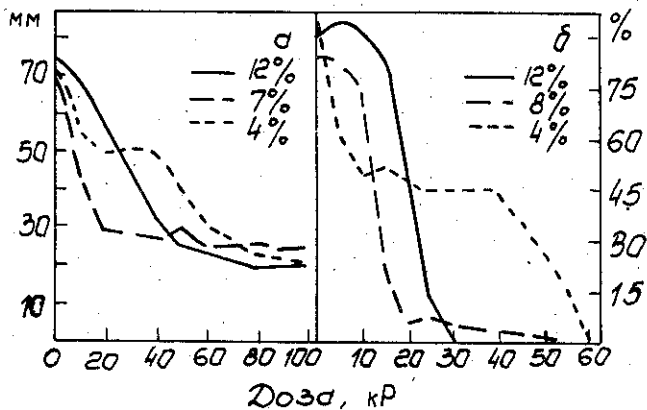
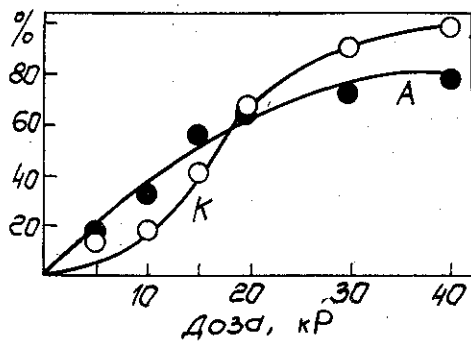


Рис. 4.



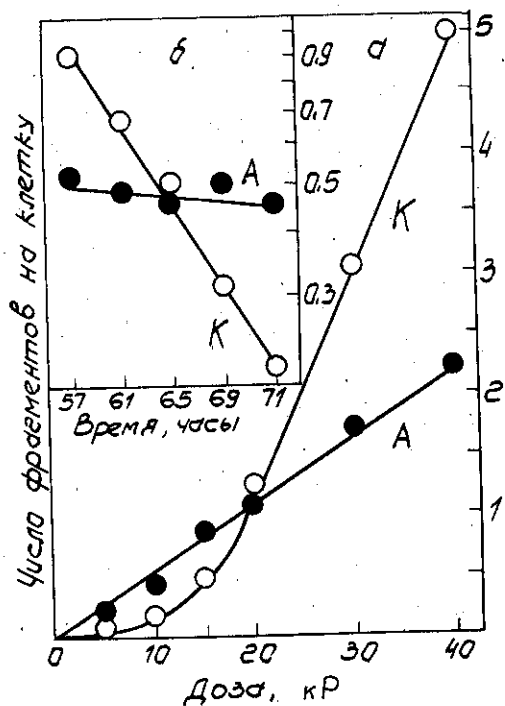


Рис.6

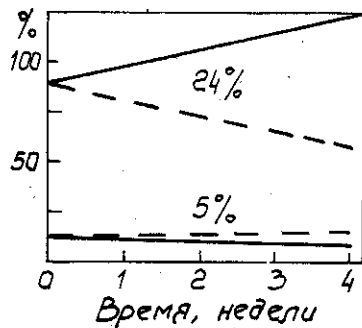


Рис.7

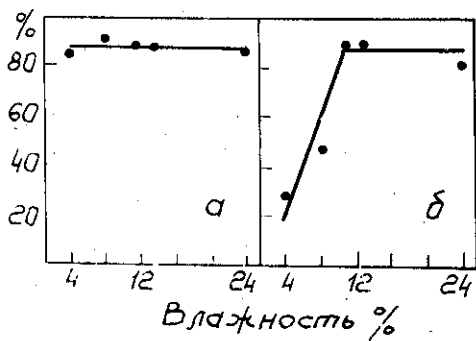


Рис.8

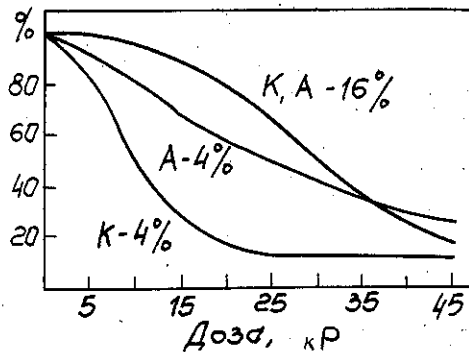


Рис.9

## ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

- Рис.1 Семейства кривых доза-эффект (а) и кривых выживаемости (б). Кривые 1,2,3,4 соответствуют значениям числа попаданий  $n=1, 2, 5, 50$ . На оси абсцисс отложены доли дозы, вызывающей 50% эффект.
- Рис.2 Гипотетические кривые доза-эффект: в чистом виде - правая кривая; при применении модифицирующего воздействия - левая кривая.
- Рис.3 Сравнение эффективности двух модифицирующих факторов, увеличивающих способность клеток к репарации. А - гипотетическая кривая доза-эффект, Б и В - модифицированные кривые.
- Рис.4 Зависимость высоты проростков (а) и процента зрелых растений (б) от дозы при облучении семян ячменя разной влажности.
- Рис.5 Влияние кислорода на зависимость от дозы облучения семян процента поврежденных анафаз. К - замачивание в присутствии кислорода; А - замачивания в отсутствие кислорода.
- Рис.6 Влияние кислорода на зависимость от дозы облучения (а) и от времени фиксации материала (б) числа фрагментов на клетку. Обозначения как на рис.5.
- Рис.7 Влияние пострадиационного изменения влажности на биологическое последствие в семенах пшеницы влажности 5 и 24%, облученных в дозе 20 кР. Прерывистые линии - хранение сухих семян во влажной атмосфере и влажных - в сухой. Ось ординат - высота проростков, процент относительно контроля

Рис.8 Влияние влажности на начальное поражение (а) и на биологическое последствие (б) в семенах ячменя, облученных в дозе 30 кР. Период хранения - 1 неделя. Ось ординат как на рис.7.

Рис.9 Изменение высоты проростков с дозой при пострadiационном замачивании семян ячменя влажности 4 и 16% в присутствии кислорода и азота.

Редактор Л.П.Мукаян  
Тех.редактор А.С.Абрамян

Заказ ГЭИ

ВФ-04358

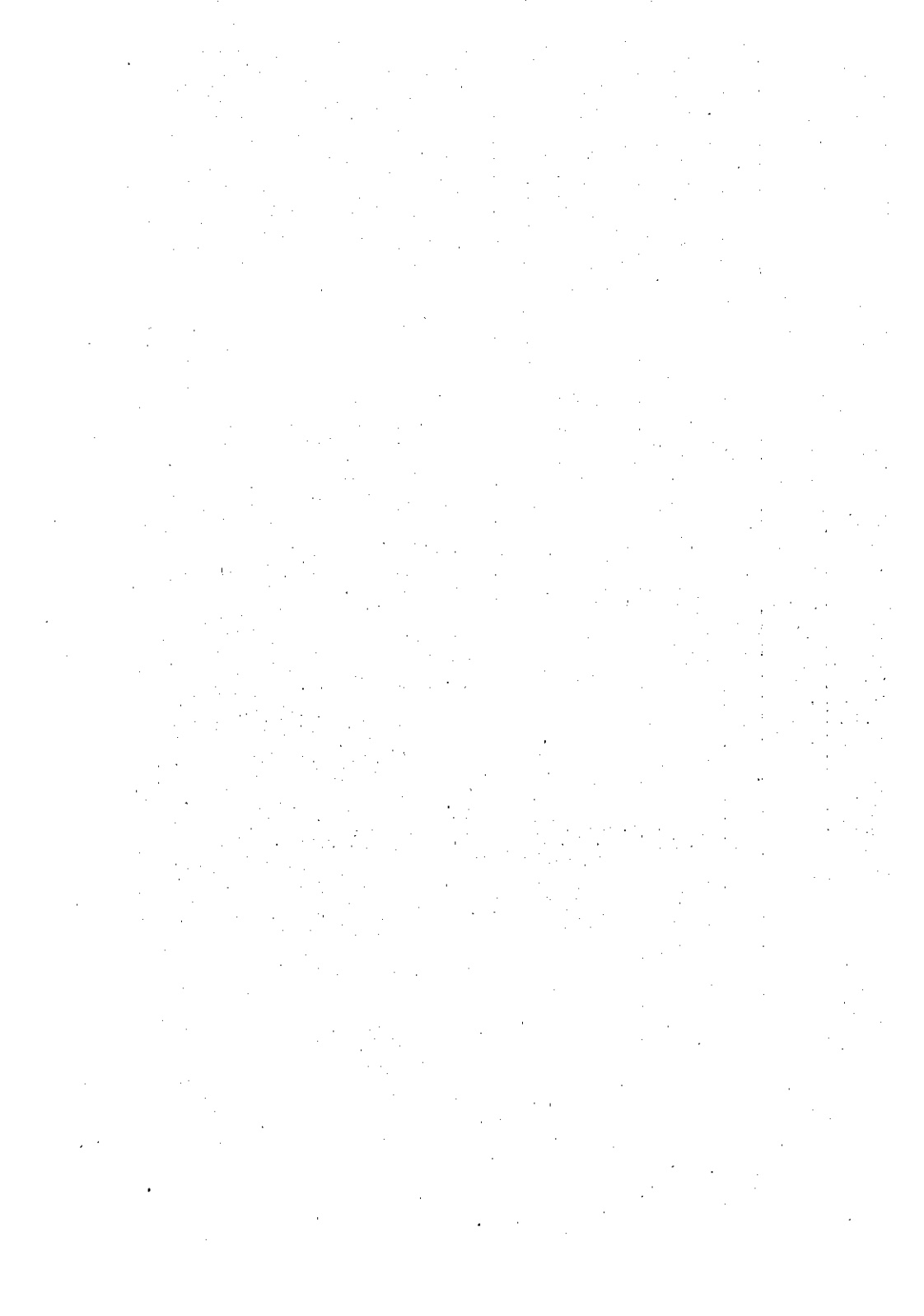
Тираж 299

Препринт ВФИ

Формат издания 60x84/16

Подписано к печати 19/У-83г. I, Суч.-изд. л. Ц. 15 к.

Издано Отделом научно-технической информации  
Ереванского физического института, Ереван 36, Маркаряна 2



индекс 3624

24