

ԵՐԵՎԱՆԻ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ  
ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ЕФИ-632(22)-83

Р.Р.АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛУЧЕВЫЕ  
ПОВРЕЖДЕНИЯ

П. ПРЕДРАДИАЦИОННЫЙ ТЕПЛОВОЙ ШОК

ԵՐԵՎԱՆ 1983 ԵՐԵՎԱՆ

Р.Р.АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛУЧЕВЫЕ  
ПОВРЕЖДЕНИЯ

## II. ПРЕДРАДИАЦИОННЫЙ ТЕПЛОВОЙ ШОК

Эффективность предрадиационного теплового шока как модифицирующего фактора связана с тем, что высокие температуры вытесняют из семян воду и кислород; влияние температуры через прогрев пренебрежимо мало. Сильное тепловое воздействие увеличивает резистентность семян к облучению и подавляет возможное развитие последствий, что обусловлено, по-видимому, удалением из семян кислорода. Усиление или инициирование (в случае влажных семян) пострадиационного поражения, наблюдающееся при применении умеренных тепловых воздействий, связано с удалением из семян воды.

Ереванский физический институт

Ереван 1983

R.R. ATAYAN

INFLUENCE OF TEMPERATURE  
ON RADIATION CYTOGENETIC DAMAGE  
2. PRE-IRRADIATION HEAT TREATMENT

The modifying effectiveness of pre-irradiation heat treatment is mainly due to heat-induced changes in seed oxygen and water content, not to heat per se. The strong thermal treatment increases the resistance of seeds to consequent irradiation and prevents the storage injury progression. These effects are apparently due to heat-induced oxygen expulsion from the seed. Increased post-irradiation damage at moderate temperatures is certainly due to heat-induced seed drying.

Yerevan Physics Institute

Yerevan 1983

ЕРЕВАНСКИЙ ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ЕФИ-632(22)-83

Р.Р.АТАЯН

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛУЧЕВЫЕ  
ПОВРЕЖДЕНИЯ

П. ПРЕРАДИАЦИОННЫЙ ТЕПЛОВОЙ ШОК

Ереван 1983

© *Ереванский физический институт*, 1983г.

Сухие семена (влажность до 10-12%) являются удобной системой для изучения модифицирующего влияния сопутствующих облучению факторов на физико-химическом уровне. Они как системы относительно инертные позволяют исследовать взаимодействие различных модифицирующих факторов без затемняющего влияния метаболизма. В настоящем исследовании влажность семян варьировалась таким образом, чтобы покрыть диапазон, в пределах которого модификация осуществляется на физико-химическом уровне.

В настоящем сообщении представлена серия кривых доза-эффект, полученных при воздействии на семена *Crepis capillaris* влажности 10, 5,3 и 2,5% тепловыми шоками - 60, 80 и 100°C в течение 30 минут - непосредственно до X-облучения (рис.1). Выход хромосомных aberrаций в метафазах учитывали при замачивании семян сразу после облучения и после пострadiационного хранения в течение одной недели.

Биологическое последствие - изменение поражения в процессе пострadiационного хранения, - наиболее заметное в семенах влажности 2,5%, сходит на нет с увеличением влажности. Обратим

внимание на то, что эффекты тепловых шоков в 60 и 80°C практически неотличимы, но они во всех случаях отличаются от эффектов шока в 100°C. В последнем случае термическая обработка защищает семена от последующего облучения, а также подавляет возможное развитие последствий в семенах. Меньшие температуры оказали защитное влияние на наиболее сухие семена, но не влияли на начальное поражение семян с большим содержанием воды. В семенах влажности 5,3% наблюдается усиление последствий, если они до облучения подвергались воздействию шоками в 60 и 80°C. Эти же температуры инициировали развитие пострadiационного поражения в семенах влажности 10%, в норме не проявляющих последствий. Под влиянием тепловых шоков кривые доза-эффект для семян влажности 2,5% приняли необычную форму: при малых дозах облучения выход хромосомных aberrаций в комбинированном варианте "температура + облучение" ниже, чем в соответствующих температурных контролях.

Представленные кривые, как нам кажется, являют собой прекрасную иллюстрацию положения о необходимости получения кривых доза-эффект в температурных радиобиологических исследованиях [1, 2]. Кривые доза-эффект для выхода хромосомных aberrаций, подобные полученным нами для семян влажности 2,5%, насколько нам известно, никем в литературе не сообщались. Представленные данные также показывают, что при исследовании модификации радиобиологических реакций клеток для полноты картины уровни сопутствующих облучению факторов следует изменять в широких пределах. В частности, варьирование температуры теплового воздействия позволило обнаружить новый феномен: усиление или даже, в случае семян влажности 10%, инициирование биологичес-

кого последствия.

Попытаемся определить в общих чертах подход к интерпретации данных по влиянию предрадиационных шоков на семена.

Многие эффекты модифицирующих факторов обусловлены влиянием их на эффективность кислорода — основного модифицирующего фактора [3]. Вода является важным вторичным фактором, регулирующим участие кислорода в индуцированных радиацией биологических эффектах [4-7]. В частности, зависимость начальной радиочувствительности и биологического последствия от влажности семян определяется степенью проявления кислородного эффекта [3]. Воздействие на семена тепловым шоком неизбежно влечет за собой удаление из семян некоторого количества воды. Сравнивая реакцию на облучение семян одинаковой влажности, полученных двумя разными путями — путем термической обработки и путем выдерживания в атмосфере соответствующей относительной влажности — можно идентифицировать эффекты тепловых шоков, непосредственно обусловленные влиянием через высушивание семян на кислородозависимое поражение. Данные о влиянии предрадиационных тепловых шоков следует рассматривать на фоне данных об изменении начального поражения и последствия в соответствующем диапазоне влажностей. Знание этих "фоновых" зависимостей необходимо для установления возможного влияния теплового шока через высушивание семян. Следует в то же время помнить, что высокая температура способна вытеснить из семян не только воду, но и кислород. К сожалению, попытка контролировать кислород в температурных радиобиологических опытах с семенами сталкивается с непреодолимыми трудностями. И тем не менее можно выделить те температурные эффекты, которые связаны непосредственно с вытеснением кислорода.

Дело в том, что в исследованном нами диапазоне влажностей наблюдается обратная зависимость начального поражения семян от влажности (за исключением сверхсухой области 0-1%). Это значит, что влияние температуры через высушивание будет направлено в сторону усиления поражения. В то же время влияние температуры через удаление кислорода будет направлено, очевидно, в сторону уменьшения поражения. Удаление кислорода и воды в семени происходит одновременно, и оба эффекта растут с температурой тепловой обработки. По изменению выхода реакции можно судить о том, который из путей влияния теплового шока оказался эффективнее в данной конкретной ситуации. Безусловно, температура может вызвать в семенах изменение и других параметров (помимо влажности и кислорода), но определить их и оценить их значение не представляется возможным.

Подчеркнем еще одно обстоятельство, которое иначе может остаться незамеченным. Влияние температуры через прогрев, столь существенное при применении теплового шока после облучения, в эффектах, вызванных предрадиационным шоком, пренебрежимо мало. По крайней мере, использованный нами материал терял температуру очень быстро — в пределах минуты, проходящей от конца термической обработки до начала облучения. По-видимому, то же верно и в отношении более крупных семян. Правда, Конзак с сотрудниками обратили внимание на то, что семена ячменя, обработанные тепловым шоком, к моменту облучения оставались теплыми, и предположили, что это обстоятельство в какой-то мере ответственно за эффект теплового шока [6]. Хотя экспериментальная проверка этого предположения не представляла каких-либо сложностей, она проведена не была. В дальнейшем на тех же семенах ячменя Бергбуш и

Калдекотт показали, что защитный эффект теплового шока не зависит от интервала времени (вплоть до 8 недель), проходящего между термической обработкой и облучением [9]. Этот результат показывает, что предположение предыдущих авторов о влиянии предрадиационного теплового шока через прогрев лишено оснований.

Прежде чем перейти к интерпретации конкретных результатов, отметим, что изучение зависимости выхода хромосомных аберраций от влажности в семенах *Crepis capillaris* показало, что семена наиболее чувствительны при влажности 2-3%; чувствительность падает с увеличением влажности до 8%, где начинается плато. Значительное биологическое последствие - увеличение выхода хромосомных аберраций до 3-3,5 раз - наблюдается в семенах влажности 2-3%. С увеличением влажности величина последствия падает. И наконец, "сверхсухие" семена (влажность около 0%) примерно в 4 раза резистентнее семян влажности 2%; выход хромосомных аберраций в этих семенах с пострadiационным хранением заметно не изменяется.

Конгер [10] считает, что защитное влияние предшока связано с уменьшением количества воды в семенах. В качестве единственного довода в пользу этого представления он приводит наблюдение, что семена в процессе термической обработки теряют влагу. Калдекотт [9,11] считает, что защитное влияние предшока не связано с уменьшением количества воды в семенах. В качестве единственного довода в пользу этого представления он приводит наблюдение, что биологические результаты воздействия на семена гелловым шоком в течение 15 минут и 24 часов одинаковы, тогда как семена при этом теряют разное количество воды. Дискуссия по этому вопросу между Конгером и Калдекоттом [10] не привела к опре-

деленному заключению ввиду отсутствия прямых экспериментальных доказательств. Нам кажется, что утверждения общего характера здесь вряд ли оправданы — выводы о возможной роли высушивания в наблюдаемой картине должны делаться, как уже было отмечено, на основании знания того, в каком диапазоне изменяется влажность семян в результате теплового воздействия и, с другой стороны, как в этом же диапазоне влажностей меняется радиочувствительность семян. Тепловой шок в 100°C снижает влажность семян *Speris* на несколько процентов. "Фоновые" опыты показали, что уменьшение влажности в диапазоне 2–10% приводит к усилению радиобиологической реакции клеток. Таким образом, если бы эффект предшока был обусловлен удалением воды, следовало бы ожидать увеличения, а не уменьшения выхода хромосомных aberrаций. Итак, защитный эффект теплового шока в 100°C в семенах влажности 10 и 5,3% не связан с удалением воды из семян. Подобный вывод будет правомерен во всех случаях, когда начальная и конечная (после термического воздействия) влажности семян находятся в диапазоне, в пределах которого наблюдается обратная зависимость радиочувствительности от влажности. На основании приведенных выше соображений можно прийти к заключению, что защитный эффект предрадиационных тепловых шоков обусловлен удалением из семян кислорода. Здесь интересно вспомнить, что исследования предрадиационного влияния кислорода, окиси азота и температуры на выход и природу радикалов в семенах также привели (другим путем) к выводу, что защитное действие теплового шока сводится к удалению из семян кислорода [12, 13]. Естественно представить, что с понижением температуры уменьша-

ется количество удаленного кислорода. Отсутствие защитного эффекта при воздействии на семена влажности 5,3 и 10% тепловыми шоками в 60 и 80°C можно объяснить тем, что при низких температурах вытеснение кислорода не столь эффективно, чтобы перекрыть эффект высушивания.

Подавление биологического последствия мы наблюдали в семенах, обработанных до облучения тепловым шоком в 100°C. Этот эффект также не связан с высушиванием семян — наши "фоновые" опыты показали, что уменьшение влажности в исследуемом диапазоне должно было бы привести к усилению последствия, а не к подавлению его. Вытеснение из семян кислорода может обусловить не только защитный эффект, но и подавление последствия. Тем более, что кислород редифундирует в обработанные высокой температурой семена, с большим трудом (см. дискуссию в [14]). С уменьшением температуры предрадиационной обработки уменьшается, естественно, и количество вытесненного кислорода, и в этом случае следует ожидать развития пострadiационного поражения, что мы и наблюдали в опыте.

Рассмотрим, далее, с чем связано индуцированное тепловыми шоками в 60 и 80°C усиление последствия в семенах влажности 10 и 5,3%. Детальный анализ имеющегося у нас экспериментального материала приводит нас к следующему общему утверждению: в диапазоне влажностей 2-8% в семенах каждой данной влажности наблюдается примерно одинаковое пострadiационное усиление поражения независимо от того, каким путем (прогрев или высушивание) были получены эти семена. Таким образом, при умеренных тепловых воздействиях, когда в семенах остается достаточно для развития

последствия кислорода, влияние температуры на выход изучаемой реакции осуществляется через влияние на влажность — фактор, контролирующий степень проявления кислородного эффекта.

Подход к интерпретации данных по влиянию предрадиационных тепловых шоков на семена, который мы определили выше, допускает следующее следствие: диапазон влажностей, в пределах которого можно наблюдать модификацию радиочувствительности семян на физико-химическом уровне, расширяется, если в качестве сопутствующего облучению фактора применяется предрадиационный тепловой шок. Это следствие было проверено нами в эксперименте с семенами влажности 18,6%. На рис. 2 приведены основные кривые (а), а также кривые доза-эффект при температурах 60 (б) и 80°C (в). Тепловой шок 100°C оказался для этих семян летальным. Влажные семена реагировали на облучение неровно. Данные, однако, позволили получить ответ на интересующий нас вопрос. Обработка семян температурой 80°C снижала их влажность примерно до 8%, и такое высушивание оказалось достаточным для развития в семенах значительного пострадиационного поражения.

Применим развиваемые здесь представления к интерпретации результатов исследования влияния предрадиационного теплового шока на восстановление лучевых повреждений хромосом, опубликованных ранее [18]. В качестве тест-системы были избраны покоящиеся семена гороха влажности 17%. К шок-овому воздействию были предъявлены следующие требования: это воздействие должно быть достаточно сильным, чтобы иметь ощутимый эффект на семена; оно не должно влиять на всхожесть семян. Температура 70°C в течение 30 минут удовлетворяла этим условиям. Кривые доза-эффект,

полученные при применении теплового шока, качественно от контрольных (облучение без температурного воздействия) не отличались. Количественное сравнение экспериментальных данных показало, что под влиянием теплового шока несколько снижался выход фрагментов, но не мостов. Зависимость эффекта от дозы была получена для последней временной точки фиксации первого митоза. Для установления зависимости эффекта от времени материал фиксировали в пяти равноотстоящих друг от друга временных точках в пределах первого митоза. Кривые время-эффект, полученные для дозы 10 кР, показали, что тепловой шок не оказывает существенного влияния на скорость восстановления лучевых повреждений хромосом. Умеренное тепловое воздействие лишь незначительно (на 2-3%) снижало влажность семян и вряд ли влияло существенно на уровень кислорода. То обстоятельство, что тепловой шок не влиял на реакцию семян на облучение, должно свидетельствовать, следовательно, о примерно одинаковой радиочувствительности (измеренной в конце первого митоза) семян гороха влажности 14,15 и 17%. Этот вывод вполне согласуется с данными Порядковой [16], детально исследовавшей влияние влажности семян гороха на цитогенетические эффекты облучения.

С семенами *Steris* влажности 2,5% ситуация несколько иная. Эти семена реагируют одинаковым образом как на удаление воды, так и на удаление кислорода. Каждый из этих механизмов мог вполне объяснить результаты, полученные нами для сухих семян. В то же время, ни один из этих механизмов не мог обусловить своеобразную форму кривых доза-эффект.

На рис.3 цитогенетический эффект, начальный (а) и пострадиационный (б), представлен как функция температуры предрадиа-

ционной обработки для каждой дозы. Выход aberrаций указан за вычетом соответствующих температурных контролей, также показанных на рисунке. Следовательно, выход aberrаций ниже нулевого уровня свидетельствует о том, что поражение в комбинированном варианте было меньше, чем в температурном контроле. Легко видеть, что выход aberrаций при комбинированной обработке находится в обратной зависимости от температуры предобработки. Детальный анализ кривых доза-эффект для семян влажности 2,5% опубликован в [17], и мы лишь вкратце изложим основные соображения, выдвинутые нами для объяснения полученной картины. Основные наблюдения, которые выделяют семена влажности 2,5% среди других семян, испытанных нами, следующие:

(1) сильный цитогенетический эффект тепловых шоков; эффект растет с температурой;

(2) тепловой шок защищает от последующего облучения; эффект растет с температурой;

(3) облучение, примененное после термического воздействия, снижает выход реакции; эффект падает с дозой.

Приемлемая интерпретация экспериментальных данных должна непротиворечиво объяснить все эти факты.

Свободные радикалы в семенах играют важную роль как промежуточное звено в индуцировании генетических изменений ионизирующими излучениями [18]. Показано, что тепловой шок вызывает усиление сигнала ЭПР в семенах [19]. Конгер находит, что к образованию хромосомных aberrаций приводят радикалы [10]. Можно думать, что радикалы, индуцированные термическим воздействием, вовлекаются, по крайней мере частично, в реакции, ведущие к образованию хромосомных aberrаций. Если это так, то

легко объясняется сильный цитогенетический эффект тепловых шоков и рост его с температурой — факт (1). Пусть радикалы, индуцируемые облучением, взаимодействуют с радикалами, индуцированными тепловым шоком, что приводит к элиминации потенциально вредных радикалов. Тогда следует ожидать, что выход реакции при малых дозах будет падать до некоторого уровня, затем с увеличением дозы будет расти — факт (3). Согласно этой же интерпретации, чем больше радикалов индуцировано тепловым шоком, тем больше X-индуцированных радикалов будет безвредно удалено из семян путем рекомбинации — факт (2). Предлагаемая нами гипотеза вполне удовлетворительно объясняет сложную зависимость эффекта от дозы при комбинированном действии на сухие семена тепловых шоков и облучения.

Температурные эффекты оцениваются по изменению выхода изучаемой реакции в результате термического воздействия. Температура, сообщенная семенам в виде предрадиационного теплового шока, не вмешивается непосредственно в ход первичных радиобиологических процессов. Эффективность ее как модифицирующего фактора связана с тем, что она переводит семена из исходного состояния в новое, характеризующееся иными параметрами. Изменение уровня важнейших сопутствующих облучению факторов — кислорода и влажности, и приводит в конечном счете к изменению выхода изучаемой радиобиологической реакции. Заметим, что температурный эффект сводится, фактически, к кислородному эффекту. Мы рассмотрели два пути, согласно которым предрадиационный тепловой шок влияет на кислородный эффект: (1) удаление кислорода, препятствующее проявлению кислородного эффекта, и (2) удаление воды,

способствующее проявлению кислородного эффекта. Эти два противоположно направленных пути и есть, по-видимому, два основных механизма, определяющих эффективность предрадикационного теплового шока как модифицирующего фактора. Температурные радиобиологические опыты с семенами следует контролировать параллельными опытами по установлению влияния высушивания (в соответствующем диапазоне влажностей) на выход изучаемой реакции. Это дает возможность идентифицировать температурные эффекты, обусловленные влиянием температуры через удаление из семян воды.

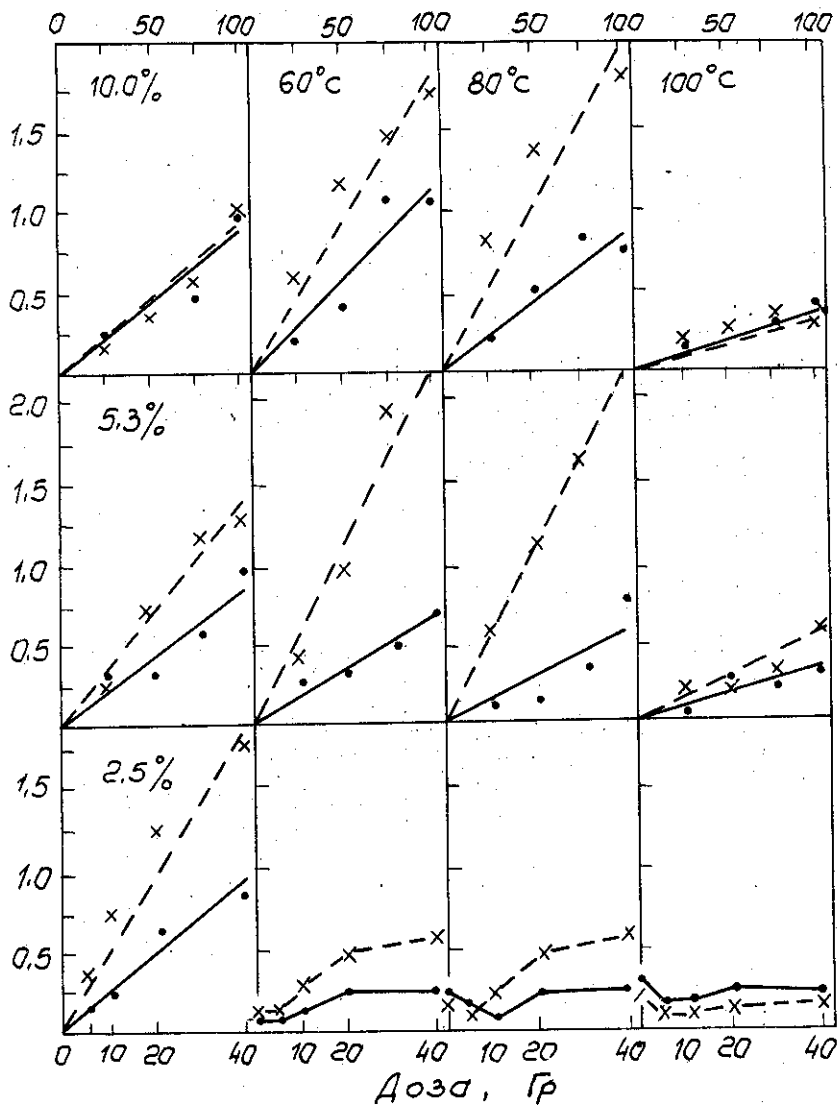


Рис. I Влияние предрадиационных тепловых шоков на выход хромосомных aberrаций в семенах влажности 10,0; 5,3 и 2,5%.

Замечание: сразу после облучения —●—, после кра-  
нения — — —х— . Ось ординат - число хромосомных  
aberrаций на клетку.

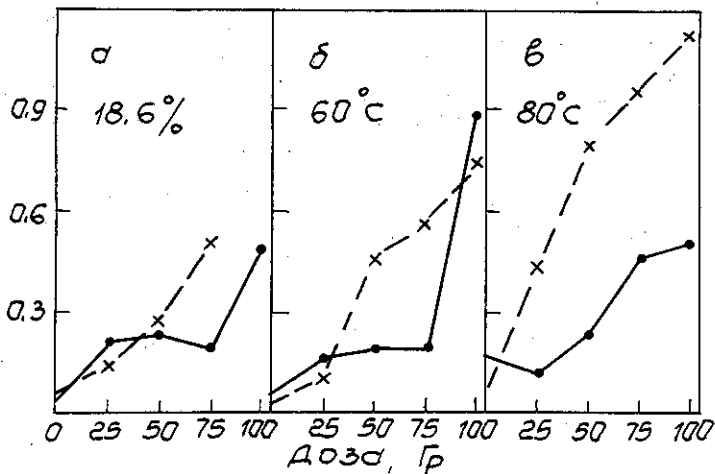


Рис.2 Влияние преирирационных тепловых шоков на выход хромосомных aberrаций в семенах влажности 18,6%. Обозначения как на рис.1.

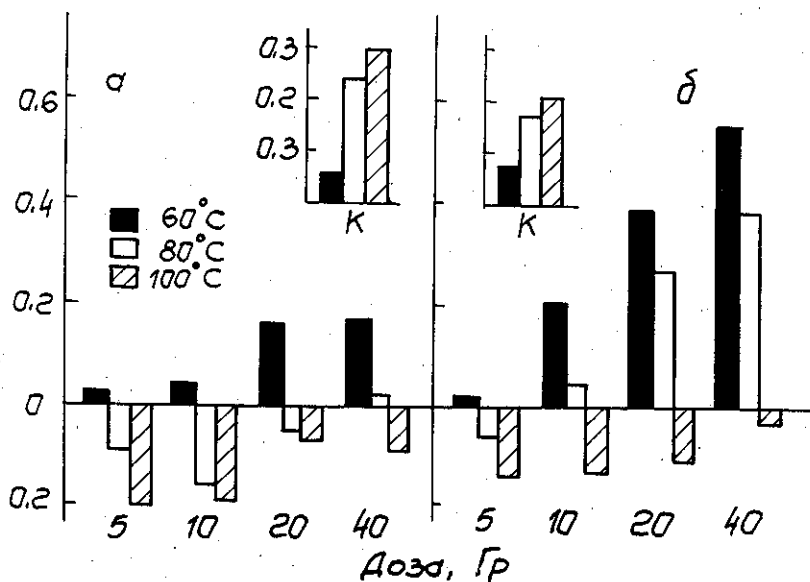


Рис.3 Изменение с температурой преирирационной обработки начального (а) и пострadiационного (б) поражения семян влажности 2,5%. Ось ординат как на рис.1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И. Применение принципа попадания в радиобиологии. М.: Атомиздат, 1966.
2. Alper T. Cellular radiobiology. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1979.
3. Conger B.V. Control and modification of seed radiosensitivity. Trans. ASAE, 1972, vol.15, p.780-784.
4. Ahnström G. Effects of oxygen and moisture content on the radiation damage in barley seeds irradiated with fast neutrons and  $\gamma$ -rays. In Neutron irradiation of seeds II. FAD/IAEA Panel, Tech.Rept., Ser., 92. Vienna, IAEA, 1968, p.43-48.
5. Conger B.V., Nilan R.A., Konzak C.F. The role of water content in the decay of radiation-induced oxygen-sensitive sites in barley seeds during post-irradiation hydration. Radiat.Res., 1969, vol.39, p.45-46.
6. Afzal S.M.J., Kesavan P.C. Influence of seed moisture content and postirradiation hydration temperature on the kinetics of reactivity towards oxygen or decay of oxygen-sensitive sites. Int.J.Radiat.Biol., 1979, vol.36, N.2, p.161-176.
7. Saleh M.N. Effect of oxygen on genetic damage in barley seeds induced by  $\gamma$ -radiation. Hereditas, 1981, vol.94, p.83-91.
8. Konzak C.F., Curtis H.J., Delihis N., Nilan R.A. Modification of radiation-induced damage in barley seeds by thermal energy. Can.J.Genet.Cytol., 1969, vol.12, p.129-141.

9. Bergbusch V.L., Caldecott R.S. The effects of preirradiation and postirradiation temperature treatments on the X-ray sensitivity of seeds of *Hordeum*. *Radiat.Res.*, 1963, vol.20 p.207-220.
10. Conger A.D. Chromosome aberrations and free radicals. In S.Wolff ed. *Radiation-induced chromosome aberrations*. N.Y. Columbia Univ.Press, 1963, p.167-202.
11. Caldecott R.S. Seedling height, oxygen availability, storage and temperature: their relation to radiation-induced genetic and seedling injury in barley. In *Effects of ionizing radiations on seeds*. Vienna, IAEA, 1961, p.3-24.
12. Ehrenberg A., Ehrenberg L., Löfroth G. Radiation-induced paramagnetic centers in plant seeds at different oxygen concentrations. *Abhandl.Dtsch. Akad.Wiss., Berlin. Kl. für Med.*, 1962, vol.1, p.229-231.
13. Bhaskaran S., Köhnlein W. ESR studies on plant seeds of differential radiosensitivity - 11. Effect of oxygen and nitric oxide at different temperatures. *Radiat.Bot.*, 1964, vol.291-298.
14. Nilan R.A., Konzak C.F., Legault R.R., Harle J.R. The oxygen effect in barley seeds. In *Effects of ionizing radiations on seeds*. Vienna, IAEA, 1961, p.139-154.
15. Атаян Р.Р. Влияние температурных шоков на частоту хромосомных aberrаций, вызванных облучением покоящихся семян. *Радиобиология*, 1968, т.8, № 4, с.603-608.
16. Порядкова Н.А. Первичные лучевые повреждения и их восстановление в покоящихся семенах разной влажности. *ДАН СССР*, 1960, т.134, № 3, с.706-709.

17. Atayan R.R. Combined effects of high temperatures and X-rays in dry seeds. Stud.Biophys., 1978, vol.68, p.71-78.
18. Ehrenberg A. Research on free radicals in enzyme chemistry and in radiation biology. In M.S. Blois Jr. ed. Free radicals in biological systems. N.Y., Academic Press, 1961, p. 337-350.
19. Randolph M.L., Heddle J.A., Hosszu J.L. Dependence of ESR signals in seeds on moisture content. Radiat.Bot., 1968, vol.8, p.339-343.

Рукопись поступила 17 января 1983 г.

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

Заказ 128

ВФ-04359

Тираж 250

Препринт ВФИ

Формат издания 60x84/16

Подписано к печати 19/У-83г. I, Оуч.-изд.л. Ц. I5 к.

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

индекс 3624

24