

УДК 57.–17.3

ОЦЕНКА КРИТИЧЕСКОГО УРОВНЯ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ, СОВМЕСТИМОГО С ВЫЖИВАНИЕМ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ У ГОРОХА

Кравец Е. А., Михеев А. Н., Овсянникова Л. Г., Забара Е. П., Гродзинский Д. М.

Оценка критического уровня радиационного повреждения апикальной меристемы, совместимого с выживанием и восстановительными процессами у гороха. — Е. А. Кравец, А. Н. Михеев, Л. Г. Овсянникова, Е. П. Забара, Д. М. Гродзинский. — Для определения критического уровня повреждения апикальной меристемы проростков гороха, индуцированного острым облучением, построены дозовые зависимости ростовых и цитогенетических параметров в диапазоне доз от 2 до 20 Гр. Сопоставляли частоты aberrantных анафаз и поклеточного распределение aberrаций, с одной стороны, и прирост фитомассы, выживаемость меристемы и регенерацию корня, с другой. Это позволило оценить 50 %-ный уровень частоты aberrantных анафаз в корневой меристеме как критический. Превышение этого уровня приводит к запуску суицидной программы в меристеме через индукцию мультиaberrantных повреждений и интерфазной гибели клеток. Предполагается, что в механизмах восстановления допорогового уровня главную роль играет клеточная конкуренция между клонами неaberrantных клеток, клеток с одной и двумя перестройки, и мультиaberrantными клетками. В корневой меристеме 50 %-ный порог маскируется репопуляцией. Регенерация главного корня обеспечивает полное или частичное восстановление латеральной и апикальной меристемы, однако этих локальных процессов может быть недостаточно для восстановления морфогенеза и выживания проростков при значительном превышении порога повреждаемости.

Ключевые слова: апикальная меристема, критический уровень повреждения, дозовые зависимости, острое облучение, частота aberrantных анафаз, поклеточное распределение aberrаций, выживаемость меристемы, регенерация, *Pisum sativum* L.

Адрес: 03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ; e-mail: elkrav@online.ua

Evaluation of the critical level of apical meristem radiation damage at the root of pea seedlings. — E. Kravets, A. Mykhayev, L. Ovsyannikova, E. Zabara, D. Grodzinsky. — There were build the dose dependencies of growth and cytogenetical values in the range from 2 to 20 Gr to determine the critical level of apical meristem damage of the pea seedlings induced by acute irradiation. We have analyzed the frequency of aberrant anaphases and the aberration distribution per cell, on the one hand, and the growth of biomass, the survival and regeneration of the root meristem and positional information, on the other. So critical level of damage to the apical meristem of stem and root of seedlings was defined as 50% of aberrant anaphase. Exceeding this level leads to launch suicidal program through induction multiaberrant damages and interphase cell death. Appears that primary role in the mechanisms of recovery up to critical level damage plays a competition between clones of non-aberrant cells, the cells bearing 1 and 2 damages and multiaberrant cells. In the root meristem 50% critical level is masked by repopulation. The regeneration of the main root provides full or partial restoration of the lateral and apical meristem. However these local processes is not enough to restore the morphogenesis and survival of seedlings in excess of the critical level damage.

Key words: apical meristem, critical level of damage, dose dependencies, acute irradiation, frequency of aberrant anaphase, aberration distribution per cell, survival of meristem, regeneration, *Pisum sativum* L.

Address: 148, Acad. Zabolotnoho, str. Kiev, 03680, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU; e-mail: elkrav@online.ua

Оцінка критичного рівня радіаційного пошкодження апікальної меристеми кореня у проростків гороху. — О. А. Кравец, О. М. Михеев, Л. Г. Овсянникова, Е. П. Забара, Д. М. Гродзинський. — Для визначення критичного рівня ушкодження апікальної меристеми кореня, індукованого гострим опроміненням, побудовано різних дозові залежності ростових та цитогенетичних параметрів в діапазоні доз від 2 до 20 Гр. Співставлення частоти aberrantних анафаз і поклітинного розподілу aberrаций, з одного боку, і приросту фітомаси, виживаності меристеми і регенерації кореня, з іншого, дозволило оцінити 50 %-вий рівень частоти aberrantних анафаз як критичний. Перевищення 50%-го рівня пошкодження в меристемі призводить до запуску суїцидної програми через індукцію мультиaberrantних пошкоджень і інтерфазної загибелі клітин. Припускається, що в механізмах відновлення при допороговому рівні пошкодження головну роль виконує клітинна конкуренція між клонами неaberrantних клітин, клітин, які мають 1 або 2 ушкодження, і мультиaberrantними клітинами. У кореневій меристемі 50%-ний поріг маскується репопуляцією. Регенерація забезпечує повне або часткове відновлення латеральної і апікальної меристеми головного кореня, однак цих локальних процесів недостатньо для відновлення морфогенезу і виживання проростків при значному перевищенні порога пошкодження.

Ключові слова: апікальна меристема, критичний рівень пошкодження, дозові залежності, частота хромосомних перебудов, поклітинний розподіл аберацій, клітинна конкуренція, репопуляція, регенерація, гостре опромінення, *Pisum sativum* L.

Адреса: 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ;
e-mail: elkrav@online.ua

Вступлення

Радиационное повреждение апикальных меристем растения может иметь широкий диапазон последствий – от эффектов стимуляции до ингибирования и полной гибели меристемы. Пролиферативная гибель меристематических клеток, как одна из составляющих этих процессов, в значительной степени определяется повреждением их хромосомного аппарата, что обуславливает адекватности цитогенетических критериев для характеристики воздействия ионизирующей радиации на клетку [2, 3]. В основе гибели клеток обычно лежат несбалансированные перестройки – асимметричные обмены и ацентрические фрагменты [1 – 4, 20]. Показано, что репродуктивная гибель аберрантных клеток происходит в течение нескольких, обычно 3–5, клеточных поколений после облучения [2, 3]. Молекулярные механизмы повреждения ДНК и хромосом достаточно полно исследованы [3, 7, 16, 27], однако немного известно о реализации первичных повреждений ДНК в хромосомные аберрации [5 – 7].

Для количественной характеристики радиобиологического эффекта часто используется такой интегральный показатель как выживаемость. Вместе с тем, данные по сопоставлению результатов цитогенетического анализа и выживаемости целого организма, органа или ткани отсутствуют. Полагают, что при оценке причинной связи между аберрациями хромосом и гибелью организма возникает много дополнительных обстоятельств, влияющих и усложняющих результаты такого сопоставления, например, выживание гамма-проростков, клеточно-репопуляционные или регенерационные процессы [5, 6]. По этой причине практически отсутствуют данные о пороговых значениях цитогенетического повреждения меристемы, коррелирующих с ее выживанием или гибелью, и выживанием или гибелью структур более высоких уровней организации (ткани, органа, организма). Определение критического резерва клеток популяции апикальной меристемы корня гороха при воздействии ионизирующего облучения находим в работе И.Н.Гудкова [6]. По данным автора, минимальное число клеток, при котором возможно репопуляционное восстановление меристемы при радиационном поражении, составляет около 30 % от общего числа клеток в норме, из которых лишь 45%, т.е. 13 % сохраняют способность к пролиферации. Отметим, что речь здесь идет о регенерационном восстановлении за счет покоящегося центра, пролиферационная активность клеток которого запускается, по мнению автора, при дозах от 8 Гр и выше. При этом, контроль уровня цитогенетического повреждения меристемы не проводился.

Целью данного исследования была цитогенетическая оценка порогового уровня повреждаемости апикальной меристемы, совместимого с ее выживанием и восстановительными процессами. Задачи работы состояли в анализе и сопоставлении следующих дозовых зависимостей: прироста фитомассы, частоты аберрантных анафаз (ЧАА) и частоты неаберрантных (нормальных) анафаз (ЧНА), поклеточного распределения аберраций, нагруженности клетки аберрациями, выживаемости меристемы и корня, регенерационных процессов в корне. Предполагалось, что сопоставление дозовых зависимостей по указанным параметрам позволит выявить связь в проявлении разных радиобиологических реакций и определить пороговые значения цитогенетических параметров меристемы, превышение которых приводит к гибели ткани, орган или весь организм.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовались проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Комет) в двух сериях экспериментов. По данным литературы, наибольшей радиочувствительностью характеризуются двухдневные проростки гороха [6]. ЛД₅₀ (на 10 день облучения) составляет для них 8,2 Гр (сорт Рамонский 77), а стимулирующая рост доза – 0,35 Гр. Мы облучали трехсуточные проростки в первой серии опытов на гамма-установке РОКУС при мощности облучения 1,42 сГр/с в дозах 8, 10, 13, 16 и 20 Гр, а во второй серии опытов – на рентгеновской установке РУМ-17 (I=10 А; U=200 keV) в дозах 2, 4, 6 и 8 Гр. Для того, чтобы избежать возможного цитостатического эффекта облучения цитогенетический анализ меристемы проводили через 48 час после облучения. Оценивали следующие цитогенетические параметры: ЧАА (частота аберрантных ана-телофаз в процентах от 100 проанализированных), ЧНА (частота нормальных ана-телофаз), поклеточное распределение аберраций (одна, две, три и множественные перестройки на клетку в процентах к общему числу аберрантных анафаз), нагруженность аберрациями аберрантной клетки (отношение суммы всех аберраций к числу аберрантных анафаз, Аб/АК), а также нагруженность аберрациями меристемы (отношение суммы всех аберраций к общему числу ана-телофаз, Аб/К). Классификацию аберраций в анафазе проводили по следующим видам: фрагменты одинарные и парные, мосты одинарные (хроматидные) и парные (хромосомные), мосты с одинарными и парными фрагментами [2, 4]. Мультиаберрантные перестройки идентифицировались при учете более трех аберраций на анафазу. При наличии микроядра в анафазе его учитывали за одно нарушение.

Указанные критерии характеризуют разные стороны и степень повреждения меристемы. Объем выборки составлял 9–11 корешков. На 8 сутки определяли выживаемость меристемы (визуально по побурению апексов и на основании гистологического анализа), фиксировали апексы корней и изготавливали постоянные цитологические препараты для анализа регенерационных процессов. На 8 и 14 сутки определяли степень развития латеральных корней и корреляцию между развитием стебля и корня. Давленные препараты окрашивали ацетоорсеином, постоянные – по Фельгену согласно общепринятой цитологической методике [17]. В течение 2-х недель культивирования определяли динамику прироста фитомассы надземной и корневой частей проростков. Материал статистически обработан [14].

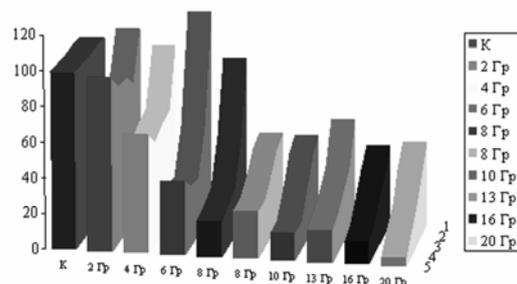
Результаты исследования

Дозовые зависимости по приросту фитомассы. Установлено, что формирование стебля ингибировалось сильнее, чем корня при всех использованных дозах (рис. 1 а, б). При дозах свыше 6 Гр развитие стебля резко угнеталось; тормозилась, прежде всего, экспоненциальная фаза прироста фитомассы, основу которой составляет растяжение первых междоузлий побега и закладка узлов. При дозах от 10 Гр и выше формирование стебля практически полностью блокировалось. Развитие корневой системы также тормозилось при всех использованных дозах, особенно от 10 Гр, а от 13 Гр прирост корня останавливался. Угнетение развития корневой системы до 10 Гр проявляется в основном в блокировании образования и роста латеральных корней, от 10 Гр и выше – замедлении и остановке роста главного корня.

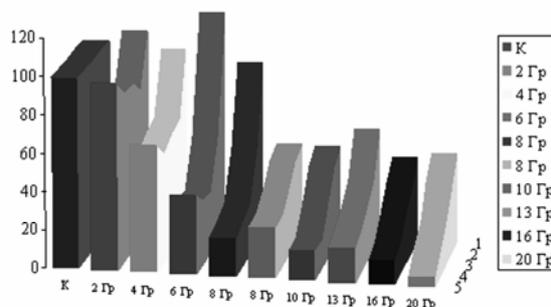
Дозовые зависимости по ЧАА и поклеточному распределению aberrаций. С помощью цитогенетического анализа корневой меристемы выявлена возрастающая частота хромосомных aberrаций от 27 % (при 2 Гр) до 80–94 % при 20 Гр (рис. 2 а). Дозовая кривая слагалась из нескольких участков, дважды формируя экспоненту в области до 4 Гр и после 8 Гр. В диапазоне доз между 4 и 8 Гр выделяется участок стабилизации повреждения меристемы на уровне 45–48%, что может осуществляться за счет успешной клеточной конкуренции между клонами нормальных и aberrантных клеток. Характер поклеточного распределения aberrаций в этом же диапазоне доз обнаруживает тенденцию к снижению числа мультиaberrантных повреждений и повышению частоты анафаз с одиночными перестройками (рис. 2 б). Это дает основание полагать, что в основе снижения числа aberrаций при повышении дозы облучения могут лежать механизмы клеточной конкуренции, а именно, конкуренции между клонами неaberrантных (нормальных), клеток с единичными перестройками и мультиaberrантными клетками.

Клеточная конкуренция, очевидно, поддерживается репопуляцией, которая пополняет клоны не-

aberrантных клеток за счет находящихся в момент облучения клеток в G_1 и G_0 . Действительно, в точной конкуренции может быть важна роль не только клонов неaberrантных клеток. Клетки, несущие одинарные или двойные перестройки, также могут сохраняться в клеточных потоках, выигрывая конкуренцию с более нагруженными перестройками клетками. Известно, что одна или две перестройки на клетку не всегда приводят к ее гибели, поскольку aberrантные хроматиды могут равномерно распределяться между анафазными наборами [2, 3].



а - а

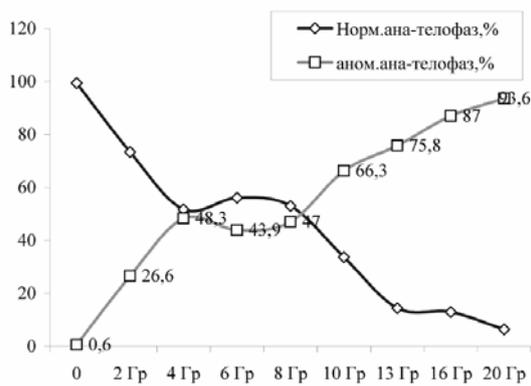


б - б

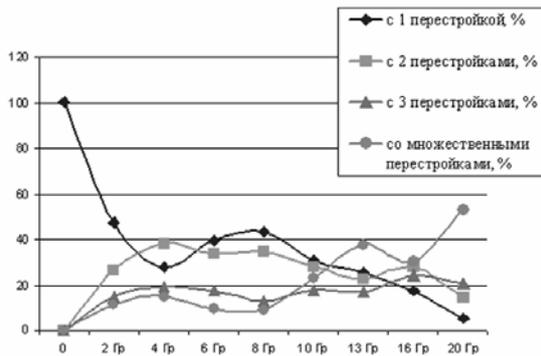
Рис. 1. Диаграммы прироста фитомассы стебля (а) и корня (б) (по оси x – доза гамма-облучения, Гр, по оси y – вес, в % к контролю, по оси z – возраст проростков в условных точках)

Fig. 1. Diagrams of biomass growth of the stem (a) and roots (b) (x-axis – the dose of irradiation, Gy; on the y-axis – weight, % to control; along the axis z – the age of seedlings at conventional points)

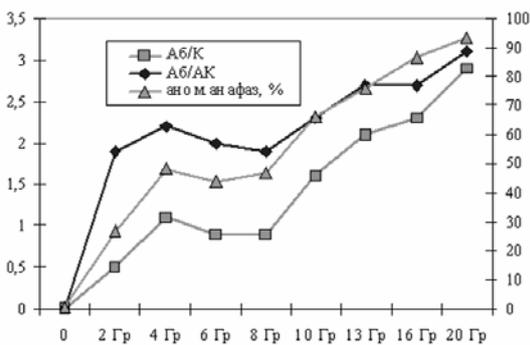
Высокий процент клеток, содержащих микроядра во втором после облучения митозе, также указывает на вероятностное выживание клеток с aberrациями. Индукция же мультиaberrантных повреждений, как правило, сопровождается исключением таких клеток из клеточных потоков и пролиферативной гибелью клетки. Соотношение между этими клонами клеток изменяется с увеличением дозы облучения: частота анафаз с одиночными, затем и двойными нарушениями, линейно снижалась, а трехчленных перестроек и мультиaberrантных анафаз возрастала (рис. 2 б). При достижении 66 %-ого уровня aberrаций и выше основной вклад в формирование повреждения меристемы вносят



а - а



б - б



в - в

Рис. 2. Графическое изображение дозовых зависимостей по частоте aberrantных анафаз (а), по клеточному распределению aberrantных анафаз (б) и абсолютной нагрузке клеток aberrantными анафазами (в): а – по оси x – доза облучения, по оси y – ЧАА и ЧНА, %, б – по оси x – доза облучения; по оси y – анафазы с 1, 2, 3 и множественными перестройками в % к общему числу aberrantных анафаз, в – по оси x – доза облучения; слева по оси y – число aberrantных анафаз на aberrantную клетку, Ab/AC и число aberrantных анафаз к общему числу анафаз, Ab/C, справа по оси y – ЧАА, %

Fig. 2. Graphic representation of the dose dependencies over the frequency of aberrant anaphases (a), over the aberration distribution per cell (b) and to the total loading of cell by aberrations (b): a – on the x-axis – the dose of irradiation, on the y-axis FAA and FNA, %, b – on the x-axis – the dose of irradiation, on the y-axis – anaphases with 1, 2, 3 and multiple reconstructions in % to the total number of aberrant anaphases, c – on the axis x – dose of irradiation, left on the y-axis – the number of aberrations per aberrant cell, Ab/AC and the number of aberrations at the whole number anaphases, Ab/C, right on the y-axis – FAA, %

мультиабберантные перестройки. Отсюда, можно предполагать, что индукция мультиабберантных повреждений при высоких дозах облучения затрагивает, прежде всего, клетки, которые уже несут генетический груз. Исходя из несоответствия экспериментального и теоретического характера по клеточному распределению aberrantных анафаз, к аналогичному выводу приходит и Н. Куцоконь [13], полагая, что "акты, ведущие к появлению aberrantных анафаз в одной клетке, не являются независимыми событиями". Пересчет по клеточной нагруженности aberrantными анафазами в абсолютных значениях указывает на то, что нагруженность около двух aberrantных анафаз на aberrantную анафазу и одна aberrantная анафаза на общее число анафаз являются критическими для корневой меристемы (рис. 2 в).

Цитостатический эффект используемых доз облучения был менее значительным, чем ожидалось. В спектре хромосомных aberrantных анафаз в интервале доз до 8 Гр преобладают мосты и двойные фрагменты (рис. 3а, б). С увеличением дозы облучения возрастает число мультиабберантных повреждений, нарушений формирования митотического веретена, клеток с микроядрами (рис. 3 в-е). Одновременно возрастает число аномальных интерфазных клеток с "вакуолизированными" ядрами и деструктурированным хроматином (рис. 3 д, е). При дозах от 13 Гр меристема практически не содержит клеток и ядер нормального строения, что свидетельствует о добавлении второй составляющей суицидной программы – интерфазной гибели клеток. Таким образом, критическим значением повреждения корневой меристемы проростков гороха при учете частоты ана-телофаз митоза является, примерно, 50 % aberrantных клеток со средним показателем нагруженности около двух перестроек на aberrantную клетку. Превышение этого порога приводит к запуску суицидной программы в меристеме путем индукции мультиабберантных повреждений и интерфазной гибели клеток.

Стабилизация частоты aberrantных анафаз не оказывает видимого эффекта на прирост корня и стебля. При одинаковой ЧАА формирование корня и побега испытывают разную степень депрессии пропорционально дозе облучения (рис. 4 а, б). Пересечение 50%-го порога повреждения меристемы имеет летальные последствия для роста побега, но не корня. Блокирование прироста корня совпадает с точкой пересечения кривых по выживаемости и ЧНА, примерно, на отметке в 30 % при дозе 13 Гр (рис. 4 а). Очевидно, 30 %-ый порог выживаемости и ЧНА регистрируется при сохранении пролиферационной активности части клеток центра покоя в случае регенерации. Следовательно, репопуляция при высоких дозах за счет активации клеток центра покоя маскирует 50 %-ный порог повреждения и, в то же время, не обеспечивает фиксированного прироста (по весу сухой фитомассы) органа.

Регенерация главного корня. Регенерация корня наблюдалась в диапазоне повреждающих доз от 6 до 20 Гр. Основу регенерации составляет

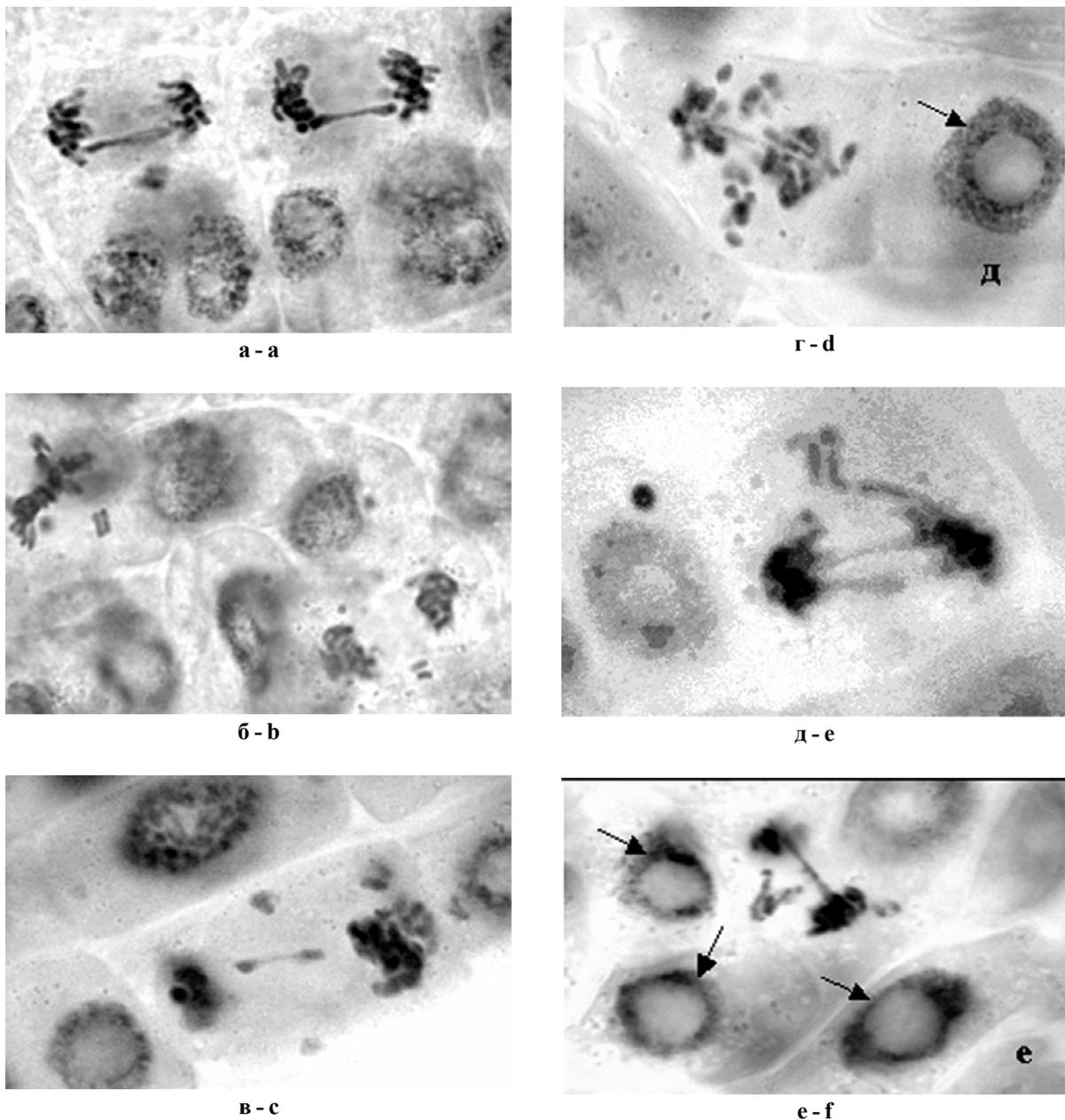
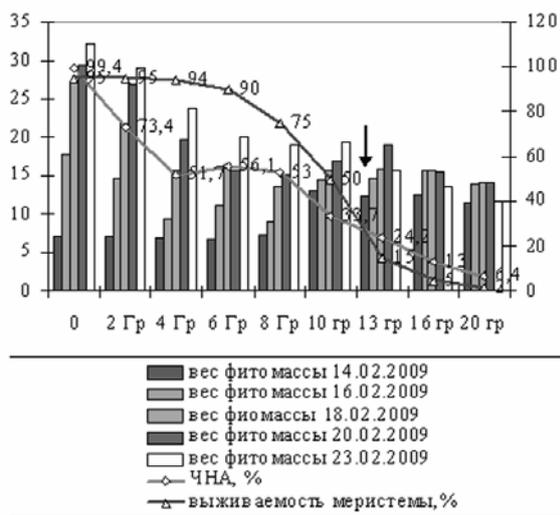


Рис. 3. Спектр хромосомных aberrаций: а, б – одиночные хромосомные мосты и двойные фрагменты в мета- и телофазе, свидетельствующие об асимметричных обменах; в – дигентрический фрагмент, двойной фрагмент и 2 микроядра в телофазе, свидетельствующие о делении aberrантной клетки (13 Гр), г – два моста и два двойных фрагмента (13 Гр); д – мультиабerrантная анафаза (16 Гр), е – хромосомный мост, двойной фрагмент и ацентрический фрагмент в телофазе (20 Гр); стрелками указаны интерфазные ядра с аномальной структурой (д, е)

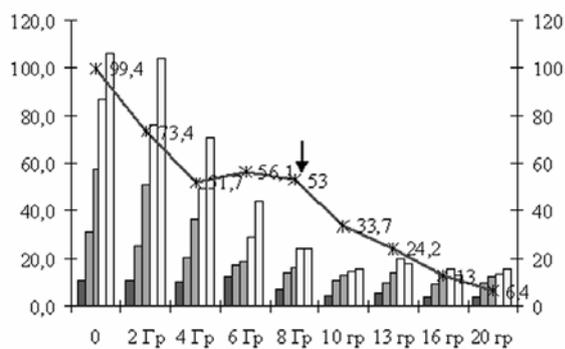
Fig. 3. Spectrum of chromosomal aberrations: a, b – single chromosome bridges and double fragments in meta- and telophase, that indicating an asymmetric exchanges; c – dicentric fragment, a double fragment and 2 micronuclei in telophase, showing the division of aberrant cell (13 Gy), d – multiaberrant anaphase (16 Gy), e – two chromosome bridges, two double fragments in telophase (13 Gy); f – chromosome bridge, double fragment and acentric fragment in telophase (20 Gy); the arrows show to anomalous structure of interphase nuclei (d, f)

механизм репопуляции, позволяющий восстанавливать не только численность, но и структуру органа. При дозах 6 и 8 Гр репопуляционный механизм органично вписывается в морфогенез корня, обеспечивая быстрое восстановление апекса, при этом, прирост главного корня лишь незначительно замедляется (рис. 5 а, б). В зависимости от степени поврежде-

ния апикальной меристемы, регенерация приводит к частичной или полной ее замене. Чем выше доза облучения, тем сложнее и медленнее происходит восстановление. При дозах в 10 и 13 Гр процесс замещения сопровождается торможением и остановкой роста; при 16 и 20 Гр – полным блокированием роста. Регенерация в большинстве случаев осуществляется



а - а

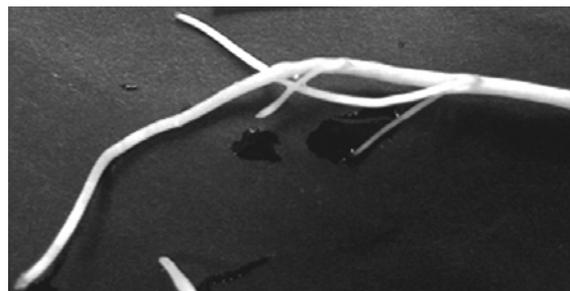


б - б

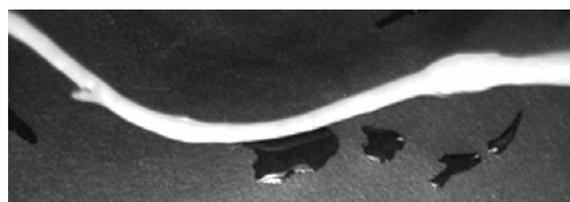
Рис. 4. Сопоставление дозовых зависимостей по приросту фитомассы корня, ЧНА и выживаемости меристемы (а) и фитомассы стебля и ЧНА (б): а – по оси х – доза гамма-облучения, слева по оси у – вес, мг; справа – выживаемость, % и ЧНА, %, стрелкой указана точка пересечения кривых; б – по оси х – доза облучения; слева по оси у – вес, мг; справа по оси у – ЧНА, %, стрелкой указана точка блокирования прироста

Fig. 4. Comparison of dose dependencies of root biomass growth, FNA and survival of the root meristem (a) and stem phytomass growth and FNA (b): a – on the x axis – the dose of irradiation, on the left of the y axis – the weight, mg; right – the survival rate of meristem, % and FNA, %, the arrow shows to the point of line crossing; b – on the x axis – dose of irradiation, to the left of the y axis – weight, mg; the right of the y axis – FNA, %, the arrow shows to the point of the blocking of growth

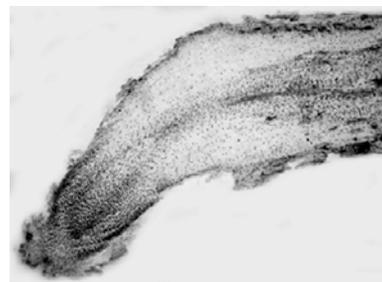
прямым путем через репопуляционный механизм (рис. 5 в), реже – непрямым, через дедифференциацию и каллусогенез (рис. 5 г). При максимальных дозах регенерация происходила в 30–40 % случаях (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными И. Н. Гудкова [6], показавшего, что на характер дозовых кривых по кинетике меристемы влияют два процесса противоположной направленности – подавление ростовой активности, с одной стороны, начало и степень процессов восстановления, с другой.



а - а



б - б



в - в



г - г

Рис. 5. Восстановление тканей и ростовой активности апекса корня при дозе в 8 Гр, стрелками указаны зона побурения (а) и утолщения (б); в – прямой способ регенерации через репопуляционный механизм, 20 Гр; г – не прямой способ регенерации через каллусогенез, 13 Гр

Fig. 5. Recovery of tissue and activity of root growth at a dose of 8 Gy, the arrows show to browning (a) and thickening (b) of the zone; c – a directly way through repopulation mechanism, 20 Gy; d – an indirectly way through genesis of callus, 13 Gy

Расхождение результатов между частотой неабerrантных клеток (ЧНА) и выживаемостью меристемы (рис. 6), по-видимому, объясняется выживанием и пролиферацией части aberrантных клеток.

Как уже отмечалось, клетки, несущие одну-две перестройки, не всегда выпадают из клеточных циклов и могут обеспечивать поставку клеток в зону растяжения. Другая причина расхождения

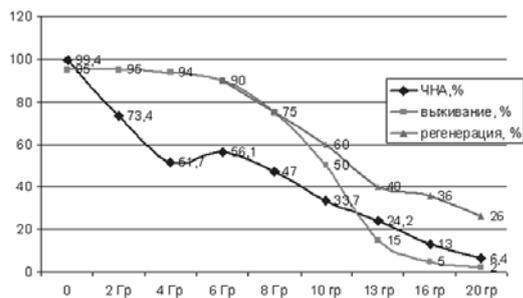


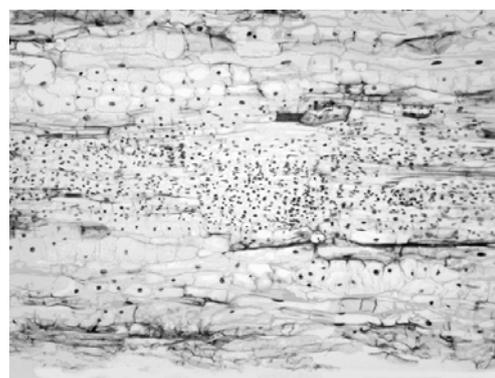
Рис. 6. Сопоставление дозовых зависимостей по ЧНА, выживаемости главного корня и регенерации апикальной меристемы (по оси x – доза облучения; по оси y – ЧНА, %, выживание меристемы, %, регенерация, %).

Fig. 6. Comparison of dose dependences of FNA, survival rate and regeneration of the main root apical meristem (on the x axis – dose of irradiation, on the y axis – FNA, %, the survival rate of meristem, %, regeneration, %).

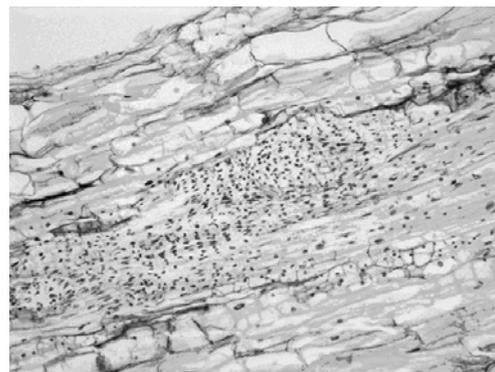
дозовых зависимостей – это наложение репопуляции. Примечательно, что частота неабerrантных клеток четко коррелируют с частотой регенерации.

В апексах проростков, облученных дозами 16 и 20 Гр, наблюдалась дегенерация и деформация тканей эпидермиса, коры, чехлика и меристемы, фрагментация элементов проводящей системы (рис. 7 а, б). Тем не менее, в побуревших апексах (признак отмирания поверхностных тканей корня) осуществлялись восстановительные процессы. Как отмечалось, в 30 – 40 % случаях, происходило репопуляционное восстановление проксимальной меристемы, формирующей новый апекс (рис. 7 в). Число абerrаций в воссозданном апексе резко снижалось, но не достигало контрольного уровня; часть вновь образованных клеток подвергалась апоптозу. С наибольшей частотой встречалась пролиферация клеток периклики, которые путем периклиналиных делений частично восстанавливали популяцию клеток первичной коры в зоне дифференциации корня. Пролиферативная активность клеток зоны периклики приводила к заложению инициалей боковых корней (рис. 7 б, г), что свидетельствовало о частичном восстановлении позиционной информации в поврежденных тканях, в частности, компетенции клеток периклики к ИУК. Однако, дальнейшее развитие боковых корней было возможно лишь после восстановления структуры и дифференцировки тканей корня, которые обеспечивают передачу сигналов и работу соответствующих сигнальных систем.

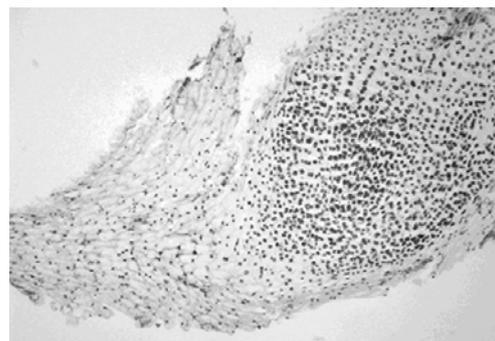
Показатель критического уровня повреждения меристемы, очевидно, зависит от генотипа, стадии онтогенеза, природы стрессового фактора и, вероятно, других причин. Так, у лука батун (*Allium fistulosum* L.) частота абerrантных клеток, сопряженная с прорастанием стареющих семян, была в



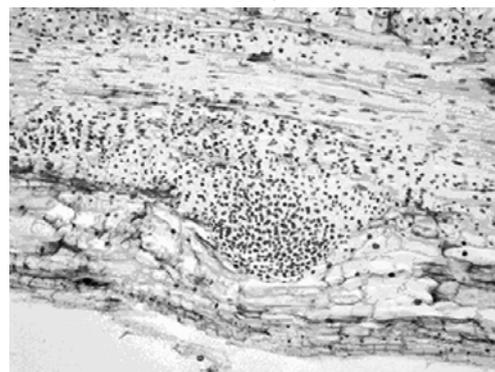
а - а



б - б



в - в



г - г

Рис. 7. Восстановительные процессы в корне при облучении в 20 Гр: а, б – пролиферация клеток периклики; в – репопуляционное восстановление апикальной меристемы корня; б, г – инициалы придаточных корней

Fig. 7. Regenerative processes in the root of the irradiation of 20 Gy: a, b – pericycle cell proliferation, c – repopulation of the root apical meristem; b, d – initials of adventitious roots

три – шесть раз выше, чем аналогичный показатель у *A. ceras L.*, и доходила до 70 % у семян, еще не утративших всхожесть. [12,13]. Согласно трактовке результатов W. Grant & E. Owens по *Pisum sativum L.* [24], уже 7 % аберраций сказываются на способности семян к прорастанию. В то же время, облучение сухих семян гороха в высоких дозах слабо влияет на прорастание. По данным Л. Царапкина [19], облучение в дозе 15 крад индуцирует 42 %-ую частоту аберраций в корневой меристеме проростков гороха, незначительно снижая всхожесть семян.

Итак, полученные результаты дают основание полагать, что в механизмах радиоустойчивости проростков гороха в интервале доз, близких к LD_{50} и выше, важную роль играет клеточная конкуренция. Клеточная конкуренция, согласно новейшим представлениям, является одним из важнейших механизмов гомеостаза в организме животных; благодаря ей определяются размеры ткани, в том числе и при регенерации, стабилизируется дифференциация клеток, элиминируются мутации [21, 22, 25, 26, 28]. Показано, что клеточная конкуренция внутри многоклеточного организма между клеточными популяциями, которые различаются по скорости роста, приводит к элиминации медленно пролиферирующих клеток [21, 26]. Клеточную конкуренцию у растений можно толковать более широко, например как фактор, обеспечивающий наследование изменений, приобретенных организмом в онтогенезе [14]. Действительно, клеточная конкуренция в гетерогенной популяции меристематических клеток может приводить к отбору клеточных клонов, наиболее адаптированных к условиям существования организма [10, 11]. В условиях давления стрессового фактора клеточная конкуренция интенсифицируется. Получены данные о положительной роли клеточной конкуренции при радиационном повреждении вегетативных и генеративных меристем [8 – 10, 23]. Показано, что, в определенном дозовом диапазоне, динамика формирования хромосомных аберраций в корневой меристеме и спорогенном комплексе растений следует обратной зависимости от дозы облучения, что обуславливает повышение фертильности растений. Клеточную конкуренцию в раннем онтогенезе растений можно рассматривать как механизм, с помощью которого ограничивается мутагенез, регулируется состояние и численность клеточных субпопуляций апикальной меристемы, восстанавливается структура поврежденных тканей и морфогенез облученных проростков.

Таким образом, критическим уровнем повреждения апикальной меристемы корня, совместимым с выживанием проростков, является 50 %. При этом же уровне аберраций меристематических клеток корня еще может выживать апикальная меристема стебля. Превышение порогового уровня несовместимо с выживанием как стеблевой, так и корневой меристемы. Сохранение ростовой активности за пределами пороговой дозы, как правило,

сопровождается нарушением морфогенеза. В механизмах восстановления меристемы решающую роль, по-видимому, играют клеточная конкуренция между клонами нормальных, аберрантных с 1 – 2 перестройками и мультиаберрантными клетками, а также репопуляция, пополняющая число неаберрантных клеток. С превышением порогового уровня повреждения запускаются механизмы самоуничтожения меристемы путем индукции мультиаберрантных повреждений и интерфазной гибели клеток. Феноменологически превышение порогового уровня радиационного повреждения проявляется в нарастании нарушений морфогенеза и остановке роста. Интерпретация результатов, как и ожидалось, усложнялась накладывающейся на эти процессы регенерацией. Процессы регенерации сопровождают восстановление во всем диапазоне повреждающих доз, причем, чем выше доза облучения, тем сложнее и медленнее происходит восстановление. Клеточную основу регенерации составляет пролиферативная активность центра покоя клеток и перицикла, находящихся в момент облучения в G_0 . При гибели апикальной меристемы регенерация может приводить к полному замещению некротической ткани на новую, восстанавливая не только численность, но и структуру корневого апекса. Возможна и непрямая регенерация через дедифференциацию и каллусогенез. Однако, при ЧАА в 66 % и выше регенерация не обеспечивает выживания и восстановления нормального морфогенеза растений, по крайней мере, в наблюдаемый период времени (в течение двух недель).

Выводы

1. Критическим, или пороговым, уровнем повреждения апикальной меристемы корня, совместимым с выживанием проростков, является 50 %, учитывая, что при этом уровне аберраций меристематических клеток корня еще может выживать апикальная меристема стебля. Превышение 50 %-го уровня повреждения в меристеме приводит к запуску суицидной программы через индукцию мультиаберрантных повреждений и интерфазной гибели клеток.
2. В механизмах восстановления апикальной меристемы главную роль играет клеточная конкуренция между клонами нормальных клеток, клеток с 1 и 2 перестройками и мультиаберрантными клетками, а также репопуляция, пополняющая число неаберрантных клеток. Соотношение между этими клетками изменяется с увеличением дозы облучения. Репопуляция маскирует 50 %-ный порог повреждения.
3. Регенерация главного корня осуществляется в диапазоне повреждающих доз от 6 до 20 Гр, обеспечивая полное или частичное восстановление латеральной и апикальной меристем. Однако этих локальных процессов недостаточно для восстановления

ния морфогенеза и выживания проростков при значительном превышении порога повреждаемости.

4. Клеточную конкуренцию в раннем онтогенезе облученных растений можно рассматривать как ме-

ханизм, с помощью которого ограничивается мутагенез, регулируется состояние и численность клеточных субпопуляций апикальной меристемы, восстанавливается структура поврежденных тканей.

1. Барсуков В. С., Малиновский О. В. Количественное описание процесса радиационной инактивации клеток. Основные посылки. Образование летальных повреждений // Цитология. – 1973. 15, N 9. – С.1152 – 1159.
2. Ганаси Е. Э. Радиационное повреждение и репарация хромосом. – М.: Наука, 1976. – 103 с.
3. Ганаси Е. Э., Заичкина С. И., Розанова О. М. Роль различных повреждений ДНК в формировании радиационного повреждения хромосом // Радиобиология. – 1984. – 4, N5. – С. 616 – 625.
4. Гостимский С. А., Дьякова М. И., Ивановская Е. В., Монахова М. А. Практикум по цитогенетике. Метод. Пособие. М.:Изд-во МГУ, 1974. – 150 с.
5. Гродзинский Д. М. Радиобиология растений. – Киев: Наук.думка, 1986. – 222 с.
6. Гудков И. Н. Клеточные механизмы пострadiационного восстановления растений. Киев: Наук.думка, 1986. – 222 с.
7. Инге-Вечитов С. Г. Генетика с основами селекции. – М.:Высшая школа, 1989. – 591 с.
8. Кравец Е. А., Гродзинский Д. М. Роль клеточной конкуренции в механизмах восстановления при воздействии ионизирующего и УФ-Б излучения (на примере *Hordeum vulgare* L.) // Труды Тимирязевской Академии, 2008. – №2. С. 30 – 35.
9. Кравец Е. А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // Цитология и генетика. – 2009. – 43, N 1. – С. 11 – 22.
10. Кравец Е. А. Клеточный отбор в онтогенезе растений и его значение для формирования адаптации к облучению // Наукові праці Миколаївського державного Університету ім Петра Могили. Миколаїв, 2008. – Вип.89. – т.102. – с.98 – 104.
11. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. –Київ: Логос, 2005.– 723 с.
12. Куцоконь Н. К., Лазаренко Л. М., Безруков В. Ф., Рашидов Н. М., Гродзинский Д. М. Кількість аберацій на клітину як параметр хромосомної нестабільності. 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи // Цитология и генетика. – 2004.– 38, N1.– С.55 – 62.
13. Куцоконь Н. К. Радіаційна індукція множинних пошкоджень у рослин: Автореф. дис канд. біол. наук. – Київ, 2004. – 24 с.
14. Лакін Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
15. Лежачий Э. Э. Элементы общей теории адаптации. – Вильнюс, "Мокслас", 1986. –273 с.
16. Митрофанов Ю. А. Индуцированная изменчивость хромосом эукариот. – М.:Наука, 1994. – 140 с.
17. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений.– М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
18. Рашидов Н. М., Куцоконь Н. К. Ефекти хронічного опромінення рослин, зумовленого радіонуклідами техногенного походження. В кн.: Радиобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи. – Київ: Наук.думка, 2008. – С.70 – 126.
19. Царапкин Л. С. Количественные закономерности действия радиации на хромосомы в покоящихся семенах гороха: Автореф. дис. ... докт. биол.наук. Киев, 1974. – 42 с.
20. Carano A. V. Transmission Probabilities of X-Ray Induced Chromosome Aberrations and their Relation to Colony Survival in Chinese Haster Cells // Radiation Res. – 1972. – 51, N 2. – P. 512 – 520.
21. Dnaz B., Moreno E. The competitive nature of cells // Exp. cell res. – 2005. –306. – P.317 – 322.
22. Gallant P. Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation // Cancer Research. – 2005. – 65. – P. 6485 – 6487.
23. Gaul H. Uber die Chmarenbildung in Gerstenpflanzen nach Rongenbestrahlung von Samen // Flora. – 1959. – 147. – N2. – P.207 – 241.
24. Grant W. F., Owens E. T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of invironmental mutagens // Mutation Research. – 2001. – 488. – P. 93–118.
25. Li Wei and Baker N. E. Engulfment Is Required for Cell Competition // Cell. – 2007. – 129. – P. 1215–1225.
26. Moreno, E., Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors // Cell. – 2004. – 117. – P.117 – 129.
27. Obe G., Pfeiffer P., Savage J.R.K. et all. Cromosomal aberrations: formation, identification., and distribution // Mutat. Res. – 2002. – 504. – P.17 – 36.
28. Tyler D. M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B. and Baker N.E. Genes Affecting Cell Competition in *Drosophila* // Genetics. – 2007. – 175. – P. 643 – 657.

Отримано: 16 листопада 2009 р.

Прийнято до друку: 4 лютого 2010 р.