

УДК 575.165/167+577.346.017.4+599.323.4

ОЦЕНКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ГРЫЗУНОВ ИЗ ЛАБОРАТОРНЫХ КОЛОНИЙ И ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПО КРИТЕРИЮ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ СТРЕССЕ

© 1999 г. Е. Б. Григоркина, Н. М. Любашевский, Г. В. Оленев

Институт экологии растений и животных УрО РАН
620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Поступила в редакцию 06.02.98 г.

В исследованиях на 600 животных (лабораторные инбредные и аутбредные мыши и рыжие полевки из природной популяции) показано различие в реактивности на равноэффективные по летальности дозы гамма-облучения на фоне медикаментозного стресса: у инбредных животных достоверно сокращается период гибели от облучения, у аутбредных мышей он не отличается от контроля, у рыжих полевок – увеличивается. В то же время предварительный стресс не вызывает существенного изменения доли погибших от облучения животных. Полученные данные интерпретированы как аргумент в пользу ведущей роли генотипа в радиорезистентности и как свидетельство правомерности оценки гетерогенности лабораторных колоний и природных популяций грызунов.

Гетерогенность природных популяций является одним из важных компонентов биоразнообразия. У млекопитающих она поддерживается генетическими механизмами. С другой стороны, для природных популяций млекопитающих характерна и функциональная структурированность. Первые представления об этом – “сезонные генерации” (Шварц и др., 1964; Шварц, 1969), дальнейшее развитие – “функциональные группировки” (Оленев, 1989), которые уже были привлечены нами в анализ радиорезистентности грызунов (Григоркина, Оленев, 1987; Оленев, Григоркина, 1998). При этом, однако, не оценивали роль генетической компоненты.

В данной работе радиочувствительность рассматривается как одно из частных проявлений общей реактивности организма. Уже много лет обсуждаются материалы, свидетельствующие о том, что морфофизиологические особенности, ответственные за радиочувствительность организма, генотипически обусловлены и что конкретное физиологическое состояние организма модифицирует реакцию на облучение. Это, в частности, относится и к уровню летальной дозы лучевого воздействия, и к срокам гибели (Лучник, 1957; Стариченко и др., 1993). Участие генотипа в определении радиочувствительности следует из видовых и, особенно, межвидовых различий в реакциях на одинаковые дозовые нагрузки (Roderrick, 1963). Различия между животными инбредных линий можно считать обусловленными главным образом генотипическими факторами, в пределах одной линии – средовыми воздействиями, вернее, взаимодействиями генотип – среда (Аршавский, 1982).

Однако проблема соотносительного значения генотипических особенностей организма и его физиологического состояния в формировании радиочувствительности исследована недостаточно, неизвестно применение к ее разработке специальных методов. В то же время представляется, что не исчерпали себя методы, базирующиеся на сопоставлении реактивности особей с различной степенью близости генотипов. Ранее (Lyubashhevsky, Grigorkina, 1994, 1995) применение этого подхода привело нас к заключению об определяющей роли генотипа в радиочувствительности организма млекопитающих. В настоящей работе он использован для сравнительной оценки вклада генотипической компоненты в гетерогенность лабораторных колоний инбредных (линейных) и аутбредных (беспородных) мышей и рыжих полевок из природной популяции на фоне медикаментозного стресса.

Исходными служили следующие посылки:

1. Представление о радиочувствительности как генотипически обусловленной реактивности организма, модифицируемой средовыми воздействиями.
2. Представление о линейных животных как носителях идентичного генотипа, подобно одногодицам близнецам (Медведев, 1968). Инбридинг упрощает генетическую структуру, в то время как система свободного скрещивания поддерживает высокую генетическую гетерогенность (Яблоков, 1987).
3. Представление о стрессе как генерализованной неспецифической реакции мобилизации внутренних резервов организма в ответ на широкий спектр повреждающих воздействий (Селье, 1960).

Средняя полулетальная доза, смертность, средняя продолжительность жизни и медиана в исследуемых группах грызунов (над чертой – опыт, под чертой – контроль)

Группа животных	$LD_{50/30}$, Гр	Смертность, % (погибш./общ.)	СПЖ, сут	Медиана
CBA	9.3	$\frac{57.3(75/131)}{51.2(64/125)}$	$\frac{12.0 \pm 0.3^*}{13.9 \pm 0.6}$	$\frac{12}{14}$
BALB/c	6.0	$\frac{58.3(28/48)}{53.6(45/84)}$	$\frac{10.1 \pm 0.5^*}{12.8 \pm 0.9}$	$\frac{10}{12}$
Аутбредные мыши	7.5	$\frac{52.7(39/74)}{51.1(47/92)}$	$\frac{12.7 \pm 1.0^*}{9.3 \pm 0.8}$	$\frac{12}{8}$
Рыжие полевки	13.2	$\frac{45.0(9/20)}{50.0(13/26)}$	$\frac{13.6 \pm 3.99}{14.2 \pm 1.01}$	$\frac{10}{14}$

* $p \leq 0.05$.

Радиационный фактор использован в работе как инструмент для выявления изменчивости распределения летальных эффектов у инbredных и аутбредных мышей и рыжих полевок; медикаментозный стресс применен как физиологическая нагрузка (контрастный фон). Контрастные экстремальные фоны успешно используются для оценки степени генетической гетерогенности популяций растений и животных (Глотов, 1983; Глотов, 1992).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

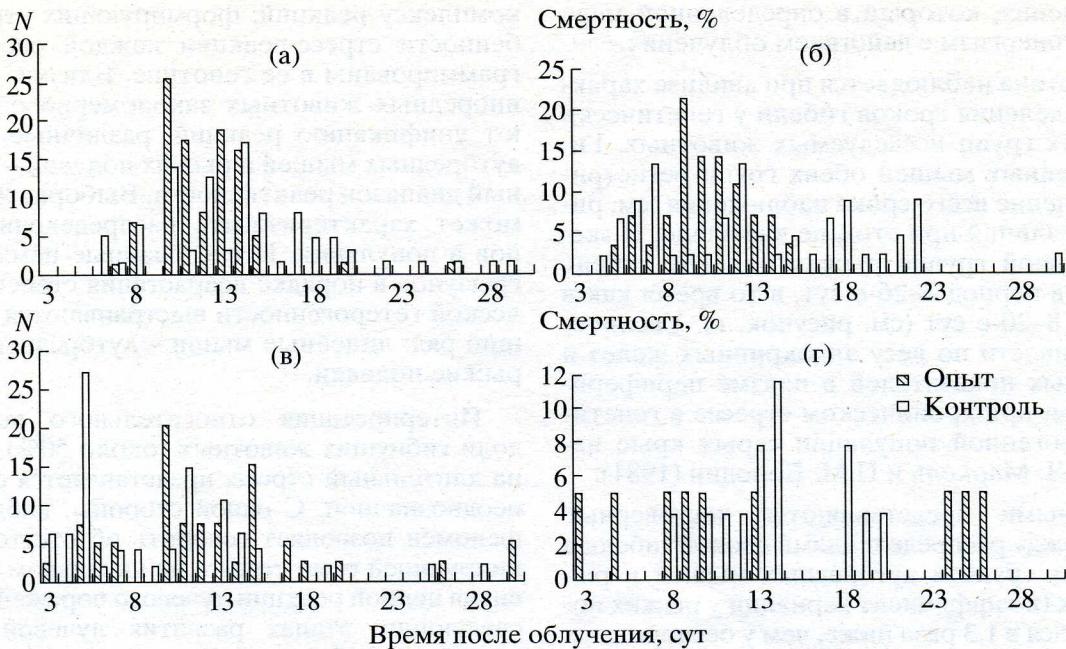
Объекты исследования – лабораторные мыши и рыжие полевки из природной популяции (Южный Урал). Использовали 4–5-месячных особей линий BALB/c как наиболее реактивной к стрессу и чувствительной к радиации из всех существующих, а также особей линии CBA как наиболее радиорезистентной и устойчивой к стрессу (Storer, 1966; Беляев, Бородин, 1982) и аутбредных мышей (стадного разведения) сходного возраста. Лабораторных мышей содержали в ванночках по 6 особей. При отборе для эксперимента рыжих полевок из природной популяции строго учитывали функциональный статус (брали животных второго типа онтогенеза – неразмножающиеся в год рождения сеголетки) (подробно см. Оленев, 1989; Оленев, Григоркина, 1998), их абсолютный возраст, время рождения, массу тела. Полевок содержали раздельно по одной особи в клетке. Это позволило наиболее корректно сформировать в условиях вивария максимально возможную по однородности выборку.

Стресс вызывали ежедневными инъекциями сублетальных доз 0,1%-ного адреналина (0,01 мл/20 г) в течение 10 сут. Затем животных облучали однократноtotально на экспериментальной гамма-установке ИГУР-1 средней полулетальной дозой ($LD_{50/30}$), предварительно опре-

деленной нами для каждой из изучаемых групп (см. таблицу). Всем опытным группам соответствовали свои контрольные группы животных, которым одновременно вводили физиологический раствор, после чего облучали теми же дозами. Наблюдение за облученными животными проводили в течение месяца, ежедневно регистрировали дату гибели. Для оценки стрессированности грызунов в ответ на введение адреналина использовали индекс надпочечника, руководствуясь методом морфофизиологических индикаторов. Для этого 10 мышей забивали на 10-е сутки. Обработку результатов по срокам гибели животных проводили с помощью критерия χ -квадрат. В эксперименте использовано 600 особей: 256 мышей линии CBA, 132 – линии BALB/c, 166 аутбредных мышей, 46 рыжих полевок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Летальность. Средние полулетальные дозы ($LD_{50/30}$) для всех изучаемых групп были определены нами в предварительных экспериментах (Стариченко, Григоркина, 1991; Grigorkina, Olenev, 1996). Во всех исследуемых вариантах лабораторных мышей (см. таблицу) показатель смертности у опытных животных несколько выше (на 4–6%), чем у контрольных, у рыжих полевок летальность в экспериментальной группе была на 5% ниже, чем в одноименном контроле. Стресс, как аргументировано считают некоторые авторы (Горизонтов и др., 1983), является одним из механизмов лучевой болезни. Поэтому полагали, что столь продолжительное воздействие адреналина должно было оказать аддитивный эффект и увеличить смертность животных после облучения. На самом деле существенного увеличения летальности стрессированных животных не наблюдали.



Распределение сроков гибели после острого гамма-облучения средними полулетальными дозами в группах генетически однородных и аутбредных животных (экспериментальные группы – адреналин, затем облучение; контрольные – физиологический раствор, затем облучение):

а – мыши линии СВА, б – мыши линии BALB/c, в – аутбредные лабораторные мыши, г – рыжие полевки из природной популяции.

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) погибших животных достоверно различалась между контрольной и опытной группами лабораторных мышей, у рыжих полевок значимых различий между группами не выявлено. Более высокие значения СПЖ наблюдались у контрольных животных, за исключением неподвижных мышей, у которых этот показатель был достоверно выше в эксперименте (см. таблицу). Сопоставление СПЖ с показателем смертности показало удовлетворительное соответствие их в группах инбредных мышей. Так, меньшей летальности контрольных мышей линий СВА и BALB/c соответствовала большая СПЖ этих животных, для беспородных мышей и рыжих полевок такого совпадения показателей не отмечено.

Распределение сроков гибели во времени. Известно, что процесс гибели млекопитающих от облучения распределен во времени, неравномерен, имеет характерные пики (Лучник, 1957). Основным признаком, по которому проводили оценку вклада генетической компоненты в радиочувствительность, было распределение сроков гибели животных в течение месяца после облучения. Полагали, что разница в вариабельности сроков гибели во времени между инбредными и аутбредными мышами, а также инбредными мышами и рыжими полевками была обусловлена генотипически, в то время как различия внутри одной линии зависели от средовых факторов. Это не исключает

того, что различия между особями внутри линии включают в определенной степени и генотипический компонент, возникающий вследствие расщепления (Медведев, 1968; Глотов, 1983).

Динамика лучевой гибели генетически однородных и аутбредных животных под влиянием стресса различна. Так, сравнительное сопоставление графиков распределений показало, что стрессированные животные линии СВА гибли в интервале 6–15-е сут, в то время как контрольные – 6–29-е сут (см. рисунок, а). Отчетливо выражено также влияние стресса на динамику смертности мышей линии BALB/c. Гибель опытных мышей регистрировали с 5-х по 15-е сут, контрольных – с 4-х по 29-е сут (см. рисунок, б). Сравнение распределений с помощью критерия χ^2 -квадрат показало достоверное ($p \leq 0.05$) сокращение распределения сроков постлучевой гибели линейных мышей, подвергнутых медикаментозному стрессу. Ранее эта закономерность (достоверное сокращение распределения сроков гибели линейных мышей) была показана нами (Lyubashevsky, Grigorkina, 1995) на фоне гипотермического стресса с последующим облучением средней полулетальной дозой. Однако показатель смертности в экспериментальной группе был на 13% выше, чем в контроле. Это может быть связано с тем, что гипотермия, наряду с неспецифическим стрессовым компонентом, имеет специфический компонент

переохлаждения, который в определенной мере проявляет синергизм с действием облучения.

Иная картина наблюдается при анализе характера распределения сроков гибели у генетически разнородных групп исследуемых животных. Гибель нелинейных мышей обеих групп регистрировали в течение всего срока наблюдения (см. рисунок, в), различий при этом не выявлено. В экспериментальной группе рыжих полевок гибель наблюдали в период 3–26-е сут, в то время как в контроле – 8–20-е сут (см. рисунок, г). Увеличение изменчивости по весу эндокринных желез и гормональных показателей в плазме периферической крови при хроническом стрессе в генетически гетерогенной популяции серых крыс наблюдали А.Л. Маркель и П.М. Бородин (1981).

Интересными представляются достоверные различия между распределениями сроков гибели в контрольных группах аутбредных мышей и рыжих полевок (коэффициент вариации у рыжих полевок оказался в 1.3 раза ниже, чем у беспородных лабораторных мышей). Вероятно, это связано с тщательным подбором однородной выборки с учетом функционального состояния животных из природной популяции, о чем мы указывали выше.

Изначально полагали, что вариабельность сроков гибели линейных мышей при облучении определяется главным образом их физиологическим статусом, в основе которого лежит иерархия особей при содержании их в террариуме. Поэтому при выборе величины и продолжительности стрессовых воздействий мы стремились к тому, чтобы добиться явно выраженных сдвигов физиологического состояния. Морфологически хронический стресс проявляется гипертрофией надпочечников и лизисом тимуса (Селье, 1960). Сопоставление индексов надпочечников мышей линии СВА опытной и контрольной групп выявило достоверные ($p \leq 0.05$) различия между ними (0.29 и 0.17%). В ходе эксперимента также наблюдали случаи возросшей агрессивности животных.

Таким образом, построение кривых постлучевой гибели во времени наглядно показало различия между животными с разной степенью близости генотипов. Медикаментозный стресс привел к синхронизации, "выравниванию" по физиологическому состоянию генетически близких линейных мышей, что повлекло за собой уменьшение изменчивости признака у животных, исходно находившихся в различном физиологическом состоянии. Отсутствие эффекта синхронизации сроков постлучевой гибели у нелинейных мышей и рыжих полевок на фоне стресса мы рассматриваем как проявление исходно высокой степени генетической гетерогенности. Воздействие адреналина привело к снятию обусловленных средой особенностей физиологического состояния и переходу к характерному для отдельных генотипов

комплексу реакций, формирующих стресс. Особенности стресс-реакции каждой особи запрограммированы в ее генотипе. Близкие генотипы инbredных животных закономерно обеспечивают унификацию реакций, различные генотипы аутбредных мышей и рыжих полевок – увеличенный диапазон реактивности. Выборка же в целом может характеризовать распределение генотипов в популяции. Исследованные нами выборки грызунов в порядке возрастания степени генетической гетерогенности выстраиваются в следующий ряд: линейные мыши – аутбредные мыши – рыжие полевки.

Интерпретация относительного постоянства доли гибнущих животных (около 50%), несмотря на длительный стресс, представляется сложной и неоднозначной. С одной стороны, наблюдаемый феномен позволяет говорить об отсутствии инициирующей роли стресса на начальном этапе развития цепной реакции лучевого поражения. На последующих этапах развития лучевой болезни, вероятно, собственное стрессирующее влияние ионизирующей радиации значительно превышает остаточные явления предварительного стресса. С другой стороны, очевидно наличие индивидуальной изменчивости в сроках постлучевой гибели во всех выборках облученных животных. Это также проявление гетерогенности по радиочувствительности и, следовательно, по обеспечивающему ее комплексу морфофизиологических характеристик, которое отражает одну из сторон фундаментальной закономерности биоразнообразия на индивидуальном уровне.

Присоединяясь к мнению Н.В. Лучника (1957) о множественности причин гибели при облучении, полагаем, что все они в высокой степени обусловлены генотипически. Так, генотипическая составляющая различий по выживаемости и срокам гибели в гетерогенной выборке представляется очевидной. Возможно и влияние мутаций *de novo*. Не исключена также гетерогенность по генетически обусловленной программе развития в онтогенезе. Роль вероятных сдвигов эпигенетического характера была показана и обсуждена при других экспериментальных и средовых воздействиях, в том числе и у линейных мышей (Васильев и др., 1986; Стариченко и др., 1993).

Механизмы реализации тех или иных, в том числе генетических, основ индивидуальной радиочувствительности и сроков лучевой гибели могут быть связаны с наличием фазовых состояний внутренней среды организмов (Дришель, 1960), обусловленных ритмикой физиологических и биохимических процессов (ритмы синтеза белка, концентрации эндогенных радиопротекторов, фазовых изменений системы крови, восстановительных процессов в тканях). К примеру, для радиочувствительной системы гемопоэза – это фазы

изменений популяционного состава Т-лимфоцитов (Осипенко, Черешнев, 1997). Можно полагать, что распределение "устойчивых" и "чувствительных" состояний у облучаемых особей постоянно определяет присутствие радиочувствительных и радиорезистентных индивидуумов даже в генетически однородной выборке. При этом сокращение сроков гибели животных напоминает репродуктивную гибель синхронизированных по стадии клеточного цикла облученных клеток.

Некоторые из обсуждаемых предположений могут быть проверены экспериментально. Кроме того, они придают дополнительную аргументированность развиваемым представлениям о ведущей роли генотипа в радиочувствительности организма и позволяют использовать полученные результаты в прикладных целях, в частности в оценке гетерогенности популяций, а также при обсуждении вопросов, выходящих за пределы тематики данной статьи.

ВЫВОДЫ

1. Представленные нами результаты, полученные методами количественной радиобиологии, можно использовать при изучении биоразнообразия на популяционном и субпопуляционном уровнях.

2. Обнаруженная однотипность постлучевой реакции у предварительно стрессированных генетически близких инbredных мышей выражается в статистически достоверном снижении вариабельности сроков гибели во времени и связана со своеобразным "выравниванием" по физиологическому состоянию особей перед облучением.

3. У предварительно стрессированных генетически разнородных групп период гибели от облучения не отличается от контроля (аутбредные мыши) или увеличивается (рыжие полевки). Это связано с минимизацией обусловленных средой сдвигов физиологического состояния посредством стресса и выявлением особенностей, характерных для данного генотипа.

4. Сокращение или увеличение периода постлучевой гибели во времени на фоне стресса рассматривается как тест на степень генотипической разнородности особей облученной выборки.

5. Медикаментозный стресс, предшествующий острому тотальному облучению средней полулетальной дозой, модифицируя сроки гибели, не приводит к существенному увеличению смертности грызунов. Это дает возможность ориентировочно оценить вклады средовой (физиологической) и генотипической составляющих в радиочувствительность.

6. Результаты, полученные нами на рыжих полевках из природной популяции, свидетельствуют о возможности "выравнивания" физиологи-

ского состояния и у особей с заведомо различными генотипами.

7. Феномен синхронизации сроков постлучевой гибели или частичной физиологической унификации линейных животных, подвергнутых предварительному стрессовому воздействию, важен не только как явление, но и как предмет для изучения вклада физиологических и генетических факторов в реализацию ответа организма на экстремальные воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. Основы негенетической теории онтогенеза. М.: Наука, 1982. 270 с.
- Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции // Эволюционная генетика. Л., 1982. С. 35–59.
- Васильев А.Г., Васильева И.А., Любашевский Н.М., Стариченко В.И. Экспериментальное изучение устойчивости проявления неметрических пороговых признаков скелета у линейных мышей // Генетика. 1986. Т. 22, № 7. С. 1191–1198.
- Глотов Н.В. Оценка генетической гетерогенности природных популяций: количественные признаки // Экология. 1983. № 1. С. 3–10.
- Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1983. 240 с.
- Григоркина Е.Б., Оленев Г.В. Особенности некоторых механизмов радиорезистентности внутрипопуляционных группировок грызунов // Экологические механизмы преобразования популяций животных при антропогенных воздействиях. Свердловск, 1987. С. 22–23.
- Дришель Г. Динамика регулирования вегетативных функций // Процессы регулирования в биологии. М.: Иностр. лит., 1960. С. 125–157.
- Лучник Н.В. Зависимость смертности облученных мышей и крыс от их штамма, пола, веса, дозы облучения и распределение этой смертности во времени // Труды Ин-та биологии УФАН АН СССР. 1957. Вып. 9. С. 70–106.
- Маркель А.Л., Бородин П.М. Генетико-эволюционные аспекты стресса // Вопросы общей генетики. М., 1981. С. 262–267.
- Медведев Н.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968. 294 с.
- Оленев Г.В. Функциональная детерминированность онтогенетических изменений возрастных маркеров грызунов и их практическое использование в популяционных исследованиях // Экология. 1989. № 2. С. 19–31.
- Оленев Г.В., Григоркина Е.Б. Функциональная структурированность популяций мелких млекопитающих (радиобиологический аспект) // Экология. 1998. № 6. С. 447–451.
- Осипенко А.В., Черешнев В.А. Иммунобиологические механизмы регенерации тканей. Екатеринбург: УрО РАН, 1997. 128 с.
- Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 253 с.

Стариченко В.И., Григоркина Е.Б. Индивидуальная изменчивость радиочувствительности и скелетного метаболизма радионуклидов // Очерки по экологической диагностике. Свердловск, 1991. С. 21–30.

Стариченко В.И., Любашевский Н.М., Попов Б.В. Индивидуальная изменчивость метаболизма остеотропных токсических веществ. Екатеринбург: Наука, 1993. 165 с.

Шварц С.С., Ищенко В.Г., Овчинникова Н.А. и др. Четедование поколений и продолжительность жизни грызунов // Журн. общ. биол. 1964. Т. 25. С. 417–433.

Шварц С.С. Эволюционная экология животных. Свердловск: Урал. фил. АН СССР, 1969. Вып. 66. 199 с.

Яблоков А.В. Популяционная биология: Учебное пособие для биологических спец. вузов. М.: Высш. шк., 1987. 303 с.

Glotov N.V. Analysis of the genotype-environment interaction in natural populations // Acta Zool. Fennica. 1992. V. 191. P. 47–55.

Grigorkina E., Olenov G. Functional approach to the study of animals populations (rodents – adaptations to harmful factors) // IRPA 9. Int. Cong. on Radiation Protection: Proc., Austria. Vienna, 1996. V. 4. P. 124–126.

Lyubashevsky N.M., Grigorkina E.B. The experimental investigation of combined action of stress and ionizing radiation // 2-nd Int. Conf. "Radiobiological consequences of nuclear accidents". Moscow, 1994. Part 1. P. 145.

Lyubashevsky N.M., Grigorkina E.B. Stress and radioresistance (genetic aspects) // Radiat. Prot. Dosim. 1995. V. 62. № 1/2. P. 27–30.

Roderick T.N. The response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body X-irradiation // Radiat. Res. 1963. V. 20. № 4. P. 631–639.

Storer J.B. Acute responses to ionizing radiation // Biology of the laboratory mouse / Ed. E.L. Green. N.Y. McGraw-Hill, 1966. P. 427–446.