

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И СОМАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕНТГЕНОВЫХ ЛУЧЕЙ И БЫСТРЫХ НЕЙТРОНОВ (ОПЫТЫ НА АРАБИДОПСИСЕ И ДРОЗОФИЛЕ)

Н. В. ТИМОФЕЕВ-РЕСОВСКИЙ, Е. К. ГИНТЕР, Н. В. ГЛОТОВ,
В. И. ИВАНОВ

*Институт медико-биологических проблем МЗ СССР, Москва;
Институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск;
Московский государственный университет,
кафедра генетики и селекции*

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, данные о характере зависимости между ЛПЭ ионизирующих излучений и индуцируемыми ими биологическими и, особенно, генетическими реакциями клеток послужили в свое время одной из важных экспериментальных основ при построении общих концепций современной количественной радиобиологии [1—3].

В теоретическом и прикладном отношениях существенное значение имеет также сравнение относительной эффективности ионизирующих излучений в индукции различных генетических и биологических реакций у разных организмов. В связи с еще непреодоленными трудностями в осуществлении точной сравнительной дозиметрии различных излучений достаточно надежные сравнения такого рода могут проводиться только на основе данных, полученных при одинаковых условиях облучения и дозиметрии.

Именно в таком плане в течение последних лет в лаборатории экспериментальной радиационной генетики ИМП АМН СССР проводились многочисленные опыты (частично в кооперации с Институтом биофизики АН ГДР), посвященные изучению биологической и, особенно, мутагенной эффективности рентгеновых и γ -лучей и быстрых частиц (протоны, альфа, нейтроны). К настоящему времени завершен первый этап работы с рентгеновыми и γ -лучами, с одной стороны, и быстрыми нейтронами — с другой. Полученные в этих опытах результаты и составляют предмет настоящего сообщения.

Объектами опытов служили дрозофила и семена арабидопсис. При этом на дрозофиле изучали такие генетические реакции, как возникновение сцепленных с полом видимых мутаций, сцепленных с полом рецессивных летальных факторов, а также нерасхождение и потеря X-хромосом. На арабидопсисе помимо возникновения рецессивных эмбриональных леталей и хлорофильных мутаций изучали также выживаемость, рост, развитие и плодовитость растений, выращенных из облученных семян.

Проведенные опыты позволяют в первом приближении выяснить два вопроса: во-первых, относительную эффективность быстрых нейтронов в индукции различных генетических и соматических реакций и, во-вторых, наличие или отсутствие корреляций между реакциями различных генетических и соматических признаков на облучение.

Авторы выражают благодарность немецким коллегам, проводившим облучение подопытного материала и сравнительную дозиметрию применявшихся излучений в филиале Института биофизики АН ГДР в Россендорфе близ Дрездена.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Во всех опытах дрозофилу и семена арабидопсиса облучали рентгеновыми лучами ($U = 245$ в, $I = 20$ мА, фильтры 1 мм Al + 2 мм Cu, средняя энергия — 0,1 Мэв, среднее значение ЛПЭ $\sim 1,6$ кэв/мк, мощность дозы ~ 6 крад/час) и быстрыми нейтронами, полученными на циклотроне при бомбардировке бериллиевой мишени быстрыми дейтеронами (средняя энергия $\sim 5,6$ Мэв, среднее значение ЛПЭ $\sim 30-35$ кэв/мк, мощность дозы ~ 6 крад/час). В ранее опубликованных работах приведены подробные данные о технике облучения и дозиметрии [4-7].

В опытах на дрозофиле для изучения радиационно-индуцированных рецессивных сцепленных с полом видимых и летальных мутаций двух-трехдневных самцов линии Berlin wild *Drosophila melanogaster* облучали рентгеновыми лучами (дозы 1, 2, 4, 6 крад в первой серии опытов и 1, 2, 3, 4 и 6 крад — во второй) и быстрыми нейтронами (дозы 1, 2, 4 крад в первой серии опытов и 1, 2, 3 и 4 крад — во второй) и скрещивали не позже чем через сутки после облучения для учета видимых мутаций с самками attached-X,

Таблица 1

Спонтанные частоты нерасхождения и потери X-хромосом в четырех культурах *Drosophila melanogaster* с разными генотипами

| Номер культуры | Генотип | Спонтанные частоты, % | |
|----------------|--|-----------------------|-------------|
| | | нерасхождение | потеря |
| 1 | yellow | 0,48 ± 0,10 | 0,20 ± 0,09 |
| 2 | y sc ^{S1} In49 v sc ⁸ | 2,4 ± 0,58 | 0 ± 0,38 |
| 3 | y/y sc ^{S1} In49 v sc ⁸ , Cy/+ | 3,6 ± 0,24 | 0,10 ± 0,17 |
| 4 | y/y sc ^{S1} In49 v sc ⁸ /Y | 51,6 ± 0,93 | 3,4 ± 0,67 |

а для учета рецессивных леталей — с самками Muller-5, yellow (в обоих случаях две самки на одного самца). Через двое суток после начала скрещивания самцов удаляли из пробирок. Учет возникающих мутаций проводили стандартными методами, при этом из видимых мутаций регистрировали только мутации типов RK1 и RK2 [8].

Радиационно-индуцированные нерасхождение и потерю X-хромосом изучали в овогенезе у самок из четырех культур *Drosophila melanogaster*. Генотипы мух, а также спонтанные частоты первичного и вторичного нерасхождения и потери X-хромосом приведены в табл. 1.

Частоты нерасхождения и потери X-хромосом вычисляли следующим образом:

$$\text{частота нерасхождения X-хромосом} = 2 \times \frac{\text{число исключительных самок}}{\text{число регулярных самок} + \text{число исключительных самок и самцов}}$$

$$\text{частота потери X-хромосом} = \frac{\text{число исключительных самцов} - \text{число исключительных самок}}{\text{число регулярных самок} + \text{число исключительных самок и самцов}}$$

Одно—пятидневных самок облучали рентгеновыми лучами (дозы 1,2; 1,8; 2,4; 3,0; 3,6 крад) и быстрыми нейтронами (дозы 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 крад). Тотчас после облучения самок скрещивали с самцами Berlin wild. Учитывали результаты трехдневной яйцекладки. Опыты, проведенные в двух повторностях для каждой культуры, дали сходные результаты, поэтому в работе приводятся суммарные данные.

Покоящиеся воздушно-сухие семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (раса Enkheim I) облучали рентгеновыми лучами (дозы 10, 20, 30, 40 крад) и быстрыми нейтронами

(дозы 5,2, 10,5; 15,6; 20,8 крад). Сразу после облучения семена намачивали в течение суток в воде, после чего растения выращивали на минеральном питательном агаре [9] в обычной пробирочной культуре [10] с рандомизированным размещением вариантов [11]. Условия культивирования были обычными для арабидопсиса [12]. Регистрировали следующие признаки: всхожесть семян, выживание проростков в фазе семядолей

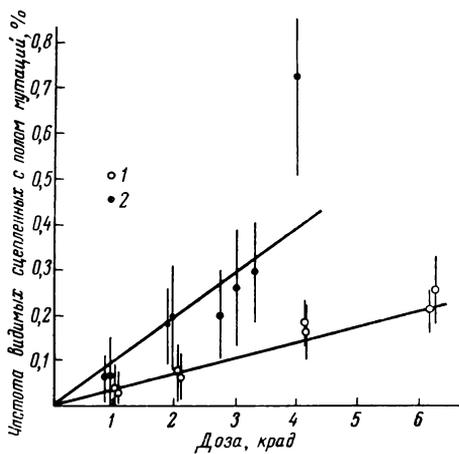


Рис. 1. Частота видимых сцепленных с полом мутаций, индуцированных в спермиях дрозофилы различными дозами рентгеновского (1) и нейтронного (2) облучения (вычтен контроль)

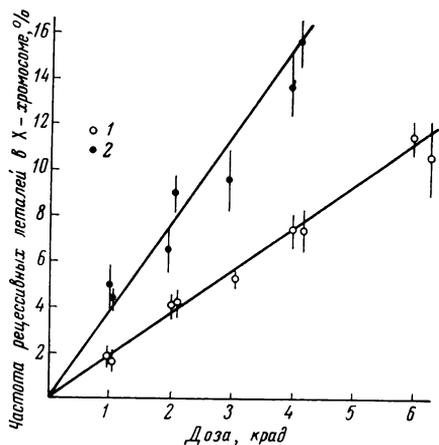


Рис. 2. Частота рецессивных сцепленных с полом леталей, индуцированных в спермиях дрозофилы различными дозами рентгеновского (1) и нейтронного (2) облучения (вычтен контроль)

и розетки, общую выживаемость растений до плодоношения, длину главного корня на седьмой день после наклеивания семян, высоту растений в день начала цветения, продолжительность развития по фазам прорастания (розетка, бутонизация, цветение), число семян, процент стерильных семянпочек и процент мутантных эмбрионов M_2 в незрелых стручках растений M_1 [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Генетические эффекты рентгеновского и нейтронного облучения у дрозофилы и семян арабидопсиса. Как отмечалось выше, в настоящей работе изучали влияние рентгеновского и нейтронного облучений на возникновение рецессивных сцепленных с полом видимых и летальных мутаций

у дрозофилы, рецессивных эмбриональных и хлорофильных мутаций у арабидопсиса, а также на частоту нерасхождения и потерю X-хромосом у дрозофилы. Полученные в этих опытах результаты представлены на рис. 1—5.

На рис. 1 и 2 приведены кривые доза — эффект для рецессивных сцепленных с полом видимых (рис. 1) и летальных (рис. 2) мутаций у дрозофилы. Статистический анализ полученных данных [14] не обнаружил значимых различий между повторными опытами, а также значимых отклонений дозовых зависимостей от линейной. При этом в отношении индукции обоих типов мутаций быстрые нейтроны оказались достоверно эффективнее рентгеновых лучей.

Кривые доза — эффект для эмбриональных и хлорофильных мутаций, полученных при рентгеновском и нейтронном облучении семян

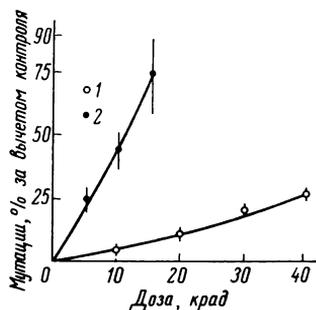


Рис. 3. Частота рецессивных эмбриональных и хлорофильных мутаций у арабидопсиса, индуцированных различными дозами рентгеновского (1) и нейтронного (2) облучения семян

арабидопсиса, представлены на рис. 3, из которого видно, что быстрые нейтроны также оказались эффективнее, чем рентгеновые лучи.

Кривые доза — эффект для потери и нерасхождения X-хромосом у дрозофилы в культурах, различающихся по структуре генотипа и спонтанным частотам анеуплоидии, представлены на рис. 4, а, б. Для всех че-

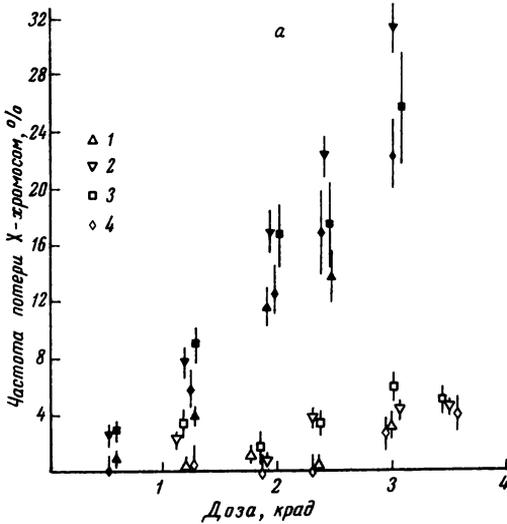
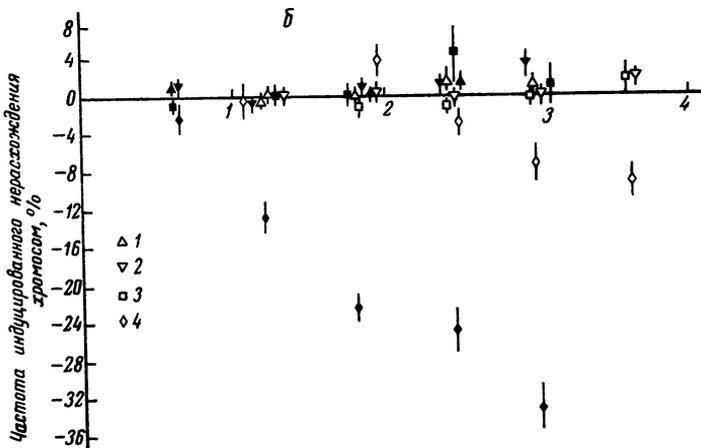


Рис. 4. Частота потери (а) и нерасхождения (б) X-хромосом в овогенезе дрозофилы при различных дозах рентгеновского (не заштрихованные значки) и нейтронного (заштрихованные значки) облучения (вычтен контроль):

1, 2, 3, 4 — номера культур (см. табл. 1)



тырех культур радиационно-индуцированные потери хромосом происходят значительно чаще при облучении нейтронами, чем рентгеновыми лучами (см. рис. 4, а). На рис. 4, б можно видеть, что для культур 1, 2 и 3 с относительно низкими частотами спонтанного нерасхождения хромосом относительно малы и изменения этих частот, вызванные облучением, так что трудно сказать, станут ли достоверными с увеличением объема выборки некоторые намечающиеся различия в сторону большей частоты нерасхождения при облучении нейтронами. Для культуры 4 с высокой спонтанной частотой вторичного нерасхождения хромосом получены очень четкие различия между облучением рентгеновыми лучами и нейтронами: частота нерасхождения хромосом убывает с дозой значительно быстрее при облучении нейтронами.

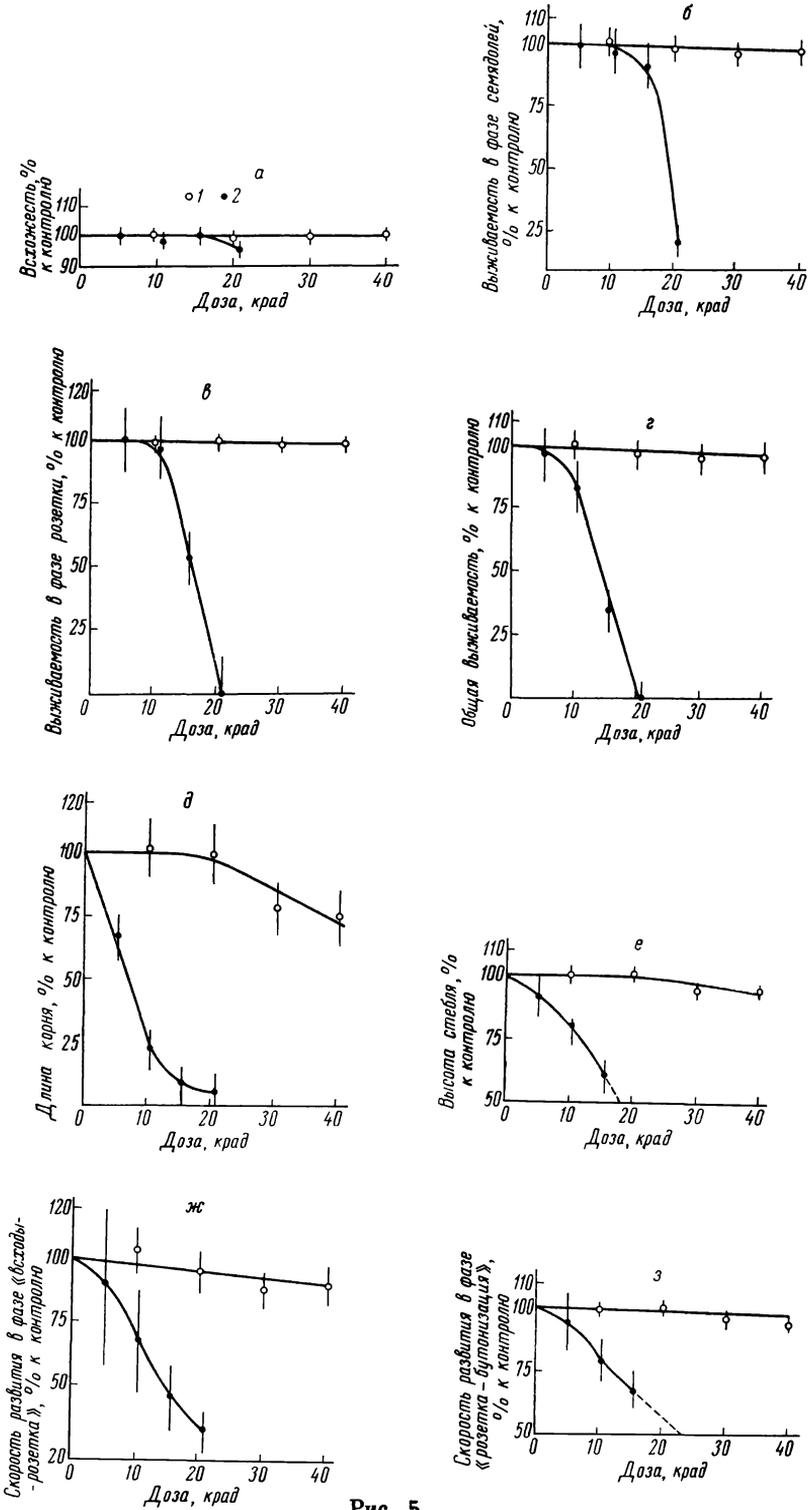


Рис. 5

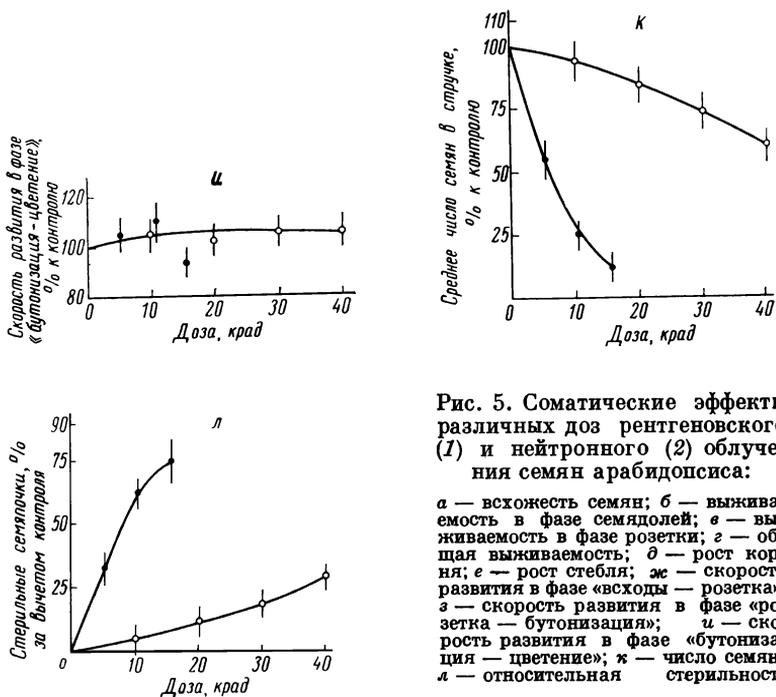


Рис. 5. Соматические эффекты различных доз рентгеновского (1) и нейтронного (2) облучения семян арабидопсиса:

а — всхожесть семян; б — выживаемость в фазе семядолей; в — выживаемость в фазе розетки; г — общая выживаемость; д — рост корня; е — рост стебля; ж — скорость развития в фазе «всходы — розетка»; з — скорость развития в фазе «розетка — бутонизация»; и — скорость развития в фазе «бутонизация — цветение»; к — число семян; л — относительная стерильность

Таким образом, в отношении индукции всех регистрировавшихся генетических эффектов облучения у дрозофилы и арабидопсиса, за исключением нерасхождения хромосом в культурах 1, 2 и 3, быстрые нейтроны оказались более эффективными, чем рентгеновые лучи.

Соматические эффекты рентгенового и нейтронного облучения семян арабидопсиса. Кривые доза — эффект для основных морфофизиологических реакций арабидопсиса (выживаемость, рост, скорость развития и плодовитость) на рентгеновское и нейтронное облучение семян представлены на рис. 5. При дозах до 40 крад рентгеновское облучение не сказывалось на выживаемости растений и приводило лишь к умеренному угнетению роста и развития растений и некоторому снижению их плодовитости (это подтверждается статистически). В то же время облучение быстрыми нейтронами в меньших дозах (до 20,8 крад) было очень эффективным в отношении почти всех изученных признаков (при последней дозе (20,8 крад) быстрых нейтронов ни одно растение не пережило фазу розетки). Лишь два признака — всхожесть семян (см. рис. 5, а) и скорость развития в фазе «бутонизация — цветение» (см. рис. 5, и) — практически не изменялись под воздействием как рентгеновского, так и нейтронного облучения в примененном диапазоне доз.

Таким образом, хотя малая эффективность рентгеновского облучения в дозах до 40 крад в отношении большинства изученных соматических радиобиологических реакций не позволяет дать только на основании результатов настоящих опытов количественных оценок ОБЭ нейтронов, несомненным является общий вывод о том, что в отношении индукции всех изученных реакций на арабидопсисе быстрые нейтроны значительно более эффективны, чем рентгеновые лучи.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом разделе мы рассмотрим подробнее два вопроса, поставленные в введении, а именно об относительной эффективности рентгеновых лучей и быстрых нейтронов в индукции различных генетических и соматических реакций и о корреляции между этими реакциями.

Как показано выше в отношении индукции регистрировавшихся радиационно-генетических эффектов, кроме нерасхождения X-хромосом в культурах с низкими спонтанными частотами этого процесса, быстрые нейтроны оказались значительно эффективнее рентгеновых лучей. При этом возникает вопрос: какова природа этих эффектов? Низкие частоты возникновения при линейной зависимости от дозы позволяют предполагать, что видимые сцепленные с полом мутации у дрозофилы представляются собой в значительной мере точковые (или генные) мутации. Относительно сцепленных с полом рецессивных леталей у дрозофилы известно, что они представляют собой смесь точковых мутаций и хромосомных aberrаций и доля последних больше, чем среди видимых мутаций [1, 15, 16]. То же можно сказать и об эмбриональных и хлорофильных мутациях, регистрировавшихся у арабидопсиса [17—19]. Полученные нами данные подтверждают, следовательно, уже сложившуюся в настоящее время точку зрения о большей эффективности нейтронов при индукции точковых мутаций и хромосомных aberrаций. В хорошем согласии с этим находится и большая эффективность нейтронов при индукции потери X-хромосом в овогенезе дрозофилы. Существующие до сих пор данные указывают, что радиационно-индуцированная потеря X-хромосом является следствием хромосомных aberrаций [20—22]. Большая эффективность нейтронов в уменьшении частоты нерасхождения хромосом в линии с высокой спонтанной частотой также объясняется возникновением aberrаций [23]. Отсутствие же заметных различий в эффективности нейтронов и рентгеновых лучей при индукции нерасхождения X-хромосом в линиях с низкими спонтанными частотами скорее всего отражает иные, не связанные с генными и хромосомными мутациями, механизмы этого процесса, для которых специфика микрогеометрического распределения поглощенной энергии нейтронов и рентгеновых лучей не имеет столь существенного значения.

Таким образом, сделанный выше вывод о большей эффективности нейтронов по сравнению с рентгеновыми лучами относится в первую очередь к хромосомным и генным мутациям. Каковы же количественные различия, если они существуют, в отношении эффективностей рентгеновых лучей и быстрых нейтронов между разными типами мутаций у дрозофилы и арабидопсиса — решать на основании имеющихся данных вряд ли целесообразно.

Большая эффективность быстрых нейтронов по сравнению с рентгеновыми лучами в индукции генных мутаций (типично одноударного процесса, инициируемого одиночными ионизациями) позволяет уточнить некоторые положения, допускаемые при биофизическом анализе мутационного процесса, а именно: такое соотношение эффективностей указывает, что квантовый выход данной радиобиологической реакции должен быть меньше 1 [24].

Аналогичное заключение о большей эффективности нейтронов было сделано выше и в отношении всех основных морфофизиологических (соматических) реакций арабидопсиса на облучение семян. Однако результаты опытов, представленные на рис. 5, не позволяют в большинстве случаев дать количественную оценку соотношения эффективностей этих двух видов излучений, поскольку примененные дозы рентгеновского излучения дали четко выраженные эффекты только по отдельным признакам; при-

Таблица 2

Относительная эффективность быстрых нейтронов по сравнению с рентгеновыми и γ -лучами в индукции различных радиобиологических реакций при облучении семян арабидопсиса

| Номер реакции | Признак | D_{50} , <i>крад</i> | | ОБЭ нейтронов |
|---------------|--|--------------------------------|----------|---------------|
| | | рентгеновые или γ -лучи | нейтроны | |
| 1 | Выживание проростков в фазе семядолей | 225 | 19,2 | 11,7 |
| 2 | Выживание растений в фазе розетки | 117 | 16,0 | 7,3 |
| 3 | Общая выживаемость растений до плодоношения | 116 | 14,7 | 7,9 |
| 4 | Рост корня | 50 | 7,0 | 7,1 |
| 5 | Рост стебля | 165 | 18,5* | 8,9 |
| 6 | Скорость развития в фазе «всходы — розетка» | 112 | 14,6 | 7,7 |
| 7 | Скорость развития в фазе «розетка — бутонизация» | 230 | 23,4* | 9,8 |
| 8 | Число семян | 48 | 5,9 | 8,1 |
| 9 | Относительная стерильность | 88 | 8,0 | 11,0 |
| 10 | Частота эмбриональных и хлорофильных мутаций | 71 | 10,9 | 6,5 |

* Получено путем экстраполяции.

менить же более высокие дозы облучения при малой мощности дозы и соответственно длительных экспозициях сложно в техническом отношении. В связи с этим для ориентировочной оценки относительной эффективности нейтронов использованы средние значения D_{50} из разных опытов (включая и настоящие) по рентгеновому и γ -облучению покоящихся семян арабидопсиса в широком диапазоне доз — до 300 *крад* (частично эти данные приведены в работах [12, 25 — 29]). Эти усредненные значения D_{50} рентгеновых и γ -лучей из разных опытов, а также значения D_{50} быстрых нейтронов, по данным настоящих опытов, приведены в табл. 2, из которой видно, что величины D_{50} для отдельных изученных реакций очень сильно отличаются друг от друга как для рентгеновых и γ -лучей (48—230 *крад*), так и для быстрых нейтронов (5,9—23,4 *крад*). В то же время приведенные в этой таблице значения ОБЭ быстрых нейтронов для различных реакций находятся в довольно узких пределах (6,5—11,7). Последнее особенно ясно видно из рис. 6, на котором показана связь между D_{50} рентгеновых и γ -лучей, с одной стороны, и быстрых нейтронов — с другой, для десяти различных реакций, приведенных в табл. 2. Практически линейный характер этой связи при незначительных (принимая во внимание приближенность оценок D_{50}) отклонениях в ту и другую сторону от линии регрессии свидетельствует об относительном постоянстве значений ОБЭ нейтронов для всех изученных

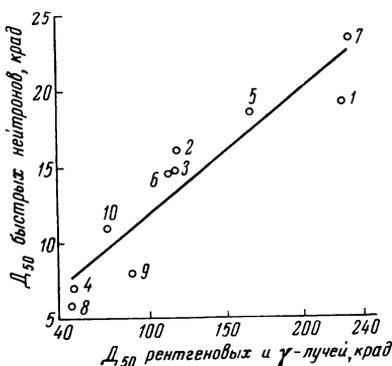


Рис. 6. Связь между средними значениями D_{50} рентгеновых и γ -лучей и D_{50} быстрых нейтронов для десяти различных соматических и генетических реакций у арабидопсиса

Цифры указывают порядковые номера реакций (см. табл. 2)

реакций и об отсутствии каких-либо четко выраженных тенденций изменения ОБЭ в зависимости от D_{50} для этих реакций.

Таким образом, значения ОБЭ быстрых нейтронов в отношении их летального действия на арабидопсис, угнетения роста и развития растений, снижения их плодовитости и индукции эмбриональных и хлорофильных мутаций очень близко совпали. Это тем более показательно, что оценки D_{50} рентгеновых и γ -лучей получены на основании результатов разновременных опытов, не говоря уже о том, что сопоставление значений ОБЭ, полученных только по значениям D_{50} для разных радиобиологических реакций, характеризующихся различной формой дозовых кривых, можно рассматривать только как грубое приближение. Поэтому наблюдаемую близость значений ОБЭ быстрых нейтронов в отношении генетических и соматических реакций арабидопсиса можно рассматривать как существенное указание на сходство, если не на общность первичных механизмов возникновения этих реакций; именно первичных механизмов, а не последующих путей развития реакций, которые, несомненно, различны для столь разнородных по своему характеру признаков.

ВЫВОДЫ

В отношении индукции видимых сцепленных с полом мутаций и рецессивных сцепленных с полом леталей у дрозофилы, рецессивных эмбриональных и хлорофильных мутаций у арабидопсиса, потери X-хромосом и снижения при облучении частоты нерасхождения X-хромосом у дрозофилы при ее высоком спонтанном уровне, т. е. для радиационно-генетических реакций, обусловленных генными и хромосомными мутациями, эффективность нейтронов больше, чем рентгеновых лучей.

При низких спонтанных частотах нерасхождения X-хромосом у дрозофилы частота нерасхождения несколько возрастала с дозой как рентгеновского, так и нейтронного облучения; при этом заметных различий в эффективности этих излучений не обнаружено.

Между относительной эффективностью быстрых нейтронов в индукции генетических (рецессивные эмбриональные и хлорофильные мутации) и соматических (выживаемость, рост, развитие, плодовитость) эффектов у арабидопсиса отмечена очень тесная связь.

Таблиц — 2, иллюстраций — 6, библиография — 29 назв.

Поступила в редакцию
9 июня 1970 г.

Литература

1. D. E. Lea. Action of radiations on living cells. Cambridge, Univ. Press, 1946.
2. N. W. Timofeeff-Ressovsky, K. G. Zimmer. Das Trefferprinzip in der Biologie. Leipzig, Hirzel Verlag. Biophysik, 1, 1947.
3. A. A. Buzzati-Traverso, L. L. Cavalli. Theoria dell'urto ed unita biologiche elementari. Milano, Longanesi a. Co., 1948.
4. H. Abel, K. Regel, H. Roßbach, K. Eichorn, G. Haberer. Experimentelle Bestimmung des mittleren linearen Energietransfer (LET) von Compton-Elektronen in gewebeähnlichen Stoffen als Funktion der primären Quantenenergie. Kernenergie, 9, 57, 1966.
5. G. Haberer, K. Eichorn, K. Abel, V. Ivanov. Strahlenbiophysikalische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*. I. Physikalische Grundlagen. Studia biophysica, 6, 113, 1968.
6. G. Haberer, K. Regel. Strahlenbiophysikalische Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*. I. Bestimmung der Dosisleistungskomponenten in intensiven Neutronen-Gamma-Strahlungsfeldern für Strahlenbiophysikalische Untersuchungen. Studia biophysica, 17, 29, 1969.
7. E. K. Ginter, E. Tolkenndorf, G. Haberer. Strahlenbiophysikalische Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*. II. Auslösung Geschlechtsgebundener

**GENETIC AND SOMATIC EFFECTS OF X-RAYS AND FAST NEUTRONS
(EXPERIMENTS WITH ARABIDOPSIS AND DROSOPHILA)**

**N. W. TIMOFEEFF-RESSOVSKY, E. K. GINTER, N. W. GLOTOV,
V. I. IVANOV**

*Institute of Medical and Biological Problems, Ministry of Health
of the USSR, Moscow; Institute of Medical Radiology, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Obninsk;
University of Moscow, Department of Genetics and Breeding*

S u m m a r y

The effect of X-rays ($\bar{E} \sim 0,1 \text{ Mev}$, average LET $\sim 1,6 \text{ kev/mcm}$, dose rate about 6 krad/hr) and D/Be neutrons ($\bar{E} \sim 5,6 \text{ Mev}$, average LET $30\text{-}35 \text{ kev/mcm}$, dose rate about 6 krad/hr) was studied on the frequencies of sex-linked visible and recessive lethal mutations in *Drosophila*, recessive embryonic and chlorophyll mutations in *Arabidopsis*, non-disjunction and loss of X-chromosomes in *Drosophila* strains differing in spontaneous aneuploidy level, as well as on the principal morphological and physiological characters in *Arabidopsis* (survival, growth, development, fertility). Comparison of the dose-response curves obtained has revealed a higher efficiency of fast neutrons as compared to X-rays in inducing all the genetic and somatic responses studied in both *Arabidopsis* and *Drosophila*. In *Arabidopsis* no significant differences were found between the RBE values of fast neutrons in all the studied cases of somatic and genetic effects of irradiation.
