

Е.А. КРАВЕЦ ¹, В.В. БЕРЕЖНАЯ ², В.И. САКАДА ²,
Н.М. РАШИДОВ ², Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ ²

¹ ДУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики»
НАН Украины, Киев

E-mail: kravetshelen@gmail.com

² Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

СТРУКТУРНАЯ АРХИТЕКТОНИКА АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ В СВЯЗИ С КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКОЙ СТЕПЕНИ ЕЕ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ



Дозовые зависимости частоты хромосомных аберраций в меристеме корня проростков гороха через 48 ч после облучения в диапазоне доз от 4 до 8 Гр характеризуются нелинейностью. Выход дозовой кривой на плато отражает активизацию восстановительных процессов. С увеличением дозы сокращаются размеры меристемы, возрастают частота инактивации клеток, нарушений пакетирования и деформаций клеточных рядов в меристеме и зоне растяжения. Однако топология клеточных рядов меристемы при 33%-ном уровне аберраций в большинстве случаев сохраняется. Поддержание и восстановление топологии клеточных рядов осуществляются через репопуляцию и замещение на ее основе поврежденных клеток и рядов. Новые клеточные ряды продвигаются в поврежденной ткани путем интрузивного роста. Продвижение аберрантных полицитов в зону растяжения замедляется или блокируется прерыванием симпластического роста. В новых субпопуляциях клеток хромосомный мутагенез сохраняется, и эффективность восстановления во многом определяется клеточной конкуренцией между нормальными и аберрантными клетками, а также их клонами. Пределы восстановительного потенциала апекса корня ограничиваются «критической массой» пролиферативного пула и степенью поражения зоны растяжения. При достижении 50%-ного порога частоты аберрантных ана-телофаз восстановление меристемы переключается на более радикальный механизм — регенерацию, которая приводит к полной замене тканей апекса, включая зону растяжения.

© Е.А. КРАВЕЦ, В.В. БЕРЕЖНАЯ, В.И. САКАДА,
Н.М. РАШИДОВ, Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ, 2012

Введение. Апикальная меристема корня, как известно, характеризуется стройной упорядоченностью рядов меристематических клеток. Организации типов апикальной меристемы, изменению их структуры в ходе онтогенеза, происхождению первичных тканей корня посвящена обширная литература [1–7]. Показано, что меристема устроена по модульному типу — в ней прослеживаются повторяющиеся модульные единицы (клеточные пакеты, или полициты), отражающие ритмы пролиферации [4–7]. Полагают, что в норме в меристеме пролиферируют все клетки, переход к митозу контролируется достижением клеткой критического размера [8, 9]. Варьирование размеров клеток и продолжительности клеточного цикла обеспечивают асинхронность митозов [10, 11], что лежит в основе устойчивости образовательных тканей к воздействию повреждающих факторов, в частности, ионизирующего облучения [12–14].

Известно, что при радиационном (механическом и холодном) повреждении основной меристемы происходит активация центра покоя, благодаря чему численность субпопуляций и рост корня восстанавливаются [14–18]. Однако мало что известно о структурной компоненте этого процесса. В меристеме существует система межклеточных взаимодействий, основанная на сочетании симпластического и интрузивного роста клеток, которая определяет образование и поддержание ее структурной архитектоники [15, 19]. При такой топологии меристемы должны существовать гибкие механизмы замены отдельных клеток и клеточных клонов с сохранением или восстановлением структурной архитектоники ткани при ее повреждении. Нет сведений о том, насколько консервативно расположение клеток и клеточных рядов в различных частях меристемы и как отражается инактивация клеток на ее архитектонике.

Одним из главных эффектов радиационного поражения меристемы являются хромосомные перестройки. Аберрантные клетки в зависимости от характера и степени повреждения хромосомного аппарата могут репарироваться, сохраняться и пролиферировать или подвергаться инактивации [20–23]. Количественные зависимости частоты хромосомных аберраций в разных диапазонах доз в одних случаях удовлетворительно описываются линейными,

в других — нелинейными моделями. В связи с этим в последние десятилетия в радиобиологии остро дискутируются вопросы о пороговости и линейности дозовых зависимостей, наличия «критического» уровня повреждения и плато, «парадоксальности» кривых доза—эффект в некоторых диапазонах доз и дискретности индукции разных систем защиты [24–29]. С учетом изложенного целью настоящего исследования было изучение изменений в структурной архитектонике меристемы в связи с количественной оценкой степени ее радиационного повреждения. Задачи работы состояли в анализе дозовых зависимостей по разным цитогенетическим параметрам меристемы и топологии клеточных рядов в норме, при повреждении и восстановлении.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовали проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Комелот. Трехсуточные проростки облучали на рентгеновской установке РУМ-17 ($I = 10 \text{ A}$; $U = 200 \text{ keV}$) в дозовом диапазоне от 4 до 10 Гр, в котором, по результатам предыдущих экспериментов [30], на дозовых кривых по выходу хромосомных aberrаций формировалось плато (рис. 1, б). Цитогенетический анализ меристемы проводили через 48 и 72 ч после облучения. Использовали общепринятый ана-телофазный метод подсчета хромосомных перестроек [31]. Поскольку на сегодняшний день не существует общепринятой терминологии в отношении мультиабберрантных клеток [32, 33], мы в эту категорию повреждений относили «тоуге»-клетки с тремя и более повреждениями хромосомного аппарата любого типа и в различных сочетаниях. В некоторых случаях для более детального анализа распределения aberrаций выделяли категорию анафаз с тремя aberrациями (рис. 1, з). Оценивали следующие цитогенетические параметры: ЧАА (частота aberrантных ана-телофаз) и ЧНА (частота и нормальных ана-телофаз), распределение aberrаций по клеткам (соотношение числа клеток с 1, 2 и множественными aberrациями к числу аномальных анафаз в процентах), число aberrаций на aberrантную клетку (отношение суммы aberrаций в aberrантных клетках к числу aberrантных анафаз, Аб/АК), число aberrаций в среднем на клетку (отно-

шение суммы aberrаций к общему числу анафаз, Аб/К), площадь клеток в дистальной меристеме и среди гистогенов первичной коры. Для подсчета aberrаций изготавливали давленные ацетокарминовые препараты [31], для анализа топологии и площади клеток — полутонкие срезы. С этой целью корневые апексы фиксировали в глутаровом альдегиде, обезвоживали и заливали в смесь эпон — аралдит согласно общепринятой методике [34]. Срезы толщиной в 5–7 мкм подкрашивали метиленовой синью или с помощью ШИК-реакции [31]. Топологию клеточных рядов меристемы изучали на продольных срезах корневых апексов, преимущественно на гистогенах первичной коры — периблеме. Предметом особого внимания был характер пакетирования клеток периблемы.

Объем выборки для цитогенетического анализа составлял 15–17 корешков, для определения площади клеток — 60–70 клеток на вариант, для анализа топологии — по четыре корешка на вариант. Площадь клеток определяли на постоянных препаратах с помощью функций программы Image. Материал статистически обработан с использованием функций Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. *Дозовые зависимости по частоте aberrантных анафаз и распределению aberrаций по клеткам.* ЧАА увеличивается с дозой от 27 до 50 % (рис. 1, а). Дозовая зависимость по выходу хромосомных aberrаций имеет нелинейный характер с порогом на уровне 27 % ЧАА и плато в диапазоне 6–8 Гр на уровне 33 %. При использовании более широкого диапазона доз и другого генотипа гороха дозовая кривая формировала плато на том же участке доз, хотя и с более высокими показателями ЧАА (рис. 1, б) [30]. Дозовые зависимости распределения aberrаций по клеткам тоже характеризуются немонотонностью (рис. 1 в, з). Так, при дозе в 4 Гр наблюдается интенсивное формирование aberrаций, преимущественно с 1 и 2 перестройками. С увеличением дозы (6 Гр) их количество снижается, а основной вклад в формирование aberrаций вносят мультиабберрантные перестройки. При 8 Гр картина примерно сохраняется, а при 10 Гр поклеточное распределение aberrаций

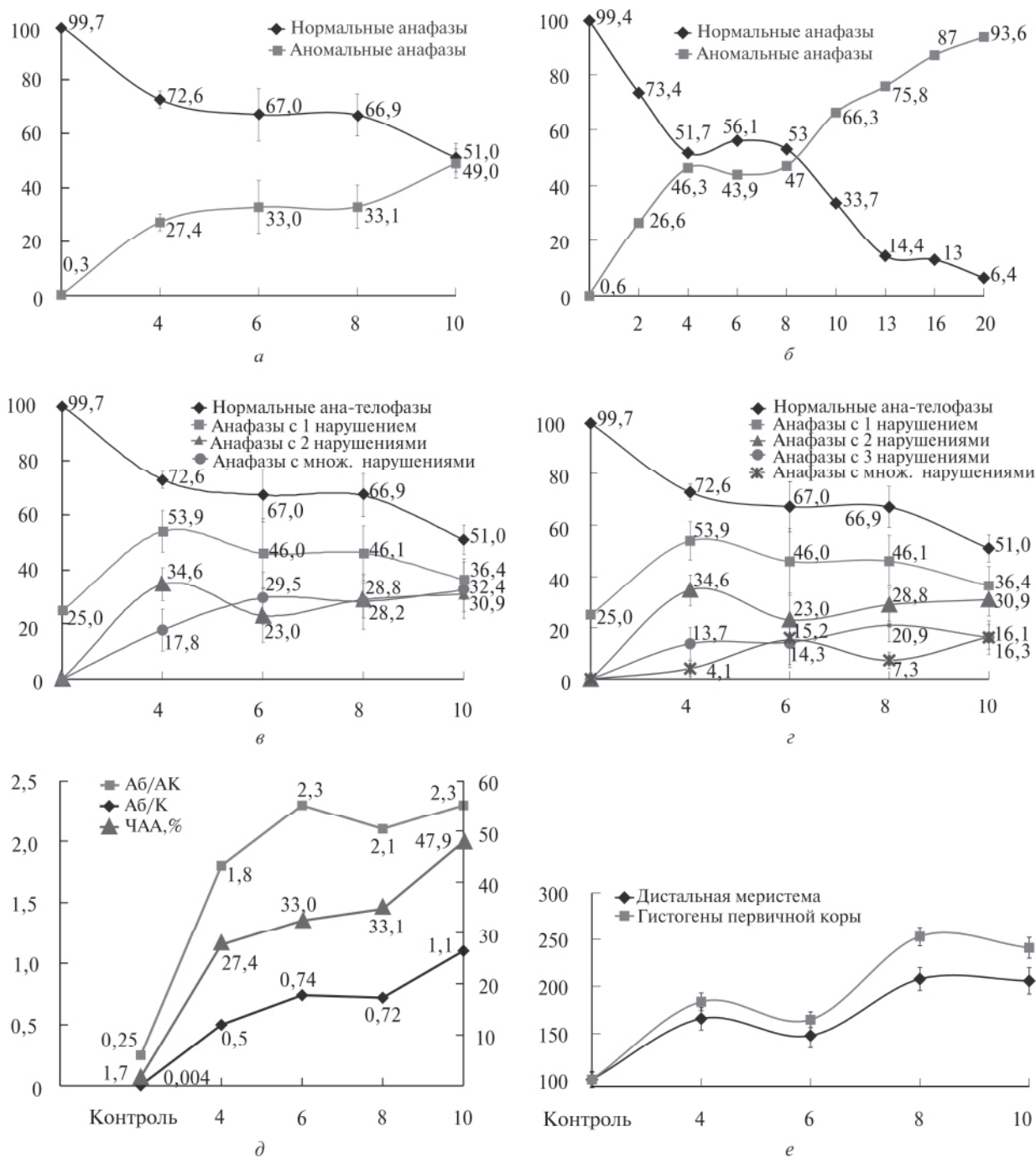


Рис. 1. Дозовые зависимости по частоте aberrантных анафаз (а, б), клеточному распределению aberrаций (в, г), абсолютной нагруженности клеток aberrациями (д) и площади клеток меристемы (е): по горизонтали – доза облучения, Гр; по вертикали: а, б – ЧАА и ЧНА, %, в, г – анафазы с 1, 2, 3 и множественными перестройками, %; д слева – число aberrаций на клетку, Аб/АК и Аб/К, справа – ЧАА, %; е – площадь клетки, % к контролю

существенно меняется: частота анафаз с 1 перестройкой снижается, а всех прочих — возрастает, что и формирует следующую экспоненту ЧАА. Формирование порога можно связать с активацией систем репарации и последующей индукцией гибели клеток с нерепарируемыми повреждениями. Выход дозовых кривых на плато совпадает с активацией пролиферативной активности в меристеме и указывает на подключение компенсаторного механизма восстановления — репопуляции. Истощение механизмов восстановления при 10 Гр приводит к снижению процента нормальных анафаз и анафаз с 1 перестройкой и одновременному возрастанию вклада мультиабберрантных перестроек (рис. 1, в, з).

Дозовые кривые нагруженности пролиферирующей клетки абберациями АБ/АК и АБ/К характеризуются наличием перегибов и плато (рис. 1, д). Уровень нагруженности возрастает с дозой, достигая максимально 2,3 АБ/АК и 0,74 АБ/К при 6 Гр, что, по-видимому, является показателем индукции мультиабберрантных повреждений и пролиферативной гибели клеток. Растущий интервал между АБ/АК и ЧАА и между АБ/АК и АБ/К, а также характер дозовых зависимостей при 6 Гр (рис. 1, в–з) указывают на индукцию мультиабберрантных повреждений, в которую, вероятно, вовлекаются уже поврежденные клетки. При 10 Гр индекс АБ/АК увеличивается незначительно — до 2,3 в отличие от АБ/К, значение которого резко возрастает (рис. 1, д), что отражает вовлечение в мутагенез новых поколений клеток. Возрастание показателя АБ/К до 1,1 свидетельствует о «критичности» повреждения меристемы.

Показатель площади клеток обычно коррелирует с интенсивностью пролиферации, его возрастание указывает на торможение или инактивацию деления. Площадь клеток меристемы увеличивается в диапазоне применяемых доз в 1,5–2 раза в дистальной меристеме и в 1,6–2,5 раза среди гистогенов первичной коры по отношению к контролю (рис. 1, е). Дозовая зависимость носит немонотонный характер. Снижение размеров клеток при 6 Гр коррелирует с активацией пролиферации (репопуляцией). Пропорционально дозе возрастает и степень варьирования размеров клеток,

причем более значительно в дистальной меристеме, чем среди гистогенов — в 3 и 1,5 раза соответственно. Значительное варьирование показателей площади клеток в дистальной меристеме, вероятно, связано с наложением процессов инактивации поврежденных клеток и репопуляции.

Следовательно, для дозовых зависимостей выхода хромосомных аббераций в меристеме проростков гороха характерны нелинейность — наличие порога, перегибов и плато, что, по-видимому, отражает включение определенных механизмов восстановления. Пороговый уровень регистрируемых эффектов — 27 % абберантных анафаз, 1,8 АБ/АК и 0,5 АБ/К — инициируют в меристеме активацию систем репарации (снижение анафаз с 1 и 2 перестройками). В диапазоне плато указанные индексы поднимаются до 33 %, 2,3 и 0,74 (индукция мультиабберрантных перестроек), что сопровождается включением компенсаторного механизма — репопуляции, восстанавливающей численность пролиферативного пула меристемы. Если при 4 Гр репопуляционное восстановление только оживляется, то при 6 Гр репопуляция становится главным инструментом восстановления. Тем не менее в новых клеточных потоках уровень абберантных анафаз сохраняется, что свидетельствует о продленном хромосомном мутагенезе. В этих условиях большое значение может иметь клеточная конкуренция, которая включает в себя не только элиминацию мутантных клеток, но и конкуренцию между клоногенными клетками (об этом будет сказано ниже). Достижение 50 % ЧАА и 1,1 АБ/К сильно усложняет восстановление и свидетельствует о «критичности» повреждения, а его превышение имеет для меристемы, как правило, летальные последствия и сопровождается включением более радикального механизма обновления путем регенерации.

На следующем этапе работы мы планировали определить, может ли ткань, в которой преобладает симпластический характер роста, сохранять топологию рядов при повреждении $1/3-1/2$ пролиферирующих клеток.

Топология клеточных потоков меристемы в норме и при повреждении. В контроле проксимальная меристема структурно четко органи-

зована в виде параллельных клеточных рядов. В меристеме нерегулярно встречаются незначительные дефекты: одиночные и парные крупные вакуолизованные клетки и полициты, деформации рядов и небольшие «пустоты». Клеткам дистальной меристемы (открытого типа) свойственна определенная степень свободы в ориентации оси деления, что, по видимому, связано с отсутствием у них сформированного аппарата симпластического роста. Структурная архитектура меристемы, в частности перифлема, хорошо прослеживается в виде повторяющихся клеточных пакетов (рис. 2, см. вклейку). Внутри них число дочерних клеток в зависимости от деления и расстояния от инициалей составляет 2–4–8–16–32. Внутри пакетов происходят симметричные деления, за исключением последних, с образованием на концах пакета мелких клеток – идиобластов. Предполагается, что в регуляции асимметрии делений участвуют концевые клеточные стенки [5–7]. В крупных полицитах всегда прослеживаются пары, квадранты или октанты симметричных сестринских клеток, которые образуют «пакеты внутри пакетов». Пролиферация этих клеток может происходить почти симультанно или с небольшой разницей по фазам митоза. Внутри пакетов поперечные деления иногда дополняются тангентальными, образующими дополнительные ряды клеток (рис. 2, б). Топология рядов переходной зоны (дистальной части зоны растяжения) более упорядочена возможно потому, что при переходе к растяжению клеточные ряды занимают фиксированное положение.

Воздействие острого облучения. Острое облучение индуцирует в меристеме возрастание гетерогенности клеточных популяций, вакуолизацию и паренхиматизацию отдельных клеток и полицитов. Изменяется характер пакетирования – клетки в пакетах варьируют по числу, размерам, форме и взаимоположению; нарушается порядок клеткообразования и симметричность митозов. Степень нарушения топологии клеточных рядов обычно коррелирует с дозой облучения и уровнем цитогенетического повреждения меристемы (рис. 3, см. вклейку). Пропорционально дозе облучения увеличивается варьирование индивидуальной

радиочувствительности растений, сокращаются размеры меристемы, возрастает частота инактивации клеток и деформаций клеточных рядов в основной меристеме и зоне растяжения. Восстановительные процессы при использованных дозах носили сходный характер и осуществлялись путем репопуляции и замещения на ее основе поврежденных клеток и рядов новыми клеточными рядами. Меристема восстанавливалась быстрее и эффективнее, чем зона растяжения. При 10 Гр восстановительные процессы на основе репопуляции теряли эффективность и заменялись регенерацией с полным замещением поврежденных тканей.

Острое облучение в 4 и 6 Гр. Характер нарушений в этом диапазоне доз сходный. Увеличивается гетерогенность клеточных субпопуляций меристемы (рис. 3, а, б и рис. 4, см. вклейку); некоторые гистогены вакуолизируются и выходят из клеточного цикла. Пакетирование в основном сохраняет правильный порядок, но встречаются и нарушения: асимметричные митозы с косой и тангентальной ориентацией деления, нарушения цитокинеза, в частности, с образованием дикарионов и их клонов (рис. 4, а–в). В дистальной меристеме паренхиматизацией обычно охватываются одиночные клетки, а в проксимальной – клоны или клеточные пакеты. Деформации рядов в дистальной части зоны растяжения выражены сильнее, чем в меристеме, тем не менее топология клеточных рядов основной меристемы сохраняется, а нарушения восстанавливаются. Дозовая кривая в точке 4 Гр характеризуется перегибом, который указывает на присутствие некоторого разброса в реакции объекта на облучение, т.е. совмещение двух разных механизмов восстановления – репаративного и репопуляционного.

Восстановительные процессы в апикальной части основной меристемы осуществляются в два этапа с помощью близких между собой механизмов. Сначала образуются небольшие пролиферативные пулы в дистальной и других частях меристемы (рис. 5, а, см. вклейку), а затем на их основе формируются новые вертикальные ряды, которые путем интрузивного роста продвигаются меж-

ду рядами вакуолизированных клеток (рис. 5, б). В составе новых клеточных рядов вновь появляются инактивированные клетки и полициты. Поврежденные ряды уступают по темпам продвижения (пролиферации клеток) в зону растяжения неповрежденным. Кроме того, продвижение аберрантных клеток и полицитов по меристеме в зону растяжения блокируется через прерывание симпластического роста поврежденных клеток. Другой, близкий по характеру, локальный механизм восстановления связан с ограниченной тангентальной пролиферацией клеток в полицитах, вследствие чего нарушается линейность пакетирования (рис. 5, в, г). Он направлен на заполнение небольших пространств между рядами при деформации соседних полицитов. В отличие от первого механизма он не носит радикального характера, но изменяет характер пакетирования клеток и топологию клеточных рядов. В зоне растяжения ряды, образованные аберрантными клетками и полицитами, деформируются. Степень повреждения дистальной части этой зоны может варьировать, но она восстанавливается как за счет поступления новых клеточных потоков из меристемы, так и пролиферации клеток перидермы и субэпидермальных слоев (рис. 5, д).

Острое облучение в 8 и 10 Гр. При облучении в 8 Гр степень поражения меристемы и зоны растяжения возрастает. Протяженность меристемы сокращается. Топология клеточных рядов основной меристемы и переходной зоны претерпевает значительные изменения, возрастает частота инактивации клеток в дистальной части, деформаций полицитов и клеточных рядов в проксимальной меристеме (рис. 3, в и 6 а, б, см. вклейку). Внутри полицитов наблюдается полиморфизм клеткообразования: часть клеток, возможно, репарируется и продолжает пролиферировать, иногда в разных плоскостях, другая — инактивируется. В результате нарушаются «линейность» пакетирования и параллельность клеточных рядов, свойственные норме (рис. 3, в и рис. 6, в, г, см. вклейку). Наибольшие деформации пакетов и рядов происходят в процессе восстановления. Дегенеративные изменения охватывают зону растяжения (рис. 6, д). При дозе в 10 Гр нарастают цитопатологические

изменения как в самой меристеме, так и во всех первичных тканях апекса корня. Паренхиматизацией охватываются большинство гистогенов дистальной меристемы, а также ряды и полициты в проксимальной меристеме (рис. 3, г и рис. 6, б, г). Размеры меристемы еще более сокращаются. На месте инактивированных клеток могут образовываться характерные пустоты (рис. 6, б). Многие клеточные пакеты претерпевают разнообразные деформации и «трансформации» (рис. 6, в, г). Нарушения топологии рядов особенно характерны для дистальной части зоны растяжения, в которой обнаруживаются «нестыковки» клеточных рядов (рис. 6, д, ж). В большинстве случаев меристема теряет присущую ей архитектуру, а зона растяжения деградирует.

При 8 Гр (ЛД₅₀) топология рядов в меристеме во многих случаях восстанавливается благодаря репопуляционному механизму. При 10 Гр восстановительный процесс замедляется и усложняется. Его основу также составляет репопуляционный механизм, но он уже теряет эффективность, поскольку его возможности ограничиваются «критической массой» пролиферативного пула и степенью поражения зоны растяжения. Полагают, что величина «критической массы» в значительной мере зависит от способности резистентных клеток к гиперфункции как основы компенсаторных процессов [35]. В большинстве случаев восстановление при облучении в 10 Гр следует более радикальному механизму — регенерации, которая приводит к полной замене тканей апекса, включая зону растяжения. При этом остатки деформированных тканей сминаются и оттесняются наружу (рис. 6, з). Локальные механизмы восстановления, играющие определенную роль в восстановлении при средних дозах, в упомянутом диапазоне значения не имеют.

Итак, острое облучение индуцирует в меристеме возрастание уровня хромосомных аберраций, степени гетерогенности клеточных популяций, частоты вакуолизации и паренхиматизации отдельных клеток и полицитов. Изменяется характер пакетирования: клетки в пакетах варьируют по числу, размерам, форме и взаимоположению; нарушается симметричность митозов и порядок клеткообразования.

Изменение характера пакетирования отражает нарушение ритма пролиферации и ее общенность между дистальной и проксимальной частями меристемы. Ранняя вакуолизация и паренхиматизация клеток проксимальной меристемы может свидетельствовать о повреждении центра покоя [15, 36]. Степень нарушения топологии клеточных рядов обычно коррелируют с дозой облучения. С увеличением дозы сокращаются размеры меристемы, возрастает частота инактивации клеток, деформаций клеточных рядов в основной меристеме и зоне растяжения (особенно в ее дистальной части). Поддержание и восстановление топологии клеточных рядов осуществляются через репопуляцию и замещение на ее основе поврежденных клеток и рядов. Новые клеточные ряды продвигаются в поврежденной ткани путем интрузивного роста, при этом продвижение аберрантных полициотов в зону растяжения замедляется или блокируется благодаря прерыванию симпластического роста. По-видимому, возможности восстановительного потенциала апекса корня ограничиваются степенью поражения дистальной части зоны растяжения.

Анализ топологии клеточных рядов меристемы согласуется с количественной оценкой уровня хромосомного мутагенеза. Формирование порога и плато по выходу хромосомных aberrаций указывает на активизацию восстановительных процессов на клеточно-популяционном уровне. У исследованного генотипа гороха 33%-ный уровень хромосомных aberrаций, или повреждение трети пролиферирующих клеток, не приводит к полной деградации ткани. Путем активизации систем репарации, затем — пролиферативной гибели поврежденных клеток и, наконец, включения компенсаторного механизма — репопуляции восстанавливается численность пролиферативного пула, структура меристемы и дистальной части зоны растяжения. По достижении 50%-ного рубежа ЧАА размеры меристемы сокращаются до «критической массы», топология клеточных рядов и зональность апекса практически полностью разрушаются, в результате его восстановление прежней архитектоники оказывается невозможным. В итоге восстановительный про-

цесс переключается на более радикальный механизм — регенерацию, которая приводит к полной замене тканей апекса, включая зону растяжения.

Формирование плато для частоты хромосомных aberrаций отмечалось многими исследователями преимущественно в низкодозовом диапазоне [24–28, 37–41 и др.]. О причинах появления плато на дозовой кривой высказаны различные предположения, в частности, неоднородность популяций клеток, включение прогрессирующего с дозой процесса репарации радиационных повреждений, существование двух разных систем репарации — «адапционной», выработанной в ходе эволюции, и SOS-системы — аварийной, включающейся при росте генетических повреждений при переходе к «плато» [24–27]. Так, для объяснения нелинейности дозовых эффектов в диапазоне малых доз Спитковский [42, 43] предложил концепцию, которая постулирует существование двух клеточных субпопуляций, принципиально различающихся по ответной реакции на слабые внешние воздействия. Для клеток одной из них характерен «адаптивный ответ» — уменьшение по сравнению с ожидаемым числа генетических нарушений, а для другой, напротив, увеличение числа нарушений сверх ожидаемого. Автор считает, что вторую субпопуляцию составляют особо радиочувствительные «клетки эволюционного резерва». Их повышенная репарация обусловлена наличием большого количества аутогенерированных клетками повреждений, которые индуцируются не непосредственно излучением, а другими событиями в клетке, также связанными с радиацией. Этой гипотезой объясняются формирование «адаптивного ответа» и пороговость дозовых зависимостей в низкодозовом диапазоне. В области средних и высоких доз облучения пороги и ступенчатый характер дозовой кривой свидетельствуют о дискретности индукции систем защиты с разным механизмом действия, адекватных соответствующему уровню повреждения [22, 44]. В популяциях опухолевых клеток выделяют, например, три уровня защиты от воздействия ионизирующего излучения в диапазоне доз от 1 до 10 Гр и выше. Полагают, что в ответ на относительно небольшие дозы излучения

включается индуцибельный радиозащитный механизм — активация синтеза репаративных ферментов. С увеличением дозы облучения в ответ на появление радиоиндуцированных ДНК-повреждений, с которыми система репарации уже не в состоянии справиться, происходит активация другой программы — индукции апоптоза. Возникший дефицит клеточного состава компенсируется включением второго уровня восстановления — репопуляции. При дозах от 10 Гр и выше срабатывает неспецифическая защита, основанная на реорганизации популяции клеток и сохранении или образовании мутантных клеток, способных к пролиферации [44].

Эффективность восстановления связана также с уровнем продленного хромосомного мутагенеза, когда реализация повреждений ДНК в абберации хромосом происходит в ряду последовательных клеточных делений после облучения. Предполагается, что в механизмах продленного мутагенеза важную роль играет ошибочная репарация ДНК и реализация скрытых (латентных) форм повреждений [35]. В этой связи эффективность восстановительных процессов в новых клеточных популяциях во многом определяется клеточной конкуренцией (клеточным отбором). Суть ее состоит в том, что внутри многоклеточного организма различия по темпам пролиферации между абберантными и нормальными клетками приводят к элиминации медленно пролиферирующих клеток [45–47]. В поврежденной меристеме абберантные клетки могут сразу инактивироваться (через пролиферативную или интерфазную гибель), уступать в темпах пролиферации, замедляться или блокироваться в своем продвижении в зону растяжения, а также формировать «неправильные» полициты и деформированные ряды, которые вытесняются и заменяются на новые, полноценные. Клеточная конкуренция в меристеме, возможно, включает в себя и конкуренцию между клетками пула «за право» образовывать ряд между смежными клеточными клонами и рядами клеток. Клеточная конкуренция приводит к «фильтрации» нарушений и отстранению значительного числа поврежденных клеток от участия в построении специализированных тканей. Воз-

можно, через клеточную конкуренцию осуществляется контроль генетического аппарата клеток и в случае необходимости индуцируется пролиферативная гибель или другой тип клеточной гибели, например апоптоз. Гипотеза клеточной конкуренции получила большое развитие за последние десятилетия и нашла широкое применение в областях иммунологии, неврологии, онкологии и морфогенеза животных. Так, показана активная конкуренция за выживание среди многочисленных клонов В-лимфоцитов в периферической крови млекопитающих [48]. Как пример острой конкуренции между клетками рассматривается опухолевый рост [45, 46, 49]. Клеточной конкуренции принадлежит важная роль в стабилизации процессов клеточной дифференцировки и определении размеров ткани, в том числе и при регенерации [50–52]. Наконец, клеточная конкуренция представляет собой один из механизмов элиминации мутантных клеток и их клонов [45, 52, 53]. Хорошо объясняются гипотезой клеточной конкуренции применительно к растениям механизмы элиминации и ограничения участия мутантных клеток в построении дифференцированных тканей при продленном радиационном мутагенезе [54, 55]. Клеточную конкуренцию можно рассматривать как механизм, с помощью которого ограничивается мутагенез, регулируется состояние, а также численность клеточных субпопуляций и клеточных рядов при репопуляционном восстановлении меристемы.

Архитектоника меристемы — довольно гибкое и динамичное образование с высоким потенциалом надежности. В его основе лежат разнообразные механизмы самоподдержания: быстрота обновления состава популяций и сохранение запаса относительно устойчивых к повреждению клеток, асинхронность клеточного цикла клеток и ритмический, гибкий характер пролиферации и пакетирования клеток, наконец, сочетание симпластического и интрузивного роста клеток и клеточных рядов. В зависимости от характера и степени повреждения меристемы включаются и разные механизмы самоподдержания. Известно, что организационным центром в корне является центр покоя. Кроме функции «депо» радио-

резистентных клеток, он регулирует состояние стволовости прилегающих к нему клеток и предотвращает их дифференцировку [56–58]. Эффективность восстановления меристемы во многом определяется клеточной конкуренцией, а поддержание структурного остова меристемы – интрузивным ростом новых клеточных рядов и прерыванием симпластического характера роста поврежденных клеток и полицитов. Пределы восстановительного потенциала апекса корня, по-видимому, ограничены не только «критической массой» пролиферативного пула меристемы, но и степенью поражения зоны растяжения.

Выводы. Дозовые зависимости частоты хромосомных aberrаций в меристеме корня через 48 ч после облучения в диапазоне от 4 до 10 Гр характеризуются порогом и плато на уровне 33 % aberrантных анафаз. Выход на плато отражает активизацию восстановительных процессов на клеточно-популяционном уровне: репарацию ДНК, затем пролиферативную гибель клеток и репопуляцию. При 10 Гр дозовая кривая формирует экспоненту, обусловленную вовлечением в мутационный процесс большого количества новых клеток, с которыми указанные механизмы уже не справляются.

С увеличением дозы облучения возрастают гетерогенность меристемы, частота инактивации и паренхиматизации клеток, сокращаются размеры меристемы. Изменяется характер пакетирования – нарушается порядок и линейность клеткообразования, а также симметричность митозов внутри пакетов. Тем не менее в большинстве случаев топология клеточных рядов основной меристемы в диапазоне плато сохраняется.

Поддержание и восстановление топологии клеточных рядов осуществляются путем репопуляции и замещения на ее основе поврежденных клеток и рядов. Новые клеточные ряды продвигаются в поврежденной ткани путем интрузивного роста. Продвижение aberrантных клеток и пакетов в зону растяжения замедляется или блокируется через прерывание симпластического роста. Локальные процессы восстановления сопровождаются изменением линейности пакетирования.

В новых клеточных популяциях уровень хромосомного мутагенеза остается высоким. Эффективность восстановления меристемы во многом определяется клеточной конкуренцией между нормальными и aberrантными клетками и их клонами, что ограничивает мутагенез и также замедляет продвижение aberrантных клеток в зону растяжения. Пределы восстановительного потенциала апекса корня ограничиваются, по-видимому, числом радиорезистентных клеток пролиферативного пула меристемы и степенью поражения зоны растяжения.

По достижении 50%-ного рубежа ЧАА размеры меристемы сокращаются до «критической массы», топология клеточных рядов и зональность апекса разрушаются, что сопровождается включением более радикального механизма восстановления – регенерации, которая приводит к полной замене тканей апекса, включая зону растяжения.

*E.A. Kravets, V.V. Berezhnaya,
V.I. Sacada,*

N.M. Rashidov, D.M. Grodzinsky

STRUCTURAL ARCHITECTONICS OF APICAL ROOT MERISTEMS IN COHERENCE WITH THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF ITS DAMAGE BY RADIATION

The dose dependencies of the aberrant anaphases frequency in the root meristem in 48 hours after irradiation in the range of doses of 4–10 Gy is characterized by threshold and plateau at 33 % aberrant anaphase. The plateau indicates the activation of the recovery processes. Topology of cell rows in the primary meristem of the dose to 8 Gy are conserved and recovered damages. New cell rows are formed by local cell pools in the distal meristem, pericycle cells and subepidermy. It grows by intrusive character displacing the rows of damaged cells. Apparently the competition between clones of normal and aberrant cells plays the primary role in the mechanisms of recovery. Resulting to competition the promotion of aberrant cells to the extension zone is slowed down or blocked. So critical level of damage of the root apical meristem was defined about 50 % of aberrant anaphase. Exceeding of this level leads to lethal consequence for meristem and it is accompanied by the inclusion of more radical process of restoration through regeneration. Regeneration leads to complete replacement of the apex tissues including the extension zone.

О.А. Кравець, В.В. Бережна, В.І. Сакада,
Н.М. Рашидов, Д.М. Гродзинський

СТРУКТУРНА АРХІТЕКТОНІКА АПІКАЛЬНОЇ
МЕРИСТЕМИ КОРЕНЯ У ЗВ'ЯЗКУ
З КІЛЬКІСНОЮ ОЦІНКОЮ СТУПЕНЯ
ЇЇ РАДІАЦІЙНОГО УРАЖЕННЯ

Дозові залежності частоти хромосомних аберацій в меристемі кореня через 48 год після опромінення в діапазоні від 4 до 10 Гр характеризуються наявністю порога і плато на рівні 33 % аберацій анафаз. Вихід на плато вказує на активізацію відновних процесів: Топологія клітинних рядів меристеми в діапазоні доз до 8 Гр в більшості випадків, ще зберігається, а пошкодження відновлюються. Підтримання та відновлення топології клітинних рядів здійснюються за рахунок репопуляції і заміщенням на її основі пошкоджених клітин і рядів. Нові клітинні ряди просуваються в пошкодженій тканині шляхом інтрузивного росту. Просування абераційних клітин та поліцитів в зону розтягування сповільнюється або блокується перериванням симпластичного росту. У нових субпопуляціях хромосомний мутагенез зберігається. Ефективність відновлення в значній мірі визначається клітинною конкуренцією між клонами нормальних і абераційних клітин, в результаті якої обмежується мутагенез і також сповільнюється просування абераційних клітин і поліцитів в зону розтягування. Межі відновного потенціалу апекса кореня обмежуються «критичною масою» меристеми і ступенем ураження зони розтягування. Критичний рівень радіаційного пошкодження апікальної меристеми кореня становить близько 50 % абераційних анафаз. Перевищення цього рівня супроводжується включенням більш радикального процесу відновлення меристеми шляхом регенерації, яка призводить до повної заміни тканин апекса, включаючи зону розтягнення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Barlow P.W.* Structure and function at the root apex-phylogenetic and ontogenetic perspectives on apical cells and quiescent centre // Structure and function of roots / Eds V. Baluška, M. Ciamporová, O. Gaspariková, P.W. Barlow. — Dordrecht : Kluwer, 1995. — P. 3–18.
2. *Groot E.P., Doyle J.A., Nichol S.A., Rost T.L.* Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms // Int. J. Plant Sci. — 2004. — **165**. — P. 97–105.
3. *Rost T.L., Bryant J.A.* Root organization and gene expression patterns // J. Exp. Bot. — 1996. — **47**. — P. 1613–1628.
4. *Clowes F.A.L.* Pattern in root meristem development in angiosperms // New Phytol. — 2000. — **146**. — P. 83–94.
5. *Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U., Barlow P.W.* Cellular patterning in root meristems : Its origins and significance // Plant roots : The hidden half / Eds Y. Waisel, A. Eshel, V. Kafkafi. — New York : Marcel Dekker, 2002. — P. 49–82.
6. *Barlow P.W.* Cellular packets, cell division and morphogenesis in the primary root meristem of *Zea mays* L. // New Phytol. — 1987. — **105**. — P. 27–56.
7. *Барлоу П.В., Люк Ж.* Ритмический характер морфогенеза растений на примере повторяющегося образования клеток идиобластов // Физиология растений. — 2008. — **55**, № 2. — С. 163–183.
8. *Иванов В.Б.* Критический размер и переход клетки к делению. Последовательность перехода к митозу сестринских клеток // Онтогенез. — 1971. — **2**. — С. 524–535.
9. *Доброчаев И.Г., Иванов В.Б.* Вариабельность размеров митотических клеток в меристеме // Онтогенез. — 2001. — **32**. — С. 252–262.
10. *Иванов В.Б.* Пролиферация клеток в растениях. — М.: ВИНТИ, 1987. — 220 с. (Итоги науки и техники. Сер. Цитология; т. 5).
11. *Доброчаев И.Г., Иванов В.Б.* Стохастическая модель пролиферации клеток в одном продольном ряду клеток // Онтогенез. — 1999. — **30**. — С. 192–204.
12. *Гродзинский Д.М.* Радиобиология растений. — Киев : Наук. думка, 1986. — 380 с.
13. *Батыгин Н.Ф.* Онтогенез высших растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 101 с.
14. *Гудков И.Н.* Клеточные механизмы пострадиационного восстановления растений. — Киев : Наук. думка, 1986. — 222 с.
15. *Иванов В.Б.* Клеточные механизмы роста растений : Тимирязев. чтения. Т. 68. — М.: Наука, 2011. — 103 с.
16. *Clowes F.A. L.* Reorganization of root apices after irradiation // Ann. Bot. — 1959. — **23**, № 2. — P. 205–210.
17. *Barlow P.W., Rathfelder E.L.* Cell division and regeneration in primary root meristems of *Zea mays* recovering from cold treatment // Environ. Exp. Bot. — 1985. — **25**. — P. 303–314.
18. *Гродзинский Д.М., Зезина Н.В., Гудков И.Н.* Восстановление апикальной меристемы корня трансплантацией покоящегося центра // Докл. АН СССР. — 1986. — **286**, № 2. — С. 487–491.
19. *Эсау К.* Анатомия растений. — М.: Мир, 1969. — 564 с.
20. *Ганасси Е.Э.* Радиационное повреждение и ре-

- парация хромосом. — М.: Наука, 1976. — 103 с.
21. *Ганасси Е.Э., Заичкина С.И., Розанова О.М.* Роль различных повреждений ДНК в формировании радиационного повреждения хромосом // Радиобиология. — 1984. — **4**, № 5. — С. 616–625.
 22. *Бычковская И.Б.* Проблема отдаленной радиационной гибели клеток. — М.: Энергоатомиздат, 1986. — 160 с.
 23. *Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M.* Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability // *Oncogene*. — 2003. — **22**. — P. 6988–6993.
 24. *Эйдус Л.Х.* О форме дозовой кривой цитогенетических повреждений в области малых доз радиации // Мед. радиология и радиац. безопасность. — 1999. — **39**. — С. 12–16.
 25. *Эйдус Л.Х.* О проблеме экстраполяции дозовой зависимости цитогенетических повреждений от больших доз к малым // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1999. — **39**. — С. 177–180.
 26. *Гераськин С.А., Зяблицкая Е.Л., Удалова А.А.* Закономерности индукции гамма-излучением структурных мутаций в корневой меристеме проростков семян гексаплоидной пшеницы // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1995. — **35**, № 2. — С. 137–149.
 27. *Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Удалова А.А. и др.* Анализ цитогенетических последствий хронического облучения в малых дозах посевов сельскохозяйственных культур // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1998. — **38**, № 3. — С. 367–374.
 28. *Trott K.R., Rosemann M.* Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, non-threshold dose response model of radiation risk estimation // *Radiat Environ Biophys*. — 2000. — **39**, № 2. — P. 79–87.
 29. *Рождественский Л.М.* Про и contra пороговости/беспороговости мутагенного (канцерогенного) действия ионизирующего излучения низкого уровня // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2001. — **41**, № 5. — С. 580–588.
 30. *Кравец Е.А., Михеев А.Н., Овсянникова Л.Г., Гродзинский Д.М.* Критический уровень радиационного повреждения апикальной меристемы корня и механизмы ее восстановления (на примере *Pisum sativum* L.) // Цитология и генетика. — 2011. — **45**, №1. — С. 24–34.
 31. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
 32. *Awa A.A., Nell I.V.* Cytogenetic «rogue» cell: what is their frequency, origin and evolutionary significance // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1986. — **83**. — P. 1021–1025.
 33. *Пилинская М.А., Шеметун А.М., Дыбский С.С., Редько Д.В., Знаевская И.А.* Выявление мультиаберрантных лимфоцитов при цитогенетическом обследовании различных групп людей, контактирующих с мутагенными факторами // Цитология и генетика. — 1994. — **28**, № 1. — С. 27.
 34. *Электронная микроскопия клеток и тканей* / Отв. ред. П.П. Румянцев. — Л.: Наука, 1990. — 144 с.
 35. *Гродзинский Д.М.* Парадигмы сучасної радіобіології // Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи. — Київ : Наук. думка, 2008. — С. 9–32.
 36. *Scheres B.* Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms // *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. — 2007. — **8**. — P. 345–354.
 37. *Luchnik N.V., Sevan'kaev A.V.* Radiation induced chromosomal aberrations in human lymphocytes. Dependence of the dose of gamma-rays and an anomaly at low doses // *Mutat. Res*. — 1976. — **36**, № 3. — P. 363–378.
 38. *Lloyd D.C., Edwards A.A., Leonard A.A et al.* Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays // *Int. J. Radiat. Biol*. — 1992. — **61**. — P. 335–343.
 39. *Севанькаев А.В.* Современное состояние вопроса количественной оценки цитогенетических эффектов в области низких доз радиации // Радиобиология. — 1991. — **31**, № 4. — С. 600–605.
 40. *Zaka R., Chenal C., Misset M.T.* Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem // *Mutat. Res*. — 2002. — **517**, № 1/2. — P. 87–99.
 41. *Elhajouji A., Lukamowicz M., Cammerer Z., Kirsch-Volders M.* Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring // *Mutagenesis*. — 2011. — **26**, № 1. — P. 199–204.
 42. *Спунковский Д.М.* Концепция малых доз ионизирующего излучения на клетки и ее возможные приложения к трактовке медико-биологических последствий // Радиобиология. — 1992. — **32**, № 5. — С. 627–630.
 43. *Спунковский Д.М., Зайцев С.В., Талызина Т.А.* Моделирование особенностей инициации генетических повреждений малыми дозами ионизирующих излучений в клетках эукариот на основе концепции существования клеток эволюционного резерва // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1994. — **34**, № 6. — С. 739–747.
 44. *Календо Г.С.* Различные уровни радиозащиты в популяции опухолевых клеток // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2001. — **41**, № 5. — С. 519–527.
 45. *Gallant P.* Myc, cell competition and compensatory proliferation // *Cancer Res*. — 2005. — **65**. — P. 6485–6487.

46. *Díaz B., Moreno E.* The competitive nature of cells // *Exp. Cell Res.* – 2005. – **306**. – P. 317–322.
47. *Yamada Takashi A., O'Connor M.B.* Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells : Cell competition and morphogenetic apoptosis // *J. Biochem.* – 2004. – **136**, № 1. – P. 13–17.
48. *McLean R., Rosado M.M., Agenes F., Vasconcellos R., Freitas A.A.* Resource competition as a mechanism for B cell homeostasis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 5792–5797.
49. *Moreno E., Basler K.* dMyc transforms cells into super-competitors // *Cell.* – 2004. – **117**. – P. 117–129.
50. *Moreno E.* Discovery of «Programmed cell competition» among stem cells. Cellular Competition Group. Overview. Molecular Oncology Programme (update 31.03.2006) // <http://www.cnio.es/ing/grupos/plantillas>.
51. *Wei Li, Baker N.E.* Engulfment is required for cell competition // *Cell.* – 2007. – **129**. – P. 1215–1225.
52. *Tyler D.M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B., Baker N.E.* Genes affecting cell competition in *Drosophila* // *Genetics.* – 2007. – **175**. – P. 643–657.
53. *Raff M.C.* Cellular competition as a mechanism for the maintenance of cellular homeostasis // *Nature.* – 1992. – **356**. – P. 397–400.
54. *Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П.* Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // *Цитология и генетика.* – 1996. – **30**, № 3. – С. 36–45.
55. *Кравец Е.А.* Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // *Цитология и генетика.* – 2009. – **43**, № 1. – С. 11–22.
56. *Van den Berg C., Willemsen V., Hage W. et al.* Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling // *Nature.* – 1995. – **378**. – P. 62–65.
57. *Sabatini S., Heidstra R., Wildwater M., Scheres B.* SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem // *Genes Develop.* – 2003. – **17**. – P. 354–358.
58. *Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J., Scheres B.* The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells // *Develop. Cell.* – 2008. – **15**. – P. 913–922.

Поступила 07.09.11