

II. ГЕНЕТИКА ПОВЕДЕНИЯ

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХРОМОСОМ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ У МЫШЕЙ

Р. И. Цапыгина

Изучению роли организменных факторов (нервной, гормональной системы) в регуляции митотического цикла посвящены многие исследования (Алов, 1964; Керкис, Логвинова, 1963; Bullough, 1949, и др.). Связь состояния периферической нервной системы с пролиферативной активностью в иннервируемом органе отмечена в работах Н. С. Еремеева (1967), Г. Г. Полянской (1969) и др. О. Чженом (1954), В. В. Козловым (1954), И. А. Аловым (1955), Фриденвальдом и Бушке (Fridenwald, Buschse, 1944) и целым рядом других авторов показано влияние стрессовых факторов на протекание митоза, которое заключается в реактивном торможении вступления клеток в деление. Это торможение носит рефлекторный характер. Основное значение в торможении клеточного деления принадлежит адреналину надпочечников (Козлов, 1954; Bullough, 1952, и др.) и гидрокортизону (Франкфурт, 19686).

Данные о роли центральной нервной системы в регуляции процесса клеточного деления недостаточны и носят противоречивый характер. На наш взгляд, применение метода условного рефлекса является одним из возможных подходов к решению данной проблемы. Подобного рода эксперименты проводились О. Чженом (1954), Л. Н. Жинкиным и Л. И. Чекулаевой (1955). Однако выработка одного условного рефлекса еще недостаточна для прямого доказательства центральной регуляции митотического цикла. Необходимо соблюдение двух условий: во-первых, исследование каждого из сочетаемых раздражителей (безусловного и условного) и, во вторых, введение отрицательного (дифференцировочного) раздражителя в стереотип. В нашем исследовании эти условия были соблюдены, и при этом изучалось влияние условного и безусловного раздражителя не только на пролиферативную активность клеток, а главным образом на радиочувствительность хромосомного аппарата.

В эксперименте использовались линии мышей СС57W и СС57BR, предварительно изученные нами как по циркадному ритму, так и по характеру торможения клеточного деления в роговице при действии стрессорных факторов (Полянская, Цапыгина, 1968). Выработка условных рефлексов проводилась по несколько модифицированной методике Л. Н. Жинкина и Л. И. Чекулаевой (1955), предложенной для подобного рода исследований. В качестве безусловного раздражителя был

использован электрический ток напряжением 25—50 в, который является одним из стрессовых факторов, снижающих митотическую активность сразу после его действия (Суворова, 1956; Уткин и Косиченко, 1956; Полянская, Цапыгина, 1968, и др.). Условным раздражителем служил сине-зеленый цвет, индифферентный к данному процессу. Дифференцировочным сигналом был сине-желто-зеленый свет.

Выработка рефлекса шла по схеме: условный раздражитель — 5 сек, безусловный раздражитель — 2 сек, интервал — 3 мин. В течение спытного дня (день тестирования) давалось по 7 применений в различные часы суток. Последнее условие соблюдалось для устранения условного рефлекса на время и ритм воздействия.

Дифференцировочный раздражитель в стереотип вводили по схеме: условный раздражитель — 5 сек, безусловный — 2 сек, интервал — 3 мин, дифференцировочный раздражитель — 7 сек, интервал — 3 мин.

О выработке рефлекса судили по поведению — по характерной двигательной реакции животных. Дача 63 сочетаний оказалась достаточной для выработки прочного положительного рефлекса, после чего вводили дифференцировочный раздражитель, четко отличать который от условного животные начинали только после 70 применений дифференцировочного раздражителя. Опыты проводили в две серии: лето 1968 г. (I серия) и зима 1968/69 г. (II серия). В первой серии использовалась линия мышей СС57BR, во второй — СС57W (по 5 животных в каждой фиксации).

Перед выработкой рефлекса, которая производилась в специально сконструированной камере, животных подвергали ежедневной тренировке с целью угашения рефлекса на обстановку. Контролем служили мышцы этих же линий и, того же возраста, которые также проходили ежедневную тренировку. После выработки положительного условного рефлекса животных подвергали воздействию одного из раздражителей: условного, безусловного или дифференцировочного. Проводилось 5 фиксаций (табл. I; серия I) по следующей схеме: 1-я фиксация — после 49 сочетаний, без воздействия в день фиксации; 2-я фиксация — после 56 сочетаний, в день тестирования — действие безусловного раздражителя (электрический ток) 2 сек, интервал 3 мин, 7 применений; 3-я фиксация — после 63 сочетаний, в день тестирования — действие условного раздражителя (сине-зеленый цвет) 7 сек, интервал 3 мин, 7 применений; 4-я фиксация — после 135 сочетаний, в день тестирования — действие дифференцировочного раздражителя (сине-желто-зеленый цвет) 7 сек, интервал 3 мин, 7 применений; 5-я фиксация — после 142 сочетаний, в день тестирования — действие условного раздражителя (сине-зеленый свет) 7 сек, интервал 3 мин, 7 применений. Материал фиксировали сразу после дачи применений. Во II серии были 4 фиксации (табл. I, серия II). 6-я фиксация заключалась в последующей даче условного раздражителя.

Для анализа влияния центральной нервной системы на радиочувствительность хромосом использовали мышей из II серии опытов. Часть животных с выработанным условным рефлексом подвергали облучению малыми дозами рентгеновых лучей (аппарат РУМ-11, напряжении 190 кВ, сила тока 15 мА, фильтр 0,5 мм Cu + 1 мм Al, расстоянии от антиматоды 36 см, Д—100 р, 51 р/мин). Спустя два часа после облучения части животных давали безусловный раздражитель, а части животных — условный раздражитель по вышеописанной схеме. Контролем служили животные только облученные, не подвергавшиеся выработке рефлекса, и такие же животные, но не облученные.

Фиксация материала в варианте с действием безусловного раздражителя проводилась сразу после действия (1-я фиксация), спустя

2,5 часа (2-я фиксация) и 22 часа (3-я фиксация) (табл. 2). В варианте опыта при действии условного раздражителя проводилась одна фиксация через 22 часа после его действия (табл. 3). Глазные яблоки фиксировали в жидкости Кларка (3 этилового спирта: 1 ледяная уксусная кислота). Митотический индекс определялся в эпителии роговицы по методике, описанной ранее (Полянская, Цапыгина, 1969).

Во II серии опытов подсчет проводился по всей роговице. В дополнение к этим экспериментам были поставлены опыты по выявлению действия условного и безусловного раздражителя на радиочувствительность хромосомного аппарата животных, у которых не выработывался условный рефлекс. Животных подвергали облучению по указанному режиму. Спустя 2 часа после облучения — одной группе давали безус-

Таблица 3

Действие X-лучей и условного раздражителя на митотический индекс и частоту хромосомных перестроек в роговице у мышей линии СС37W

Вид воздействия	$\bar{X} \pm m$ для общего числа делений, %	P	$\bar{X} \pm m$ для перестроек, %	P
Облучение + усл. раздра- житель	$1,69 \pm 0,081$	$> 0,05$	$12,0 \pm 0,50$	$< 0,01$
Облучение	$1,65 \pm 0,064$	$< 0,05$	$14,7 \pm 0,48$	$< 0,01$
Контроль	$2,41 \pm 0,061$	$< 0,05$	$0,51 \pm 0,02$	$< 0,01$

ловный раздражитель (ток 25 v), а другой группе — условный (сине-зеленый цвет) по вышеописанным схемам. Фиксацию проводили через 22 часа после действия раздражителей. Для данной серии опыта были взяты два контроля: облученные и не облученные животные (табл. 4 и 5). Митотический индекс и частоту хромосомных перестроек высчитывали по анафазной методике. Данные всех экспериментов обрабатывали статистически и оценивали по Стьюденту.

Анализ результатов I серии опытов (см. табл. 1) свидетельствует о том, что после выработки положительного условного рефлекса (63 сочетаний) животные отвечают достоверным понижением митотического индекса в эпителии роговицы на действие как безусловного, так и условного раздражителя. Дифференцировочный раздражитель спустя 70 сочетаний после введения его в стереотип не вызывает такого снижения. Условный раздражитель продолжает вызывать депрессию митотического индекса. II серия опытов (см. табл. 1) дает аналогичные результаты. Угасание рефлекса не наблюдается и к 156-му применению. В этой серии одновременно с анализом роли центральной нервной системы в пролиферативной активности эпителия роговицы проводилось изучение влияния ц. н. с. на процесс возникновения хромосомных аббераций.

Количественный анализ митоза свидетельствует о том, что действие безусловного сигнала после облучения рентгеновыми лучами вызывает уменьшение числа перестроек, регистрируемое в фиксации через 22 часа после действия раздражителя, на 20% (в относительных числах).

В контроле, которым служили необлученные животные, имеет место достоверно более высокий митотический индекс, чем в опытном варианте и у только облученных животных.

Противоположный эффект обнаружен в фиксации через 2,5 часа после действия безусловного раздражителя. Митотический индекс в опыте значительно выше, чем в облученном контроле, разницы в проценте хромосомных перестроек не наблюдается. Митотический индекс

Таблица 1

Действие условного, безусловного и дифференцировочного раздражителей на митотический индекс в эпителии роговицы у мышей линий СС57BR и СС57W

№ фиксации	Вид воздействия	$X \pm m$ для общего числа делений, %*	P
Серия I, линия СС57BR			
1	Без воздействия	$\frac{2,7 \pm 0,02}{2,6 \pm 0,01}$	>0,05
2	Безусловный раздражитель	$\frac{1,7 \pm 0,01}{3,0 \pm 0,02}$	<0,01
3	Положит. раздражитель	$\frac{1,0 \pm 0,04}{1,7 \pm 0,07}$	<0,01
4	Отрицат. раздражитель	$\frac{1,9 \pm 0,07}{2,0 \pm 0,08}$	>0,05
5	Положит. раздражитель	$\frac{1,5 \pm 0,07}{1,9 \pm 0,08}$	<0,01
Серия II, линия СС57W			
3	Положит. раздражитель	$\frac{1,3 \pm 0,02}{1,7 \pm 0,06}$	<0,01
4	Отрицат. раздражитель	$\frac{1,4 \pm 0,04}{1,4 \pm 0,05}$	>0,05
5	Положит. раздражитель	$\frac{1,3 \pm 0,06}{2,2 \pm 0,04}$	<0,01
6	„ раздражитель	$\frac{2,1 \pm 0,04}{2,6 \pm 0,05}$	<0,01

* В числителе — данные опыта; в знаменателе — контроль.

Таблица 2

Действие X-лучей и безусловного раздражителя на митотический индекс и частоту хромосомных перестроек в роговице у мышей линии СС57W

№ фиксации	Время фиксации	Вид воздействия	$X \pm m$ для общего числа делений, %	P	$X \pm m$ для перестроек, %	P
1	Сразу после безусл. раз- дражителя	Облучение + безусловн. раздражитель	$0,15 \pm 0,02$	>0,01	$8,8 \pm 3,45$	>0,01
		Облучение	$0,17 \pm 0,02$	<0,01	$10,0 \pm 3,00$	>0,01
		Контроль	$1,65 \pm 0,032$	<0,01	$0,53 \pm 0,04$	<0,01
2	Через 2,5 часа	Облучение + безусловн. раздражитель	$0,49 \pm 0,014$	<0,01	$2,0 \pm 0,29$	>0,01
		Облучение	$0,89 \pm 0,170$	<0,01	$1,6 \pm 0,33$	<0,01
		Контроль	$1,53 \pm 0,028$	<0,01	$0,53 \pm 0,02$	<0,01
3	Через 22 часа	Облучение + безусловн. раздражитель	$0,96 \pm 0,017$	>0,01	$12,2 \pm 0,65$	<0,01
		Облучение	$0,97 \pm 0,017$	<0,01	$15,2 \pm 0,70$	<0,01
		Контроль	$2,3 \pm 0,035$	<0,01	$0,53 \pm 0,04$	<0,01

необлученных животных достоверно более высокий, чем в опытной и контрольном (облученном) варианте.

Аналогичные результаты получены в варианте, где после облучения давался условный раздражитель (3-я фиксация). Частота хромосомных перестроек в опыте достоверно ниже, чем в облученном контроле, митотический индекс одинаков (табл. 4) во всех трех случаях. В опыте, где не производилась выработка условного рефлекса при действии безусловного раздражителя (электрического тока) после облучения, эффект аналогичен результату с выработанным рефлексом (табл. 5). А при даче сине-зеленого света после облучения частота уценных хромосомных перестроек одинакова в опытной и контрольной

Таблица 4
Действие X-лучей и электрического тока на митотический индекс и частоту хромосомных перестроек в роговице у мышей линии СС57W

Вид воздействия	$X \pm m$ для общего числа делений, %	P	$X \pm m$ для перестроек, %	P
Облучение + безуслов. раз- дражитель	$1,31 \pm 0,023$	$> 0,05$	$11,8 \pm 0,58$	$< 0,05$
Облучение	$1,30 \pm 0,023$	$< 0,05$	$14,8 \pm 0,70$	$< 0,01$
Контроль	$1,69 \pm 0,034$		$0,53 \pm 0,02$	

Таблица 5
Действие X-лучей и сине-зеленого света на митотический индекс и частоту хромосомных перестроек в роговице у мышей линии СС57W

Вид воздействия	$X \pm m$ для общего числа делений, %	P	$X \pm m$ для перестроек, %	P
Облучение + сине-зеленый свет	$0,79 \pm 0,100$	$> 0,05$	$10,26 \pm 0,510$	$> 0,05$
Облучение	$0,74 \pm 0,114$	$< 0,05$	$9,89 \pm 0,530$	$< 0,01$
Контроль	$1,18 \pm 0,114$	$< 0,05$	$0,53 \pm 0,020$	

(облученном) вариантах (3-я фиксация). И в том и в другом случае митотический индекс ниже по сравнению с контролем, что связано с действием облучения.

Каков механизм, вызывающий изменение уровня клеточной пролиферации и частоты возникновения индуцированных хромосомных аберраций? Известно, что в большинстве тканей млекопитающих начало синтеза ДНК всегда определяет обязательное вступление клеток в митоз. Регуляция клеточного деления сводится к регуляции начала синтеза ДНК. Какие же факторы регулируют деление клеток? Целый ряд авторов (Bullough, Laurence, 1961; Франкфурт, 1968а, б) указывают на роль в этом процессе гормонов. Немаловажная роль принадлежит адреналину. Адреналин может повышать уровень митотической активности (Bullough, 1969), но при совместном его действии с ингибитором митоза (в работе Баллоу таким ингибитором является челоп, выделенный из кожи), в момент когда адреналин усиленно поступает в кровь происходит снижение уровня пролиферации.

В наших экспериментах изменение функционального состояния нервной системы вызывает, вероятно, изменение функциональной активности гормональной системы, что в свою очередь сказывается на клеточной пролиферации, т. е. регуляция процесса клеточного деления осу-

шестьляется рефлекторным путем, находится под контролем центральной нервной системы. Регуляция обеспечивается, вероятно, действием не одного какого-либо гормона, а комплексом. Так, Франкфурт (1968а), изучая влияние гормонов надпочечников на переход в фазу синтеза ДНК клеток многослойного ороговевающего эпителия поджелудка мышей (при введении гормонов внутривбрюшинно), нашел, что введение адреналина стимулирует вступление клеток в митоз, а гидрокортизон тормозит. Но имеются определенные критические точки, в которых чувствительность клеток к ингибирующим факторам утрачивается.

О влиянии адреналового комплекса на уровень радиочувствительности хромосом в роговице глаза у мышей говорят работы многих авторов, наиболее показательны данные Ю. Я. Керкиса и В. В. Логвиновой (1963) с адреналэктомией. Роль адреналина, вырабатываемого в повышенном количестве корой надпочечников в момент стрессорного раздражения нервной системы, вероятно, велика. Велкин и Брикман (цит. Керкис, Логвинова, 1963) указывают на тот факт, что действие рентгена само по себе вызывает усиленную функцию надпочечников, поэтому авторы рассматривают адреналин как естественный хемопротектор.

Действие малых доз облучения вызывает достоверное понижение митотического индекса у облученных животных по сравнению с контрольными. Это связано с тем, что облучение вызывает блок всех фаз митотического цикла. По данным М. Г. Чумак (1963, 1964), митотическая активность после действия облучения быстро падает до нуля за счет блока G_2-M , дальнейшее снижение уровня клеточного деления происходит за счет блока S и G_1 стадий. Снятие блока идет в противоположной последовательности.

Дача безусловного раздражителя после облучения в нашем случае вызвала, вероятно, дополнительную блокировку фаз митоза, что выразилось в достоверном снижении митотического индекса (спустя 2 часа после действия раздражителя) у опытных животных по сравнению с животными, только облученными. Частота возникновения хромосомных перестроек связана, вероятно, с уровнем клеточного деления (Керкис, Роничевская, 1961), снижение которого может уменьшить ее путем удлинения интеркинеза.

Эффект снижения числа хромосомных перестроек в наших опытах наблюдается через 24 часа после облучения, т. е. спустя 22 часа после дачи безусловного раздражителя. Возможно, это связано с тем, что при действии безусловного раздражителя изменяется концентрация гормонов в крови, что вызывает дополнительный блок всех стадий митоза, удлиняет интеркинез и создаст таким путем благоприятные условия для репарации потенциальных разрывов. Аналогичное снижение уровня хромосомных перестроек в варианте с действием условного раздражителя после облучения свидетельствует о том, что регуляция клеточных процессов носит рефлекторный характер. Постановка многоклеточных опытов, где широко использовались животные, у которых не вырабатывали условный рефлекс, дала возможность подтвердить роль нервной системы в регуляции процесса протекания митоза. Действие электрического тока после облучения вызвало через 22 часа уменьшение числа хромосомных перестроек по сравнению с контролем (облученным), как и в случае условного и безусловного раздражителя у животных с выработанным рефлексом. Дача синего-зеленого света такого эффекта не вызвала.

Таким образом, процесс клеточного деления, а вместе с тем и возникновение индуцированных хромосомных aberrаций находится под контролем центральной нервной системы, который осуществляется рефлекторным путем.

ВЫВОДЫ

1. Регуляция процессов клеточного деления находится под контролем центральной нервной системы.

2. Действие условного раздражителя после выработки положительного рефлекса вызывает понижение митотического индекса в эпителии роговицы мышей.

3. Действие условного и безусловного раздражителя спустя 2,5 часа после облучения мышей X-лучами вызывает снижение уровня индуцированных хромосомных перестроек (в фиксации через 24 часа после облучения).

Summary

It is well known that the influence of stress factors on mitosis occurs by means of reactive inhibition of the beginning of cell division. This inhibition is reflective in its nature.

The role of central nervous system in the regulation of cell division process as well as radiosensitivity of chromosomes is considered in the article. The study is performed with the males of CC57W stock of mice using the method of conditioned reflex. The effect of each of combined stimuli (conditioned and unconditioned) has been studied and punishment stimulation has been included into stereotype.

Both conditioned and unconditioned stimuli after the formation of conditioned reflex (after 63 combinations) determine significant decrease of mitotic index in corneal epithelium. Punishment stimulation (in 142 combinations) did not give such an effect. Conditioned and unconditioned stimuli applied in two hours after irradiation of an experimental animal with X-rays (100 r) caused the decrease of the level of chromosomal aberrations in cells fixed in 24 hour after irradiation.

It is suggested that cell division process and the formation of induced chromosomal aberrations are under control of central nervous system.

ЛИТЕРАТУРА

- Алов И. А. 1964. Очерки физиологии митотического деления. М.
Алов И. А., Г. Я. Павленко и М. В. Сухинина. 1955. Бюлл. эксперим. биол. и мед., **39**, 4: 63—65.
Еремеев Н. С. 1957. Бюлл. эксперим. биол. и мед., **6**, 82—85.
Жинкин Л. Н. и Л. И. Чекулаева. 1955. Ежегодник Ин-та эксперим. мед.: 376—380.
Керкис Ю. Я. и Г. М. Роничевская. 1961. Радиобиология, **1**, 4: 527—534.
Керкис Ю. Я. и В. В. Логвинова. 1963. ДАН СССР, **152**, 4: 992—994.
Козлов В. В. 1954. Автореф. канд. дисс. Л.
Логвинова Б. В. и Ю. Я. Керкис. 1967. Генетика, **7**: 43—50.
О. Чжен. 1954. ДАН СССР, **99**, 6: 1111—1115.
О. Чжен. 1955. Автореф. канд. дисс. Л.,
Полянская Г. Г. и Р. И. Цапыгина. 1968. Вестник ЛГУ, **21**.
Полянская Г. Г. 1969. Цитология, **11**: 888—891.
Суворова Л. В. 1956. ДАН СССР, **110**, 1: 149—152.
Суворова Л. В. 1956. ДАН СССР, **110**, 2: 293—296.
Уткин И. А., Л. П. Косиченко. 1956. Бюлл. эксперим. биол. и мед., **XVI**: 65—71.
Франкфурт О. С. 1968а. ДАН СССР, **180**, 1: 251—253.
Франкфурт О. С. 1968б. ДАН СССР, **180**, 2: 505—507.
Чумак М. Г. 1963. Радиобиология, **3**, 6: 866—874.
Чумак М. Г. 1964. ДАН СССР, **159**, 5: 1144—1147.
Bullough W. S. J. 1952. Endocrinol., **8**, 3: 265—274.
Bullough W. S. Laurence. 1961. Proc. Roy. Soc.
Bullough W. S. 1969. J. Sci., **5**, 4: 71—76.
Blumenfeld C. M. 1958. Anat. Res., **72**, 4: 438—443.
Fridenwald S. S., W. Buschke. 1944. Amer. J. Physiol., **141**, 5: 689—694.
-