

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ АЗОТИСТОГО ИПРИТА (HN_2) И γ -ЛУЧЕЙ НА СУХИЕ СЕМЕНА *CREPIS CAPILLARIS* L.

В настоящее время многочисленные факты показывают возможность модифицирования процессов, ведущих к появлению мутаций. Такими модифицирующими факторами, оказывающими глубокое влияние на мутационный процесс при их воздействии как до, так и после мутагенного агента, являются различные изменения физиологических, химических и физических условий в клетке.

Исходным пунктом для появления мутаций служит возникновение в хромосомах первичных потенциальных изменений при действии как физических и химических мутагенов, так и различных модификаторов. Эти потенциальные изменения реализуются в мутации после прохождения ряда сложных многоступенчатых обратимых процессов.

В процессе цитогенетического изучения одного из вариантов совместного действия γ -квантов и этиленimina [4] выяснено, что предварительная обработка этиленимином снижает число aberrаций хромосом по сравнению с тем, которое должно было бы возникнуть в результате простого суммирования эффекта мутагенов.

Комбинированное действие алкилирующих агентов и γ -лучей по одним данным [6] приводит к сверхаддитивному эффекту, тогда как в других исследованиях [1—5, 7—11] количество индуцированных aberrаций ниже суммарного.

Поэтому перед нами была поставлена задача изучить совместное действие разного рода мутагенных факторов, что представляет не только большой теоретический интерес, но и позволяет вскрыть новые стороны механизма действия каждого мутагена, а также вносит значительный вклад в решение проблемы управления индуцированным мутагенезом.

Вышеизложенное позволяет допустить, что потенциальные изменения, возникающие при действии X-лучей и алкилирующих агентов, включают различные типы повреждений, общим для которых является лишь необходимость дополнительного воздействия для их реализации. В качестве этого воздействия могут выступать различные модификации, в том числе и временной фактор.

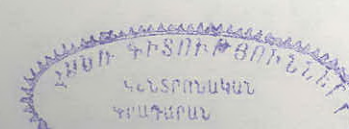
Вследствие этого стало необходимо изучить характер взаимодействия, вызываемого как алкилирующим мутагеном—азотистым ипритом (HN_2) и γ -облучением в отдельности, так и при их совместном действии.

Сухие семена *C. capillaris* с абсолютной влажностью 5,2% облучали γ -квантами Cs^{137} в дозе 15 кр (мощность дозы 620 р/мин) на установке Института биофизики АН СССР. Тотчас после облучения семена в течение 2 час обрабатывались раствором $3 \cdot 10^{-4}$ М HN_2 , затем промывались водопроводной водой 30 мин, высушивались и хранились в

Таблица 1

Влияние хранения на уровень мутабельности хромосом и спектр структурных мутаций при комбинированном действии γ -облучения и азотистого иприта (HN_2) на сухие семена

Число изученных корешков	Всего просмо- ренных метафаз	Метафазы с абер- рациями		Количество абер- раций		Типы перестроек, % от их суммы														
						Хроматидные														
		число	%	число	%	изохро- матид- ные де- лени с не- слиянием	микрофраг- менты	изохро- матид- ные де- лени с сли- нием	хроматид- ные делени	Транслокации		трирадиалы	дупликации делени и интерстени- альные де- лени	всего	Хромосомные					
										асимметрич- ные	симметрич- ные				асимметрич- ные	симметрич- ные	кольца	инверсии	всего	
52	6572	10	0,15±0,04	10	0,15±0,04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
37	1190	531	44,6±1,44	643	54,0±1,44	0,6±0,3	1,9±0,54	31,6±1,83	4,0±0,77	11,5±1,26	0,6±0,30	1,4±0,46	8,2±1,09	57,0±1,95	23,4±1,67	15,1±1,41	1,2±0,43	0,9±0,38	40,7±1,9	
14	859	440	51,3±1,70	479	55,8±1,70	1,5±0,56	0,8±0,42	36,8±2,20	5,2±1,01	16,7±1,70	0,6±0,36	0,6±0,36	4,8±2,18	64,8±2,18	19,6±1,81	11,9±1,48	0,4±0,30	1,0±0,45	32,9±2,15	
12	842	351	41,7±1,70	458	54,8±1,72	1,1±0,50	0,2±0,20	35,4±2,24	4,4±0,96	22,3±1,96	1,3±0,53	1,1±0,32	5,2±1,04	69,7±2,14	14,0±1,62	12,7±1,55	1,3±0,53	1,1±0,50	29,0±2,12	
11	479	235	49,2±2,28	264	55,2±2,27	0,8±0,55	1,9±0,84	36,8±2,97	7,2±1,59	21,6±2,54	1,5±0,75	1,5±0,75	7,6±1,63	79,2±2,62	11,0±1,92	7,6±1,63	2,7±1,00	—	21,3±2,52	
14	764	278	36,4±1,74	316	41,4±1,78	1,3±0,64	0,6±0,45	31,0±2,60	6,0±1,34	8,2±1,55	1,0±0,56	1,0±0,56	4,8±1,21	52,0±2,81	23,8±2,40	18,4±2,20	3,5±1,03	0,6±0,45	46,2±2,80	
12	681	315	46,3±1,91	367	54,0±0,93	3,3±0,93	—	34,4±1,7	11,2±1,65	15,8±1,90	1,9±0,71	1,1±0,54	1,4±0,61	66,0±2,47	15,8±1,90	10,3±1,59	3,8±1,00	1,1±0,55	31,2±2,42	



банках над гранулированным КОН, что обеспечивало минимальную и постоянную влажность семян. После высушивания часть семян проращивалась без хранения. Остальные семена проращивались через различные интервалы времени (1, 7, 15, 30 и 60 дней). При каждом сроке хранения семена проращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 0,01%-ным колхицином, при 25°C. Фиксация производилась при длине проростков 1,0—1,5 мм, затем продолжали фиксировать корешки до исчезновения диплоидных клеток. В качестве фиксатора был использован ацетозанол (1:3). Учет аберраций хромосом производился в метафазе. При комбинированном действии двух мутагенов контролем служили только семена, облученные γ -квантами в дозе 15 кр и только обработанные HN_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ с теми же сроками хранения; проращивание и фиксация контрольных семян производились так же, как описано в варианте совместного действия.

В другом варианте опыта по исследованию комбинированного действия сухие семена обрабатывались HN_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$, влажные семена (27,6%) облучались γ -квантами Cs^{137} в дозе 5 кр (мощность дозы 620 р/мин). Часть семян проращивалась сразу после действия двух мутагенов. Остальная часть семян хранилась в банках над гранулированным КОН и проращивалась в те же сроки (1, 7, 15, 30 и 60 дней). Для каждого срока хранения семена проращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 0,1%-ным раствором колхицина, в термостате при 25°C. Фиксировались проростки длиной 1,0—1,5 мм, затем фиксацию продолжали до исчезновения диплоидных клеток.

Для этого варианта опыта совместного действия (HN_2 и γ -облучения) в качестве контроля было произведено γ -облучение влажных (предварительно замоченных в течение 2 час в воде) семян, дозой 5 кр.

Хранение и проращивание производилось так же, как в опыте с комбинированным действием.

Уровень естественного мутирования хромосом в первой серии опытов по анализу действия мутагенов без хранения, проводившихся на свежих семенах *C. capillaris* урожая 1967 г., составил $0,16 \pm 0,11\%$. Все перестройки были хроматидного типа (табл. 1).

Всего было просмотрено 6572 метафазы, из них измененными были 10. Таким образом, средний уровень мутирования составлял $0,15 \pm 0,04\%$. На всех сроках хранения аберрации в основном были хроматидного типа (табл. 1). Основными типами нарушений были хроматидные делеции [6], изохроматидные делеции [3] и асимметричная хроматидная транслокация [1].

При комбинированном воздействии компонентами совместного действия были HN_2 и γ -кванты. Рассмотрим результаты воздействия каждого мутагенного фактора в отдельности в условиях хранения семян.

На рис. 1 показана кривая уровня мутирования клеток при действии HN_2 на сухие семена. Как видно из рисунка, отмечается нарастание уровня мутирования на 7-ой день после обработки, на 30-ый день наблюдается резкий спад, на 60-ый день уровень мутабельности вновь повышается. При действии HN_2 на сухие семена аберрации хромосом были почти исключительно хроматидного типа (табл. 2), а хромосомные встречались очень редко (0,2—0,4%) и не на всех сроках хранения. В табл. 2 представлена абсолютная частота хроматидных и хромосомных аберраций (из общего количества просмотренных метафаз).

При действии γ -лучей на сухие семена *C. capillaris* (рис. 1) после облучения уровень мутирования клеток наименьший. По мере

Таблица 2

Сравнение хромосомных и хроматидных aberrаций при действии HN_2 , γ -облучения и их комбинации на сухие семена *Crepis capillaris* D. (с хранением)

Дни хранения	HN ₂					γ-облучение					Комбинированное действие γ-облучения и HN ₂				
	Всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации		Всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации		всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации	
		число	% *	число	%		число	%	число	%		число	%	число	%
0	680	217	32,0±1,79	1	0,15±0,15	678	3	0,4±0,24	193	28,5±1,73	1190	366	31,0±1,14	261	22,0±1,20
1	648	323	49,9±1,96	—	—	638	1	0,2±0,16	273	42,8±1,96	859	310	36,1±1,64	158	18,4±1,32
7	452	249	55,2±2,34	2	0,4±0,30	451	1	0,4±0,31	295	65,4±2,24	842	319	37,9±1,67	133	15,8±1,26
15	479	237	49,5±2,28	—	—	611	—	—	442	72,4±1,81	479	201	42,0±2,25	56	11,7±1,47
30	564	155	27,5±1,88	1	0,2±0,19	517	1	0,2±0,19	348	67,3±2,06	764	164	21,4±1,48	146	19,1±1,42
60	584	301	51,5±2,06	—	—	433	—	—	341	78,8±1,69	681	241	35,4±1,83	114	16,8±1,43

* Процент вычислен по отношению к общему количеству просмотренных метафаз.

Влияние хранения на уровень мутабельности и спектр структурных мутаций хромосом при комбинированном действии азотистого иприта (HN_2) и γ -облучения на сухие семена *Crepis capillaris* L.

Типы перестроек, % от суммы																				
Время хранения	Число изученных корешков	Всего просмотренных метафаз	Метафазы с абберациями		Количество аббераций		Хроматидные									Хромосомные				
			число	%	число	%	изохроматидные делеции с неслиянием	микрофрагменты	изохроматидные делеции с слиянием	хроматидные делеции	Транслокации		трирадиалы	дупликации делеции и интерстициальные делеции	всего	асимметричные	симметричные	кольца	инверсии	всего
											асимметричные	симметричные								
0	10	508	343	67,5±2,08	375	73,8±1,95	0,8±0,46	—	44,8±2,56	3,2±0,91	14,7±1,83	1,1±0,54	1,3±0,58	5,3±1,16	70,5±2,36	15,5±1,87	10,7±1,60	2,1±0,75	0,5±0,36	28,8±2,0
1	13	773	352	45,6±1,79	403	52,2±1,80	1,5±0,60	0,5±0,36	40,1±2,44	7,7±1,33	16,9±1,92	1,2±0,54	1,0±0,45	3,2±0,88	70,3±2,27	17,2±1,87	9,9±1,40	0,5±0,34	0,2±0,25	27,8±2,0
7	15	769	263	34,2±1,71	324	42,2±1,78	3,4±1,00	2,2±0,81	35,3±2,66	1,5±0,67	13,6±1,90	—	1,2±0,60	3,7±1,05	55,3±2,76	23,8±2,36	11,1±1,74	3,1±0,96	1,2±0,60	39,2±2,0
15	12	642	364	56,7±1,95	389	60,7±1,93	1,5±0,61	1,0±0,45	40,6±2,48	3,6±0,89	12,3±1,67	1,3±0,55	2,6±0,81	5,9±1,20	66,5±2,40	18,0±1,94	12,1±1,65	0,2±0,20	0,7±0,45	31,0±2,0
30	12	533	264	49,3±2,16	273	51,0±2,16	1,8±0,81	1,5±0,73	39,6±0,94	5,9±1,42	14,7±2,14	1,5±0,73	1,8±0,81	4,4±1,24	67,8±2,82	16,1±2,22	9,5±1,77	2,2±0,89	1,1±0,63	29,0±2,0
60	12	699	306	43,8±1,87	341	48,8±1,89	2,3±0,81	0,3±0,30	41,4±2,63	20,0±2,16	15,5±1,96	0,3±0,30	0,6±0,41	2,6±0,86	80,4±2,14	10,6±1,66	4,7±1,14	1,2±0,59	0,6±0,41	17,0±2,0

удлинения времени хранения уровень мутабельности нарастает и доходит до максимума на 60-ый день.

Данные табл. 2 показывают, что при действии γ -лучей на сухие семена возникают исключительно хромосомные aberrации. Количество

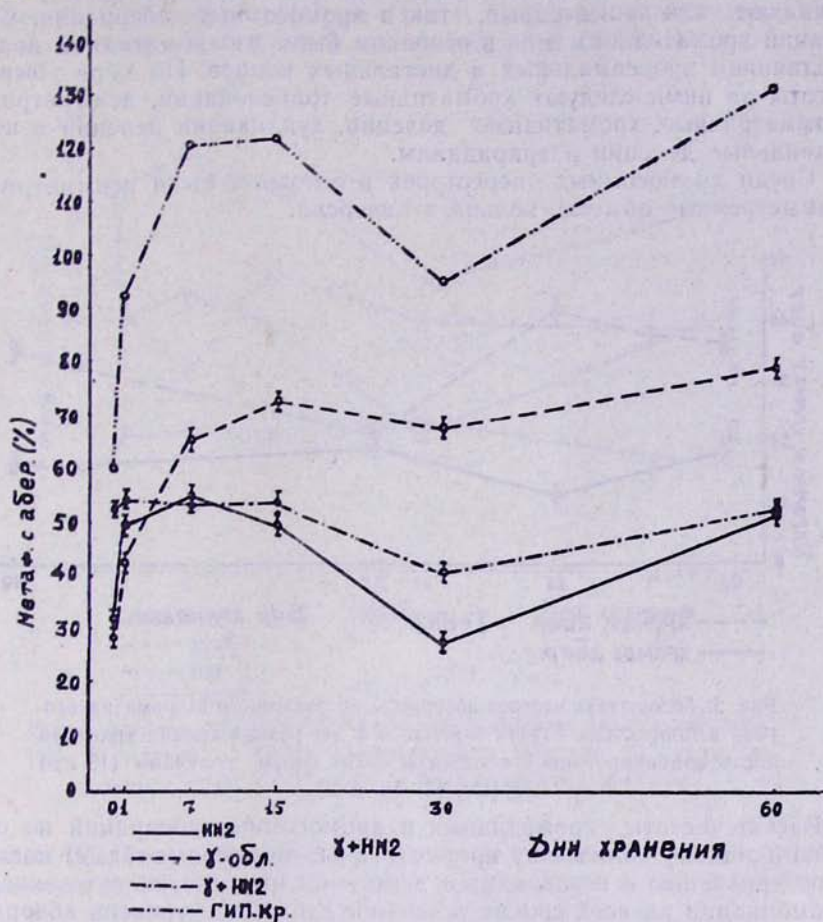


Рис. 1. Уровень мутирования клеток при комбинированном действии γ -лучей и HN_2 , а также их независимое действие на сухие семена *Crepis capillaris* L. с последующим хранением.

хроматидных aberrаций находится на уровне естественного мутирования клеток.

При комбинированном воздействии на сухие семена *C. capillaris* двумя мутагенами— γ -лучами в дозе 15 кр и азотистым ипритом (HN_2) уровень мутирования клеток в 1,5—2 раза ниже суммарного количества aberrантных клеток, наблюдаемых при независимом действии каждого из мутагенов.

Кривая мутабельности хромосом (рис. 1) при комбинированном действии этих двух мутагенных факторов имеет волнообразный характер.

При проращивании обработанных семян без хранения уровень мутирования клеток составлял $44,6 \pm 1,44\%$, а через день наблюдался максимальный уровень aberrации хромосом. На 7-ой день уровень мутабельности достоверно снижается ($t=3,0$).

Второй пик мутирования наблюдается на 1-ый день, а на 30-ый день хранения уровень мутабельности вновь снижается. На 60-ый день наблюдается третий достоверный подъем мутабельности ($t=3,8$).

Данные табл. 1 показывают, что при комбинации двух мутагенов возникают как хроматидные, так и хромосомные aberrации. Среди мутаций хроматидного типа в основном были изохроматидные делеции со слиянием проксимальных и дистальных концов. По мере убывания частоты за ними следуют хроматидные транслокации, асимметричные и симметричные, хроматидные делеции, дубликации делеции и интерстициальные делеции и триадалялы.

Среди хромосомных перестроек в основном были асимметричные и симметричные обмены, кольца и инверсии.

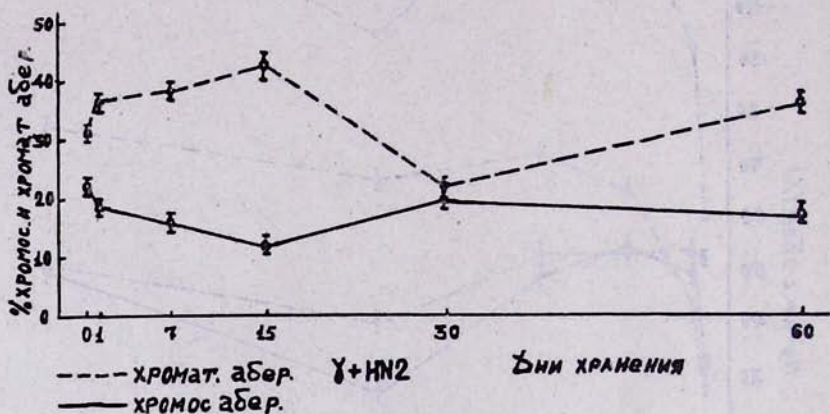


Рис. 2. Абсолютная частота aberrаций хромосомного и хроматидного типа в проростках *Crepis capillaris* L. на разных сроках хранения после комбинированной обработки сухих семян γ -лучами (15 кр) и HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М).

Расчет частоты хроматидных и хромосомных aberrаций по отношению к общему количеству просмотренных метафаз (табл. 2) показал, что по сравнению с независимым действием каждого из мутагенов при их комбинации на всех сроках хранения снижается уровень aberrаций обоих типов.

На рис. 2 представлены кривые абсолютной частоты хромосомных и хроматидных aberrаций при совместном действии γ -облучения и HN_2 на разных сроках хранения.

В другом варианте опыта, когда семена предварительно обрабатывались HN_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М и влажные семена облучались γ -лучами в дозе 5 кр, картина мутабельности отличалась.

Кривая выхода хромосомных aberrаций при облучении влажных семян и последующем хранении представлена на рис. 3. Как видно из рисунка, количество мутаций хромосом незначительно повышается по мере хранения семян после облучения, достигая максимума к 30-му дню, а затем падает. На 60-ый день уровень мутабельности ниже исходного (в семенах, проращиваемых без хранения).

Данные табл. 4 показывают, что при действии γ -лучей (5 кр) на влажные семена возникают исключительно хромосомные aberrации, как при облучении сухих семян. Количество хроматидных aberrаций находится на уровне естественного мутирования клеток.

В табл. 3 представлены данные комбинированного действия HN_2 с последующим γ -облучением влажных семян. Уровень мутирования 98

Эплеток сразу после действия двух мутагенов выше ($t=8,0$), а при вращении—ниже аддитивного при независимом действии каждого из мутагенных факторов в отдельности (рис. 3). Анализ кривой мутирования хромосом в этих опытах показывает, что максимум мутантных эплетов наблюдается при проращивании семени тотчас после второго воздействия. В последующие дни (1 и 7 дней хранения) уровень мутабельности снижается. Второй пик приходится на 15-ый день хранения.

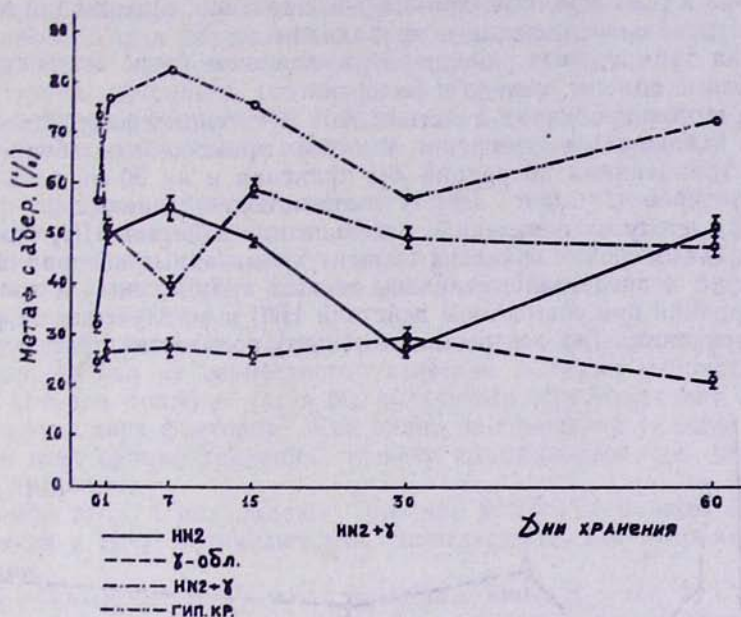


Рис. 3. Уровень мутирования клеток при комбинированном действии HN_2 и γ -лучей, а также их независимое действие на сухие семена *Crepis capillaris* L. с последующим хранением.

Таблица 4

Сравнение абсолютного соотношения хромосомных и хроматидных aberrаций при независимом γ -облучении влажных семян *Crepis capillaris* L. (с хранением) и при предварительной обработке HN_2

Дни хранения	γ -облучение					Комбинированное действие HN_2 и γ -облучения				
	всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации		всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации	
		число	%*	число	%		число	%	число	%
0	664	1	$0,15 \pm 0,15$	168	$24,6 \pm 1,67$	508	264	$52,0 \pm 2,22$	108	$21,3 \pm 1,81$
1	565	1	$0,2 \pm 0,18$	151	$26,8 \pm 1,87$	773	283	$36,6 \pm 1,73$	112	$14,5 \pm 1,26$
7	575	2	$0,2 \pm 0,18$	157	$27,4 \pm 1,86$	769	179	$23,3 \pm 1,52$	127	$16,5 \pm 1,33$
15	610	2	$0,3 \pm 0,20$	159	$26,0 \pm 1,77$	642	258	$40,2 \pm 1,93$	121	$18,9 \pm 1,55$
30	637	—	—	189	$29,8 \pm 1,81$	536	185	$34,6 \pm 2,06$	79	$14,8 \pm 1,53$
60	606	1	$0,2 \pm 0,18$	128	$21,2 \pm 1,66$	699	274	$39,2 \pm 1,84$	58	$8,3 \pm 1,04$

* Процент вычислен по отношению к общему количеству просмотренных метафаз.

Второй пик мутирования наблюдается на 1-ый день, а на 30-ый день хранения уровень мутабельности вновь снижается. На 60-ый день наблюдается третий достоверный подъем мутабельности ($t=3,8$).

Данные табл. 1 показывают, что при комбинации двух мутагенов возникают как хроматидные, так и хромосомные aberrации. Среди мутаций хроматидного типа в основном были изохроматидные делеции со слиянием проксимальных и дистальных концов. По мере убывания частоты за ними следуют хроматидные транслокации, асимметричные и симметричные, хроматидные делеции, дупликации делеции и интерстициальные делеции и трирадиалы.

Среди хромосомных перестроек в основном были асимметричные и симметричные обмены, кольца и инверсии.

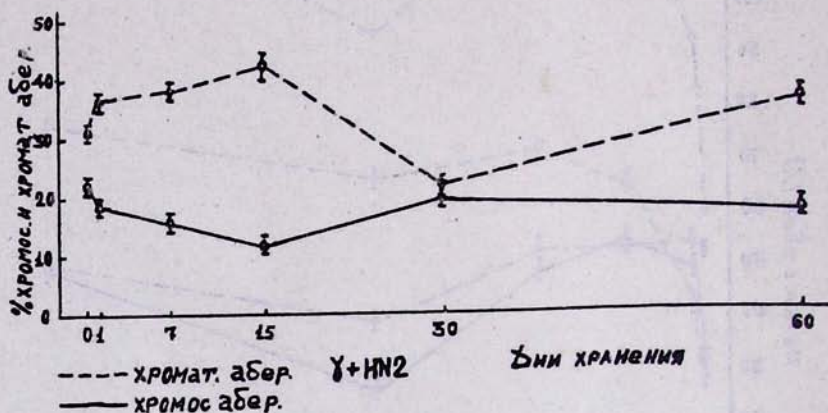


Рис. 2. Абсолютная частота aberrаций хромосомного и хроматидного типа в проростках *Crepis capillaris* L. на разных сроках хранения после комбинированной обработки сухих семян γ -лучами (15 кр) и HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М).

Расчет частоты хроматидных и хромосомных aberrаций по отношению к общему количеству просмотренных метафаз (табл. 2) показал, что по сравнению с независимым действием каждого из мутагенов при их комбинации на всех сроках хранения снижается уровень aberrаций обоих типов.

На рис. 2 представлены кривые абсолютной частоты хромосомных и хроматидных aberrаций при совместном действии γ -облучения и HN_2 на разных сроках хранения.

В другом варианте опыта, когда семена предварительно обрабатывались HN_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М и влажные семена облучались γ -лучами в дозе 5 кр, картина мутабельности отличалась.

Кривая выхода хромосомных aberrаций при облучении влажных семян и последующем хранении представлена на рис. 3. Как видно из рисунка, количество мутаций хромосом незначительно повышается по мере хранения семян после облучения, достигая максимума к 30-му дню, а затем падает. На 60-ый день уровень мутабельности ниже исходного (в семенах, проращиваемых без хранения).

Данные табл. 4 показывают, что при действии γ -лучей (5 кр) на влажные семена возникают исключительно хромосомные aberrации, как при облучении сухих семян. Количество хроматидных aberrаций находится на уровне естественного мутирования клеток.

В табл. 3 представлены данные комбинированного действия HN_2 с последующим γ -облучением влажных семян. Уровень мутирования

таеток сразу после действия двух мутагенов выше ($t=8,0$), а при взаимодействии—ниже аддитивного при независимом действии каждого из мутагенных факторов в отдельности (рис. 3). Анализ кривой мутирования хромосом в этих опытах показывает, что максимум мутантных таеток наблюдается при проращивании семени тотчас после второго воздействия. В последующие дни (1 и 7 дней хранения) уровень мутантности снижается. Второй пик приходится на 15-ый день хранения.

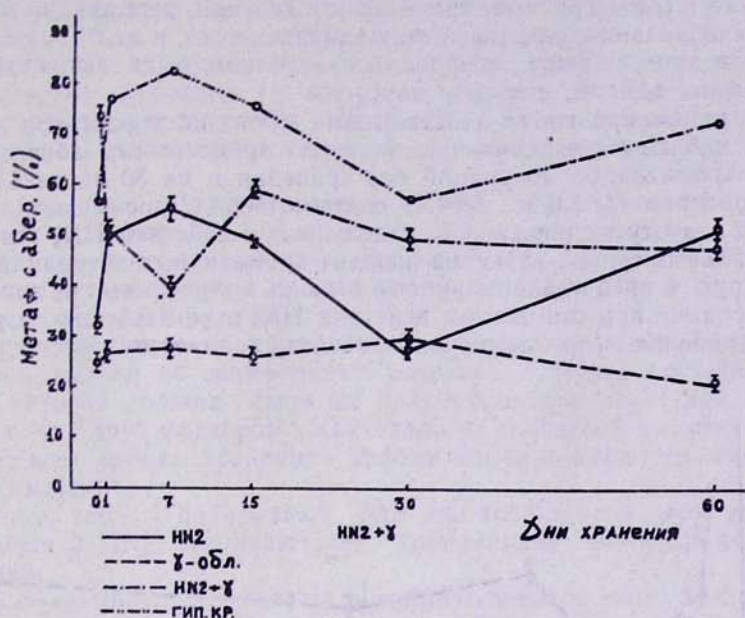


Рис. 3. Уровень мутирования клеток при комбинированном действии HN_2 и γ -лучей, а также их независимое действие на сухие семена *Crepis capillaris* L. с последующим хранением.

Таблица 4

Сравнение абсолютного соотношения хромосомных и хроматидных aberrаций при независимом γ -облучении влажных семян *Crepis capillaris* L. (с хранением) и при предварительной обработке HN_2

Дни хранения	γ -облучение					Комбинированное действие HN_2 и γ -облучения				
	всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации		всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации	
		число	% *	число	%		число	%	число	%
0	664	1	$0,15 \pm 0,15$	168	$24,6 \pm 1,67$	508	264	$52,0 \pm 2,22$	108	$21,3 \pm 1,81$
1	565	1	$0,2 \pm 0,18$	151	$26,8 \pm 1,87$	773	283	$36,6 \pm 1,73$	112	$14,5 \pm 1,26$
7	575	1	$0,2 \pm 0,18$	157	$27,4 \pm 1,86$	769	179	$23,3 \pm 1,52$	127	$16,5 \pm 1,33$
15	610	2	$0,3 \pm 0,20$	159	$26,0 \pm 1,77$	642	258	$40,2 \pm 1,93$	121	$18,9 \pm 1,55$
30	637	—	—	189	$29,8 \pm 1,81$	536	185	$34,6 \pm 2,06$	79	$14,8 \pm 1,53$
60	606	1	$0,2 \pm 0,18$	128	$21,2 \pm 1,66$	699	274	$39,2 \pm 1,84$	58	$8,3 \pm 1,04$

* Процент вычислен по отношению к общему количеству просмотренных метафаз.

ния, после чего (30 и 60 дней хранения) количество мутантных клеток вновь постепенно падает.

Спектр структурных мутаций хромосом (табл. 3) при комбинированном действии HN_2 и γ -облучения представлен хроматидными и хромосомными перестройками. Среди хроматидных aberrаций в основном были изохроматидные делеции со слиянием проксимальных и дистальных концов. За ними следуют хроматидные транслокации асимметричные и симметричные, хроматидные делеции, дупликации делеции и интерстициальные делеции и трирадиалы.

Среди хромосомных aberrаций в основном были асимметричные хромосомные обмены, кольца и инверсии.

При комбинированном действии этих мутагенных факторов на всех сроках наблюдается снижение частоты хромосомных aberrаций, а частота хроматидных aberrаций без хранения и на 30-ый день хранения достоверно ($t=7,0$ и $t=4,7$) соответственно превышает в этих условиях частоту их появления отдельно при действии HN_2 (табл. 2). При остальных сроках хранения процент хроматидных aberrаций ниже.

На рис. 4 представлены кривые выхода хромосомных и хроматидных aberrаций при совместном действии HN_2 и γ -облучения на разных сроках хранения (по отношению к общему количеству просмотренных метафаз).

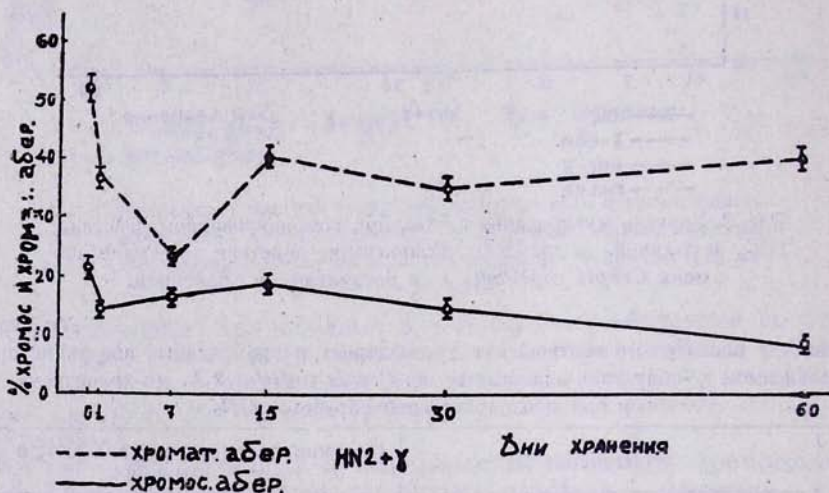


Рис. 4. Абсолютная частота aberrаций хромосомного и хроматидного типа в проростках *Crepis capillaris* L. на разных сроках хранения после комбинированной обработки сухих семян HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М) и последующего γ -облучения (5 кр) влажных семян.

Описанные результаты указывают на то, что HN_2 индуцирует мутагенное последствие, которое в условиях хранения после обработки семян имеет волнообразный характер (рис. 1). Такая картина мутагенного последствия согласуется с полученными ранее данными Дубинина и Дубининой [12], использовавших в своих опытах другие мутагены из класса алкилирующих соединений (этиленимин и триэтиленмеламин). Все эти данные позволяют сделать ряд выводов.

Прежде всего, они свидетельствуют об индукции в хромосомах, при контакте их с алкилирующим агентом, мутагенного последствия, в течение которого вероятность реализации потенциального повреждения

снижалась до минимума и вновь повышалась до максимального уровня. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что на протяжении этого срока сохраняется исходное количество потенциальных изменений. По нашему взгляду, эти факты могут свидетельствовать также и о том, что механизм потенциальных изменений обладает каким-то порогом, что ограничивает в конкретных обстоятельствах количество потенциальных изменений, которые могут быть реализованы.

Общая картина мутагенного последствия при облучении сухих семян дозой 15 кр и последующем хранении сводится к тому, что после увеличения интервала времени между обработкой и проращиванием количество аббераций (почти исключительно хромосомного типа) возрастает, к 15-му дню достигает максимума и затем с незначительными колебаниями держится на этом уровне еще, по крайней мере, в течение 60 дней.

В литературе имеются сведения о том, что в условиях хранения последствия возникают и при дозах облучения, которые настолько малы, что не дают начального радиационного эффекта [13, 14]. С помощью хранения можно достичь увеличения первичного радиационного эффекта в 3—5 раз [15].

На рис. 1 нанесены кривые независимого действия каждого из факторов, кривая их совместного действия, а также гипотетическая кривая, которая должна была бы получиться при отсутствии взаимодействия этих двух факторов. Как видно из сравнения указанных кривых, при всех сроках хранения эффект комбинированного облучения ниже суммарного.

Данные табл. 1 показывают, что при комбинированном действии облучения и HN_2 возникают как хроматидные, так и хромосомные абберации.

Как показывают результаты, представленные в табл. 2, снижение эффекта происходит за счет падения аббераций, как хромосомного, так и хроматидного типа.

Когда же и каким образом реализуется этот низесуммарный эффект? С одной стороны, возможно себе представить, что поскольку обработки следовали непосредственно одна за другой, часть индуцированных облучением долгоживущих активных радикалов могла прореагировать с проникающими в клетку алкильными радикалами. Кроме того оба примененных мутагенных фактора индуцируют в хромосомах сухих семян долгоживущие потенциальные изменения. Возможно, что в самих хромосомах существование различных премутационных повреждений индуцирует препятствия для их развития или реализации. Нельзя исключить и того, что препятствия эти не связаны с самим генетическим материалом, а обусловлены внутриклеточными условиями в целом.

Кривая мутабельности (рис. 1) при комбинированном действии в этом варианте имеет несколько более выраженный волнообразный характер, чем даже при независимом действии HN_2 . Прежде всего этот факт указывает на то, что из всех сделанных выше предположений относительно механизма взаимодействия наиболее вероятно то, что оно осуществляется на уровне потенциальных повреждений, поскольку волнообразность в уровне мутабельности вообще может быть обусловлена какими-то процессами. Процессы развития потенциальных повреждений в сухих семенах при совместном действии и процессы уменьшения числа мутаций при проращивании семян разных сроков хранения являются следствием закономерных изменений вероятностей перехода потенциальных повреждений, для которых вероятность перехода в мутации во времени волнообразно изменяется.

клеток сразу после действия двух мутагенов выше ($t=8,0$), а при хранении—ниже аддитивного при независимом действии каждого из мутагенных факторов в отдельности (рис. 3). Анализ кривой мутирования хромосом в этих опытах показывает, что максимум мутантных клеток наблюдается при проращивании семени тотчас после второго воздействия. В последующие дни (1 и 7 дней хранения) уровень мутабельности снижается. Второй пик приходится на 15-ый день хранения

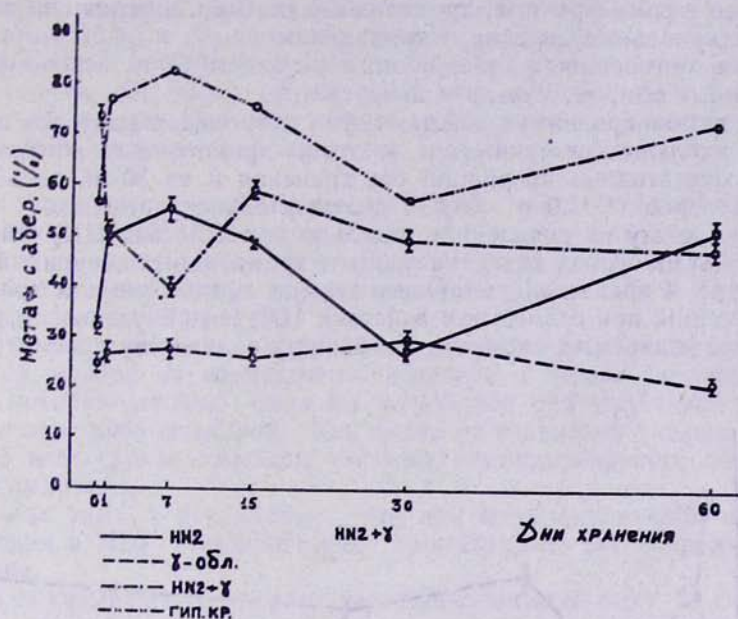


Рис. 3. Уровень мутирования клеток при комбинированном действии HN_2 и γ -лучей, а также их независимое действие на сухие семена *Crepis capillaris* L. с последующим хранением.

Таблица 4

Сравнение абсолютного соотношения хромосомных и хроматидных aberrаций при независимом γ -облучении влажных семян *Crepis capillaris* L. (с хранением) и при предварительной обработке HN_2

Дни хранения	γ -облучение					Комбинированное действие HN_2 и γ -облучения				
	всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации		всего просмотренных метафаз	хроматидные aberrации		хромосомные aberrации	
		число	% *	число	%		число	%	число	%
0	664	1	$0,15 \pm 0,15$	168	$24,6 \pm 1,67$	508	264	$52,0 \pm 2,22$	108	$21,3 \pm 1,81$
1	565	1	$0,2 \pm 0,18$	151	$26,8 \pm 1,87$	773	283	$36,6 \pm 1,73$	112	$14,5 \pm 1,26$
7	575	1	$0,2 \pm 0,18$	157	$27,4 \pm 1,86$	769	179	$23,3 \pm 1,52$	127	$16,5 \pm 1,33$
15	610	2	$0,3 \pm 0,20$	159	$26,0 \pm 1,77$	642	258	$40,2 \pm 1,93$	121	$18,9 \pm 1,55$
30	637	—	—	189	$29,8 \pm 1,81$	536	185	$34,6 \pm 2,06$	79	$14,8 \pm 1,53$
60	606	1	$0,2 \pm 0,18$	128	$21,2 \pm 1,66$	699	274	$39,2 \pm 1,84$	58	$8,3 \pm 1,04$

* Процент вычислен по отношению к общему количеству просмотренных метафаз.

ния, после чего (30 и 60 дней хранения) количество мутантных клеток вновь постепенно падает.

Спектр структурных мутаций хромосом (табл. 3) при комбинированном действии HN_2 и γ -облучения представлен хроматидными и хромосомными перестройками. Среди хроматидных aberrаций в основном были изохроматидные делеции со слиянием проксимальных и дистальных концов. За ними следуют хроматидные транслокации асимметричные и симметричные, хроматидные делеции, дубликации делеции и интерстициальные делеции и трирадиалы.

Среди хромосомных aberrаций в основном были асимметричные хромосомные обмены, кольца и инверсии.

При комбинированном действии этих мутагенных факторов на всех сроках наблюдается снижение частоты хромосомных aberrаций, а частота хроматидных aberrаций без хранения и на 30-ый день хранения достоверно ($t=7,0$ и $t=4,7$) соответственно превышает в этих условиях частоту их появления отдельно при действии HN_2 (табл. 2). При остальных сроках хранения процент хроматидных aberrаций ниже.

На рис. 4 представлены кривые выхода хромосомных и хроматидных aberrаций при совместном действии HN_2 и γ -облучения на разных сроках хранения (по отношению к общему количеству просмотренных метафаз).

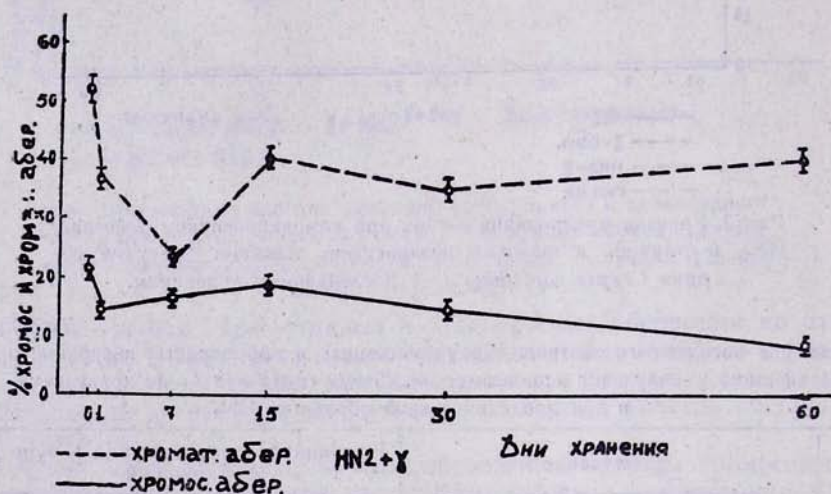


Рис. 4. Абсолютная частота aberrаций хромосомного и хроматидного типа в проростках *Crepis capillaris* L. на разных сроках хранения после комбинированной обработки сухих семян HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М) и последующего γ -облучения (5 кр) влажных семян.

Описанные результаты указывают на то, что HN_2 индуцирует мутагенное последствие, которое в условиях хранения после обработки семян имеет волнообразный характер (рис. 1). Такая картина мутагенного последствия согласуется с полученными ранее данными Дубинина и Дубининой [12], использовавших в своих опытах другие мутагены из класса алкилирующих соединений (этиленимин и триэтиленмеламин). Все эти данные позволяют сделать ряд выводов.

Прежде всего, они свидетельствуют об индукции в хромосомах, при контакте их с алкилирующим агентом, мутагенного последствия, в течение которого вероятность реализации потенциального повреждения

снижалась до минимума и вновь повышалась до максимального уровня. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что на протяжении всего срока сохраняется исходное количество потенциальных изменений. На наш взгляд, эти факты могут свидетельствовать также и о том, что механизм потенциальных изменений обладает каким-то порогом, что ограничивает в конкретных обстоятельствах количество потенциальных изменений, которые могут быть реализованы.

Общая картина мутагенного последствия при облучении сухих семян дозой 15 кр и последующем хранении сводится к тому, что по мере увеличения интервала времени между обработкой и проращиванием количество аберраций (почти исключительно хромосомного типа) растет, к 15-му дню достигает максимума и затем с незначительными колебаниями держится на этом уровне еще, по крайней мере, в течение 45 дней.

В литературе имеются сведения о том, что в условиях хранения последствия возникают и при дозах облучения, которые настолько малы, что не дают начального радиационного эффекта [13, 14]. С помощью хранения можно достичь увеличения первичного радиационного эффекта в 3—5 раз [15].

На рис. 1 нанесены кривые независимого действия каждого из мутагенов, кривая их совместного действия, а также гипотетическая кривая, которая должна была бы получиться при отсутствии взаимодействия этих двух факторов. Как видно из сравнения указанных кривых, при всех сроках хранения эффект комбинированного облучения ниже суммарного.

Данные табл. 1 показывают, что при комбинированном действии γ -облучения и HN_2 возникают как хроматидные, так и хромосомные аберрации.

Как показывают результаты, представленные в табл. 2, снижение эффекта происходит за счет падения аберраций, как хромосомного, так и хроматидного типа.

Когда же и каким образом реализуется этот низесуммарный эффект? С одной стороны, возможно себе представить, что поскольку обработки следовали непосредственно одна за другой, часть индуцированных облучением долгоживущих активных радикалов могла прореагировать с проникающими в клетку алкильными радикалами. Кроме того оба примененных мутагенных фактора индуцируют в хромосомах сухих семян долгоживущие потенциальные изменения. Возможно, что в самих хромосомах существование различных предмутационных повреждений индуцирует препятствия для их развития или реализации. Нельзя исключить и того, что препятствия эти не связаны с самим генетическим материалом, а обусловлены внутриклеточными условиями в целом.

Кривая мутабельности (рис. 1) при комбинированном действии в этом варианте имеет несколько более выраженный волнообразный характер, чем даже при независимом действии HN_2 . Прежде всего этот факт указывает на то, что из всех сделанных выше предположений относительно механизма взаимодействия наиболее вероятно то, что оно осуществляется на уровне потенциальных повреждений, поскольку волнообразность в уровне мутабельности вообще может быть обусловлена какими-то процессами. Процессы развития потенциальных поражений в сухих семенах при совместном действии и процессы уменьшения числа мутаций при прорастании семян разных сроков хранения являются следствием закономерных изменений вероятностей перехода потенциальных поражений, для которых вероятность перехода в мутации во времени волнообразно изменяется.

Причина закономерных изменений частоты перехода потенциальных изменений в мутации по мере прохождения времени при хранении семян остается неясной. Возможно, что здесь проявляется особенность в работе системы восстановления, которая при совместном действии максимально эффективна в семенах при хранении, либо максимально поражена и не принимает эффективного участия в стабилизации мутаций, и что указанные закономерности обусловлены наличием типов (или различных путей развития) предмутационных повреждений.

Несколько иная картина имеет место при обработке семян вначале ипритом, с последующим облучением влажных семян.

Рис. 3 (табл. 3) представляет графическое сравнение этих результатов, аналогичное предыдущему. Наиболее существенное различие в результатах этих экспериментов по взаимодействию мутагенных факторов различной природы заключается в том, что в отличие от предыдущего опыта здесь низесуммарный эффект наблюдается не во все сроки. Разность между суммарным количеством aberrаций и полученным в эксперименте количеством перестроек покрывается исключительно aberrациями хроматидного, а также хромосомного типов (табл. 3 и 4), тогда как частота хромосомных aberrаций даже несколько снижается.

При хранении семян после обработки и в высушенном состоянии (во все сроки), также как и в первом варианте комбинированного воздействия, отмечается эффект ниже суммарного.

Сверхэффект при комбинированном действии (HN_2 и γ -облучение) в наших условиях осуществляется за счет прироста aberrаций только (табл. 4, рис. 4) хроматидного типа. С точки зрения взаимодействия на уровне предмутационного потенциального повреждения трудно найти объяснение этому факту, во всяком случае до тех пор пока мы ничего не знаем о молекулярной природе развития этих повреждений. Однако если предположить участие системы восстановления в этом взаимодействии, то о чем могут свидетельствовать обсуждаемые данные?

В первую очередь, по-видимому, о том, что эта система должна работать в плане стабилизации разрывов уже на стадиях, когда хромосома представлена двумя эффективными нитями и поэтому каждая из них оказывается поврежденной независимо от другой. Альтернативный вывод состоит в том, что пути стабилизации потенциальных повреждений, индуцированных ионизирующим излучением и алкилирующим излучением и алкилирующим агентом, различны.

Если вернуться к предположению о повреждении в результате комбинированной мутагенной обработки самой системы восстановления, то простейшей интерпретацией полученных данных, по-видимому, будет предположение о том, что она сама репарируется и начинает функционировать уже тогда, когда хромосома двунитчатая. В пользу такого предположения косвенно свидетельствуют и данные по комбинированной обработке в обратном порядке.

Опыты по изучению комбинированного действия γ -лучей и алкилирующего агента выявили эффект взаимодействия. Снижение уровня мутабельности по сравнению с аддитивным при всех сроках хранения обработанных семян обеспечивалось падением частоты как хромосомных, так и хроматидных aberrаций.

Сверхаддитивный эффект наблюдается лишь в семенах, последовательно обработанных HN_2 и γ -лучами и проращиваемых без хранения. В этом случае мутабельность повышалась за счет роста частоты хроматидных aberrаций.

ԱՂՈՏԱՅԻՆ ԻՊՐԻՏԻ (HN_2) եվ γ -ՃԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ ԿՈՄԲԻՆԱՑՎԱՄ
ԱՂԻԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *CREPIS CAPILLARIS*-Ի ՉՈՐ ՍԵՐՄԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Գամմա ճառագայթների և ալկիլացնող ազդակների կոմբինացված ազդեցությամբ *Crepis capillaris*-ի չոր սերմերի վրա իհայտ է բերել այդ նյութերի փոխազդեցությունը: Ըստ որում նկատվել է ինչպես բրոմոսոմային, այնպես էլ բրոմատիգային խոտորումների մակարդակի իջեցում:

R. A. AZATYAN

JOINT EFFECT OF NITROGEN YPERITE (HN_2) AND GAMMA-RAY ON THE DRY SEEDS OF *CREPIS CAPILLARIS*

Summary

The Joint effect of X-rays and alkalinizing influences on the dry seeds of *Crepis capillaris* has shown the interaction of those substances. Observations have shown that there is a decrease of the level of both chromosome and chromatid aberrations.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moutschen I. Action combinee Myleran et des rayons x-rays et son importance an point de vue genetique. Hereditas, 46, 471, 1960.
2. Merz T. Swanson C. P. a. Cohn N. S. Interaction of chromatid Breaks Produced by x-rays and Radiomimetic compounds. Science N. Y., 133, 703, 1961a.
3. Mer. T., Swanson C. P. a. Hemalatha. Radiosensitivity and the probzem of chromosome Breakage and rejoining Brookhawn Symp. Biol № 14, Fundamental Aspects of Radiosensitivity, P. 53, 1961b.
4. Аветисов В. А., Валева С. А. Эффект обработки этиленмином семян ячменя, облученных гамма-квантами и быстрыми нейтронами. Генетика, т. IV, № 5, 31, 1968.
5. Scott. D. The additive effect of X-rays and maleic hidrazide in inducing chromosomal aberrations at different stage of the mitotic cycle in *Vicia faba*. Mutat. Res. 5, 31, 1968
6. Делоне Н. Л., Козлов В. А. Влияние β -меркоптопропиламина на уменьшение числа перестроек хромосом в микроспорах *Tr. paludosa* при γ -облучении. Радиобиология, вып. 4, № 6, 922, 1964.
7. Валева С. А. Цитогенетический анализ совместного действия мутагенов и облучения на семена ячменя. Радиобиол., вып. 4, № 3, 451, 1964.
8. Moutschen-Dahmen M., Moutschen I. Ehrenberg L. On postir-radiation modification of biological effects of neutrons. 1. Effect of Myleran on chromosomal aberration in neutron irradiated seeds. Radiat. Rot. 6, № 3, 251, 1966
9. Moutschen-Dahmen I. M. Meiotic consequences of a combined tretment fast neutrons-FUDR. V. faba. Experientia, 23, № 7, 582, 1967.
10. Cohn N. S. Production of chromatid. Aberrations by Diepoxybutane and an Iron Cheator. Nature, London, 192, 1093, 1961a.
11. Cohn N. S. The effect of chelation on the Production of chromatid aberrations in *Vicia faba*. Expl. cell. Res. 24, 59b, 1961b.
12. Дубинин Н. П., Дубинина Л. Г. Проблема потенциальных изменений в хромосомах при хранении сухих семян *Crepis capillaris*, Генетика, т. IV, № 9, 3, 1968.
13. Сахаров В. В., Мансурова В. В., Платонова Р. Н. Влияние физиологических особенностей полиплоидных семян на частоту возникновения радиоиндуцированных хромосомных перестроек. В сб.: «Влияние ионизирующих излучений на наследственность», стр. 258, 1966.
14. Немцева Л. С. Последействие быстрых нейтронов в семенах *Crepis capillaris* L. Радиобиология, вып. 5, № 1, 126, 1965.
15. Конгер А. Д. Биологическое последействие в облученных семенах и долгожившие радикалы. В сб.: «Восстановление клеток от поврежд.», М., Госатомиздат, стр. 46, 1963.