

Р. А. Азатян, М. С. Закарян

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ АГЕНТОВ С ХРОМОСОМАМИ *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. /1/.

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 /2/.

Ригер и Михаэлис /3/ в своих опытах установили, что действие триэтиленмеламина и HN_2 на *V.faba* дает те же результаты, что и использование двух доз триэтиленмеламина. Аналогичные данные теми же авторами /4/ получены при одновременной обработке этилметансульфонатом и его бифункциональным аналогом — милераном. Во всех указанных случаях был получен аддитивный эффект. Полученные данные объяснены авторами с позиции теории взаимодействия. Изучение взаимодействия гидразида малеиновой кислоты, триэтиленмеламина и этанола показало, что все соединения вызывали хроматидные aberrации /5/. Установлено взаимодействие хроматидных разрывов, индуцированных этанолом и триэтиленмеламином. При использовании гидразида малеиновой кислоты и триэтиленмеламина количество изолюкусных разрывов и хроматидных транслокаций не превышало суммарной величины aberrаций, вызванных каждым соединением в отдельности. Полученные результаты объясняются различной природой разрывов хромосом, индуцированных разными агентами.

Следует отметить, что ни в одной из перечисленных работ взаимодействие не изучалось строго в одной фазе, за исключением движения клеток по циклу. Следовательно, учитывая чувствительность отдельных моментов митотического цикла, связанных с репрограммированием генов, при интерпретации результатов взаимодействия надо проявлять осторожность.

Тем не менее, как метод анализа этапов мутагенеза комбиниро-

ванные воздействия следует считать весьма перспективными.

Вследствие этого возникла необходимость изучить характер взаимодействия, вызываемого как азотистым ипритом (HN_2) и этиленимином (ЭИ) в отдельности, так и при их совместном действии.

Сухие семена *S. capillaris* обрабатывали два часа ЭИ в концентрации $2,3 \cdot 10^{-2}$ М. Затем обработанные семена в течение 30 мин. промывали водопроводной водой, высушивали фильтровальной бумагой, и влажные семена обрабатывали в течение 2 час. HN_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М. Далее семена промывали водопроводной водой и помещали для проращивания в чашки Петри, на фильтровальную бумагу, смоченную 0,01% колхицином в термостате при 25° . Фиксировали проростки длиной 1,5–2,0 мм, затем фиксацию продолжали до исчезновения диплоидных клеток. В качестве фиксатора использовали уксусно-этанол (1 : 3).

В другом варианте опыта сухие семена обрабатывали сначала HN_2 затем ЭИ в тех же дозах. Проращивание и фиксацию производили при тех же условиях.

Для описываемых опытов контролем служили семена, обработанные отдельно тем и другим мутагеном и проращиваемые и фиксируемые при тех же условиях.

Во всех опытах анализ хромосомных aberrаций проводили в первом митозе в метафазе на временных ацетокарминовых препаратах.

Данные табл. 1 показывают, что при действии этиленимина на сухие семена в дозе $2,3 \cdot 10^{-2}$ М уровень мутирования клеток составлял $73,1 \pm 1,70\%$. Aberrации в основном имеют характер хроматидных повреждений ($95,2 \pm 0,87\%$, табл. 2). Хромосомные перестройки составили всего $3,0 \pm 0,89\%$.

Среди хроматидных перестроек чаще других встречались изохроматидные делеции со слиянием проксимальных и дистальных концов. Хроматидные транслокации асимметричные составили $28,8 \pm 1,81\%$, симметричные – $3,2 \pm 0,70\%$; за ними следуют хроматидные делеции, дупликации-делеции и интерстициальные делеции и трирадиалы.

Среди хромосомных перестроек в основном были асимметричные – $1,6 \pm 0,50\%$, симметричные хромосомные обмены – $1,1 \pm 0,42\%$ и инверсии – $0,3 \pm 0,22\%$ (табл. 2).

Изохроматидные делеции с неслиянием и микрофрагменты в табл. 1 выделены в отдельную графу, так как неизвестно, в какой фазе митотического цикла возникают эти перестройки.

При воздействии азотистым ипритом (HN_2) в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М в этих опытах найдено $26,5 \pm 1,57\%$ мутантных клеток (табл. 1).

Aberrации были в основном хроматидного типа ($96,6 \pm 1,21\%$), хромосомные перестройки составляли $0,4 \pm 0,40\%$ от общего количества перестроек (табл. 2).

Основная категория среди хроматидных перестроек была представлена изохроматидными делециями со слиянием проксимальных и дистальных концов ($48,3 \pm 3,28\%$). За ними следуют хроматидные транслокации (асимметричные и симметричные), хроматидные делеции, дупликации-делеции и интерстициальные делеции (табл. 2).

Как свидетельствуют данные табл. 1, при комбинированном дей-

ствии обоих мутагенов в любом порядке уровень мутабельности ($82,3 \pm 1,91$ % при ЭИ + HN_2 и $79,8 \pm 1,69$ % при HN_2 + ЭИ) ниже суммарного эффекта каждого из мутагенов, действовавших порознь, т. е. наблюдается ниже аддитивный эффект, причем более выраженный в варианте, когда первым действовавшим агентом был иприт. Относительная частота встречаемости каждого из типов aberrаций практически не менялась. В варианте ЭИ + HN_2 хроматидные aberrации составили $90,8 \pm 1,33$ %, а хромосомные — $3,8 \pm 0,88$ %. В другом варианте опыта (HN_2 + ЭИ) хроматидные aberrации составляли $96,6 \pm 0,79$ %, а хромосомные — $2,0 \pm 0,61$ % (табл. 2).

В опытах по взаимодействию двух алкилирующих мутагенов показано, что независимое действие ЭИ на сухие семена отличалось тем, что он давал довольно высокий, по сравнению с HN_2 процент aberrаций хромосомного типа (табл. 2) — $3,0 \pm 0,68$ %. Однако эта величина несколько ниже той, которая была получена в опытах Дубининой и Дубинина /6, 7/. При комбинированном действии двух алкилирующих агентов в любой последовательности, как видно из той же табл. 1, частота aberrаций в прорастающих семенах в первом митозе меньше суммарной при независимом действии каждого из мутагенов. Иными словами, в этой серии также было получено взаимодействие, выразившееся в минус-эффекте. Спектр aberrаций при этом по существу не изменялся.

Однако на результаты этих опытов можно взглянуть и в несколько ином аспекте. Поскольку ЭИ и HN_2 относятся к одному классу мутагенов и не обладают выраженной специфичностью в действии по крайней мере на уровне первичных молекулярных повреждений и обработка ими семян производилась непосредственно одна за другой, их комбинированное действие можно рассматривать как действие большой дозы при малой интенсивности. В этом плане полученные данные сравнимы с имеющимися в литературе /3-5/.

С другой стороны, последовательное воздействие двумя мутагенами одного класса можно сопоставить с эффектом фракционирования дозы при минимальном интервале между фракциями. Такие опыты также проводились неоднократно /3/.

В этом аспекте следует обратить внимание на тот факт, что при воздействии HN_2 перед ЭИ минус-эффект несколько более выражен. Заметим по этому поводу, что в опытах Ригера и Михаэлиса /3/, где фракции дозы были неравными, ниже аддитивный эффект был отмечен лишь в том варианте, когда материал обрабатывали вначале малой, а затем большой дозой. Поскольку мутагенный эффект HN_2 в наших экспериментах был ниже, чем эффект ЭИ, тот вариант, в котором комбинированная обработка велась в порядке HN_2 + ЭИ, в известной мере сравним с результатами Ригера и Михаэлиса.

К сожалению, ни в одной из приведенных работ как по влиянию на выход aberrаций интенсивности дозы, так и по фракционированию дозы мутагена нет интерпретации полученных данных на современном уровне, и они по существу не идут далее регистрации феномена. Что же касается высказанных здесь гипотез, то для того, чтобы сделать выбор между ними или найти указание на возможность какого-то

Таблица 1

Уровень мутирования хромосом при взаимодействии бифункционального иприта (HN_2) и этиленimina (ЭИ) на сухие семена *C. capillaris* L.

Концентрация мутагенов	Сроки фиксации от начала мутационной работы, часы	Число просмотренных метафаз	Метафазы с абберациями		Количество аббераций	
			Число	%	Число	%
Контроль	30-36	1215	3	$0,25 \pm 0,14$	3	$0,25 \pm 0,14$
ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$ М)	42-78	674	493	$73,1 \pm 1,70$	625	$92,7 \pm 1,00$
($3 \cdot 10^{-4}$ М)	32-68	786	208	$26,5 \pm 1,57$	232	$29,6 \pm 1,63$
ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$)	52-88	483	397	$82,3 \pm 1,91$	475	$98,4 \pm 0,57$
($3 \cdot 10^{-2}$)						
ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$)	52-88	584	450	$78,8 \pm 1,69$	538	$95,3 \pm 0,89$

Таблица 2

Спектр структурных мутаций хромосом при взаимодействии бифункционального иприта (HN_2) и этиленimina (ЭИ) на сухие семена *C. capillaris* L.

Концентрация мутагенов	Конт- роль	ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$ М)	HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М)	ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$ М) HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$)	HN_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М) ЭИ ($2,3 \cdot 10^{-2}$ М)		
Количество aberrаций	3	625	232	475	538		
Изохроматидные деления с неслиянием	-	$1,6 \pm 0,50$	$2,8 \pm 1,04$	$5,1 \pm 1,01$	$1,3 \pm 0,49$		
Микрофрагменты	-	$0,2 \pm 0,17$	$0,4 \pm 0,40$	$0,4 \pm 0,30$	$0,2 \pm 0,20$		
Изохроматидные де- лени со слиянием	1	$34,2 \pm 1,90$	$48,3 \pm 3,28$	$34,4 \pm 2,18$	$42,8 \pm 2,14$		
Хроматидные де- лени	2	$21,0 \pm 1,63$	$17,7 \pm 2,50$	$12,6 \pm 1,52$	$13,8 \pm 1,48$		
Типы перестроек хромосомные	Транс- лока- ции	асимметричные	-	$28,8 \pm 1,81$	$25,0 \pm 2,84$	$25,5 \pm 2,00$	$26,6 \pm 1,90$
		симметричные	-	$3,2 \pm 0,70$	$1,7 \pm 0,85$	$4,4 \pm 0,94$	$1,3 \pm 0,49$
	Трирадикалы	-	$0,6 \pm 0,32$	-	$4,0 \pm 0,90$	$2,4 \pm 0,86$	
	Дубликации деления и ин- терстициальные деле- нии	-	$7,5 \pm 1,05$	$3,9 \pm 1,27$	$9,9 \pm 1,37$	$8,7 \pm 1,27$	
	Итого	3	$85,2 \pm 0,87$	$88,6 \pm 1,21$	$90,8 \pm 1,33$	$98,6 \pm 0,79$	
Типы перестроек хромосомные	Асимметричные	-	$1,6 \pm 0,50$	$0,4 \pm 0,40$	$2,3 \pm 0,69$	$1,3 \pm 0,49$	
	Симметричные	-	$1,1 \pm 0,42$	-	$1,3 \pm 0,52$	$0,7 \pm 0,37$	
	Инверсии	-	$0,3 \pm 0,22$	-	$0,2 \pm 0,20$	-	
	Итого	-	$3,0 \pm 0,89$	$0,4 \pm 0,40$	$3,8 \pm 0,88$	$2,0 \pm 0,81$	

инного объяснения, необходимы дополнительные эксперименты, которые могут дать полное объяснение механизму взаимодействия двух алкилирующих агентов. Возможно, что указанные закономерности обусловлены наличием разных типов (или различных путей развития) потенциальных предмутационных повреждений.

R. A. Azatian, M. S. Zakarian

THE INTERACTION OF ALKALIZING MATTERS WITH THE CHROMOSOMES OF CREPIS CAPILLARIS L.

S u m m a r y

The effects of combined as well as separately applied nitrogenous yperite and ethylenimine on the dry seeds of the species *Crepis capillaris* L. were studied.

It was discovered that, in whatever sequence of application, the changes in the first cellular cycle were smaller after separate applications than after the combined application of the mutagens.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Dubinin N.P. and Tarasov V.A. Problems of radiation mutagenesis. Reprint from "Atomic energy review", Vol. VI, N 3, International atomic energy agency, Vienne, 1968.
2. Дубинин Н. П., Акифьев А. П. Предмутационные потенциальные изменения хромосом. Успехи современной генетики, вып. 2, 5, 1969.
3. Rieger R. and Michaelis A. On the Time period During which chemical induced chromatid breaks are available for interaction. Exptl. cell res., 31, 202, 1963.
4. Rieger R. and Michaelis A. Chromatiden aberrationen nach Einwirkung von Athylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurseln von *Vicia faba*. Kultur - pflanze, 8, 230, 1960.
5. Michaelis A. and Rieger R. Interaction of chromatid breaks induced by three different radiomimetic compounds. Nature, London, 199, 1014, 1963.
6. Дубинина Л. Г., Дубинин Н. П. Доказательство поражения хромосом алкилирующими соединениями в предсинтетической фазе клеточного цикла. ДАН СССР, 174, 6, 1223, 1967.
7. Дубинина Л. Г., Дубинин Н. П. Новое в действии алкилирующих соединений на мутации хромосом. Генетика, № 2, 3, 1968.