

А. З. Восканян, Ю. А. Митрофанов

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АЗОТИСТОГО ИПРИТА (HN_2) И ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА ДНК ФУДР НА КЛЕТКИ *CREPIS CAPILLARIS*

Познание механизмов перестроек хромосом и процессов, происходящих в молекуле ДНК, является одним из насущных вопросов современной генетики.

В изучении механизмов образования перестроек хромосом важное значение приобретает модификация спонтанного и индуцированного мутагенеза специфическими ингибиторами синтеза ДНК и белка.

С помощью этого метода накоплен ценнейший экспериментальный материал, и исследователям пришлось пересмотреть многие положения о структурных мутациях, сделанных ранее. Показано, что ингибиторы синтеза ДНК индуцируют цитогенетические нарушения — фрагментируют хромосомы /1-3/. Согласно большинству работ, они наиболее эффективны в S фазе /4-8/. Установлено, что тиминное голодание, в частности, индуцированное ФУДР, приводит к мутированию микроорганизмов.

В основу данной работы положено изучение специфики мутагенного и модифицирующего эффекта ИС ДНК ФУДР в различных фазах митотического цикла клеток.

В предыдущих экспериментах была выяснена продолжительность G_1 , S и G_2 фаз в клетках корешков прорастающих семян /9/. Использовали концентрации: для HN_2 — $3 \cdot 10^{-4}$ М, а для ФУДР — 10 мкг/мл.

Для изучения модифицирующего влияния ингибитора (ФУДР) в G_1 , S и G_2 фазах митотического цикла:

1. Воздушно-сухие семена *Crepis capillaris* обрабатывали $3 \cdot 10^{-4}$ М раствором HN_2 в течение 2 час., отмывали от HN_2 в течение 15 — 18 мин. проточной водой, затем переносили на фильтровальную бумагу в чашки Петри и ставили в термостат при температуре 26°C.

Семена через 3 час. от начала воздействия HN_2 обрабатывали модификатором мутационного процесса ФУДР. Через 24 час. роста семян к ним добавляли 0,01 % раствор колхицина. Фиксацию проводили через 26 и 30 час. от начала замачивания. Время нахождения семян и проростков в ФУДР равно 2 час. Для изучения модифициру-

шего действия ингибитора в *S* обработку корешков проводили через 18 час. от начала обработки HN_2 , а для фазы C_2 - через 24 час. Фиксацию проводили через 26 и 30 час. после замачивания.

II. Проростки обрабатывали HN_2 в *S* фазе, изучали действие ФУДР в *S* и C_2 . Здесь применена та же методика, что и в первом варианте.

Материал фиксировали уксусно-этиловым спиртом. Препараты красили ацетокармином.

Изучение действия ФУДР последовательно во всех фазах митотического цикла показало, что чувствительность клеток *Crepis capillaris* в *S* выше, чем в C_2 (табл. 1). В *S* подавляющее большинство нарушений составляли хроматидные и изолюкусные разрывы без соединения. В C_2 число нарушений последней категории возросло. В C_1 ФУДР был неэффективен. Модификация ФУДР в C_1 , *S* и C_2 эффекта HN_2 в C_1 была четкой (фиксация через 26 час.) в *S*, отсутствовала в C_1 , а в фазе C_2 заметно уменьшалось число изолюкусных разрывов с соединениями и увеличивалось число без соединения (табл. 1). Этот факт модификации перестроек в C_2 дает основание сделать предположение, что, по-видимому, хроматидные перестройки, индуцированные алкилирующими соединениями в C_1 не реализуются вплоть до фазы C_2 .

При фиксации через 30 час. эффект ФУДР отсутствует. Последнее, вероятно, связано с увеличением периода времени от момента действия мутагена до момента действия модификатора.

Модификация ФУДР в *S* и C_2 эффекта HN_2 в фазе *S* показывает очень интересные данные (табл. 2). Ингибитор, обладая значительной активностью (*S*, C_2), подавлял образование перестроек с соединениями (Upr , $UprNid$, $UprNir$), но активно увеличивал общий выход хромосомных нарушений. Здесь следует отметить, что ФУДР при действии HN_2 в C_2 обладал наибольшей эффективностью как модификатор химически индуцированного мутагенеза. Это явление, вероятно, можно объяснить химическим взаимодействием и нейтрализацией ФУДР и HN_2 при использовании их для обработки друг за другом. Фрагментирующий эффект был вызван избытком ФУДР, который не нейтрализовался остатками HN_2 оказавшимися в клетках после отмывки мутагена.

В отношении молекулярного механизма взаимодействия HN_2 с ДНК известно, что он образует сшивки между остатками гуанина ДНК. Для родственного серного иприта показано, что эти сшивки вырезаются и удаляются системой репарации /10, 11/.

Известно, что тимидин является предшественником не репликативного, а репаративного синтеза, и в связи с этим торможение синтеза тимидина ФУДР должно привести прежде всего к подавлению репаративного синтеза ДНК. Наши данные по отсутствию мутагенного и модифицирующего эффекта ФУДР при кратковременном введении в C_1 показывают, что кратковременное подавление репаративного синтеза неэффективно. Очевидно, после снятия блока ингибиторов в C_1 репаративный синтез возобновляется. Ингибитор был активен в *S* фазе, что можно объяснить торможением репаративного синте-

Перестройки хромосом, возникающие под действием азотистого иприта (HN_2) на клетки в фазе C_1 с последующей обработкой ФУДР ($10^{-7}M$) в C_1 , S , C_2 фазах

Таблица 1

Варианты опытов	Число изученных метафаз	Число клеток с перестройками	Число перестроек на 100 клеток					Число пробелов на 100 клеток			
			Хроматидные разрывы	Изолюкусные разрывы с <i>Urd</i> , <i>NidUrd</i> , <i>NipUrd</i> и транслокации	Изолюкусные разрывы с <i>NipUrd</i>	Общее число перестроек	Симметричные и асимметрич. хроматид. обмены		Одиночные	Парные	
							полные	неполные			
Фиксация через 28 часов											
<i>HN₂</i> в <i>C₂</i>	337	11,1±1,8	8,2±0,9	2,8±0,4	1,5±0,6	12,3±1,8	0,4±0,3	0,4±0,3	0,77±0,37	0,55±0,32	
<i>HN₂</i> + ФУДР в <i>C₁</i>	545	11,2±1,7	4,8±0,91	3,8±0,81	2,8±0,23	12,4±1,4	0,9±0,4	0,18±0,17	3,5±0,78	3,5±0,78	
<i>HN₂</i> + ФУДР в <i>S</i>	400	14,2±1,74	10,0±1,5	1,7±0,64	4,0±0,93	16,5±0,85	0,75±0,43	0	0,4±0,89	0	
<i>HN₂</i> + ФУДР в <i>C₂</i>	307	12,2±1,88	7,2±1,47	1,8±0,73	2,2±0,82	12,3±1,9	0,8±0,14	0	0,3±0,9	0,3±0,09	
- ФУДР в <i>C₁</i>	456	0,5±0,3	0,5±0,3	0	0	0,5±0,3	0	0	0,8±0,4	0,8±0,4	
- ФУДР в <i>S</i>	540	1,2±0,3	0,8±0,2	0	0,4±0,03	1,2±0,3	0	0	3,2±0,8	1,1±0,5	
- ФУДР в <i>C₂</i>	907	0,6±0,2	0,5±0,2	0	0	0,6±0,2	0	0	0	0	
Контроль	2197	0,02±0,01	0,02±0,01	0	0	0,02±0,01	0	0	0,01±0,01	0,01±0,01	
Фиксация через 30 часов											
<i>HN₂</i> в <i>C₁</i>	900	17,1±1,2	6,6±0,8	2,9±0,7	4,8±0,8	19,2±1,3	1,3±0,4	0	0,8±0,3	0,4±0,2	
<i>HN₂</i> + ФУДР в <i>C₁</i>	442	14,2±1,67	4,8±1,0	3,6±0,9	2,7±0,75	14,02±1,65	1,1±0,5	0	0,45±0,97	0	
<i>HN₂</i> + ФУДР в <i>S</i>	802	15,0±1,28	8,4±0,97	1,5±0,45	5,2±0,78	17,4±1,35	1,1±0,35	0,12±0,12	0,24±0,17	0,24±0,17	
- ФУДР в <i>C₂</i>	522	0,5±0,25	0,4±0,2	0	0	0,5	0	0	0	0	
ФУДР в <i>S</i>	902	3,1±0,5	1,9±0,4	0	11±0,3	3,1±0,3	0	0	4,2±0,7	1,3±0,4	
Контроль	1068	0,4±0,2	0,2±0,1	0	0,50±0,09	0,4±0,2	0,09±0,09	0	0,1±0,1	0,1±0,1	

Таблица 2

Перестройки хромосом, возникающие под действием азотистого иприта (HN_2) на клетки в фазе S с последующей модификацией ФУДР ($10^{-7} M$) в S и C_2 фазах.

Варианты опыта	Число изученных метафаз	Число клеток с перестройками, %	Число перестроек на 100 клеток						Число пробелов на 100 клеток	
			Хроматидные разрывы	Изохроматидные разрывы с соединениями и транслокациями	Изолюкусные разрывы без соединений концов	Общее число перестроек	Симметричные и асимметричные обмены		Одиночные	Парные
							полные	неполные		
HN_2 в C_2	320	$9,6 \pm 1,85$	$6,2 \pm 1,36$	$2,5 \pm 0,28$	$0,62 \pm 0,14$	$10,3 \pm 1,7$	0	0	$1,8 \pm 0,24$	0
HN_2 +ФУДР в S	261	$25,3 \pm 2,7$	$20,0 \pm 2,48$	$0,8 \pm 0,5$	$7,6 \pm 1,64$	$26,3 \pm 2,2$	$0,37 \pm 0,12$	0	$1,5 \pm 0,24$	0
HN_2 +ФУДР в C_2	380	$30,6 \pm 2,37$	$21,0 \pm 2,1$	$0,8 \pm 0,2$	$8,1 \pm 1,4$	$32,1 \pm 2,02$	0	0	$0,52 \pm 0,11$	0
- ФУДР в S	850	$3,4 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,5$	0	$0,9 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,6$	0	0	$4,2 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,4$
- ФУДР в C_2	484	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$	0	$0,1 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,3$	0	0	$0,5 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$
Контроль	1608	$0,5 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,02$	0	$0,66 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,02$	0	0	$0,06 \pm 0,024$	0

за при продолжавшем идти репликативном. Прохождение процесса репликации через поврежденный участок, содержащий брешь от вырезания неуклеотидов, создавало разрыв в обеих комплементарных цепочках ДНК. Подобный механизм депоразжения мутационного эффекта при действии ингибиторов синтеза ДНК предлагался ранее при модификации радиационного эффекта Митрофановым и Котоминой. /6/.

ФУДР при действии в фазе G_2 после мутагенной обработки в G_1 и S производит основной эффект, проявляющийся в увеличении числа неслиянных фрагментов. Объяснить это действие возможно с позиции гипотезы обмена /8/, постулирующего слияние фрагментов на базе гибридизации ступенчатых концов ДНК и прохождение кроссинговерного синтеза ДНК, сшивающего объединенные фрагменты. Так как модификация перестроек хроматидного типа наблюдается в фазе G_2 при действии радиации и химических мутагенов во всех изученных условиях, описанных нами, очевидно, что реализация хроматидных перестроек происходит в фазе G_2 . Присутствие ингибитора в момент реализации этих перестроек механизмом обменного характера должно привести к подавлению кроссинговерного синтеза ДНК и фрагментации хромосом, что и наблюдалось во всех указанных исследованиях.

A. S. Voskanyan, Yu. A. Mitrofanov

COMBINED INFLUENCE OF HN_2 AND FUDR ON THE CELLS OF CREPIS CAPILLARIS

S u m m a r y

Cromosome aberrations are exposed to modification in S and G_2 in phases mitotic cycle.

By the reason of fragmentory action of DNA the spector of aberration cromosomes NUPd, NUPd is chanded, it is almost doubled.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kihlman B.A., Hartley B. Effect of hydroxyurea and other inhibitors of DNA synthesis on Vicia chromosomes previously exposed to x-rays or to radiomimetic chemicals. Hereditas, 59, 439, 1968.
2. Kihlman B.A. Deoxyriponucleotide syntesis and chromosome breakage. Edinburgh, Oliver Boyd, p.108, 1966.
3. Ahnström S., Nantarajan A.T. Mechanism of chromosome breakage. A new theory. Hereditas, 54, N 3, 379, 1966.
4. Taylor J.H. DNA Synthesis in relation to chromosome reproduction and the reunion of breaks. J.Gellubur and Compar. Physiol., Suppl., I, 62, N 2, 1963.

5. Oskey C.H., Hsu T.C., Richardson L.C. Chromosome damage induced by 5-fluoro-2deoxyuridine in relation to the cell cycle of the chinese hamster. J. Nat.Concer. inst., 40, N 3, 465, 1968.
6. Митрофанов Ю.А., Котомина И.Ф. Самостоятельное и совместное действие радиации и ингибиторов синтеза ДНК и белка на клетки. Генетика, т. У1, № 3, 1970.
7. Митрофанов Ю.А., Селюкова В.В. (Отрадова), Восканян А.З. Некоторые вопросы механизма образования перестроек хромосом. Генетика, т. УШ, № 1, 1972.
8. Митрофанов Ю.А., Котомина И.Ф. Влияние на процессы образования перестроек хромосом в облученных семенах. Радиобиология, т. 9, № 2, 1969.
9. Митрофанов Ю.А., Восканян А.З. Анализ цитогенетического эффекта азотистого иприта в двух клеточных поколениях. Цитология и генетика, т. 6, № 5, 1972.
10. Crathorn A.R., Roberts I.I., Mechanism of the cytotoxic action of alkylating agents in mammalian cells and evidence of the removal of alkylated groups from deoxyribonucleic acid. Nature, 211 5045, 150, 1966.
11. Roberts I.I., Crathorn A.R., Brent T.R. Repair of alkylated DNA in mammalian cells. Nat. 218, 972, 1968.
12. Митрофанов Ю.А., Котомина И.Ф., Отрадова В.В. Влияние ингибиторов синтеза ДНК и белка на процессы появления структурных мутаций хромосом. Симпозиум "Молекулярные механизмы генетических процессов", М., 1970.