

А. З. Восканян, Ю. А. Митрофанов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕСТРОЕК И ПРОБЕЛОВ ХРОМОСОМ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЗОТИСТОГО ИПРИТА (HN_2)

Несмотря на успехи, достигнутые за последние годы по индуцированному мутагенезу, ряд вопросов, касающихся механизма появления мутации, остается нерешенным. До сих пор не выяснены внутриклеточные процессы, протекающие с момента алкилирования ДНК, пути возникновения потенциальных повреждений и их реализации. Остается открытым вопрос в отношении такой распространенной категории мутации, как перестройки хромосом. В связи с этим значительный интерес представляет изучение динамики образования разрывов и щелей при применении химических мутагенов задержанного характера в ранних фазах митотического цикла. В этом аспекте азотистый иприт (HN_2) удобен тем, что он в первых сроках после обработки не индуцирует перестроек хромосом.

Установлено, что азотистый иприт приводит к появлению пробелов (гэпов) в фазе C_2 перестройки хромосом /1, 2/, как и следовало ожидать, при этом не появляется. Действие ионизирующих излучений, как известно, характеризуется одновременным появлением как перестроек хромосом, так и пробелов в первых сроках фиксации, что затрудняет их анализ /3/. Не изучена продолжительность периодов, определяющих возникновение пробелов.

Для выяснения некоторых аспектов вышеизложенных вопросов нами проведены следующие экспериментальные работы: семена *Crepis capillaris* (четырёхмесячного хранения) проращивали в термостате при 26°C в течение 28–30 час. Отбирали проростки длиной 1,5 – 3 мм и обрабатывали их азотистым ипритом 10^{-6}M в течение 15 – 17 мин., после чего в течение 10–15 мин. промывали проточной водой и переносили на фильтровальную бумагу, замоченную 0,01% раствором колхицина. Фиксировали раствором Карнуа в первом эксперименте через 2; 4; 6; 8; и 10 час., а во втором – через 1; 2 и 4 час.

В другой серии опытов обработке подвергали семена 1968 и 1969 гг. Фиксация проведена в максимально короткие сроки сразу после обработки и отмывки.

Опыты преследовали цель определить самые начальные сроки образования пробелов.

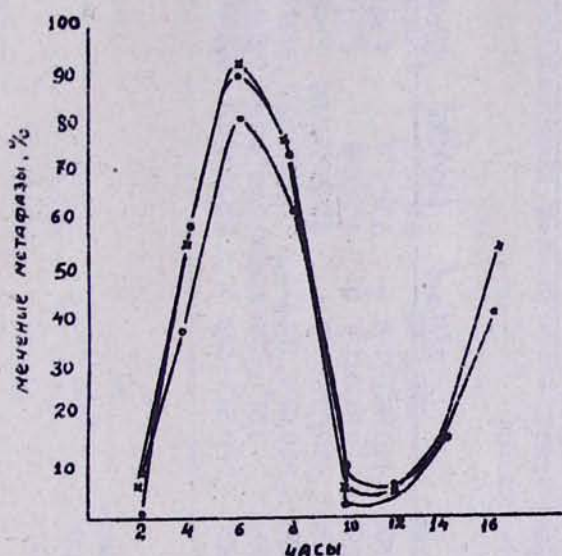
Продолжительность митотического цикла определяли методом автордиографии. В контроле проростки на 15 мин. помещали в 5 мк Кири/мл раствор тимидина $-H^3$, а в варианте с мутагеном тимидин $-H^3$ вводился до азотистого иприта в концентрациях 10^{-6} М и $5 \cdot 10^{-7}$ М. Фиксацию проводили через 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14 и 16 час. Препараты покрывали фотоэмульсией типа М и экспонировали 14 суток. Автографы проявляли металгидрохиновым проявителем и докрашивали карболфуксином. Для определения длительности стадии митотического цикла с помощью микроскопа МБИ-3 (окуляр 10х, объектив 90х), изучали количество меченых метафаз в разные сроки фиксации. Понятия щель (гэп) и разрыв квалифицировали по методике Ривелла /5, 6/.

Нарушение хромосомы причисляли к категории "разрыва", если оно удовлетворяло следующим условиям:

удаление разорванных концов хромосом не меньше, чем на толщину хроматиды;

разорванные концы хромосом округлены;

цитоплазма между разорванными фрагментами должна быть окрашена сходно с другими местами цитоплазмы в клетке. Желателен сдвиг фрагментов.



Кривые меченых метафаз. По оси абсцисс — время после введения тимидина $-H^3$; по оси ординат — процент меченых митозов: х — контрольные метафазы; · — меченые метафазы, $5 \cdot 10^{-7}$ М; 0 — меченые метафазы, 10^{-6} М.

Как видно из рисунка, при обработке в фазе G_2 азотистый иприт в концентрации 10^{-6} М несколько задерживает вступление клеток

Таблица 1

Появление перестроек хромосом и щелей после обработки проростков
C. capillaris $5 \cdot 10^{-7}$ М

Часы фикса- ции	Всего изуче- но ме- тафаз	Число клеток с абер- рациями %	Число щелей на 100 клеток	Количество aberrаций на 100 клеток						
				Изолюкусные разрывы				Хрома- тидные разрывы	Симметрич- ные и асим- метричные обмены (транс- локации)	Микрофраг- менты и ин- терстициаль- ные деле- ции
				<i>NUpd</i>	<i>UpNUd</i>	<i>NUpUd</i>	<i>Upd</i>			
Контроль	2109	0,05	$0,1 \pm 0,04$	0	0	0	0	0,05	0	0
2	666	$0,15 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,41$	0	0	0	0	$0,2 \pm 0,04$	0	0
4	496	$1,02 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,5$	0	$0,205 \pm 0,66$	0	0	$0,6 \pm 0,3$	0	$0,4 \pm 0,03$
6	727	$2,8 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,6$	$0,14 \pm 0,2$	$0,14 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,34$	0	$1,6 \pm 0,5$
8	634	$9,06 \pm 1,1$	$2,5 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,29$	0	$1,5 \pm 0,5$
10	821	$12,7 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,06$	$2,4 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,08$	$2,2 \pm 0,5$

Таблица 2

Появление перестроек хромосом и щелей после обработки проростков

C. capillaris К 10^{-6} М HN_2

Часы фиксации	Всего изучено метафаз	Число клеток с абберациями, %	Число щелей на 100 клеток	Количество аббераций на 100 клеток			
				Делеции		Транслокации	
				хроматидные	изохроматидные с соединениями и без соединений	симметричные	асимметричные
2	330	$0,3 \pm 0,3$	$6,1 \pm 1,3$	$0,3 \pm 0,3$	0	0	0
4	387	$3,3 \pm 0,9$	$13,9 \pm 1,7$	$2,3 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,6$	0	0
6	220	$5,4 \pm 1,5$	$3,1 \pm 1,2$	$2,3 \pm 1,2$	$1,9 \pm 0,9$	0	0
8	400	$15,0 \pm 1,9$	$3,3 \pm 0,9$	$5,2 \pm 1,1$	$6,7 \pm 1,3$	$0,25 \pm 0,25$	$0,25 \pm 0,24$
10	500	$12,0 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3$	$0,40 \pm 0,28$	$0,20 \pm 0,14$
12	300	$12,0 \pm 1,9$	$2,6 \pm 1,1$	$4,8 \pm 1,2$	$5,5 \pm 1,3$	$0,3 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,4$
Контроль	1198	$0,1 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,2$	$0,05 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,05$	0	0

Примечание: Интерстициальные делеции, дупликации встречались в незначительном количестве, поэтому не вынесены в отдельную графу.

Таблица 3

Появление перестроек хромосом и щелей в ранние сроки фиксации после
воздействия $5 \cdot 10^{-7} \text{ M H}_2$

Часы фикса- ции	Семена 1968 года						Семена 1969 года					
	Всего изуче- но метафаз		Число клеток с аб- еррациями, %		Число щелей на 100 клеток		Всего изучено метафаз		Число клеток с аберрациями, %		Число щелей на 100 клеток	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт.	контр.	опыт	контр.	опыт
1	1460	1416	$0,24 \pm 0,12$	$0,61 \pm 0,23$	$0,5 \pm 0,18$	$3,2 \pm 0,15$	442	604	$0,207 \pm 0,19$	0	$0,42 \pm 0,28$	$0,65 \pm 0,35$
2	1298	1388	0	$0,58 \pm 0,2$	$0,36 \pm 0,17$	$4,3 \pm 0,17$	482	687	0	$0,29 \pm 0,22$	$0,42 \pm 0,22$	$1,02 \pm 0,45$
4	1322	917	$0,26 \pm 0,14$	$1,7 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,19$	$5,1 \pm 0,025$	481	736	0	$0,96 \pm 0,36$	$0,42 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,63$

в 1 митоз, а в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М практически такого эффекта не вызывает.

Исходя из кривой числа меченых метафаз, по срокам фиксации, была выяснена продолжительность митотического цикла и его фаз: в среднем $G_2 + M = 3$ час., $S = 5,3$ час., $G_1 = 3,5$ час., $T = 12,4$ час.

Из представленных данных (табл. 1, 2) видно, что обработка азотистым ипритом в фазе G_2 вызывает перестройки хромосом спустя 4 час., между тем щели появляются намного раньше — через 2 час. Максимальное количество щелей при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М наблюдается спустя 4 час., а при концентрации 10^{-6} М — 6 час.

В дальнейшем количество перестроек возрастает, а щелей — уменьшается.

Из табл. 3 видно, что щели начинают появляться через один час, после воздействия азотистым ипритом. В партии семян 1968 г. количество щелей больше, чем в партии семян 1969 г.

Исходя из этого, можно предполагать, что процесс образования щелей имеет некоторую протяженность и, по-видимому, определяется внутриклеточными физиологическими процессами. Результаты настоящих экспериментов сходны с таковыми, описанными Ривеллом /5, 6/, при использовании физического мутагена на *V.faba*. Это сходство указывает на близость процессов проявления щелей при радиационном и химическом мутагенезе /4/.

Можно полагать, что нарастание числа пробелов в старых семенах обусловлено повышенном проницаемости клеточных стенок. Изложенное дает основание полагать, что в отличие от перестроек хромосом образование пробелов носит незадержанный характер. Минимальный период времени, необходимый для возникновения щелей, вероятно, несколько больше тридцати минут. Через один час после обработки азотистым ипритом выход щелей достигает уже значительного уровня, (табл. 3).

A. S. Voskanyan, Yu. A. Mitrofanov

THE COMPARING STUDY OF CHROMOSOME ABERRATION AND GAPS

S u m m a r y

The results of experiment show that the gaps are manifested quicker than aberrations.

In old semens the quantity of gaps is much than in young ones.

Probably, that is connected with mutagen's flow and cells' walls penetration.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Анализ цитогенетического азотистого иприта в двух клеточных поколениях. Цитология и генетика, № 5, стр. 422-425, 1972.
2. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Мутагенный эффект азотистого иприта в клетках. Биол. журнал Армении, т. XXV, № 8, стр. 42-48, 1972.

3. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. Самостоятельное и совместное действие радиации и ингибиторов синтеза ДНК и белка на клетки. Генетика, т. У1, № 3.
4. Елисенко Н. Н. Первичные и вторичные процессы в хромосомах растений при модификации радиационного поражения. Канд. дисс., ИОГЕН АН СССР, 1971.
5. Revell S.H. A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations and its relevance to theorise for mode of action of chemical agents. Ann. New York Acad. Sci., 68, 802, 1958.
6. Revell S.H. The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberration induced by ionizing radiation Pzoc. Roy. Sec. London, B 150, 563, 1959.