

А. З. Восканян, Р. А. Азатян, М. С. Закарян

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА ДНК 5-АУ НА ОБЛУЧЕННЫЕ КЛЕТКИ *CREPIS CAPILLARIS* В ФАЗАХ G_1 И S

В последние годы в области экспериментального мутагенеза повысился интерес к вопросам генетических повреждений организмов не только на уровне хромосомы, но и на ДНК.

В исследованиях этого направления перспективным является изучение модификации радиационного нарушения ингибиторами клеточного метаболизма, в особенности ингибиторами синтеза ДНК [1-5].

Ингибиторы, подавляя синтез соответствующих предшественников, блокируют внутрихромосомные процессы и приводят к изменению функционирования хромосомы.

Использование ингибиторов синтеза ДНК в пострадиационный период дает возможность обнаружить генетическую роль биохимических процессов, ответственных за структурно-наследственную надежность хромосом. Такой подход в изучении структурных мутаций поможет определить, в каком отрезке времени митотического цикла подвергаются реализации предмутационные потенциальные изменения и каким образом они проходят свою начальную форму в хромосоме.

Исследование механизмов таких процессов даст возможность понять природу перестроек хромосом и по-новому оценить процессы радиационного мутагенеза.

В настоящей работе приводятся результаты изучения действия ингибитора синтеза ДНК 5-АУ на появление хромосомных aberrаций в облученных клетках корневой меристемы *Crepis capillaris* в фазах G_1 и S . Исследование проводили на воздушно-сухих семенах 5-месячного хранения. Для цитогенетических исследований семена *Crepis capillaris* удобны тем, что все клетки, находящиеся в предсинтетическом периоде (G_1) интерфазы, являются естественно-синхронизированной популяцией.

Синтез ДНК (S) начинается через 8-10 час. после замачивания и кончается через 24-26 час. [1].

Спустя 10 час. после облучения, т. е. перед началом синтеза, семена переносили в раствор 5-АУ (500 $МКГ/мл$), где их держали в течение 6; 12; 18 и 24 час.

Часть семян сразу после облучения обрабатывали 5-АУ в течение 10 час., т. е. в фазе G_1 .

Самки проращивали в термостате при 25°C в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 0,01% раствором колхицина.

Облучение рентгеновскими лучами в дозе 10 и 15 кр проводили на аппарате РУМ-11 (напряжение 185, сила тока 15мА, без фильтра, мощность дозы 450 р/мин.).

Корешки в каждом варианте фиксировали в четыре срока в смеси уксусной кислоты и спирта (1:3). Учет перестроек хромосом проводили в метафазах первого деления на давленных ацетокарминовых препаратах. В каждом сроке фиксации просматривали не менее 8 корешков.

Результаты экспериментов по изучению перестроек хромосом в клетках *Crepis capillaris* отражены в табл. 1, 2.

Как видно из табл. 2, естественное мутирование составляет $0,4 \pm 0,01$. Аберрации были хромосомного и хроматидного типа с преобладанием последнего. Клетки, облученные в фазе C_2 дали общий выход аберраций при дозе 10 кр $23,9 \pm 0,74$, а при дозе 15 кр — $33,1 \pm 0,84$. Аберрации в основном были хромосомного типа: асимметричные и симметричные обмены, кольца и инверсии. Хроматидные перестройки — хроматидные делеции, изолюкусные разрывы с неслиянием проксимальных и дистальных концов — составляли небольшое количество. Фрагменты как хромосомного типа, так и хроматидного происхождения также были в незначительном количестве.

5-АУ при обработке клеток в фазах C_2 и S не индуцировал перестроек хромосом, хотя по литературным данным ингибиторы синтеза ДНК обладают мутагенным эффектом /1-7/.

Если в фазе C_2 5-АУ не модифицировал радиационный эффект, то в фазе S особенно во время пика синтеза ДНК (18 час.), он вызвал резкое повышение числа клеток с аберрациями. По-видимому, это можно объяснить тем, что ингибирующее действие 5-АУ в небольшой степени проявляется во время активного синтеза ДНК. А это, вероятно приводит к допорожению радиационных повреждений.

Исследования Килмана и Хартли /5, 8/ показывают, что модифицирующий эффект проявляется в фазе C_2 вследствие подавления репаративного синтеза ДНК. Доводы этих авторов сомнительны, так как они работали без радиоавтографических экспериментов с семенами *Vicia faba*, клетки которых спонтанно находятся в состоянии асинхронности. Они предполагают существование специфического типа ДНК, синтезирующегося в конце S фазы, которая необходима для сохранения целостности ДНК. А подавление этого ДНК ингибиторами в C_2 приводит к нарушению структуры хромосом.

Вейс и Толмач /9/, изучая модифицирующий эффект некоторых ингибиторов синтеза ДНК, показали, что радиационный эффект можно модифицировать не только при введении их сразу после облучения, но и спустя несколько часов. Эти авторы, как Килман и Хартли, подробно не изучали фазовые периоды и не придавали значения асинхронности клеток изучаемого объекта, и поэтому при анализе полученных данных пришли к ошибочным выводам.

Модификацию радиационного эффекта ингибиторами синтеза ДНК изучали и другие исследователи /1-3, 10, 11/, но с точки зрения структурных мутаций интересны работы Тейлора (10) и его сотру-

Таблица 1

Уровень мутирования клеток и спектр структурных мутаций хромосом при облучении семян
Crepis capillaris 10 кр и обработке 5-АУ в разные периоды интерфазы

Варианты опыты		Число просмотренных метафаз	Число клеток с перестройками, %	Общее число перестроек, %	Количество перестроек на 100 клеток							
					Асимметричные обмены	Симметричные обмены	Кольца	Инверсии	Микрофрагменты	Хроматидные делеции	Изохроматидные делеции	
Контр. естеств. мутиров.		4125	0,4±0,086	0,4±0,086	0,02±0,02	-	-	-	0,07±0,04	0,07±0,04	0,2±0,07	
Облучение		3251	21,1±0,71	23,9±0,74	12,6±0,58	7,9±0,47	2,4±0,27	0,2±0,08	0,2 ±0,08	0,09±0,05	0,4±0,1	
Инкубация 5-АУ	10 час. фаза G ₂	5-АУ	0,3 ±0,08	0,3±0,08	0,02±0,02	-	-	-	0,09±0,045	0,06±0,036	0,2±0,068	
		10кр+5-АУ	3323	22,7±0,72	24,9±0,75	12,1±0,56	9,1±0,50	2,4±0,27	0,06±0,04	0,5 ±0,12	0,1 ±0,05	0,6±0,13
	6 час. фаза S	5-АУ	4125	0,3 ±0,085	0,3±0,85	0,02±0,16	0,04±0,22	-	-	0,04±0,22	0,2 ±0,69	-
		10кр+5-АУ	3385	35,3±0,82	37,2 ±0,83	20,0±0,68	12,6±0,57	3,1±0,30	0,09±0,051	0,7 ±0,14	0,14±0,064	0,6±0,13
	12 час. фаза S	5-АУ	3245	0,3±0,086	0,3±0,086	0,03±0,03	-	-	-	0,06±0,042	0,9 ±0,052	0,09±0,062
		10кр+5-АУ	3099	39,5±0,88	41,9±0,88	22,4±0,75	14,4±0,62	3,9±0,35	0,03±0,03	0,5 ±0,13	0,1 ±0,057	0,5 ±0,13
	18 час. фаза S	5-АУ	4257	0,3±0,084	0,3 ±0,084	0,02±0,02	-	-	-	0,04±0,03	0,07±0,04	0,1 ±0,048
		10кр+5-АУ	3114	49,6±0,89	51,3±0,89	28,5±0,81	17,7±0,68	4,1±0,35	0,03±0,03	0,3 ±0,08	0,09±0,053	0,52±0,12
	24 час.	5-АУ	3637	0,4±0,1	0,4±0,1	0,03±0,03	0,06±0,037	-	-	0,1±0,053	0,08±0,015	0,1 ±0,052
		10кр+5-АУ	3040	43,2±0,91	44,9±0,90	25,0±0,78	14,9±0,64	3,8±0,35	0,07±0,045	0,5±0,13	0,07±0,045	0,6 ±0,14

Таблица 2

Уровень мутирования клеток и спектр структурных мутаций хромосом при облучении семян
Crepis capillaris 15 кр и обработке 5-АУ в разные периоды интерфазы

Варианты опыта		Число просмотренных метафаз	Число клеток с перестройками, %	Общее число перестроек, %	Количество перестроек на 100 клеток								
					Асимметричные обмены	Симметричные обмены	Кольца	Инверсии	Микрофрагменты	Хроматидные делеции	Изохроматидные делеции		
Контроль естественный		4125	0,4±0,086	0,4±0,086	0,02±0,02	-	-	-	0,07±0,04	0,07±0,04	0,2±0,07		
Облучение		3085	31,3±0,83	33,1±0,84	15,8±0,88	11,5±0,57	4,3±0,36	0,08±0,04	0,8±0,14	0,03±0,03	0,8±0,18		
Инкубация 5-АУ	10 час. фаза G ₂	5-АУ	4334	0,3±0,08	0,3±0,08	0,02±0,02	-	-	0,08±0,045	0,08±0,08	0,2±0,088		
		5кр+5-АУ	3162	3,19±0,82	34,9±0,85	18,6±0,89	11,1±0,58	4,0±0,35	0,12±0,06	0,5±0,13	-	0,8±0,13	
	6 час. фаза S	5-АУ	4125	0,3±0,085	0,3±0,085	0,02±0,02	0,04±0,02	-	-	0,04±0,02	-	0,2±0,089	
		15кр+5-АУ	3079	4,05±0,89	4,28±0,89	23,5±0,76	14,0±0,82	4,0±0,35	0,08±0,04	0,5±0,13	0,03±0,03	0,5±0,13	
	12 час. фаза S	5-АУ	3245	0,3±0,088	0,3±0,08	0,03±0,03	-	-	0,08±0,042	0,08±0,06	0,09±0,05	0,09±0,05	
		15кр+5-АУ	3003	45,6±0,89	4,87±0,91	27,5±0,81	15,8±0,87	4,0±0,36	-	0,8±0,18	0,1±0,08	0,8±0,14	
	18 час. фаза S	5-АУ	4257	0,3±0,084	0,3±0,084	0,02±0,02	-	-	0,04±0,03	0,07±0,04	0,1±0,048	0,1±0,048	
		15кр+5-АУ	2885	58,2±0,82	60,0±0,90	34,3±0,87	20,1±0,74	3,8±0,35	-	0,5±0,13	0,13±0,058	0,8±0,14	
	24 час. фаза S	5-АУ	3837	0,4±0,1	0,4±0,1	0,03±0,03	0,05±0,037	-	-	0,1±0,053	0,08±0,015	0,1±0,052	0,1±0,052
		15кр+5-АУ	3104	47,2±0,89	50,5±0,88	27,3±0,79	18,0±0,89	4,4±0,37	0,1±0,057	0,3±0,088	0,03±0,03	0,42±0,11	

ников. Они показали, что модификация цитогенетического эффекта радиации сопровождается фрагментацией хромосом, возрастанием числа перестроек без соединения.

Тэйлор связывает модифицирующий эффект ФУДР с фазой S' , т.е. репликацией ДНК. Данные ряда авторов /1 - 3/, как и наши, в некоторой степени совпадают с данными Тэйлора и его сотрудников. Результаты наших экспериментов показывают, что модификация постмутационного повреждения связана с фазой S . Во время 18-часовой обработки синтез ДНК находится в пике. В этом периоде происходит столкновение репаративного и репликативного синтезов /1/, в ходе которого включаются во взаимодействие поврежденные участки хромосомы, и хромосома переходит в состояние необратимого повреждения - окончательно разрывается на основе кроссингового синтеза или же торможения синтеза ДНК ингибитором 5-АУ. Оно приводит к выпадению неуклеотидов или включению неспецифических предшественников ДНК, которые впоследствии проявляются в виде хромосомных aberrаций. В начальных периодах (обработка 5-АУ 6; 12 час.), когда репликативные процессы протекают слабо, 5-АУ не проявляет сильного модифицирующего эффекта.

Фактически при удалении от начала синтеза ДНК (обработка 5-АУ 24 час.), когда репликативные процессы идут на затухание, наблюдается снижение числа aberrаций. Это, по-видимому, связано с постепенным восстановлением нормальной функции репаративного синтеза по оси поврежденной ДНК.

Из представленного материала видно, что как при 10 кр, так и при 15 кр наблюдается одна и та же закономерность. Отсюда вытекает, что в основе модифицирования рентген эффекта лежит один и тот же механизм, не зависящий от дозы облучения.

A. S. Voskanyan, R. A. Azatian, M. S. Zakarian

INHIBITOR ACTION OF SYNTHESIS DNA 5-AU ON RAYED CELLS IN PHASES G_1 AND S .

S u m m a r y

The results of experiments show that modifying property 5-AU is connected with the phase S .

When the reduplicated processes of DNA come to an end, the total sum of aberrations are decreased.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. Самостоятельное и совместное действие радиации и ингибиторов синтеза ДНК и белка на клетки *Crepis capillaris*. Генетика, т. 6, № 3, 1970.
2. Митрофанов Ю. А., Велюкова В. В., Восканян А. З. Неко-

торые вопросы механизма образования перестроек хромосом. Генетика, т. 8, № 1, 1972.

3. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. Влияние пурамицина и 5-фтор-2-дезоксигидроуридина на процессы образования перестроек хромосом в облученных семенах.
4. Bell S., Wolff S. Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 51, № 2, 195, 1964.
5. Kihlman B.A., Hartley B. Interphase sensitivity to the chromosome breating effect of 2-deoxyadenosine; an autoradiographe stuady. *Mut. Res.*, 4, 771, 1967.
6. Kihlman B.A. Deoxyribonucleotide synthesis and chromosome breakage. *Edinburgh, Oliver Boyd*, P 108, 1966.
7. Kihlman B.A., Hartley B. Hydroxyurea effect on vicia faba chromosomes previously exposed to x-rays to radiomimetis chemicals. *Exptl. Cell. Res.* 48, 629, 1967.
8. Kihlman B.A., Hartley B. Effect hydroxyurea and oter inhibitors of DNA synthesis on vicia chromosomes previously exposed to x-rays or to radiomimetic chemicals. *Her.* 59, 1968.
9. Weiss B., Tolmach L. Modification of x-ray-unduced Killing of Hela S 3 cells by inhibitors of DNA synthesis *Biophysical* 7, 779, 1967.
10. Taylor J.H., Haut W.F., Tung S. Effects of fluorodeoxyuridine en DNA replication, chromosome breakage and reunion. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 48, 190, 1962.
- II. Yana M.K., Mautshen J., Degrawe N. On combined effects of deoxyflour-ouridine (FuOR) With radiations and ethylmethansylphonate (EMS) on cromosomes. *Experientia*, 22, N 2, 581, 1966.