

Г. Г. БАТИКЯН, А. Х. ДАНИЕЛЯН, С. Н. МАРТИРОСЯН, А. С. КАРАГЕЗЯН

ВЛИЯНИЕ АТФ И КИНЕТИНА НА ЧАСТОТУ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМОСОМ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ В СЕМЕНАХ CREPIS CAPILLARIS

Одной из главных проблем генетического эффекта ионизирующих излучений является защита наследственных структур в клетке от поражающего действия радиации. В настоящее время получены доказательства, что генетические эффекты радиации могут быть модифицированы химическими, физическими факторами, при вмешательстве до облучения, в момент облучения и после облучения [3, 4, 6, 14, 15, 20, 23, 25]. В качестве таких дополнительных воздействий использованы различные химические и физические факторы: кислород, влажность, группа «защитных соединений», цианистый калий и т. д.

Изучение защитного действия веществ, принадлежащих к различным классам химических соединений и обладающих различным механизмом действия, не только помогает отысканию средств борьбы с лучевым поражением, но и позволит сделать некоторые заключения о механизме действия излучений на биологические объекты.

Известно, что применение химических веществ перед облучением так же эффективно, как и после облучения [18]. Среди известных противолучевых средств цистеин является одним из наиболее изученных. Большинство опытов показывает, что цистеин проявляет защитный эффект и в случае, когда он применяется до облучения, и при воздействии после облучения, уменьшая число клеток с перестройками хромосом [5, 6].

Непременным условием репарации является активный энергетический метаболизм. Угнетение дыхания, блокада сопряженного фосфорилирования увеличивают количество аберраций. С этой точки зрения определенный интерес представляли данные, полученные в опытах с радиацией [19], показавшие, что для воссоединения разорванных концов хромосом необходима энергия, которую дают окислительные процессы и АТФ с ее макроэргическими связями (АТФ участвует в различных звеньях белкового, углеводного и жирового обмена веществ). Поэтому добавление извне АТФ, глюконата Са, 6-фосфоглюконата, глюкозы и др. как бы создает в клетке дополнительный источник энергии, который используется в репарационных процессах. Эта точка зрения высказывается многими исследователями [1, 8—10, 16—18, 21, 22, 24, 26].

Целью настоящей работы было показать модифицирующее действие АТФ и кинетина на радиационное поражение клеток при разной экспозиции в этих растворах и при воздействии ими до или после облучения.

В качестве показателя действия радиации на клетки принималась частота метафаз с хромосомными абберациями в 1 митозе после начала прорастания. Эффект защиты выражался в снижении количества перестроек хромосом, вызванных рентгеноблучением.

Материал и методика работы. Материалом для исследования служили воздушно-сухие семена *Crepis capillaris*, облученные рентгеновскими лучами в дозе 4000 р и развивавшиеся в темноте на влажной фильтровальной бумаге при $t = 24 \pm 1^\circ\text{C}$.

В меристематических клетках корешков, фиксированных по Карнуа, окрашенных ацетокармином, анализировались перестройки хромосом в стадии метафазы. Это дает возможность при разборе учитывать все основные типы хромосомных перестроек (делеции, симметричные и асимметричные транслокации, кольца, инверсии, микрофрагменты), а также неидентифицированные нарушения, которые из-за их сложности или неудачного расположения хромосом в метафазной пластинке не были разобраны.

По каждому варианту из 8—12 корешков анализировалось не менее 1000 клеток. В качестве дополнительного воздействия была использована АТФ, которая является макроэргическим соединением, играющим важную роль в процессах окислительного фосфорилирования, и кинетин, известный как стимулятор роста.

Водный раствор АТФ в расчете 4 мг на 25 см³ дистиллированной воды приготавливался непосредственно перед употреблением. В испытуемом растворе семена выдерживали 30 мин. и 2 часа. Обработанные семена были поделены на 2 порции. Одну порцию семян промывали под проточной водопроводной водой в течение 1 часа, другую часть без промывки ставили на проращивание. Так как при сопоставлении данных опытов с промывкой и без промывки стало ясно, что существенных различий между ними нет, эти два варианта при изложении материала мы не разграничивали.

Обработка семян в растворе АТФ производилась через 8 дней после облучения, затем проводились посев и фиксация материала. В случае, когда обработка предшествовала облучению, семена высушивались до воздушно-сухого состояния и затем уже подвергались облучению.

Во всех случаях семена замачивали в обычной воде и за два часа до фиксации помещали в 0,05% раствор колхицина. Фиксацию проводили через 24—28 час. после начала замачивания, для изучения диплоидных клеток. Параллельно ставился контроль, при котором семена соответствующее время (30 мин. и 2 часа) выдерживали в дистиллированной воде.

Принцип обработки кинетином был тот же, только экспозиция в 0,05% водном растворе была 1 и 3 часа.

Обсуждение данных. Результаты подсчета перестроек хромосом при обработке их АТФ до и после облучения семян дозой 4000 р приведены в табл. 1.

Таблица 1

Количество аберрантных клеток при обработке семян *Speris capillaris* АТФ до и после облучения р-лучами (в %)

Вариант	Время	После облучения	До облучения
Контроль в H ₂ O	0,5 час.	20,06±1,31	21,02±1,18
В растворе АТФ	0,5 час.	14,25±1,01	9,77±0,93
Контроль в H ₂ O	2 час.	20,94±1,33	20,66±1,26
В растворе АТФ	2 час.	7,97±0,84	7,73±0,83

При сравнении опытных данных с контрольными (без введения защитного вещества) видно снижение процента перестроек хромосом при введении АТФ. Намачивание семян в растворе АТФ дает реальное снижение процента хромосомных аберраций по сравнению с семенами, продержанными в воде, почти в 3 раза. Этот результат согласуется с наблюдениями других исследователей. По данным Вольфа и Луиппольда [27], количество аберраций под влиянием АТФ, которая ускоряет воссоединение разрывов в их исходном положении, снижается.

Наши данные получены в экспериментах, где концентрация АТФ постоянна, но время обработки различно. При увеличении времени обработки АТФ количество аберраций уменьшалось в 2 раза, т. е. с 14,25% до 7,97%. Таким образом, мы наблюдали прямую зависимость между временем воздействия и защитным эффектом АТФ. Из наших исследований видно, что и пред- и постобработка АТФ дают почти тот же защитный эффект (табл. 1).

Полученные факты могут быть объяснены следующим образом. Ионизирующее излучение наряду с истинными поломками хромосом обуславливает также и появление потенциальных изменений. Судьба последних зависит от тех условий, в которые клетки попадают до или после облучения. В одних случаях потенциальные нарушения возвращаются к норме, в других — реализуются в поломки. Это положение, к которому присоединяемся и мы, неоднократно высказывалось рядом авторов и имеет экспериментальное обоснование [8—11].

Нами выявлен также спектр хромосомных нарушений (табл. 2).

Следует отметить, что все аберрации, наблюдаемые в метафазах первого деления клеток, относятся к перестройкам хромосомного типа. Этого и следовало ожидать, ибо ряд авторов [7, 11—13] установил, что у семян *St. capillaris* все клетки в зародышевой меристеме находятся в стадии G₁. В подсчитываемых нами клетках отмечены и учтены все типы хромосомных нарушений. Среди нарушений, обнаруживаемых в облученных клетках митотически активных тканей, наибольшее число аберраций в процентном соотношении приходится на хромосомные транслокации (асимметричные и симметричные), а затем уже на делеции, кольца, микрофрагменты, инверсии (табл. 2).

Как известно, нормальный кариотип *Speris capillaris* содержит 3 пары хромосом (рис. 1), а при разборе материала наряду с отмеченными

Таблица 2

Мутирование клеток *Sceris capillaris* при действии р-лучей и модифицирование спектра мутаций хромосом с помощью АТФ (в %)

Вариант обработки	Число метафаз	Число измененных метафаз	Хромосомные делеции	Хромосомные транслокации	Кольца		Инверсии	Микрофрагменты
					центроммерные	ацентрические		
После облучения								
Контроль в Н ₂ О 0,5 час.	1104	20,06	1,34	5,24	0,18	1,43	0,101	1,82
В растворе АТФ 0,5 час.	1043	14,25	1,17	4,79	0,13	0,09	0,09	1,24
Контроль в Н ₂ О 2 час.	1099	20,94	1,45	6,82	0,14	1,09	—	3,00
В растворе АТФ 2 час.	1028	7,97	0,82	2,14	0,17	0,08	—	0,87
До облучения								
Контроль в Н ₂ О 0,5 час.	1202	21,02	2,48	5,18	0,16	2,33	—	1,99
В растворе АТФ 0,5 час.	1013	9,77	1,08	3,55	0,108	0,39	—	1,07
Контроль в Н ₂ О 2 час.	1027	20,66	2,52	4,91	0,18	2,96	0,19	1,46
В растворе АТФ 2 час.	1021	7,73	0,48	2,44	0,14	0,09	—	0,76

видами хромосомных перестроек (рис. 2, 3, 4) имелось небольшое число клеток со сложными нарушениями.

Метафазная пластинка, в которой хромосомы претерпели 4 разрыва (по одному разрыву в С и А₁ хромосомах и 2 разрыва в А₂ хромосоме), схематично представлена на рис. 4. В результате этого участок



Рис. 1. Диплоидный набор хромосом *Sc. capillaris*. Видны три пары хорошо идентифицированных хромосом (АА, СС, ДД).



Рис. 2. Хромосомная перестройка—асимметричный хромосомный обмен между хромосомами А и Д. Видны дицентрик (→) и пара фрагментов (→).

одной А хромосомы вставился в середину другой. Следовательно, рентгеновские лучи могут вызывать не только хромосомные нарушения типа делеций, колец и т. д., но и более сложные нарушения в пределах одной клетки.

Перед нами стояла также задача выяснить, может ли кинетин модифицировать радиационное повреждение хромосомного аппарата клеток при его применении до или после р-облучения, зная, что непосредственным результатом облучения является образование потенциальных повреждений, которые позже реализуются в виде хромосомных аберраций.

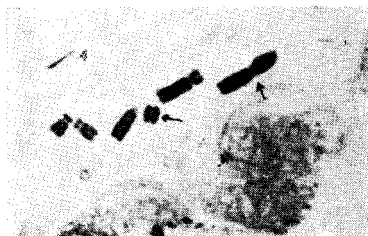


Рис. 3. Хромосомная перестройка—асимметричный хромосомный обмен между коротким плечом А и длинным плечом Д хромосомы (→).

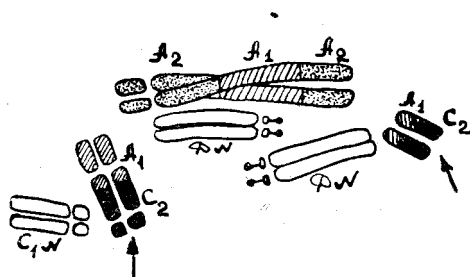


Рис. 4. Сложная хромосомная перестройка—участок одной А хромосомы вставился в другую А хромосому (→). Асимметричный хромосомный обмен между оставшимся центромерным куском одной А хромосомы и С хромосомой. Виден дицентрик (→) и пара фрагментов (→) РА-4 ок. $7 \times$ об. 90.

В принципе все, что выше было сказано о действии АТФ, можно отнести и к кинетину (табл. 3).

Таблица 3

Количество аберрантных клеток при обработке семян *Crepis capillaris* кинетином до или после облучения р-лучами (в %)

Вариант	После облучения	До облучения
Контроль 1 час в H_2O . . .	$22,6 \pm 1,323$	$21,4 \pm 1,232$
Обработка 1 час в кинетине . .	$13,04 \pm 1,039$	$14,6 \pm 1,118$
Контроль 3 час. в H_2O . . .	$20,00 \pm 0,0037$	$19,65 \pm 1,295$
Обработка 3 час. в кинетине . .	$11,95 \pm 1,020$	$12,05 \pm 1,291$

Как видим из данных, модифицирующее действие кинетина сравнительно слабее, чем АТФ.

Обобщая наши данные, можно сказать, что АТФ является макроэргическим соединением, играющим важную роль в процессах окислительного фосфорилирования, кинетин—стимулятор роста, однако, несмотря на разный характер в условиях радиационного пред- или постдействия, названные вещества обнаруживали почти одинаковую способность — модифицировать генетические повреждения, индуцированные облучением.

Հ. Գ. ՔԱՏԻԿՅԱՆ, Ա. Խ. ԴԱՆԵԼՅԱՆ, Ս. Ն. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Ա. Ս. ԿԱՐԱԳՅԱՆՉՅԱՆ

**ԱՏՖ-Ի ԵՎ ԿԻՆԵՏԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՈՒՄԻՅ
ԱՌԱՋԱՅԱԾ ՔՐՈՄՈՍՈՄՍԱՅԻՆ ԽԱՆՏՈՒՄՆԵՐԻ ՀԱՃԱՍԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ
Crepis capillaris ՍԵՐՄԵՐՈՒՄ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Իոնացնող ճառագայթումների զենետիկական էֆեկտի պարզաբանման կարևոր պրոբլեմներից մեկը՝ ճառագայթաճարման վնասակար ազդեցության վերացման հարցն է:

Ներկայումս ստացված են բազմաթիվ ապացույցներ այն մասին, որ ճառագայթաճարման զենետիկական էֆեկտը կարելի է մեղմացնել (մոդիֆիկացիայի ենթարկել) քիմիական, ֆիզիկական գործոններով: Իս հնարավորություն է տալիս գտնելու ոչ միայն ճառագայթաճարման վնասակար ազդեցության դեմ պաշարելու միջոցներ, այլև որոշ նախապայմաններ է ստեղծում պարզաբանելու կենսաբանական օբյեկտների վրա ճառագայթաճարման ազդեցության մեխանիզմը:

Մեր նպատակն է եղել ցույց տալ ԱՏՖ-ի և կինետինի մոդիֆիկացնող ազդեցությունը ճառագայթաճարմած սերմերի բջիջներում:

Սերմերը ճառագայթաճարմվել են 4000 ռ դոզայով և մշակվել փորձարկվող լուծույթներում ճառագայթաճարմից առաջ կամ հետո:

Պարզվել է, որ սերմերի թրջումը ԱՏՖ-ի 0,016% և կինետինի 0,05% լուծույթներում տալիս է քրոմոսոմային խախտումների տոկոսի ռեալ իջեցում (մոտ 3 անգամ): Կինետինի դեպքում այդ ազդեցությունը արտահայտվում է համեմատաբար թույլ:

Մեր կողմից նկատվել է նաև ուղղակի կախում ԱՏՖ-ի ու կինետինի ազդման տեղություն և պաշտպանական էֆեկտի միջև:

Ուսումնասիրված է նաև աբերացիաների սպեկտրը, որից պարզվել է, որ մերիսթեմատիկ բջիջներում նշված բոլոր խտորոշումները քրոմոսոմային տիպի փոփոխություններ են:

ԱՏՖ-ը մակրոէրգիկ միացություն է, որը կարևոր դեր է խաղում օքսիդացնող ֆոսֆորացման պրոցեսներում, կինետինը՝ ածման խթանիչ: Չնայած իրենց տարբեր բնույթին, այդ նյութերն ինչպես նախքան, այնպես և ճառագայթաճարման հետազդեցության պայմաններում ցուցաբերում են նույն պաշտպանական էֆեկտը, իջեցնելով քրոմոսոմային խտորոշումների քանակը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дубинин Н. П., Руднева С. В., Щербаков В. К. Генетика, 9, 1967.
2. Дубинин Н. П., Суйкова Л. А., Щербаков В. К. ДАН СССР, 166, 5, 1214, 1966.
3. Корогодин В. И., Лучник Н. В. Радиобиология, информ. бюлл. 7, 1965.
4. Лучник Н. В. Биохимия, 23, 146, 1958.
5. Лучник Н. В., Царапкин Л. С. Цитология, I, 1, 71, 1959.
6. Лучник Н. В., Царапкин Л. С. ФАН, 124, 1: 213—216, 1959.
7. Немцева Л. С. Радиобиология, 5, 126, 1965.

8. Нуждин Н. И., Дозорцева Р. Л., Самохвалова Н. С. Тр. Ин-та генетики АН СССР, 32, 4, 1965.
9. Парибок В. П., Крупнова Г. Ф., Королева Ю. И. ДАН СССР, 169, 4, 1966.
10. Протопопова Е. М. Тез. симпозиума Ин-та биофизики АН СССР, т. 2, 1965.
11. Протопопова Е. М., Шапиро Н. И. Генетика, 1, 1968.
12. Протопопова Е. М., Шевченко В. В., Генералова М. В. Генетика, 6, 1967.
13. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С. Генетика, 1, 1965.
14. Сидоров Б. Н., Хвостова В. В. Итоги науки, III, изд. АН СССР, 1960.
15. Эйндус Л. Х., Ганасси Е. Э. Биофизика, 5, 5, 1960.
16. Beatty A. V., Beatty J. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 46, 11, 1960.
17. Beatty A. V., Beatty J. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 49, 4, 1963.
18. Beatty A. V., Beatty J. W. Genetics, 53, 1, 1966.
19. Beatty A. V., Beatty J. W., Collins J. L. Am. J. Bot., 43, 5, 1956.
20. Guy Deysson, Truhaut Rene. Compt. cent. Soc. biol., 160; 2, 1966.
21. Zamagaiti. Sausekutai, Kromosomo, 51—52, 1962.
22. Matsuura H., Saho T., Tanifuji S., Iwabachi M. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 5, 8, 2—3, 1965.
23. Nucumi Ota Norico. J. Breed., 14, 1, 1964.
24. Rieger R., Michaelis A. Naturwissenschaften, 5, 139, 1961.
25. Tiruhaut Rene, Deysson Guy, Compt. rend., Soc. biol., 160, 2, 1966.
26. Wolff S. J. Cellular and Compar. Physiol., 58, 3, 151, 1961.
27. Wolff S., Luippold H. E. Proc. Nat. Acad. Sc. USA. 42:510, 1956.