

Ю. А. МИТРОФАНОВ, А. З. ВОСКАНЯН

МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ АЗОТИСТОГО ИПРИТА В КЛЕТКАХ *CREPIS CAPILLARIS*

Сравнительный анализ нарушений хромосом в метафазах и анафазах

Азотистый иприт эмбихин (HN_2) удобен при изучении индуцированного мутационного процесса как алкилирующий агент с небольшим периодом полураспада в водной среде. Несколько лет назад HN_2 применялся при лечении рака, в настоящее время он заменен менее токсичным и имеющим больший период полураспада производным—новоэмбихином.

Исследования мутагенного действия HN_2 имеются [8, 11, 12], однако вопрос о механизме образования мутаций, и в частности перестроек хромосом, индуцированных HN_2 , остается нерешенным. Не ясен путь превращения алкилированного основания или оснований ДНК в разрыв и перестройку хромосом. В 1969 г. опубликована обширная работа Ивенса и Скотта [9], посвященная анализу цитогенетического эффекта HN_2 у *Vicia faba*. Изучение проведено на фоне радиоавтографических экспериментов. При этом Ивенсом—сторонником обменной гипотезы образования перестроек хромосом Ривела—были получены данные, не соответствующие указанной гипотезе.

Ивенс и Скотт рассматривают молекулярный механизм действия на ДНК (образование межнитевых сшивок между остатками молекул гуанина ДНК) и пытаются связать его с образованием перестроек хромосом у высших организмов на основе гипотезы ошибочной репликации (*mis-replication*) и работы репаративных систем. Авторы делают ряд дополнительных допущений (смена полуконсервативной репликации на консервативную и др.), что придает их гипотезе довольно умозрительный характер.

Настоящая работа ставила цель изучить реальность повреждений хромосом, возникающих в метафазах под действием HN_2 , на основе сопоставления данных по метафазному и анафазному анализу перестроек и других нарушений хромосом. Этому вопросу на растительных объектах посвящено небольшое количество работ, притом в области радиационного мутагенеза [7, 13]. Исследования, выполненные с клетками животных [1, 2], основаны на использовании дополнительного приема—воздействия гипотонического раствора, что следует учитывать при анализе данных.

Проведение экспериментов на *C. capillaris* позволило обойтись без

обработки гипотоническим раствором, а в некоторых случаях—без воздействия колхицина. Выбор обработки HN_2 обусловлен задержанным действием этого мутагена для перестроек хромосом и, как показали предварительные эксперименты, незадержанным действием для щелей.

Материал и методика. Исследования выполнены на *S. capillaris*, хромосомы которого удобны для проведения метафазного и анафазного анализов.

Материал готовили следующим образом: семена проращивали в термостате при 26° в течение 28—30 час., отбирали проростки и обрабатывали HN_2 (2,2-дихлордиэтилметиламин), $5 \cdot 10^{-7}$ М, в течение 15—17 мин. Затем материал промывали в водопроводной воде 10—15 мин. Проростки разбивались на 2 партии, одну из которых помещали на фильтровальную бумагу в чашки Петри с 0,01% раствором колхицина для анализа метафаз, а вторую—в чашки с водопроводной водой. Материал фиксировали смесью этилового спирта и уксусной кислоты (3:1) через 2, 4, 6, 8, 10 час. после обработки HN_2 .

Кроме этого, проведены эксперименты с бесколхициновой средой (метафазы и анафазы при этом анализировали в одних и тех же препаратах) для проверки возможного влияния колхицина на образование перестроек хромосом и щелей (гэпов).

В первых экспериментах колхицин применялся для отделения клеток первого после обработки HN_2 митоза от второго. Основной эффект его проявляется в разрушении веретена митотических клеток, клетки претерпевают колхициновый митоз без задержки фаз [6]. В связи с тем, что метафаза по продолжительности очень невелика (около 10 мин), анализ метафаз и анафаз выполнен на фиксированных препаратах без сдвига сроков фиксации (колхициновые телофазы не учитывались). Этот подход сохранялся при сравнении нарушений хромосом в анафазах и метафазах на неколхициновых препаратах. Были получены результаты, аналогичные данным предыдущих опытов. Как мутаген задержанного действия, HN_2 индуцировал перестройки хроматидного типа. Мутагенный эффект алкилирующих агентов, кроме того, характерен появлением небольшого числа слипаний хромосом. Типичные слипания в виде «сапожков» отмечались нами крайне редко. Концевые слипания не сопровождаются фрагментами. Нами были зарегистрированы мосты без фрагментов. При обсуждении результатов они не включались в перестройки.

Для дифференцировки пробелов (гэпов) от разрывов хромосом в метафазах использованы критерии Ривела [13]. Разрыв в анафазе также должен был удовлетворять этим критериям. Если фрагмент составлял непосредственное продолжение хромосомы, от которой он отделился, края не округлены и расстояние невелико (в некоторых случаях оно было больше толщины хроматиды), нарушение причислялось к категории гэпов.

Последовательные серии экспериментов с обработкой колхицином и без него проведены на семенах урожая одного года (1969 г.), при этом были получены сходные результаты.

Цитогенетические исследования выполнены на фоне экспериментов по определению фаз митотического цикла клеток в асинхронной популяции корневой меристемы проростков *S. capillaris* методом микрорадиоавтографии. Для этого проростки помещали в раствор тимидина- H^3 (5 мккюри/мл, 11 к/мМ) на 15 мин. В варианте с мутагеном тимидин- H^3 вводился до HN_2 .

Изучено действие HN_2 в концентрациях $5 \cdot 10^{-7}$ М и 10^{-6} М. Препараты покрывали фотоэмульсией типа М и экспонировали 14 суток. Радиоавтографические опыты проведены с материалом, подвергнутому воздействию колхицина.

Экспериментальная часть и обсуждение. На рисунке приведены данные радиоавтографического анализа динамики меченых митозов в асинхронной популяции клеток корешков *S. capillaris* после кратковременного (15 мин) введения тимидина- H^3 . HN_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М практически не влияет на длительность фаз митотического цикла. HN_2

в концентрации 10^{-6} М несколько отдалает вступление в митоз клеток, обработанных HN_2 в фазе S, в первый и второй митозы.

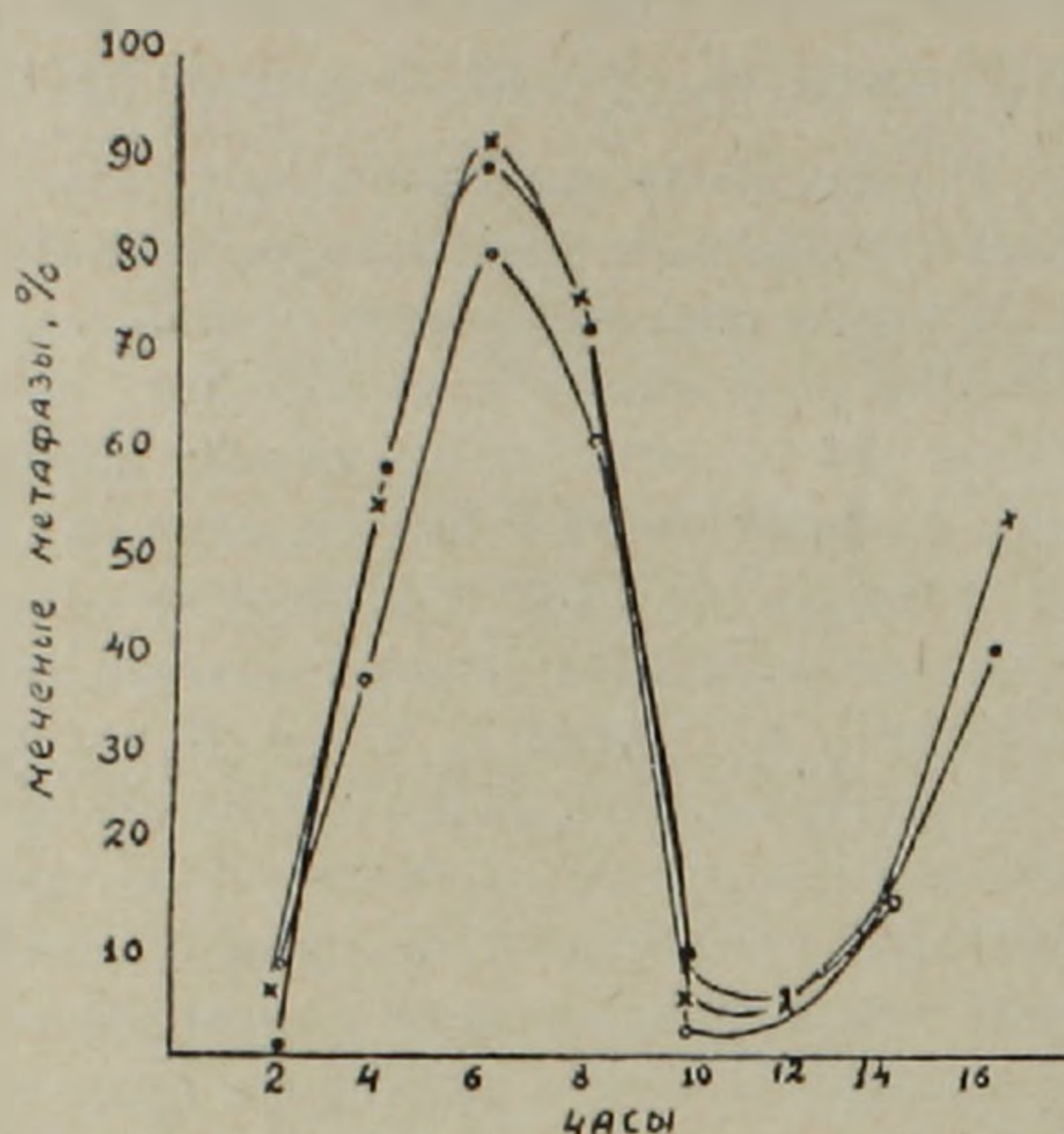


Рис. Динамика появления меченых митозов после кратковременного (15 мин) введения тимидина- H^3 в клетки асинхронной популяции проростков *C. capillaris*.

В норме минимальные $G_2 + M$ равны 2 час. или несколько меньше, средние $G_2 + M$ — 3.6 час., средняя S — 5.3 час., средняя G_1 — 3.5 час., весь цикл — 12.4 час.

Таким образом, длительность фаз M, G_2 и S сходна в проростках и прорастающих семенах *C. capillaris* [4]. Увеличение продолжительности цикла в прорастающих семенах происходит в основном за счет фазы G_1 .

Данные проведенных параллельно исследований по анализу перестроек хромосом и щелей в анафазах и колхициновых метафазах представлены соответственно в табл. 1 и 2.

На двухчасовую фиксацию (клетки, обработанные HN_2 в фазе G_2) HN_2 индуцирует щели (пробелы), но не разрывы хромосом. Это регистрируется и в анафазах, и в метафазах. Начиная с 4-часовой фиксации, когда вступают в митоз клетки, подвергнутые обработке в S, а с 8-го часа — в G_1 и т. д. фазах появляются, увеличиваясь в числе по мере удаления фиксации, перестройки хромосом. Для перестроек хромосом, индуцированных HN_2 , характерен типичный задержанный эффект, обусловленный необходимостью реализации их во время синтеза ДНК.

Клетки с перестройками в анафазах встречаются несколько чаще, чем в метафазах. Даже если вычесть из общего количества перестроек хроматидные мосты без фрагментов, которые невозможно отличить от концевых слипаний хроматид, разница в числе перестроек, обнаруживаемых анафазным и метафазным методами, сохраняется. Еще большая разница наблюдалась при учете пробелов, которые появлялись в анафазах в 2 раза чаще, а иногда и более часто, по сравнению с метафазами.

Сопоставляя соответствующие перестройки (табл. 1 и 2) — мосты в анафазах и дицентрики в метафазах, непарные фрагменты в анафазах и непарные фрагменты в метафазах (хроматидные концевые делеции,

Таблица 1

Появление перестроек хромосом и щелей после обработки проростков *S. capillaris* HN_2 ($5 \cdot 10^{-7}$ М). Анализ анафаз

Часы фиксации	Всего изучено анафаз	Число клеток с аберрациями, %	Число щелей на 100 клеток	Количество аберраций на 100 клеток					
				одиночные хроматидные фрагменты	парные фрагменты	мосты без фрагментов	мосты с фрагментами		микрофрагменты
							с одиночными	с парными	
Контроль	463	$0,6 \pm 0,3$	$0,94 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,02$	0	0	0	0
2	390	$0,3 \pm 0,03$	$2,8 \pm 0,3$	0	0	$0,3 \pm 0,02$	0	0	0
4	302	$4,6 \pm 1,35$	$6,3 \pm 1,4$	$2,4 \pm 0,8$	0	$0,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,7$
6	202	$10,0 \pm 2,2$	$19,09 \pm 2,7$	$5,4 \pm 1,5$	0	$0,3 \pm 0,2$	$3,6 \pm 1,3$	0	$4,09 \pm 1,4$
8	200	$16,0 \pm 2,6$	$10,0 \pm 2,7$	$6,0 \pm 1,5$	$2,5 \pm 0,9$	$4,0 \pm 1,3$	$2,5 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$3,5 \pm 1,3$
10	190	$22,1 \pm 3,1$	$4,7 \pm 1,6$	$15,8 \pm 2,6$	$2,0 \pm 1,1$	$1,1 \pm 0,7$	$6,8 \pm 1,8$	$3,2 \pm 1,3$	$3,2 \pm 1,3$

Таблица 2

Появление перестроек хромосом и щелей после обработки проростков *S. capillaris* HN_2 ($5 \cdot 10^{-7}$ М).
Анализ метафаз в препаратах, обработанных колхицином

Часы фиксации	Всего изучено метафаз	Число клеток с аберрациями, %	Число щелей на 100 клеток	Количество аберраций на 100 клеток						
				изолокусные разрывы				хроматидные разрывы	симметричные и асимметричные обмены (транслокации)	микрофрагменты и интерстициальные делеции
				NUpd	UpNud	NUpUd	Upd			
Контроль	2109	$0,05 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,04$	0	0	0	0	$0,05 \pm 0,05$	0	0
2	666	$0,15 \pm 0,15$	$1,2 \pm 0,41$	0	0	0	0	$0,2 \pm 0,15$	0	0
4	496	$1,02 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,5$	0	$0,205 \pm 0,1$	0	0	$0,6 \pm 0,3$	0	$0,4 \pm 0,2$
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	$9,06 \pm 1,1$	$2,5 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,35$	0	$1,5 \pm 0,4$
10	821	$12,7 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,08$	$2,2 \pm 0,5$

одиночные фрагменты, образующиеся в результате слияния дистальных фрагментов при изолокусном разрыве), микрофрагменты в анафазах и метафазах,— можно заметить, что они, кроме парных фрагментов и хроматидных мостов (если из них вычесть мосты без фрагментов), встречаются в анафазах в большем количестве, чем в метафазах. Парные фрагменты появляются в одинаковом количестве в анафазах и метафазах, хроматидные дицентрики и мосты также. Приведем пример сопоставлений данных из табл. 1 и 2. При фиксации через 8 час. хроматидные мосты в анафазах, за вычетом таковых без фрагментов, присутствуют в количестве 3 ± 1 на 100 клеток, дицентрики в метафазах, способные дать мост в анафазе, в количестве $3,2 \pm 0,6$, непарные фрагменты в анафазах— $8,5 \pm 1,79$, непарные фрагменты в метафазах— $3,0 \pm 0,67$, парные фрагменты в анафазах— $3,0 \pm 1,0$, парные фрагменты в метафазах— $3,2 \pm 0,7$.

После обнаружения расхождений в числе перестроек хромосом и пробелов в анафазах и метафазах были поставлены эксперименты без воздействия колхицина на клетки, с целью исключения его влияния на движение клеток по циклу, на профазное и метафазное движение хромосом при получении метафазных препаратов, а также исключения его возможного влияния на процессы образования перестроек хромосом в метафазных препаратах. Проведен параллельный анализ анафаз и метафаз в одних и тех же неколхицинированных препаратах. В связи с тем, что продолжительность анафазы и метафазы исчисляется одним или двумя десятками минут [5], в наших опытах ею можно было пренебречь. Несмотря на трудоемкость анализа перестроек в неколхициновых препаратах (с корешка без обработки колхицином удавалось учесть в среднем 7 метафаз), был собран статистически значимый материал, в котором устойчиво сохранялись различия анафазных и метафазных данных. В анафазах наблюдалось гораздо больше перестроек, чем в метафазах. Следовательно, обработка проростков *S. carillagis* колхицином не искажает реальной картины появления перестроек в метафазах. С другой стороны, подтвердилось, что в анафазах регистрируется больше перестроек, чем в метафазах. Нерешенным, однако, остается вопрос о сопоставлении дицентрических хромосом в метафазах и анафазах. Вероятно, при этом нет различий. Довольно устойчивые различия для метафазного и анафазного методов учета наблюдаются при регистрации непарных фрагментов и пробелов.

Для объяснения представленных данных выдвигается следующее предположение: хотя перестройки реализуются до метафазы, некоторая часть их в ней визуально под микроскопом не обнаруживается, однако в анафазе при движении хромосом к полюсам они выявляются. Указание на это имеется в другой работе [10]. Елисеенко [3] при исследовании радиационного мутагенеза также описала преобладание числа перестроек хромосом в анафазах по сравнению с метафазами.

Если считать пробелы (гэпы) дефектами в строении хромосом, хо-

тя и другой природы, нежели перестройки, аналогичное объяснение применимо и к ним.

Таким образом, точность оценки цитогенетических нарушений в метафазах для растительных объектов несколько относительна. Использование гипотонической обработки при изучении метафаз клеток животных и человека, вероятно, повышает выявляемость нарушений хромосом в них. При сравнении количественных соотношений в числе перестроек хромосом в анафазах и метафазах, возникающих при действии тиюТЭФ, нами были получены сопоставимые результаты [2]. Под действием тиюТЭФ в метафазах клеток культуры человека появлялось больше перестроек хромосом, чем в анафазах. Это было вполне понятно в связи с тем, что непарные фрагменты, например хроматидные делеции, довольно часто, притягиваясь силами гомологии к сестринским участкам хромосом, имеющим центромер, уходили вместе с ними в анафазные шапки. В многохромосомных клетках человека значительная часть таких фрагментов в анафазах не может быть обнаружена. Это же явление было описано Джемилевым [1] при анализе радиационного эффекта.

В клетках *C. capillaris*, имеющих 6 хромосом, случаи утягивания фрагментов в анафазные шапки почти всегда можно заметить, вследствие чего это расхождение анафазного и метафазного методов учета перестроек хромосом устранялось. У *C. capillaris* удается обнаружить также в шапках анафаз симметричные и асимметричные транслокации. Невозможно заметить в анафазах только довольно редкие случаи появления небольших интерстациональных дупликаций—делеций.

Подведем итог различиям учета перестроек в клетках человека и *C. capillaris*. У *C. capillaris* вследствие малого числа хромосом в анафазах удается учесть не меньше различных видов перестроек хромосом (за исключением интерстациональных дупликаций—делеций), чем в метафазах. Вследствие движения хромосом к полюсам некоторые перестройки в анафазах выявляются в большем количестве, чем в метафазах. В клетках человека и, вероятно, у других многохромосомных объектов, перестройки, которые могут утягиваться к полюсам анафаз, частично в анафазах не обнаруживаются.

Институт общей генетики АН СССР,
Московская ветеринарная академия

Поступило 30.VII 1971 г.

Зна. А. ՄԻՏՐՈՅԱՆՈՎ, Ա. Զ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ

ԱԶՈՏԱՅԻՆ ԻՊՐԻՏԻ ՄՈՒՏԱԳԵՆԱՅԻՆ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ
C. CAPILLARIS-ի ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

C. capillaris-ի արմատածայրերը 15—17 րոպե մշակվել են ազոտային իպրիտի $5 \cdot 10^{-7}$ լուծույթով: Մետաֆազերի և անաֆազաների հաշվարկման համար պրեպարատները ֆիքսվել են 2, 4, 6, 8, 10 ժամերից հետո:

Արմատաժայրերը, որոնք հետագայում ենթարկվել են անաֆազային հետազոտման, ի տարբերություն մետաֆազերի, կոլիցինով չեն մշակվել:

Ջուգահեռաբար փորձեր են դրվել միտոտիկ ցիկլի ֆազերի ուսումնասիրության համար՝ կիրառելով ռադիոավտոգրաֆիայի մեթոդը:

Բջջիները G_2 պարբերությունում մշակելիս առաջին միտոզում բացարձակապես առաջանում են գէպեր (Gaps—пробелы): Քրոմոսոմային վերականգնումները իհայտ են գալիս այն ժամանակ, երբ բջջիները մշակվում են G_1 և S պարբերություններում, և նրանց թիվը աստիճանաբար աճում է ֆիքսման կետերին համապատասխան: Գէպերի քանակը սկսած 4-ժամյա ֆիքսացիայից գրեթե մնում է միևնույն մակարդակին, միայն վերջին կետում (10 ժամ) հետո նկատվում է նրանց քանակի նվազում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Джемилев З. А. Генетика, 5, 67, 1967.
2. Дубинин Н. П., Митрофанов Ю. А., Мануилова Е. С. Известия АН СССР, серия биологическая, 4, 1967.
3. Елисеенко Н. Н. Кандидатская диссертация, ИОГЕН АН СССР, 1971.
4. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. 6, 17, 1970.
5. Мэзия Д. Изд. иностр. лит. М., 1963.
6. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н. Радиобиология. 3, 3, 415, 1963.
7. Conger A. D. Mutation Res., 4, 449, 1967.
8. Darlington C. D., Koller P. C. Heredity, 1, 187, 1947.
9. Evans H. J., Scott D. Proc. Roy. Soc. B. 173, 1033, 491, 1969.
10. Humphrey R. M., Brinkley B. R. J. Cell Biol., 42, 3, 795, 1969.
11. Koller P. C., Casarini A. Brit. J. Cancer, 6, 173, 1952.
12. Revell S. H. Heredity, 6, Suppl., 107, 1953.
13. Revell S. H. Proc. Roy. Soc., Ser. B, 150, 563, 1959.