

Г. Г. БАТИКЯН, В. С. ПОГОСЯН, Э. А. АГАДЖАНЯН

ДЕЙСТВИЕ КОФЕИНА НА МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЛУКА

Изучалось цитогенетическое действие 0,03, 0,3 и 3% концентрации кофеина на меристематические клетки двух видов лука (*Allium cepa*, *Allium fistulosum*). Выяснилось, что с повышением концентрации кофеина увеличивается процент хромосомных aberrаций и подавляется митотическая активность клеток корешков. Наивысший эффект хромосомных aberrаций отмечается при более поздних сроках фиксации. Основными типами aberrаций, индуцированных кофеином, являются делеции. Из других типов отмечались транслокации.

За последние годы уже накопились данные о мутагенной активности ряда лекарственных препаратов, которые применяются довольно длительно и большим количеством населения. Среди таких препаратов особое место занимает кофеин — алкалоид, содержащийся в листьях чая (около 2%), семенах кофе (1—2%), орехах кола. В медицине он употребляется в виде порошков и таблеток (0,05—0,1 г чистый кофеин), являющихся средством, повышающим возбудимость центральной нервной системы и расширяющим сосуды сердца и мозга [5].

Кофеин-пуриин отличается от производного пуринового мутагена 8-этоксикофеина (8-ЭОК) лишь замещением водородного атома в положении 8 на этилоксигруппу.

Имеется много работ, посвященных изучению действия 8-ЭОК на хромосомы. С этим мутагеном особенно много работал Килман, который первым обнаружил радиомиметическое действие 8-ЭОК на луке [9]. Однако работ по цитогенетическому эффекту кофеина на клетки высших организмов мало (4, 8, 10—13, 16—19, 21), а имеющиеся свидетельства о том, что он вызывает разрывы хромосом в соответствии с дозой.

Лумб и другие [15] считают, что в бактериальных системах кофеин блокирует фермент иссечения, т. е. действует на один из начальных этапов репарационного процесса. Учитывая это обстоятельство, в последние годы кофеин стал использоваться в бактериальных системах в качестве ингибитора темновой репарации [7, 14, 20, 22, 23] и модификатора радиационного эффекта у высших организмов, хотя имеющиеся по этому вопросу литературные данные довольно противоречивы [1, 3, 6, 24, 25]. Работы, сделанные на скерде [3], показывают, что кофеин увеличивает количество клеток с aberrациями при обработке в момент облучения и через 4 и 6 час. после облучения; через 2 час. после облучения этого не наблюдается.

В этом аспекте представляло интерес изучение действия кофеина на хромосомы двух видов лука (*Allium cepa*, *Allium fistulosum*) с проведением темпоральных фиксаций на основании учета продолжительности митотического цикла каждого вида.

Материал и методика. С этой целью семена двух видов лука—репчатого (*A. cepa*) и лука-батуна (*A. fistulosum*) — проращивались на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Отбирались корешки длиной 0,5—0,7 см, которые в течение часа обрабатывались 0,03, 0,3, 3% концентрацией кофеина. После обработки в течение 5 мин они промывались в проточной воде, а затем снова проращивались в термостате в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при 24°C. Корешки репчатого лука фиксировались в течение 46 час., а лука-батуна—36 час., с интервалом 2 час. между фиксациями. Контрольные же корешки фиксировались после погружения их в дистиллированную воду в течение часа. Фиксацию производили уксуснокислым спиртом (1:3). Готовились давленные ацетокарминовые препараты. Анализ эффекта кофеина проводился анафазным и частично метафазным методами.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, у изученных видов лука кофеин при всех сроках фиксации уже при концентрации 0,03% вызывает повышение частоты анафаз с абберациями хромосом, которое при 3% концентрации доходит до максимума (рис. 1, 2). Интересно отметить, что картина действия кофеина 0,3% концентрации особенно не отличается от таковой, наблюдаемой при более низкой концентрации (0,03%). Разница между указанными вариантами у двух видов лука проявляется в том, что пики хромосомных аббераций отмечаются не в одни и те же часы фиксации: у репчатого лука второй пик хромосомных аббераций попадает на более поздние часы фиксации (через 28, 38 час.), чем у лука-батуна (через 20 и 24 час. после обработки).

Разница у двух видов лука выявляется при воздействии 3% концентрацией кофеина. У репчатого лука первый пик хромосомных аббераций отмечается через 6 час. после обработки (7,2%), в последующие часы процент аббераций снижается до 1,4%. Второй и третий пики наступают через 22 час. Причем через 24 и 28 час. после обработки процент абберантных клеток превышает контроль на 10,2—8,2% (рис. 1). У лука-батуна, в отличие от первого вида, при 3% концентрации частота хромосомных аббераций повышается через 2 час. после обработки, далее идет снижение, а через 14 час. отмечается вторая волна (рис. 2), которая достигает максимума через 24 час. (на 7,5% больше, чем у контроля). У лука-батуна при указанной концентрации процент хромосомных аббераций в среднем на 1,9%, а при 0,3 и 0,03% на 0,5% меньше, чем у репчатого лука. Это обстоятельство обусловлено видовой спецификой исследуемых объектов. Известно, что оба вида лука сходны по количеству хромосом в наборе ($2n=16$), однако они отличаются друг от друга по содержанию ДНК: репчатый лук содержит на 33% больше ДНК, чем лук-батун [2]. Килман и другие [11, 12] показали, что в клетках корешков лука при подавлении генерации АТФ (аноксия, действие азидата натрия) наблюдаются лишь немногочисленные абберации, между тем увеличение АТФ на 70% (аденином или аденозином) втрое больше увеличивает способность кофеина вызывать хромосомные абберации. Автор

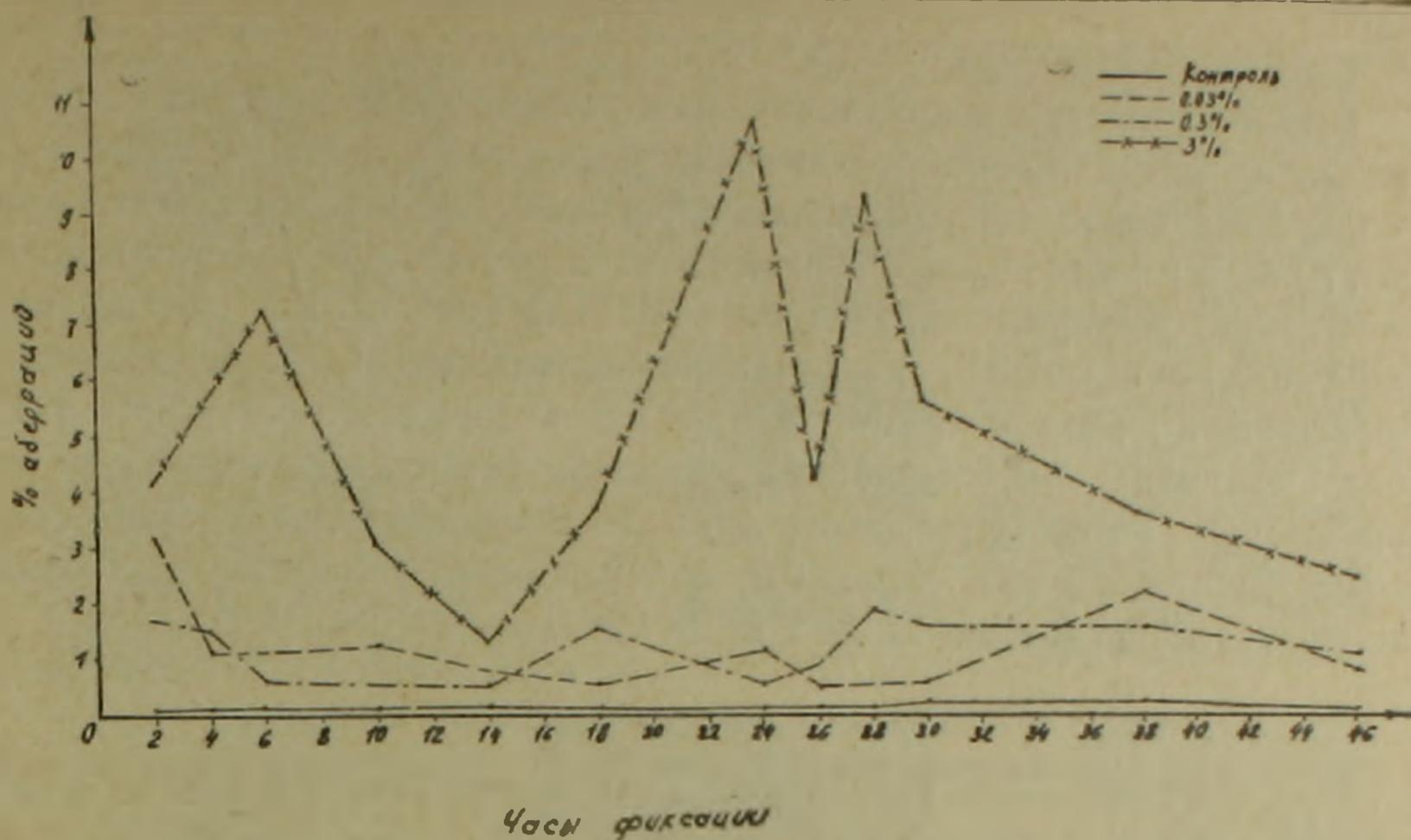


Рис. 1. Частота aberrаций хромосом у репчатого лука, индуцированных кофеином.

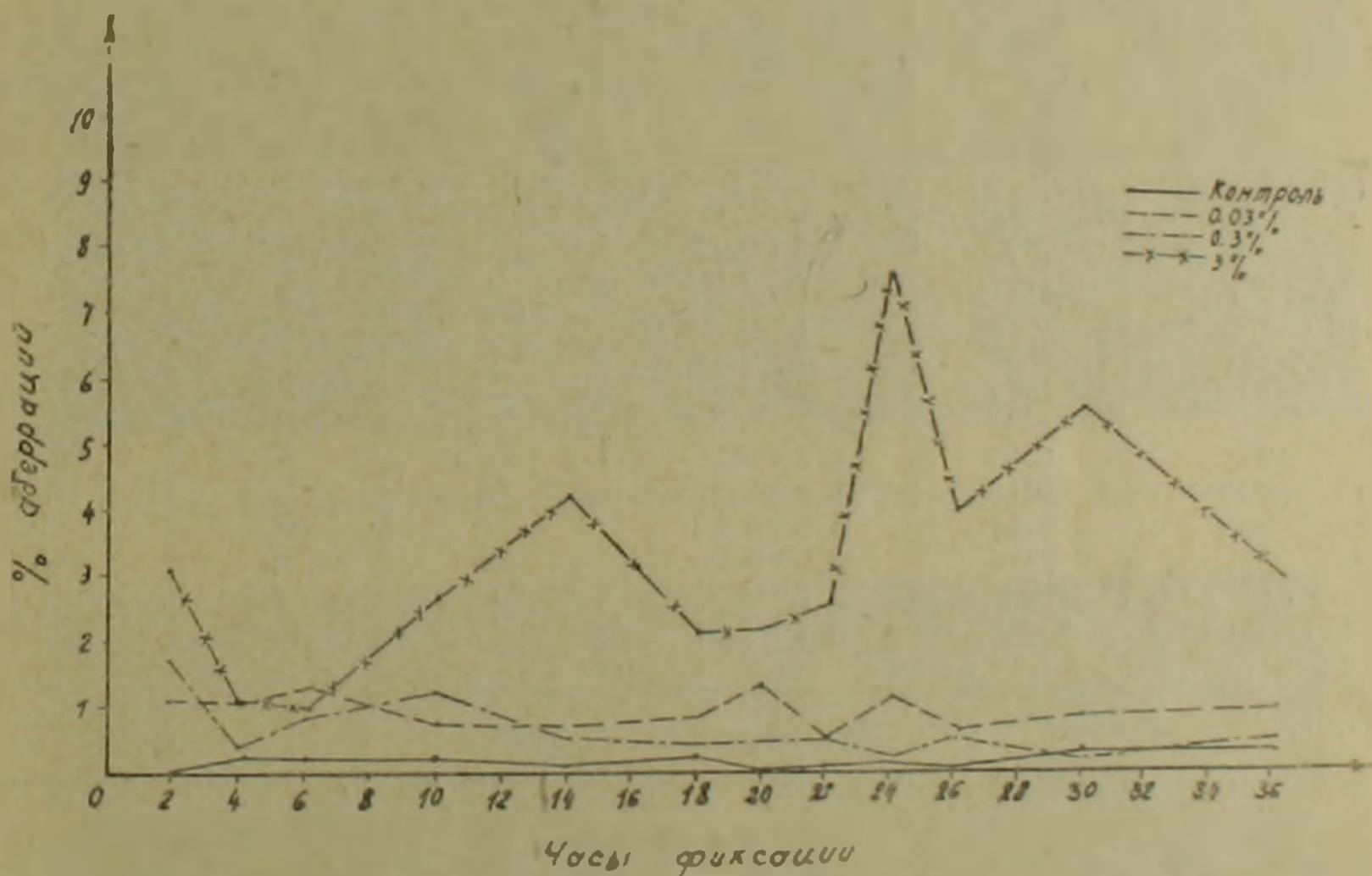


Рис. 2. Частота aberrаций хромосом у лука-батуна, индуцированных кофеином.

считает, что такое влияние обусловлено не изменением тех или иных особенностей общего обмена веществ клетки, а связано с прямым влиянием АТФ на организацию компонентов хромосом, облегчающим взаимодействие между кофеином и ДНК. Следовательно, если дополнительное количество АТФ способствует взаимодействию ДНК с кофеином, то можно предполагать, что оно более осуществимо при наивысшей концентрации кофеина и при большом количестве ДНК. Вследствие этого у вида, содержащего большое количество ДНК, процент хромосомных aberrаций выше, чем у вида, содержащего меньшее количество его.

Нами замечено, что с увеличением концентрации кофеина возрастает процент всех типов встречающихся перестроек, среди которых у исследуемых объектов преобладают одиночные и парные фрагменты (рис. 3). Анализ метафазных пластинок показал, что эти фрагменты представляют изохроматидные делеции типа NUPUD (рис. 4). Из других типов aberrаций отмечаются транслокации—одиночные и парные мосты с фрагментами и без фрагментов (рис. 5), которые особенно часто и в большом количестве встречаются у лука-батун при всех часах фиксации, между тем как у репчатого лука это отмечается лишь при 0,03% концентрации кофеина. При 0,3 и 3% концентрациях транслокации встречаются при фиксациях от 2 до 28 час. (табл.).

Т а б л и ц а

Частота и типы хромосом в меристематических клетках лука,
индуцированные 3% раствором кофеина

Репчатый лук (A. сера)					
Часы фикса- ций	Число анафаз	% аберра- ций	Типы aberrаций, % от общего числа aberrаций		
			одиночный фрагмент	парный фрагмент	одиночный мост
2	1474	$4,1 \pm 0,03$	—	—	100
4	1027	$5,7 \pm 0,30$	67	33	—
6	1228	$7,2 \pm 0,60$	—	—	100
10	1878	$3,1 \pm 0,30$	100	—	—
14	2167	$1,3 \pm 0,10$	100	—	—
18	1394	$3,7 \pm 0,20$	25	50	25
24	3360	$10,7 \pm 0,30$	22	67	11
26	1516	$4,2 \pm 0,20$	33,3	33,3	33,3
28	2614	$9,4 \pm 0,40$	78	—	22
30	2941	$5,6 \pm 0,50$	—	100	—
38	2384	$3,6 \pm 0,20$	50	50	—
46	2675	$2,5 \pm 0,20$	100	—	—
Контроль Среднее	3484	$0,1 \pm 0,01$	83,4	—	16,6

Лук-батун (A. fistulosum)						
Часы фикса- ций	Число анафаз	% аберра- ций	Типы aberrаций, % от общего числа aberrаций			
			одиночный фрагмент	первый фрагмент	одиночный мост	парный мост
2	1176	$3,0 \pm 0,02$	—	—	67	33
4	1397	$1,1 \pm 0,08$	50	50	—	—
6	2045	$1,0 \pm 0,07$	—	—	50	50
10	1719	$2,6 \pm 0,10$	75	—	25	—
14	1644	$4,2 \pm 0,10$	57	—	43	—
18	2853	$2,1 \pm 0,07$	25	25	50	—
20	2485	$2,2 \pm 0,2$	100	—	—	—
22	1975	$2,5 \pm 0,10$	57	43	—	—
24	1784	$7,6 \pm 0,02$	45	40	15	—
26	1618	$4,0 \pm 0,10$	33,3	33,3	33,3	—
30	2272	$4,1 \pm 0,20$	67	33	—	—
36	1901	$7,2 \pm 0,20$	50	38	22	—
Контроль Среднее	3647	$0,2 \pm 0,01$	100	—	—	—

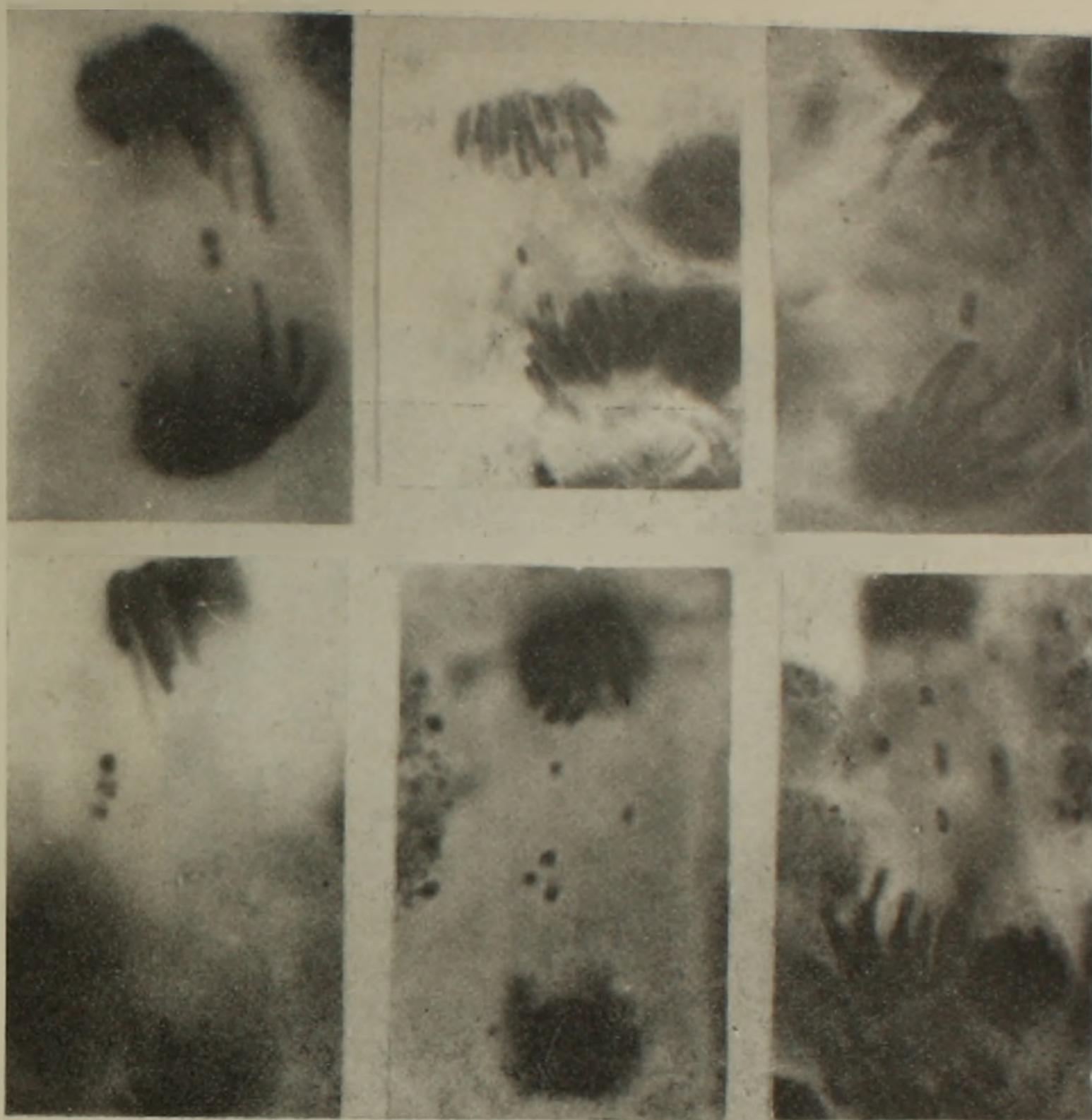


Рис. 3. Ацентрические фрагменты, индуцированные 3% раствором кофеина.



Рис. 4. Изохроматидная делеция, индуцированная кофеином. 1. нормальный кариотип лука-батуна. 2. делеция типа NUPUD.

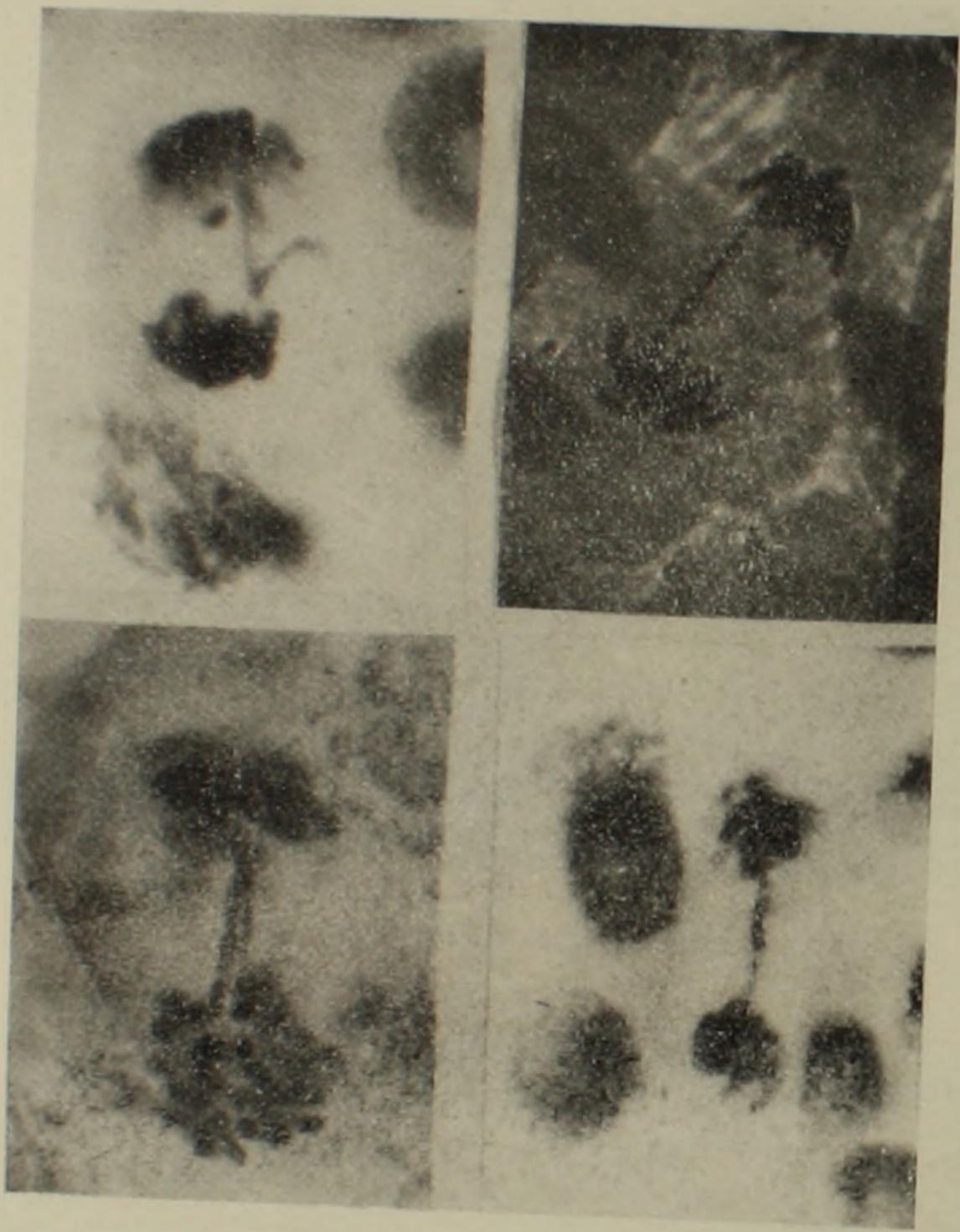


Рис. 5. Одиночные и парные мосты с фрагментами и без фрагментов, индуцированные 0,3% раствором кофеина.

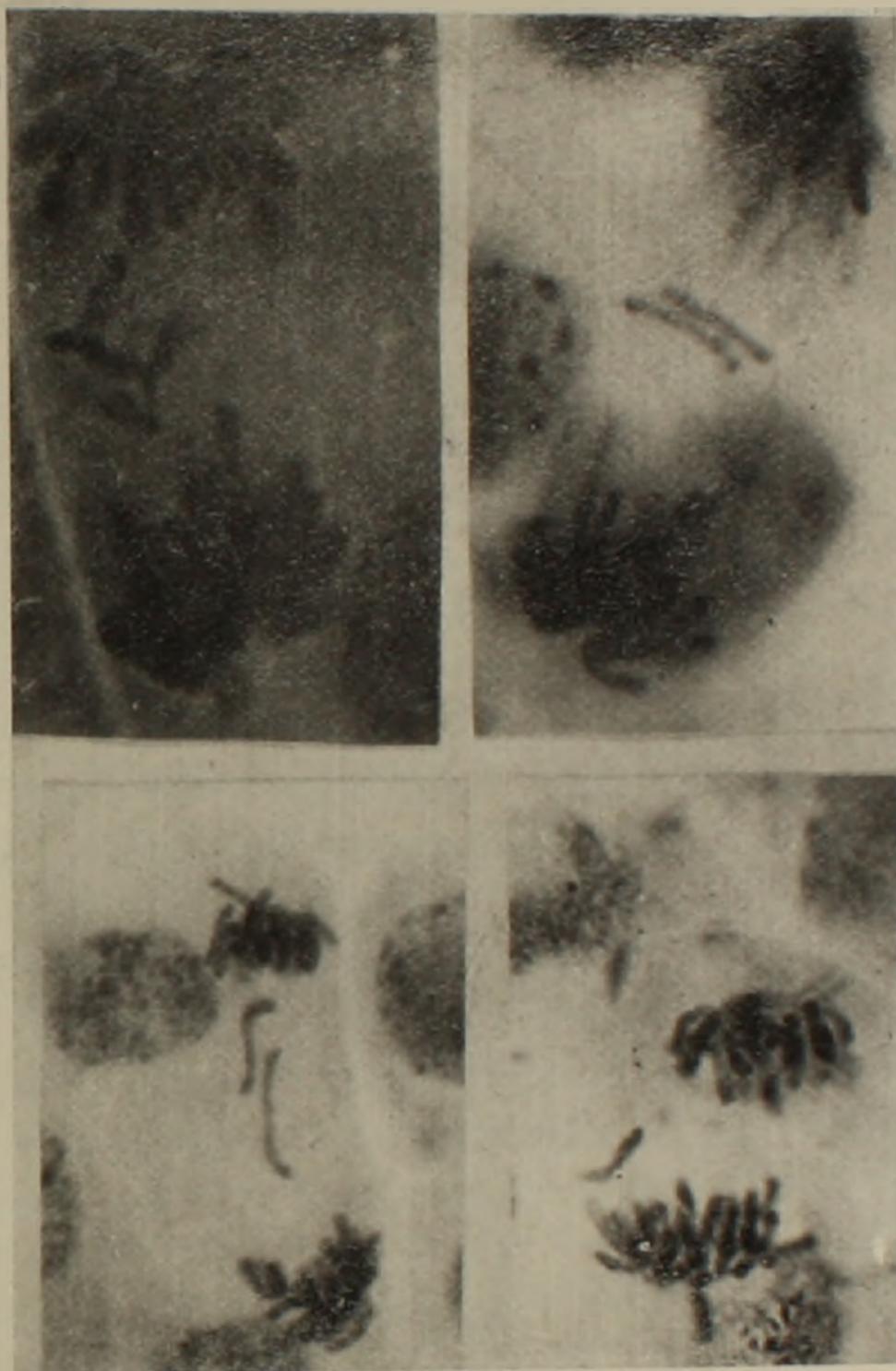


Рис. 6. Отстающие хромосомы в экваториальной части клетки, индуцированные 3% раствором кофеина.

При воздействии кофеином особого внимания заслуживает отставание хромосом в анафазе. Причем этот тип нарушений в большом количестве наблюдается у репчатого лука, при концентрации 0,03% в среднем доходя до 1,9%, а при 3% концентрации—до 5,4%. С повышением концентрации нарастает не только процент нарушений, но и количество отстающих хромосом в одной клетке (рис. 6). При 3% концентрации кофеина в более поздние часы фиксации (от 24 до 30 час. после обработки) встречаются клетки, в которых отмечаются от 2 до 4 отстающих хромосом. Процент таких клеток составляет соответственно от 11% до 33,3%. Подобное явление, очевидно, является результатом повреждающего действия кофеина на центромеру, так как известно, что к числу причин, обуславливающих отставание хромосом, относится именно повреждение центромеры.

Кроме указанных нарушений в митозе, применяемые концентрации кофеина приводят также к уменьшению митотического индекса, особенно в первые часы фиксации (через 2—18 час. после обработки). При низких концентрациях (0,03 и 0,3%) в более поздние сроки фиксации, начиная от 24 до 30 час. после обработки, замечается восстановление митотической активности, которая затем вновь подавляется. Митотическая активность особенно подавляется у репчатого лука при 3% концентрации кофеина, где отмечен высокий процент аберраций и отставание целых хромосом в экваториальной плоскости. Подобные результаты получены и при обработке 1% раствором кофеина [3].

Таким образом, с повышением концентрации кофеина подавляется митотическая активность клеток корешков лука и увеличивается процент хромосомных аберраций. Это явление, как и повышение частоты хромосомных аберраций в поздние часы фиксации, свидетельствует о том, что действие кофеина реализуется именно в период стадий G₂ и в процессе митоза, так как аберрантные клетки, отмечаемые через 24 час. после обработки, в момент воздействия находились или в процессе первого митоза или на стадии G₂.

Ереванский государственный университет,
лаборатория цитологии

Поступило 15.VII 1973 г.

Հ. Գ. ԲԱՏԻՎՅԱՆ, Վ. Ս. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Է. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ

ԿՈՖԵԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՆԻ ՄԵՐԻՍՏԵՄԱՏԻԿ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է կոֆեինի ազդեցությունը սոխի 2 տեսակների (*Allium cepa* և *Allium fistulosum*) արմատածայրերի բջիջների վրա: Այդ նպատակով սոխի ծիլերը 0,5—0,7 սմ երկարությամբ մշակվել են կոֆեինի 0,03, 0,3 և 3% լուծույթներում 1 ժամ տևողությամբ:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ կոֆեինի վերը նշված խտությունները ստուգիչի համեմատությամբ առաջացնում են քրոմոսոմային

վերականգնումների բարձր հաճախականություն: Հնդ որում՝ խտության մեծացման հետ մեկտեղ աճում է բրոմոսոմային վերականգնումների հաճախականությունը և ընկնում բջիջների միթոտիկ ակտիվությունը: Առաջացած վերականգնումների հիմնական տիպերից է դելեցիան: Հանդիպում են նաև տրանսլոկացիոն տիպի փոփոխություններ:

Բացի նշված խախտումներից, կոֆեինի խտության բարձրացմանը պարունակող նկատվում է նաև ետ մնացող բրոմոսոմաներ պարունակող բջիջների հաճախականության մեծացում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Антикаева Г. В. Радиобиология, 12, 4, 1972.
2. Гиндилис В. М., Бабдаев Н. С., Павулсон С. А., Барский В. Е. Изв. АН СССР, серия биол., 4, 1972.
3. Елисеенко Н. И. Радиобиология, 10, 4, 1970.
4. Журков В. С., Сурайкин Т. И. Генетика, 7, 7, 1971.
5. Машковский М. А. Лекарственные средства, М., 1954.
6. Немировский А. Е., Акифьев А. П., Клименко В. В. Генетика, 5, 12, 1969.
7. Clarke C. H. Mutat. Res., 5, 1968.
8. Fries N., Kihlman B. Nature, 162, 1948.
9. Kihlman B. A. Exptl. Cell. Res. 1, 1950.
10. Kihlman B. A., Levan A. Hereditas, 35, 1949.
11. Kihlman B. A., Odmarc G., Norlen K., Karlsson M. B. Hereditas, 68, 2, 1971.
12. Kihlman B. A., Sturelid S., Norlen K., Tidriks D. Hereditas, 69, 1, 1971.
13. Kihlman B. A., Tromme H., Heede E., Ostertag W. Cancer Res., 28, 1968.
14. Lieb M. Z. Vererbungslehre, 92, 4, 1961.
15. Lumb J. R., Sideropoulos A. S., Shenkel D. M. Kinetics of inhibition M.G.G., 102, 2, 1968.
16. Минэма Мимико, Само Сёми, Сэнсекутай кромосома, 69—70, 1967.
17. Ostertag W. Mutat. Res., 3, 3, 1966.
18. Ostertag W., Crelf B. J. Humangenetik, 3, 4, 1967.
19. Ostertag W., Dulsberg E., Stürman M. Mutat. Res., 2, 1965.
20. Sauerbier W. Biochim. et biophys. Res. Commun., 14, 1964.
21. Sax Karl, Sax Hally J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 55, 1966.
22. Shankel D. M. J. Bakteriolog., 84, 3, 1962.
23. Shlmada K., Takagi J. Biochem. et biophys. acta, 145, 3, 1967.
24. Yamamoto K., Yamaguchi H. Mutat. Res., 8, 1969.
25. Wolff S., Scott D. Exptl. Cell Res., 55, 1, 1969.