

Р. С. КАГРАМАНЯН

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ГИДРАЗИДА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ДИПЛОИДНЫХ, ТЕТРАПЛОИДНЫХ И ОКТО- ПЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ *CREPIS CAPILLARIS*

Изучался мутагенный эффект гидразида малеиновой кислоты (ГМК) в 3-х последовательных митотических циклах, проявившийся в возникновении хроматидных перестроек. В кривой мутагенного эффекта ГМК в диплоидных клетках отсутствовало характерное для алкилирующих соединений плато. Резкое падение частоты перестроек после максимума отличало ГМК от алкилирующих соединений.

Изучая соотношение количества хромосомных перестроек и видимых мутаций, вызванных различными мутагенами, исследователи часто не учитывают специфики их цитогенетического эффекта. На растениях путем применения колхициновой методики было показано, что, в отличие от радиации, алкилирующие мутагены триэтилекметамин [4], этиленмин [3], ТиоГЭФ [2] вызывают абберрации в ряде клеточных поколений. Поэтому утверждение, что ионизирующие излучения дают больше хромосомных перестроек (учет в первом митотическом цикле) и меньше видимых мутаций, чем химические мутагены, возможно, основано как раз на том, что, проводя при действии химических мутагенов учет перестроек только в первом митозе (как это обычно делается), авторы сильно снижали показатель их цитогенетической активности. В то же время методика учета видимых мутаций позволяет учитывать изменения, возникающие во всех клеточных поколениях.

Вопросы, связанные с мутагенным действием химических соединений в ряде клеточных поколений, разработаны пока недостаточно. Между тем эта проблема является актуальной, поскольку тесно связана с задачами теории мутагенеза.

При изучении эффекта химических мутагенов важно определить, существует ли какая-либо закономерность в действии разных групп химических мутагенов в ряде клеточных поколений, в чем заключается сходство и различие между ними.

По динамике появления абберраций после обработки мутагеном и по распределению разрывов хромосом алкилирующие мутагены близки к структурному изомеру тимина—гидразиду малеиновой кислоты.

Однако во всех работах эффект ГМК изучался только в первом митотическом цикле. В нашу задачу входило изучить его в 3-х митотических циклах, т. е. провести работу, аналогичную той, которая выполнена с алкилирующими мутагенами.

Материал и методика. Проростки *C. capillaris* длиной 1,5—2 мм обрабатывали $5 \cdot 10^{-4}$ и $7 \cdot 10^{-4}$ М растворами ГМК и фиксировали в разные сроки после обработки

мутагеном. В силу асинхронности клеточной популяции в один срок фиксации могут присутствовать одновременно клетки, находящиеся в первом, втором и третьем митотических циклах. Чтобы разграничить клеточные циклы, после обработки мутагеном проростки помещали в 0,01%-ый раствор колхицина, в котором они росли до конца опыта; клетки, прошедшие одну редупликацию, были диплоидными, две—тетраплоидными, три—октоплоидными.

Проростки фиксировали в несколько сроков в охлажденной смеси 96° этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Учет aberrаций проводили в диплоидных, тетраплоидных и октоплоидных метафазных пластинках на временных ацетокарминовых препаратах.

Так как число мишеней (хромосом) в полиплоидных клетках увеличивается, для сравнения данных в клетках разной плоидности частоту перестроек в них пересчитывали на диплоидный набор хромосом (на 2 и 4 соответственно). Во всех случаях вычитали число перестроек, наблюдавшихся в контроле.

Результаты и обсуждение. Как следует из таблицы, ГМК, будучи мутагеном с задержанным эффектом, в первые часы после обработки проростков не индуцировал перестроек хромосом. Aberrации появились только через 6 часов после начала обработки мутагеном. Максимальная частота перестроек в диплоидных клетках отмечалась через 10 часов, а в последующие сроки фиксаций наблюдалось постепенное падение числа aberrаций. Все aberrации были хроматидного типа. Через 14 часов появились первые тетраплоидные клетки, а через 22 часа—октоплоидные.

Как и после действия алкилирующих соединений, не наблюдалось задержанного эффекта в клетках, находящихся после обработки ГМК во втором и третьем митотических циклах. В тетраплоидных и октоплоидных клетках сразу обнаружилась максимальная частота aberrаций; в последующие сроки фиксации число перестроек снижалось. Сравнение частоты aberrаций при фиксациях, когда одновременно присутствовали диплоидные, тетраплоидные и октоплоидные клетки (взяты суммарные данные по точкам фиксаций от 22 часов до 50 часов после обработки мутагеном), показало, что в среднем в каждом клеточном поколении она составляла: в первом митотическом цикле—3,7, во втором—3,3, в третьем—9,6%. После пересчета на диплоидный набор оказалось, что количество вновь возникших aberrаций в клетках разной плоидности, одновременно вступивших в митоз, неодинаково: в первом митозе оно составило 3,7, во втором—1,7 и в третьем—2,4%. Таким образом, в первом митотическом цикле частота aberrаций была значительно выше и достоверно превышала этот показатель в тетраплоидных и октоплоидных клетках (различия между последними недостоверны).

Характер действия ГМК в 3-х последовательных митозах при концентрации $7 \cdot 10^{-4}$ М оказался аналогичным, разница заключалась только в том, что при обработке $7 \cdot 10^{-4}$ М раствором ГМК выход aberrаций был выше.

Итак, изучение цитогенетического эффекта ГМК в проростках *S. capillaris* показало, что в первом митотическом цикле он действует несколько иначе, чем алкилирующие агенты: после быстрого подъема частоты aberrаций сразу наступает падение (отсутствие плато). Если сравнить динамику появления aberrаций хромосом в диплоидных клетках

после обработки проростков ГМК и алкилирующими соединениями (ТиюТЭФ, этиленимин), то прежде всего обращает на себя внимание наличие плато в случае действия алкилирующих соединений. Вероятно, это свидетельствует о том, что ГМК быстрее проникает к хромосомам и активнее реагирует с ними. В отличие от алкилирующих соединений, ГМК за время обработки не успевает вступить в соединение с какими-либо метаболитами и в значительной степени вымывается из клеток, в результате этого происходит незамедлительное падение частоты перестроек в последующие сроки фиксации.

Второе отличие действия ГМК от алкилирующих соединений касается количественного характера мутирования в последовательных митотических циклах. ГМК так же, как и алкилирующие вещества, вызывает в ряде клеточных поколений аберрации хроматидного типа. Однако, если при действии алкилирующих мутагенов число вновь возникших перестроек в клетках разной плоидности, одновременно входящих в митоз, было практически одинаковым при пересчете на диплоидный набор хромосом, то в случае с ГМК этого не наблюдалось. Как видно из таблицы, количество аберраций в первом митотическом цикле превышает тако-

Т а б л и ц а

Частота хроматидных перестроек в клетках разной плоидности (ГМК, концентрация — $5 \cdot 10^{-4}$ М)

Число просмотренных корешков	Время фиксации, часы	Диплоиды			Тетраплоиды			Октоплоиды		
		изучено метафаз	число перестроек		изучено метафаз	число перестроек		изучено метафаз	число перестроек	
			общее	на 100 клеток		общее	на 100 клеток		общее	на 100 клеток
12	2	400	0	0	0	0	0	0	0	0
16	6	693	58	$8,4 \pm 1,05$	0	0	0	0	0	0
13	10	559	155	$27,7 \pm 1,89$	0	0	0	0	0	0
19	14	909	113	$12,4 \pm 1,09$	27	5	$18,5 \pm 7,45$	0	0	0
20	18	804	89	$11,1 \pm 1,11$	130	19	$14,6 \pm 3,1$	0	0	0
14	22	613	56	$9,1 \pm 1,16$	347	48	$13,8 \pm 1,85$	3	0	0
17	26	711	57	$8,0 \pm 1,02$	406	38	$9,4 \pm 1,45$	8	0	0
16	30	772	22	$2,8 \pm 0,59$	512	25	$4,9 \pm 0,95$	15	3	$20,0 \pm 10,35$
18	34	695	23	$3,3 \pm 0,68$	403	24	$5,9 \pm 1,17$	25	7	$28,0 \pm 8,98$
12	38	346	10	$2,9 \pm 0,9$	342	15	$4,4 \pm 1,14$	30	5	$16,7 \pm 6,74$
12	42	132	4	$3,0 \pm 1,49$	265	14	$5,3 \pm 1,37$	29	4	$13,8 \pm 6,4$
15	46	215	3	$1,4 \pm 0,82$	259	9	$3,5 \pm 1,14$	38	5	$13,1 \pm 5,48$
13	50	70	1	$1,4 \pm 1,4$	253	6	$2,4 \pm 0,96$	53	2	$3,8 \pm 2,53$
Средний процент	с 14 час.— 50 час. 22 час.— 50 час.	1059	3	$5,5 \pm 0,3$	1625	12	$8,2 \pm 0,37$	85	2	$11,9 \pm 0,54$
				$4,0 \pm 0,28$			$4,0 \pm 0,28$			
				Контроль						
				$0,3 \pm 0,17$			$0,7 \pm 0,21$			$2,3 \pm 1,62$

По каждому сроку фиксации в клетках разной плоидности высчитывали число аберраций на 100 метафаз и вычисляли среднее. Сравнение частоты перестроек в клетках разной плоидности проводили с той точки фиксации, когда они вступали в митоз одновременно.

вое в тетраплоидных и октоплоидных клетках. Если исходить из того, что абerrации в тетраплоидных и октоплоидных клетках возникают в результате сохранения мутагена или продуктов его взаимодействия в клетке [1], то падение частоты перестроек во втором и третьем митозах, вероятно, можно объяснить следующим образом.

Можно допустить, что диплоидные клетки, которые вышли в митоз одновременно с тетраплоидными, начали проходить синтез раньше, чем тетраплоидные клетки. Это вполне возможно, так как задержка ГМК первого митотического цикла гораздо больше, чем второго и третьего. Следовательно, клетки первого митотического цикла начали проходить и завершили значительную часть стадии синтеза в присутствии более высокой концентрации мутагена, чем тетраплоидные и октоплоидные клетки.

Почему же этого не наблюдалось при действии алкилирующих мутагенов? Ведь и там в первом митозе стадия синтеза растянута больше, чем во втором и третьем. Очевидно, это объясняется тем, что после обработки алкилирующими соединениями концентрация внутриклеточного мутагена долго держится на одном уровне (об этом свидетельствует плато абerrаций в первом митозе). В таком случае диплоидные клетки, которые начали проходить стадию синтеза по времени раньше, а также тетраплоидные и октоплоидные клетки, прошедшие синтез позже, но вышедшие в митоз одновременно с диплоидными, подвергались воздействию одной и той же концентрации мутагена и поражались в одинаковой степени.

Это объяснение нельзя считать окончательным, и для выяснения точного механизма действия ГМК на хромосомы нужна специальная работа по определению концентрации ГМК в клетках, которая методически в данное время неосуществима.

Ереванский физический институт

Поступило 21.IV 1975 г

Բ. Ս. ՂԱՀՐԱՄԱՆՅԱՆ

ՄԱԼԵՆԱՅԻՆ ԹԹՎԻ ՀԻԴՐԱԶԻԴԻ (ՄԹՀ) ՑԻՏՈԳԵՆԵՏԻԿ ԷՖԵԿՏԸ
CREPIS CAPILLARIS ԴԻՊԼՈԻԴ, ՏԵՏՐԱՊԼՈԻԴ ԵՎ
ՕԿՏԱՊԼՈԻԴ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ ՄԹՀ-ն ինչպես 5×10^{-4} М, այնպես էլ 7×10^{-4} М կոնցենտրացիաներում առաջացնում է բրոմատիդային վնասվածքների առաջին, երկրորդ և երրորդ միթոտիկ ցիկլներում: Ի տարբերություն ալկիլային մոտազենների ազդեցության, ՄԹՀ-ով ինդուկցված բրոմատիդային վնասվածքների քանակը առաջին ցիկլում ավելի էր, քան

երկրորդում և երրորդում, ինչպես ֆիքսման առանձին ժամկետներում, այնպես էլ վնասվածքների միջին հաճախականությամբ:

Դիպլոիդ բջիջներում ՄԹՀ-ի մուտագենն էֆեկտի կորում բացակայում էր ալկիլային միացություններին բնորոշ պլատոն: Մաքսիմումից հետո վնասվածքների հաճախականության կտրուկ իջեցումը տարբերում է նրան ալկիլային մուտագենների էֆեկտից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Андреев В. С., Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н. Генетика, 6, 28—35, 1966.
2. Կառամանյան Ր. Ս. Генетика, 6, 4, 184—185, 1970.
3. Сидоров Б. Н., Соколов Н. Н., Андреев В. С. Генетика, 1, 112, 1965.
4. Bulatti M., Ronchi V. N. Caryologia, 16, 39—403, 1963.