

УДК 575.551.521

Р. А. АЗАТЯН, А. З. ВОСКАНЯН, А. П. АКИФЬЕВ, М. С. ЗАКАРЯН

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА ДНК
5-АМИНОУРАЦИЛА НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ
АБЕРРАЦИИ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ
CREPIS CAPILLARIS L. II

Изучалось модифицирующее действие 5-АУ в различных фазах митотического цикла на сухих семенах *C. capillaris*. После облучения был использован ингибитор синтеза ДНК. Обнаружено, что при совместном действии с облучением в фазе G_1 5-АУ не эффективен, в S-фазе наиболее эффективен, в фазе G_2 также эффективен.

В настоящее время многочисленные факты свидетельствуют о возможности модификации радиационного мутагенеза. Особенно перспективны такие воздействия, которые могут быть специфически направлены на отдельные этапы внутрихромосомных процессов [1, 3, 6].

В нашей работе изучалось модифицирующее действие подавления синтеза ДНК 5-аминоурацилом (5-АУ) на различных этапах образования радиационно-индуцированных структурных мутаций хромосом в клетках *C. capillaris*. Модифицирующий эффект 5-АУ, индуцированный рентгеновскими лучами, мы могли оценить при действии его в G_1 -, S- и G_2 -фазах митотического цикла.

Материал и методика. Объектом исследования были семена *C. capillaris* в возрасте 5 месяцев. Облучение рентгеновскими лучами проводилось на аппарате РУМ-11 (напряжение 185 кв., сила тока 15 мА, без фильтра, мощность дозы 450 р/мин.). Воздушно-сухие семена облучались в дозе 15 кр. Часть облученных семян обрабатывалась 5-АУ (500 μ /мл) в течение 10 час., т. е. в фазе G_1 .

Остальная часть сразу после облучения выдерживалась в воде до 10 час. для обработки 5-АУ в фазе S.

Известно, что у *C. capillaris* фаза S начинается после 10 час. и кончается через 24—26 часов [5]. Мы дробили ее на четыре варианта, обрабатывая через 6, 12, 18 и 24 часа. Чтобы действовать на фазу G_2 , в течение 3 часов от начала фиксации проростки обрабатывались 5-АУ.

Во всех обработанных 5-АУ вариантах семена помещались в чашки Петри, смоченные 0,01%-ым колхицином, и проращивались в термостате при 25°. Фиксация проводилась в четыре срока.

Аберрации хромосом учитывались в стадии метафазы на давленных ацеткарминовых препаратах. Корешки фиксировались в первом митозе смесью уксусной кислоты и спирта (1:3).

Результаты и обсуждение. В контрольном варианте (облучение в дозе 15 кр) уровень мутирования клеток составлял $31,3 \pm 0,83\%$; при облучении сухих семян структурные мутации хромосом были в основном хромосомного типа (таблица).

При инкубации 5-АУ во всех фазах клеточного цикла уровень мутирования клеток составлял 0,3—0,4%; все перестройки, наблюдаемые в этих вариантах опыта, были хроматидного происхождения. Хромосомные перестройки возникали на уровне естественного контроля. Уровень естественного мутирования хромосом свежих семян *S. capillaris* (урожае 1973 г.), как показывают данные таблицы, составлял $0,4 \pm 0,1\%$. Во всех перестройках хромосом в контрольном материале, преобладали нарушения хроматидного типа.

При сочетанном действии 5-АУ и облучения в фазе G_1 уровень мутирования хромосом составлял $31,9 \pm 0,82\%$. Перестройки в основном были хромосомного типа. Разница в уровне мутирования клеток в варианте контроль с облучением и при комбинированном действии облучения и 5-АУ в фазе G_1 не обнаружена.

В фазе S, в отличие от фазы G_1 , комбинированное действие облучения и 5-АУ в течение 6, 12, 18 и 24 часов достоверно увеличивало уровень мутирования клеток по сравнению с действием одного облучения. Структурные мутации хромосом были хромосомного типа. Во всех вариантах фазы S наблюдалась модификация хромосомных типов перестроек. Максимум уровня модификации радиационного повреждения отмечался в фазе S при 18-часовом комбинированном действии. Процент перестроек хромосом в этом варианте опыта был выше, чем в других вариантах в фазах G_1 , S и G_2 .

В наших опытах в каждом варианте наибольшая модификация радиационного эффекта ингибитором синтеза ДНК отмечалась в фазе S, даже при больших интервалах времени между облучением и обработкой 5-АУ. Это касается как хромосомных, так и хроматидных перестроек (таблица).

В таблице приведены также результаты модифицирующего действия 5-АУ в фазе G_2 . Радиационный эффект при обработке 5-АУ модифицировался в большей степени в фазе S, чем в G_2 . Уровень мутирования клеток в этом варианте выше, чем в фазе G_1 и в варианте только с облучением.

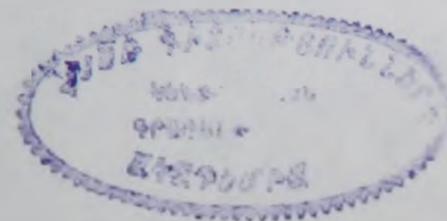
На рисунке приведены кривые модификации радиационного эффекта 5-АУ в фазе G_1 , S и G_2 . Максимум сенсibiliзирующего действия наблюдался в фазе S при 18-часовой обработке. В фазе G_2 наблюдалась более повышенная сенсibiliзация, чем в фазе G_1 и в варианте только с облучением. Кривые уровня мутирования хромосом в разных фазах клеточного цикла показывают, что это явление можно связать с усугублением радиационных повреждений в фазе S под влиянием 5-АУ. При исключении момента облучения часть повреждений хромосом в фазе S успевает восстановиться, в связи с чем действие 5-АУ становится менее эффективным.

Таким образом, максимальный сенсibiliзирующий эффект возникал в фазе S, это связано с тем, что он протекал во времени трех событий: облучения, синтеза ДНК и действия ингибитора. В клетках, облученных в G_1 , синергический эффект мутагенов был гораздо ниже, что,

Таблица

Уровень мутирования клеток и спектр структурных мутаций хромосом при облучении семян *S. capillaris* и обработке 5-АУ в разные периоды интерфазы

Варианты опыта	Число просмотренных метафаз	Метафазы с аберрациями		Количество аберраций		Количество аберраций на 100 клеток						
		число	%	число	%	асимметричные обмены	симметричные обмены	кольца	инверсии	микрофрагменты	хроматидные делеции	изохроматидные делеции
Контроль естественный	4125	15	$0,4 \pm 0,096$	15	$0,4 \pm 0,096$	$0,02 \pm 0,02$	—	—	—	$0,07 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,07$
Контроль с облучением 15 кр	3095	967	$31,3 \pm 0,83$	1024	$33,1 \pm 0,84$	$15,8 \pm 0,66$	$11,5 \pm 0,57$	$4,3 \pm 0,36$	$0,06 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,14$	$0,03 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,16$
Инкубация 5-АУ	Фаза 5-АУ	4334	$0,3 \pm 0,08$	15	$0,3 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,02$	—	—	—	$0,09 \pm 0,045$	$0,06 \pm 0,036$	$0,2 \pm 0,068$
	10 час G ₁ 15 кр+5-АУ	3162	$31,9 \pm 0,82$	1104	$34,9 \pm 0,85$	$18,6 \pm 0,69$	$11,1 \pm 0,56$	$4,0 \pm 0,35$	$0,12 \pm 0,06$	$0,5 \pm 0,13$	—	$0,6 \pm 0,13$
	6 час Фаза 5-АУ	4125	$0,3 \pm 0,085$	14	$0,3 \pm 0,085$	$0,02 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$	—	—	$0,04 \pm 0,02$	—	$0,2 \pm 0,069$
	6 час S 15 кр+5-АУ	3079	$40,5 \pm 0,89$	1313	$42,6 \pm 0,89$	$23,5 \pm 0,76$	$14,0 \pm 0,62$	$4,0 \pm 0,35$	$0,06 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,13$	$0,03 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,13$
	5-АУ	3245	$0,3 \pm 0,096$	9	$0,3 \pm 0,096$	$0,03 \pm 0,03$	—	—	—	$0,06 \pm 0,042$	$0,09 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,05$
	12 час 15 кр+5-АУ	3003	$45,6 \pm 0,89$	1463	$48,7 \pm 0,91$	$27,5 \pm 0,81$	$15,8 \pm 0,67$	$4,0 \pm 0,36$	—	$0,8 \pm 0,16$	$0,1 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,14$
	5-АУ	4257	$0,3 \pm 0,084$	12	$0,3 \pm 0,084$	$0,02 \pm 0,02$	—	—	—	$0,04 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,048$
	18 час 15 кр+5-АУ	2965	$56,2 \pm 0,82$	1766	$60,0 \pm 0,90$	$34,3 \pm 0,87$	$20,1 \pm 0,74$	$3,8 \pm 0,35$	—	$0,5 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,058$	$0,6 \pm 0,14$
	5-АУ	3637	$0,4 \pm 0,1$	15	$0,4 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,37$	—	—	$0,1 \pm 0,053$	$0,08 \pm 0,015$	$0,1 \pm 0,052$
	24 час 15 кр+5-АУ	3104	$47,2 \pm 0,89$	1568	$50,5 \pm 0,88$	$27,3 \pm 0,79$	$18,0 \pm 0,69$	$4,4 \pm 0,37$	$0,1 \pm 0,057$	$0,3 \pm 0,098$	$0,03 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,11$
3 час Фаза 5-АУ	3265	$0,4 \pm 0,1$	14	$0,4 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,04$	—	—	$0,06 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,08$	
G ₂ 15 кр+5-АУ	3198	$41,6 \pm 0,86$	1437	$44,9 \pm 0,88$	$24,1 \pm 0,76$	$15,5 \pm 0,64$	$4,2 \pm 0,35$	$0,06 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,13$	$0,03 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,14$	



по-видимому, объясняется большим промежутком времени между моментом облучения и фазой синтеза ДНК.

Полученные данные показывают, что с помощью модификации радиационного эффекта ингибиторами синтеза ДНК удается локализовать процесс формирования радиационно-индуцированных структурных мутаций хромосом на разных фазах клеточного цикла. Этот факт, а также

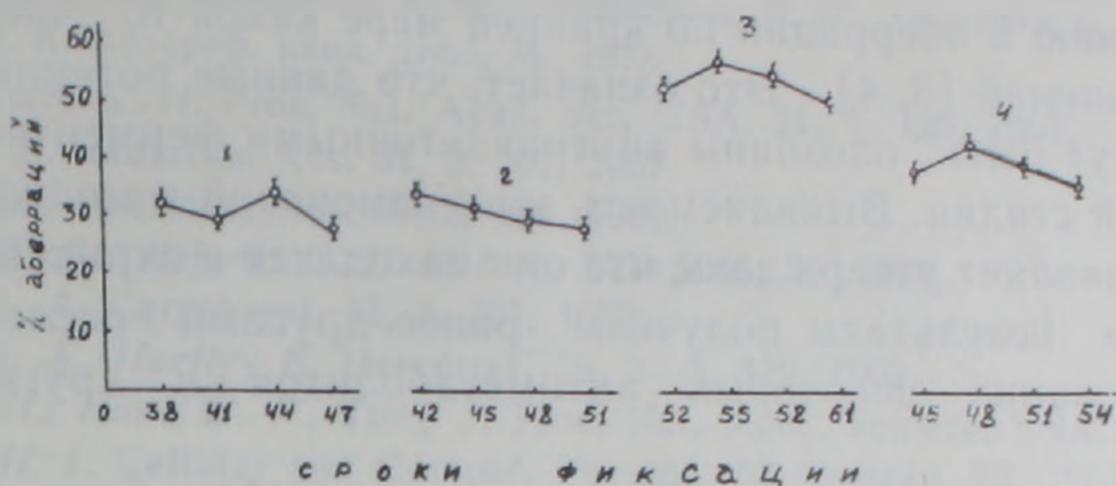


Рис. Динамика мутирования клеток при облучении семян *C. sativus* в дозе 15 кр. и обработке 5-АУ в разные периоды интерфазы. 1. Контроль с облучением (15 кр), 2. Фаза G₁, инкубация 5-АУ 10 час. 3. Фаза S, инкубация 5-АУ 18 час. 4. Фаза G₂, инкубация 5-АУ 3 час.

другие [3, 4, 6], наблюдаемые рядом авторов при модификации цитогенетического эффекта радиации в связи с внутрихромосомными процессами, включающими в себя синтез ДНК, дают возможность по новому подойти к вопросам радиационного мутагенеза.

Опыты Килмана [11], Килмана и Хартли [12] показали, что ингибиторы синтеза ДНК увеличивают выход пробелов и хроматидных делеций, индуцированных радиацией и азотистым ипритом. Полученные ими данные трудно интерпретировать однозначно, поскольку из-за асинхронности клеточной популяции корневой меристемы *v. faba*, с которой работали авторы, невозможно точно указать, в какой фазе цикла находились анализируемые клетки во время мутагенного воздействия.

Использование естественно-синхронной популяции семян *Crepis* позволяет утверждать, что какая-то часть предмутационных изменений, индуцированных радиацией и этиленмином в предсинтетической фазе митотического цикла, проходит репликацию ДНК и доживает до периода G₂, где может быть выявлена в условиях ингибирования дополнительного синтеза ДНК [3, 4]. Необходимо отметить, что этот дополнительный синтез ДНК, расцениваемый Килманом и Хартли [12] как репаративный, не является таковым, поскольку неконсервативный синтез ДНК, прстекающий после УФ и рентгеновского облучения [9, 15, 16], а также после обработки клеток алкилирующими агентами [10], нечувствителен к ингибиторам синтеза ДНК [8]. Можно предположить, что этот дополнительный синтез связан с достройкой более значительных участков ДНК, чем короткие одноцепочечные проблемы, образующиеся после репаративного вырезания поврежденного участка молекулы ДНК [2]. Можно рассматривать чувствительный к 5-АУ синтез

ДНК и период G_2 в качестве одного из этапов специального генетического процесса.

Обнаружение четкого модифицирующего эффекта в фазе G_2 в наших опытах объясняется тем, что дополнительный синтез, протекающий в период G_2 , вероятно, связан с предмитотической организацией хромосомы. Важно отметить, что нарушение именно этого процесса приводит к превращению в абберации по крайней мере какой-то части потенциальных изменений [3, 4]. Это означает, что данные потенциальные изменения могут быть опознаны внутриклеточными ферментами в предмитотической стадии. Выявляемость этих изменений в модифицируемых условиях позволяет утверждать, что они находятся в скрытой форме [3]. Аналогичные результаты получены ранее другими исследователями при использовании некоторых антиметаболитов и других веществ [11—16].

Отсутствие модифицирующего эффекта 5-АУ в фазе G_2 в наших экспериментах объясняется тем, что подавление репаративного процесса ингибиторами синтеза ДНК в G_1 не обязательно должно отразиться на появлении цитогенетических нарушений или на гибели клеток. Некоторые перенарированные молекулярные изменения в ДНК могут не привести к нарушению структуры хромосом [4]. Поэтому можно предположить, что на цитогенетическом уровне не наблюдается увеличения модифицирующего эффекта радиации в этом периоде.

На основе вышесказанного следует отметить модифицирующее действие 5-АУ в различных фазах митотического цикла при использовании после облучения ингибитора. В G_1 5-АУ не был эффективен, в S проявлял наибольшую эффективность как модификатор радиационно-индуцированных аббераций хромосом. В G_2 5-АУ также эффективен по сравнению с фазой G_1 , но менее эффективен, чем в фазе S.

Лаборатория мутагенеза растений

АН АрмССР

Поступило 28.VIII 1974 г.

Բ. Ա. ԱԶԱՏՅԱՆ, Ա. Զ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ, Ա. Պ. ԱԿԻՅԵՎ, Մ. Ս. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

ԳՆԹ-Ի ՍԻՆԹԵԶԻ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉ 5-ԱՄԻՆՍՈՒՐԱՑԻԼԻ ՉԵՎԱՓՈԽԻՉ
ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ՀԵՏԵՎԱՆՔՈՎ ՄԱԿԱՑՎԱԾ
ՔՐՈՄՈՍՈՄԱՅԻՆ ԽՈՏՈՐՈՒՄՆԵՐԸ CREPIS CAPILLARIS L.

ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ. II

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Փորձի տվյալներից պարզվել է, որ 5 ամինաուրացիլի (5-ԱՈԻ) համատեղ ազդեցությունը ռենտգենյան ճառագայթների հետ *C. capillaris*-ի միթոտիկ ցիկլի տարբեր փազաներում առաջացնում է ձևափոխիչ ազդեցություն: G_1 փազայում 5-ԱՈԻ էֆեկտիվ չէ, իսկ S փազայում նկատվում է քրոմոսոմային խոտորումների ամենաբարձր էֆեկտիվություն: G_2 փազայում 5-ԱՈԻ էֆեկտիվ է G_1 փազայի համեմատությամբ, բայց S փազայի համեմատ քրոմոսոմային խոտորումների ձևափոխիչ ազդեցությունը ցածր է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дубинин Н. П. Генетика, 5, 8, 5, 1969.
2. Дубинин Н. П., Соifer В. Н. Изв. АН СССР, серия биол., 5, 637, 1969.
3. Дубинин Н. П., Македонov Г. П., Акифьев А. П., Фролова Е. М. Генетика, 8, 4, 38, 1972.
4. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. Генетика, 6, 3, 19, 1970.
5. Протопопова Е. М., Шевченко В. В., Генералова М. В. Генетика, 6, 19, 1967.
6. Эргашев А. К. Автореф. канд. дисс., М., 1973.
7. Bell S., Wolff S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 1, 195, 1964.
8. Cleaver J. E. Radiation Res. 31, 3, 607, 1967.
9. Cleaver J. E. Radiation Res. 37, 2, 334, 1969.
10. Crathorn A. R., Roberts S. S. Nature, 211, 5045, 15, 1966.
11. Kihlman B. A. Caryologia, 15, 5, 261, 1962.
12. Kihlman B. A., Hartley B. Hereditas, 59, 2—3, 439, 1968.
13. Taylor J. H., Haut W. F., Tung J. Proc. Nat. Acad. Science, USA, 48, 1, 190, 1962.
14. Taylor J. H. J. Cellular and Compar. Physiol., 62 (Suppl.), 73, 1963.
15. Spiegler P., Norman A. Mut. Res., 10, 4, 379, 1970.
16. Spiegler P., Norman A. Radiation Res., 43, 1, 187, 1970.