ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXX, № 11, 1977

УДК 575.24

Р. А. АЗАТЯН, М. С. ЗАКАРЯН, Г. И. МИРЗОЯН, А. П. АКИФЬЕВ

# ПОСТРАДИАЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ОБЛУЧЕНИЯ КОФЕИНОМ В S-ФАЗЕ В КЛЕТКАХ CREPIS CAPILLARIS L.

Исследовался модифицирующий эффект кофеина при облучении семян C. capillaris в начале и в середине S-фазы. Установлено, что кофеин увеличивает выход аберрантных клеток в начале S-фазы за счет аберраций хромосомного типа. В середине S-фазы он увеличивает долю внутрихромосомных и межхромосомных обменов хроматидного типа.

Известно, что при воздействии радиации на ДНК повреждаются основания и возникают одиночные и двойные разрывы. Среди различного типа повреждений ДНК при облучении in vitro двойные разрывы наиболее редкий случай [1]. Если разрывы не сопровождаются превращением в брешь с помощью экзонуклеаз, они могут репарироваться действием лигаз. При появлении брешей необходимо уже совместное действие ферментов репликативного синтеза и лигаз [2—4]. Одним из подходов к изучению пострадиационного восстановления является использование специфических ингибиторов репарационных механизмов, в частности кофеина, который, как предполагается, взаимодействует с генетическим материалом [5]. Подавляет ли кофеин активность ДНК-полимеразы и лигазы, необходимых для воссоединения одноцепочечных разрывов ДНК, в настоящее время неизвестно [6—9].

Кофеин известен как ингибитор темновой репарации [10—12]. Относительно молекулярного механизма его действия единого мнения нет. Предполагают, что он или блокирует ферменты иссечения [13], или подавляет репаративный синтез ДНК [14].

Поэтому, с точки зрения репарационной гипотезы образования аберраций хромосом [1], использование кофеина как модификатора мутагенного последействия ионизирующего излучения может оказаться интересным.

В настоящей статье приводятся результаты изучения модифицирующего влияния кофеина на процесс образования радиационно-индуцированных хромосомных аберраций в клетках прорастающих семян C. capillaris в S-фазе.

*Материал и методика.* Объектом исследования были семена C. capillaris урожая 1974 г. Облучение рентгеновскими лучами проводили на аппарате РУМ-11 (напряжение 185 кв, сила тока 15 мА, без фильтра, мощность дозы 336 р/мин).

В первом варианте опыта семена замачивали в воде до 18 час., т. е. до начала S-фазы и облучали в дозе 1000 р. Сразу после облучения обрабатывали кофеином ($4 \cdot 10^{-3}$ м) в течение 6 и 12 час.

Во втором варианте опыта семена замачивали в воде в течение 25 час., т. е. до середины S-фазы и облучали в дозе 500 р. Облученные семена сразу обрабатывали

кофеином в течение 6 час. Таким образом, кофеин в этом опыте действовал на клетки, находившиеся в фазе S.

Семена проращивали в чашках Петри, в 0,01% колхицине, в термостате при 25°. Корешки фиксировали смесью уксусной кислоты и спирта (1:3). Аберрации хромосом учитывали в стадии метафазы на давленых ацетокарминовых препаратах.

*Результаты и обсуждение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что кофеин ($4 \cdot 10^{-3}$ м) не вызывает структурных изменений хромосом при воздействии на семена C. capillaris после 18- и 25-часового замачивания в воде. Уровень аберрантных клеток при этом составлял $0{,}33 \pm 0{,}23\%$, а естественный уровень мутирования—$0{,}42 \pm 0{,}24\%$. В спектре структурных мутаций хромосом, полученных в варианте с кофеином (без облучения), и при естественном мутировании были аберрации хромосомного и хроматидного типов (рис. 1).

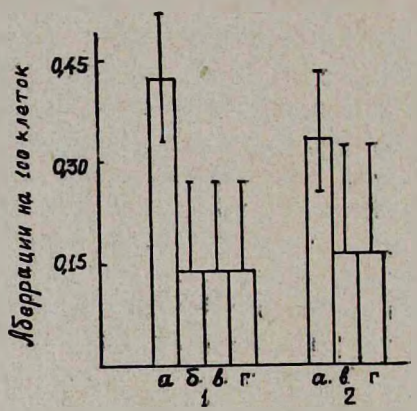


Рис. 1. Действие кофеина на прорастающие семена C. capillaris. а—количество аберраций на 100 клеток; б—изохроматидные делеции (NUpd); в—хроматидные делеции; г—хромосомные обмены; 1—контроль; 2—кофеин.

Данные рис. 2 показывают, что в первом варианте опыта отмечалось появление аберраций хромосомного (87,75%) и хроматидного (5,37%) типов. Среди аберраций хромосомного типа были асимметричные и симметричные обмены, кольца и инверсии; среди хроматидных аберраций—хроматидные и изохроматидные делеции типа Up и Ud.

Постобработка облученных клеток кофеином в течение 6-и и 12-и час. достоверно увеличивает выход аберрантных клеток и модифицирует спектр структурных мутаций хромосом. Следует отметить, что спектр радиационно-индуцированных аберраций изменяется под действием кофеина особенно при 12-часовой обработке, при этом отмечаются в основном перестройки хромосомного типа (рис. 2).

Во втором варианте опыта (только облучение) появлялись в основном хроматидные аберрации (67,58%), а хромосомные составляли 8,92% от общего числа перестроек. В спектре структурных мутаций хромосом имелись все типы хроматидных перестроек (рис. 3).

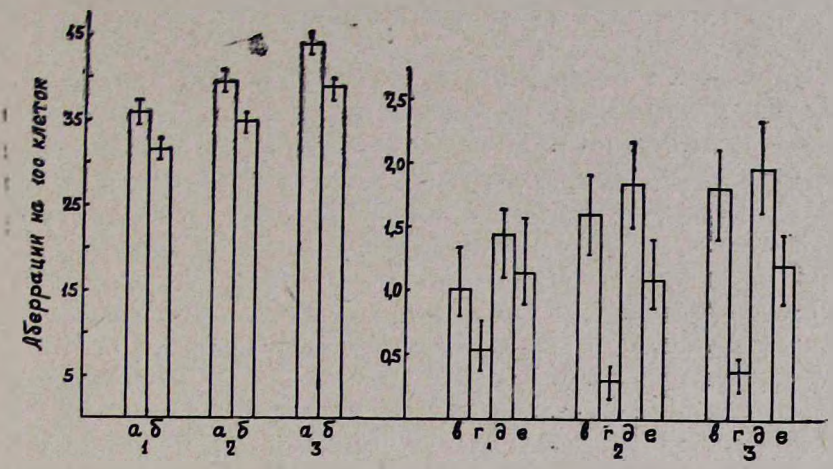


Рис. 2. Модифицирующий эффект кофеина при облучении прорастающих семян C. capillaris в начале S-фазы. а—количество аберраций на 100 клеток; б—хромосомные обмены; в—изохроматидные делеции (NUpd); г—изохроматидные делеции (без NUpd); д—хроматидные делеции; е—микрофрагменты. 1—рентгеновские лучи (18 час.); 2—рентгеновские лучи+кофеин (18+6); 3—рентгеновские лучи+кофеин (18+12).

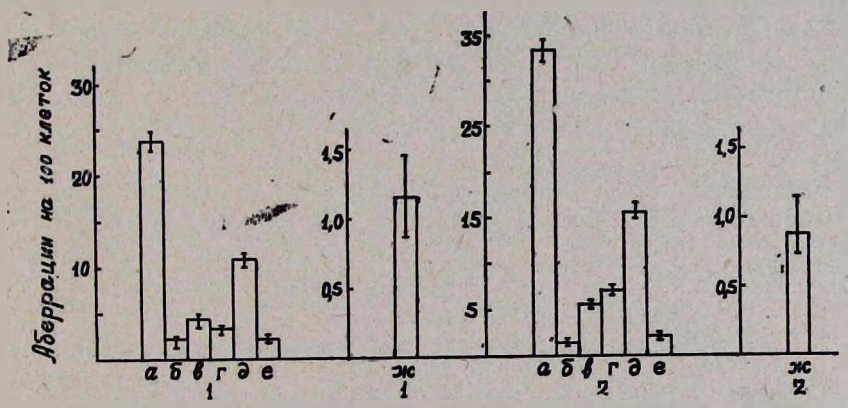


Рис. 3. Модифицирующий эффект кофеина при облучении прорастающих семян C. capillaris в середине S-фазы. а—количество аберраций на 100 клеток; б—хромосомные обмены; в—изохроматидные делеции (NUpd); г—изохроматидные делеции (без NUpd); д—хроматидные делеции: е—хроматидные обмены; ж—микрофрагменты. 1—рентгеновские лучи (25 час.); 2—рентгеновские лучи+кофеин (25+6).

Постобработка облученных клеток значительно увеличивает выход хроматидных аберраций (75,70%) в середине S-фазы. Особенностью модифицирующего действия кофеина является увеличение доли аберраций обменного типа, относительное увеличение количества изохроматидных разрывов типа Up, Ud и хроматидных делеций (рис. 3). В этом варианте опыта доля хроматидных аберраций в клетках после облучения и обработки кофеином была значительно выше, чем доля аберраций хромосомного (4,63%) типа. Это указывает на то, что облучение

и модификация даже в эти сроки затрагивают в основном клетки, находящиеся в середине S-фазы, когда большинство клеток находится в фазе синтеза ДНК.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что кофеин модифицирует не только количественные параметры радиационного хромосомного мутагенеза, но и долю внутрихромосомных и межхромосомных обменов, особенно в середине S-фазы (рис. 3). Модифицирующий эффект кофеина в начале S-фазы—конце $G_1$, особенно при 12-часовом замачивании семян в нем (рис. 2), выражается в увеличении числа перестроек хромосомного типа.

В концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ М кофеин способствует соединению однонитевых разрывов ДНК, вызываемых в фазе S при облучении.

Соединение разрывов является одним из наиболее четких проявлений пострадиационной репарации ДНК на молекулярном уровне. Можно предположить, что оно прямо не связано с такими восстановительными процессами, как внеплановый синтез ДНК, репаративная (неполуконсервативная) репликация и эффект репарации на хромосомном и клеточном уровнях [5—8, 15, 16].

Таким образом, данные наших экспериментов показывают, что кофеин модифицирует цитогенетический эффект рентгеновских лучей в начале и в середине S-фазы. Модификация аберраций хромосомного типа в начале S-фазы показывает, что в это время большинство клеток находится в фазе $G_1$. Увеличение доли обменных аберраций хроматидного типа в середине S-фазы объясняется тем, что кофеин способствует соединению однонитевых разрывов ДНК.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Институт химической физики АН СССР
Поступило 28.XII 1976 г.

Ռ. Ա. ԱԶԱՏՅԱՆ, Մ. Ս. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Գ. Ի. ՄԻՐԶՈՅԱՆ, Ա. Պ. ԱԿԻՖԵՎ

## ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ՑԻՏՈԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՁԵՎԱՓՈԽՈՒՄԸ ԿՈՖԵԻՆՈՎ CREPIS CAPILLARIS L. ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ S-ՇՐՋԱՆՈՒՄ

### Ա մ փ ո փ ո ւ մ

*Ուսումնասիրվել է կոֆեինի ձևափոխող հատկությունը* C. capillaris *խոնավ սերմերը* S*-շրջանի սկզբնական և միջին մասում ճառագայթահարելու ժամանակ։ Պարզվել է, որ կոֆեինը նշված շրջաններում չի փոխում քրոմոսոմային խոտորումների մակարդակը բնական ստուգիչի համեմատությամբ, որոնք հիմնականում քրոմոսոմային և քրոմատիդային տիպի են։*

*Կոֆեինը* S*-շրջանի սկզբում, ճառագայթահարումից հետո ազդելիս, ավելացնում է փոփոխված բջիջների մակարդակը՝ քրոմոսոմային խոտորումների տիպի հաշվին, իսկ* S*-շրջանի միջին մասում ձևափոխում է փոփոխված բջիջ-*

*ների քանակը՝ իշեցնելով միջքրոմոսոմային և ներքրոմոսոմային փոխանակումների քանակը։*

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Дубинин Н. П., Сойфер В. Н.* Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 637, 1969.
2. *Сойфер В. Н.* Молекулярные механизмы мутагенеза. 409, М., 1969.
3. *Wolff SH., Scott D.* Expit. Cell Res., 55, 19, 1969.
4. *Yamamoto K., Yamaguchi V.* Mutat. Res., 8, 2, 428, 1969,
5. *Goth R. Cleaver E. L.* Mutat. Res., 36, 1, 105, 1976.
6. *Айказян Э. В., Михельсон В. М., Жестяников В. Д.* Цитология, 15, 7, 881, 1973
7. *Шалумашвили М. А., Тарасов В. А., Мясова Э. Н.* Радиобиология, 11, 1, 64, 1971.
8. *Митрофанов Ю. А., Отраднова В. В.* Успехи совр. биологии, 80, 4, 39, 1975.
9. *Kihlman B. A., Sturelid S.* Hereditas, 80, 247, 1975.
10. *Alper T.* Brit. J. Radiol., 36, 431, 1963.
11. *Harm W.* Mutat. Res., 4, 2, 93, 1967.
12. *Rauth A. M.* Radiation Res., 31, 1, 121, 1967.
13. *Lumb I. R., Sideropoulos A. S., Shenkel D. M.* Kinetics of inhibition M. G. G. 102, 2, 108, 1968.
14. *Grigg G. K.* Kinetics of inhibition M. G., 102, 4, 316, 1968.
15. *Ганасси Е. Э.* Радиационное повреждение и репарация хромосом, 36, М., 1976.
16. *Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Аптикаева Г. Ф.* Радиобиология, 13, 4, 606, 1973.