

Р. А. АЗАТЯН, А. З. ВОСКАНЯН, М. М. САРКИСЯН, Р. Е. ПАНОЯН

МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ОБЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРАМИ СИНТЕЗА ДНК В ПРЕДСИНТЕТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА *CREPIS CAPILLARIS* L.

Исследования проводились на сухих семенах *C. capillaris*. Комбинированная обработка рентгеновскими лучами и ФУДР приводит к увеличению аберрантных клеток. Пострадиационный эффект тимидина в фазе G_1 не модифицирует уровень мутирования. Облучение и обработка ФУДР+тимидин приводят к достоверному снижению аберрантных клеток.

В исследованиях в области мутагенеза большую роль играют работы модификации радиационного эффекта специфическими ингибиторами синтеза ДНК [1—3].

Применяя ингибиторы в пострадиационный период и изучая их действие на фоне различных фаз митотического цикла клеток, можно выявить природу процессов, лежащих в основе цитогенетических нарушений [4—6]. Особенно перспективно в этом направлении использование в качестве модификаторов облучения ингибиторов синтеза ДНК [7, 8].

Нами изучался мутагенный эффект специфических ингибиторов синтеза ДНК 5-фтор-2-дезоксинуридина (ФУДР) и тимидина в предсинтетическом периоде клеточного цикла у семян *Crepis capillaris*.

Материал и методика. Объектом исследования были семена *C. capillaris* в возрасте 6 месяцев. Облучение проводилось на аппарате РУМ-11 (напряжение 185 кв, сила тока 15 мА, без фильтра, мощность дозы 440 р/мин). Воздушно-сухие семена облучались в дозе 10 кр и затем обрабатывались растворами ингибиторов ФУДР (10^{-7} М), тимидином ($5 \cdot 10^{-5}$ М), а также смесью ФУДР+тимидин в пределах фазы G_1 в течение 5 и 10 час.

Во всех обработанных вариантах семена, смоченные 0,01% колхицином, помещались в чашки Петри, и проращивались в термостате при 25°. Фиксация проводилась в три срока. На рисунке приведены данные, полученные при 10-часовой обработке ингибиторами (рис.).

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

Результаты и обсуждение. В контрольном варианте (облучение в дозе 10 кр) уровень мутирования клеток составлял $32,32 \pm 1,14$; структурные мутации хромосом были в основном хромосомного типа ($33,60 \pm 1,15\%$).

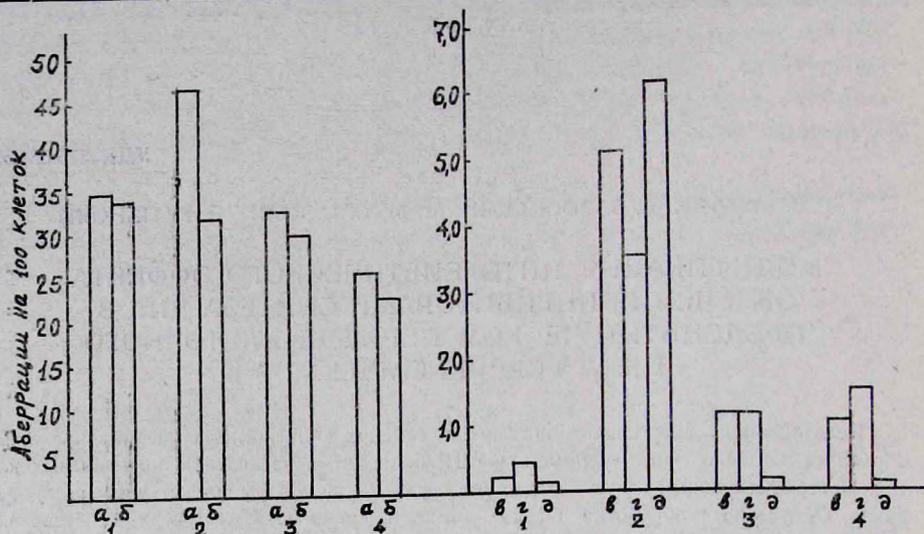


Рис. Модифицирующий эффект ФУДР, тимидина и ФУДР+тимидина при облучении сухих семян *C. carillaris*. а—количество аберраций на 100 клеток, б—хромосомные обмены, в—изолюкусные разрывы, г—микрофрагменты: д—хроматидные разрывы. 1—рентгеновские лучи, 2—рентгеновские лучи+ФУДР, 3—рентгеновские лучи+тимидин, 4—рентгеновские лучи+ФУДР+тимидин.

Действие ФУДР на хромосомы. Наиболее сильные повреждения хромосом наблюдались при 10-часовой обработке. Уровень мутирования клеток под воздействием ФУДР составил $4,58 \pm 0,50\%$. Спектр структурных мутаций хромосом в основном был представлен хроматидными и изохроматидными делециями.

Модификация цитогенетического эффекта рентгеновского облучения ФУДР. В результате облучения клеток на стадии однонитчатой хромосомы в G_1 возникали перестройки хромосомного и хроматидного типов. Преобладающим видом аберраций являлись хромосомные транслокации и кольца ($31,78 \pm 1,13\%$). Комбинированная обработка облучением и ФУДР приводила к увеличению хроматидных делеций ($6,17 \pm 0,58$), изохроматидных разрывов ($5,11 \pm 0,53$) и микрофрагментов ($3,52 \pm 0,45$). Модификация эффекта радиации происходила за счет увеличения количества аберраций с несоединившимися фрагментами хромосом. Причем на фоне увеличения выхода аберраций фрагментного характера наблюдалось реальное увеличение числа хромосомных транслокаций и колец, т. е. процесс модификации сопровождался изменением спектра радиационных повреждений (рис.).

Вообще для сенсibiliзирующего взаимодействия эффектов ФУДР и облучения, индуцирующего хроматидные перестройки, характерно увеличение хроматидных, изохроматидных разрывов типа NU_{pd} и клеток с массовой фрагментацией хромосом.

Действие тимидина на хромосомы. Цитогенетический эффект тимидина (тимидиндезоксирибозид TgP) зависит от дозы ингибитора: при

относительно низких дозах мутагенный эффект не обнаруживается [7].

При обработке тимидином уровень измененных клеток составил $0,57 \pm 0,19\%$, что близко к контролю ($0,51 \pm 0,15\%$).

Аберрации хромосом в основном представлены хроматидными и изо-хроматидными делециями.

Модификация цитогенетического эффекта рентгеновского облучения тимидином. Пострадиационный эффект тимидина в фазе G_1 приводит к образованию перестроек хромосомного типа. Тимидин не модифицирует уровень аберрантных клеток (рис.).

При совместном действии облучения и тимидина преобладающим видом аберраций хромосом являются хромосомные транслокации и кольца ($29,82 \pm 1,17\%$). В этом варианте опыта наблюдалось реальное снижение числа дицентриков и колец, т. е. процесс модификации сопровождался изменением спектра радиационных повреждений. Тимидин приводит к увеличению изохроматидных разрывов ($1,19 \pm 0,28\%$), а также микрофрагментов ($1,19 \pm 0,28\%$). Число хроматидных делеций ($0,20 \pm 0,11\%$) почти на уровне контроля (рис.).

Действие ФУДР+тимидина на хромосомы. При совместном действии ФУДР+тимидина в предсинтетическом периоде мутагенный эффект не обнаруживается. Уровень мутирования клеток составляет $0,68 \pm 0,20\%$. Спектр структурных мутаций хромосом в основном составляют хроматидные, изохроматидные делеции и микрофрагменты (рис.).

Модификация цитогенетического эффекта рентгеновского облучения совместным действием ФУДР+тимидина. Такая комбинация приводит к достоверному снижению уровня аберрантных клеток ($24,10 \pm 1,03\%$).

Преобладающим видом аберраций являются хромосомные транслокации и кольца ($22,59 \pm 1,02\%$). Модификация эффекта радиации происходит за счет снижения межхромосомных транслокаций и колец, а также изохроматидных разрывов. Хроматидные делеции возникают на уровне контроля. Количество микрофрагментов увеличивается.

Модификация радиационного эффекта ингибиторами синтеза ДНК показана в ряде работ [4—6, 9—16], по данным которых цитогенетический эффект радиации этим классом ингибиторов сопровождается фрагментацией хромосом и перестроек без соединения фрагментов. Тейлор [18] полагает, что ФУДР препятствует восстановлению индуцированных рентгеновскими лучами повреждений, ингибируя процессы слияния фрагментов с незаживленными концами, что основано на синтезе ДНК. Модифицирующий эффект ФУДР в фазе G_1 имеет важное значение для понимания общего процесса радиационного мутагенеза. Наблюдаемое в результате пострадиационного воздействия ФУДР дополнительное количество разрывов хромосом возникает вследствие подавления репаративного синтеза ДНК ингибитором [8]. В нашей работе показано, что процесс модифицирования ФУДР сопровождается изменением спектра повреждений, индуцированных облучением. На фоне увеличения количества аберраций фрагментного характера (хроматид-

ные разрывы, изохроматидные делеции типа NU_{pd} , хромосомные делеции, микрофрагменты) наблюдается снижение общего количества aberrаций хромосомного типа, изохроматидных делеций с сестринским соединением хроматид (типа U_{pd}), хроматидных транслокаций. Относительное уменьшение выхода хромосомных транслокаций и изохроматидных разрывов U_{pd} при возрастании числа концевых хромосомных делеций и изохроматидных aberrаций типа NU_{pd} можно рассматривать как доказательство того, что ФУДР и тимидин препятствуют процессу слияния концов хромосом при образовании этих aberrаций. Предположение о подавлении ФУДР процесса слияния фрагментов хромосом согласуется с гипотезой Тейлора [17], согласно которой синтез ДНК является необходимым условием для образования хромосомных перестроек, и противоречит точке зрения Вольфа [19], по которому слияние разорванных радиацией фрагментов происходит на основе синтеза структурных белков хромосомы.

Однако, по-видимому, подавление репаративного процесса ингибиторами синтеза ДНК в G_1 не обязательно приводит к появлению цитогенетических нарушений или к гибели клеток. Во-первых, некоторые нерепарированные молекулярные изменения в ДНК могут не привести к нарушению структуры хромосом. Во-вторых, временно приостановленная реперация без вступления молекулы ДНК в другие синтезы (например, репликативный) может пройти повторно при снятии блока. В наших опытах при воздействии тимидином на фазу G_1 не обнаруживается модифицирующего эффекта. Однако спектр структурных мутаций хромосом свидетельствует о реальном снижении aberrаций хромосомного типа. Вероятно, модифицирующий эффект тимидина объясняется ускорением нормального синтеза ДНК.

Известно, что модифицирующий эффект антиметаболитов—ингибиторов синтеза ДНК исчезает в случае добавления дефицитных предшественников [7]. В наших опытах это также подтвердилось. При обработке клеток в фазе G_1 смесью ФУДР+тимидин исчезает не только модифицирующий эффект, но и достоверно снижается цитогенетический эффект самого облучения. В этом варианте опыта нами было отмечено, что снижение выхода aberrаций происходит в основном за счет хромосомных транслокаций и колец.

Таким образом, данные наших опытов показывают, что ингибиторы синтеза ДНК способны модифицировать цитогенетический эффект рентгеновских лучей в фазе G_1 . Модификация aberrаций хромосомного типа осуществляется в предсинтетическом периоде.

Ռ. Ա. ԱԶԱՏՅԱՆ, Ա. Զ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ, Մ. Մ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ռ. Ե. ՓԱՆՈՅԱՆ

ՀԱՌԱԿԱՅԹԱՀԱՐՄԱՆ ԲԶՋԱԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԷՖԵԿՏԻ ՄՈՒԴՅԻԿԱՑԻԱՆ
ԴԵԹ-Ի ՍԻՆԹԵԶԻ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐՈՎ CREPIS CAPILLARIS-Ի
ՍԵՐՄԵՐԻ ԲԶՋԱՅԻՆ ՑԻԿԼԻ ՆԱԽԱՍԻՆԹԵԶԱՅԻՆ ՓՈԽԼՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Crepis capillaris-ի օդաչոր սերմերը բջջային ցիկլի նախասինթեզային շրջանում ենթարկվել են ճառագայթաահարման և անմիջապես մշակվել ՖՈՒԴՐ-ի, թիմիդինի և ՖՈՒԴՐ+թիմիդինի լուծույթներով:

Թենտոգենյան ճառագայթների և ՖՈՒԴՐ-ի կոմբինացված ազդեցության դեպքում ավելանում է քրոմատիդային դելեցիաների, միկրոֆրագմենտների և ոչ միացյալ տիպի իզոքրոմատիդային կտրվածքների քանակը:

G₁-փուլում չի դիտվում թիմիդինի հետուդիացիոն մոդիֆիկացնող ազդեցությունը, խոտորումների ընդհանուր քանակը մնում է միևնույն մակարդակին, սակայն, ի տարբերություն միայն ճառագայթահարման, այստեղ միկրոֆրագմենտների և իզոքրոմատիդային կտրվածքների ավելացումը ոչ արժանահավաստ է:

Ճառագայթահարման և ՖՈՒԴՐ+թիմիդինի համատեղ մշակման դեպքում տեղի է ունենում խոտորված բջիջների մակարդակի արժանահավաստ իջեցում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дубинин Н. П. Генетика, 5, 8, 5, 1969.
2. Дубинин Н. П., Соифер В. Н. Изв. АН СССР, серия биол., 5, 637, 1969.
3. Тарасов В. А., Сафонова Г. М., Сидоров В. П., Мясова Э. Н. Генетика, 12, 3, 4. 1976.
4. Phillips R. A., Tolmach L. J. Radiation Res., 29, 413, 1966.
5. Weiss B. J., Tolmach L. J. Biophysical J., 7, 799, 1967.
6. Kihlman B. A., Hartley B. Hereditas, 59, 439, 1968.
7. Митрофанов Ю. А., Отраднова В. В. Успехи совр. биол., 80, 4, 39, 1975.
8. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Генетика, 12, 8, 44, 1976.
9. Kihlman B. A. Edinburgh, Oliver Boyd, p. 108, 1966.
10. Kihlman B. A., Hartley B. Mut. Res., 4, 771, 1967.
11. Kihlman B. A., Hartley B. Exptl cell Res., 48, 29, 1967.
12. Ahnström G., Natarajan A. T. Hereditas, 54, 3, 379, 1966.
13. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф., Генетика, 4, 3, 18, 1970.
14. Yang G. M., Hahn N., Bagshaw M. A. Exptl cell Res., 42, 130, 1966.
15. Mennigman H. D., Szybalski W. Biochem. and Biophys. Res. commun., 9, 598, 1962.
16. Brides B. A. Low J., Munson R. J. Mol. and Gen. Genetics, 103, 3, 266, 1968.
17. Taylor J. H., Haut W. F., Tang J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 48, 190, 1962.
18. Taylor J. H. J. Cell and Compar. Physiol., 622, suppl. 1, 73, 1963.
19. Wolff S., Scott D. Exptl cell Res., 55, 1, 9, 1969.