

МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ОБЛУЧЕНИЯ 5-ФТОР-2-ДЕЗОКСИУРИДИНОМ И ТИМИДИНОМ В S- И G₂-ФАЗАХ В КЛЕТКАХ CREPIS CAPILLARIS L.

Р. А. АЗАТЯН, Г. И. МИРЗОЯН

Исследовался модифицирующий эффект 5-фтор-2-дезоксимуридина (ФУДР) и тимидина при облучении прорастающих семян *C. capillaris* в начале и в середине S- и G₂-фаз. Установлено, что ФУДР увеличивает выход аберрантных клеток в начале и в середине S-фазы за счет простых и изолюкусных разрывов и снижает выход аберраций хромосомного типа. Тимидин и комбинация ФУДР+тимидин оказывают «защитный» эффект. В фазе G₂ они не оказывают влияния на количество аберраций, индуцированных рентгеновскими лучами в середине S-фазы.

В последние годы многие исследователи, работающие в области теории мутаций, склоняются к мысли, что образование аберраций хромосом находится в тесной связи с репарацией ДНК или генетической рекомбинацией [1]. Известно, что репарация ДНК в клетках высших организмов возможна в любой период интерфазы и даже во время самого митоза [2], тогда как аберрации, как правило, возникают в строго определенные моменты митотического цикла в соответствии с типом использованного мутагена. Основной постулат репарационной гипотезы образования аберраций хромосом—равновероятное разрезание эндонуклеазой нормальной и поврежденной цепи ДНК—отвергается на основании опытов Парибока и Томилина [3] и Кэрнера и Сетлоу [4], показавших, что эндонуклеаза действует только на поврежденной цепи.

Известно, что одним из этапов формирования и распада временных дуплексов является дополнительный синтез ДНК, отличный от индуцированной репаративной репликации [5]. Представляется целесообразным воздействовать на хромосомный мутагенез ингибиторами-антагонистами предшественников, с одной стороны, и с другой—их нормальными аналогами. Наибольшей специфичностью среди подобных модификаторов, по-видимому, обладает 5-фтор-2-дезоксимуридин (ФУДР), связывающий тимидилатсинтетазу и блокирующий таким образом эндогенный синтез тимидиловой кислоты и его нормальный аналог—тимидин [6]. Имеющиеся данные позволяют интерпретировать любую возможную модификацию хромосомного мутагенеза под

действием ФУДР или тимидина как результат подавления или стимуляции синтеза ДНК.

Исходя из изложенного, мы изучали модифицирующее влияние ФУДР и тимидина на эффект торможения репликативного и дополнительного синтеза ДНК в S- и G₂-фазах при рентгенооблучении прорастающих семян *C. capillaris* в начале и в середине S-фазы.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена *C. capillaris* урожая 1976 года. Облучение рентгеновскими лучами проводили на аппарате РУМ-11 (напряжение 185 кВ, сила тока 15 мА без фильтра, мощность дозы 440 Р/мин.).

В первом варианте опыта воздушно-сухие семена замачивали в воде в течение 18 час., т. е. до начала фазы S, и облучали дозой 1 кр. Сразу после облучения семена обрабатывали водными растворами ФУДР (10⁻⁷ М), тимидина (5·10⁻⁶ М) и смесью ФУДР+тимидин в течение 7 и 14 час.

Во втором варианте опыта семена замачивали в воде в течение 25 час., т. е. до середины S-фазы, облучали дозой 0,5 кр и сразу обрабатывали ФУДР, тимидином и смесью ФУДР+тимидин в течение 7 час.

В третьем варианте опыта часть облученных семян в середине S-фазы проращивали в воде и до фиксации в течение 3 час., т. е. в пределах фазы G₂, обрабатывали раствором ФУДР+колхицин, тимидин+колхицин и ФУДР+тимидин+колхицин.

Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 0.01%-ным колхицином, в термостате при 25°. Корешки фиксировали в первом митозе смесью уксусной кислоты и спирта (1:3). Аберрации хромосом учитывали в стадиях метафазы на давленных ацетокарминовых препаратах.

Результаты и обсуждение. *Цитогенетический эффект ФУДР и тимидина в начале и середине S-фазы.* Обработка прорастающих семян раствором ФУДР в течение 14 и 7 час. в начале и середине фазы S увеличивает выход аберраций хромосом по сравнению с контролем за счет простых и изолюкусных разрывов (рис. 1). Сильное повреждающее действие ФУДР наблюдается при 14-часовой обработке, когда большинство клеток находится в S-фазе. Следует отметить, что ФУДР обладает способностью индуцировать разрывы в начале и в середине S-фазы. Тимидин в использованной нами концентрации не оказывает существенного влияния на естественный мутационный процесс (0.41—0.45%). Комбинированное воздействие ФУДР и тимидина в начале и в середине S-фазы при 14- и 7-часовой обработке приводит к ликвидации ингибирующего эффекта ФУДР (рис. 1).

Влияние ФУДР и тимидина на выход радиационно индуцированных аберраций хромосом в начале и середине S-фазы. Полученные данные показывают, что ионизирующая радиация индуцирует в начале S-фазы в клетках *C. capillaris* аберрации в основном хромосомного типа (67, 70%), хроматидные аберрации составляют 3.09% от общего количества перестроек (рис. 2).

Количество хромосомных обменов в начале S-фазы при действии ФУДР на облученные прорастающие семена меняется. Число простых и изолюкусных разрывов достоверно превышает их суммарное количество, что обусловлено собственным эффектом ФУДР. При этом модифицирующее действие ингибитора синтеза ДНК проявляется при об-

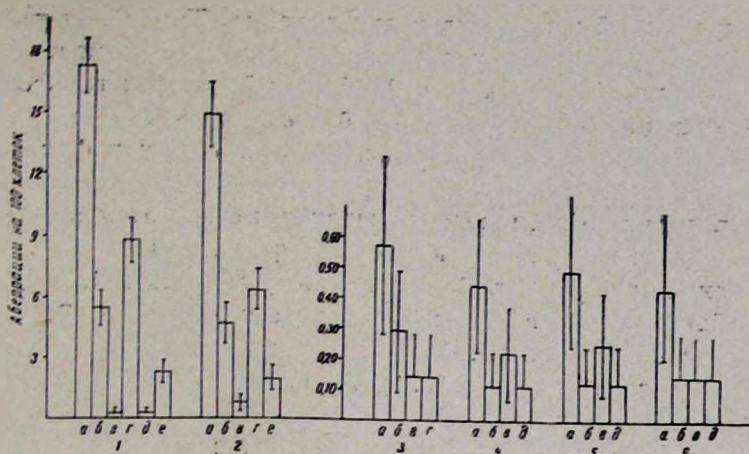


Рис. 1. Цитогенетический эффект ФУДР и тимидина на прорастающие семена *C. capillaris* в начале и середине S-фазы. а—количество аберраций на 100 клеток; б—изолюкусные разрывы NU_{rd} ; в—изолюкусные разрывы со слиянием; г—хроматидные разрывы; д—хроматидные обмены; е—микрофрагменты. 1. Обработка ФУДР 14 час. в начале S-фазы; 2. Обработка ФУДР 7 час. в середине S-фазы; 3. Обработка тимидином 14 час. в начале S-фазы; 4. Обработка тимидином 7 час. в начале и середине S-фазы; 5. Обработка ФУДР+тимидин 14 час. в начале S-фазы; 6. Обработка ФУДР+тимидин 7 час. в начале и середине S-фазы.

работке в течение 7 и 14 час. (рис. 2). При действии ФУДР на облученные прорастающие семена в начале S-фазы хромосомные аберрации составили 48,16%, а хроматидные—21,78%. Тимидин, а также комбинация ФУДР+тимидин заметно снижают число хромосомных аберра-

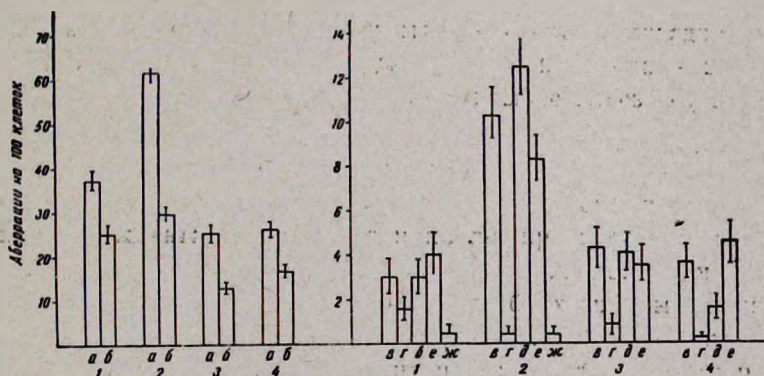


Рис. 2. Модификация радиационных повреждений хромосом *C. capillaris* с последующей модификацией ФУДР и тимидином в начале S-фазы. а—количество аберраций на 100 клеток; б—хромосомные обмены; в—изолюкусные разрывы NU_{rd} ; г—изолюкусные разрывы со слиянием; д—хроматидные деления; е—микрофрагменты; ж—хроматидные транслокации. 1. Облучение прорастающих семян 18 час. 2. Облучение 18 час., обработка ФУДР 14 час. 3. Облучение 18 час., обработка тимидином 14 час. 4. Облучение 18 час., обработка ФУДР+тимидин 14 час.

ний, т. е. оказывают «защитный» эффект на радиационное мутирование хромосом (рис. 2). При комбинированном действии облучения и тимидина хромосомные aberrации составили 50,0, хроматидные—19,12%, а при действии облучения и комбинации ФУДР+тимидин—63,58 и 6,43% соответственно. При рентгенооблучении в середине S-фазы появлялись в основном хроматидные aberrации (78,50%), а хромосомные составляли 9,10% от общего числа перестроек. В спектре структурных мутаций хромосом имелись все типы хроматидных перестроек (рис. 3).

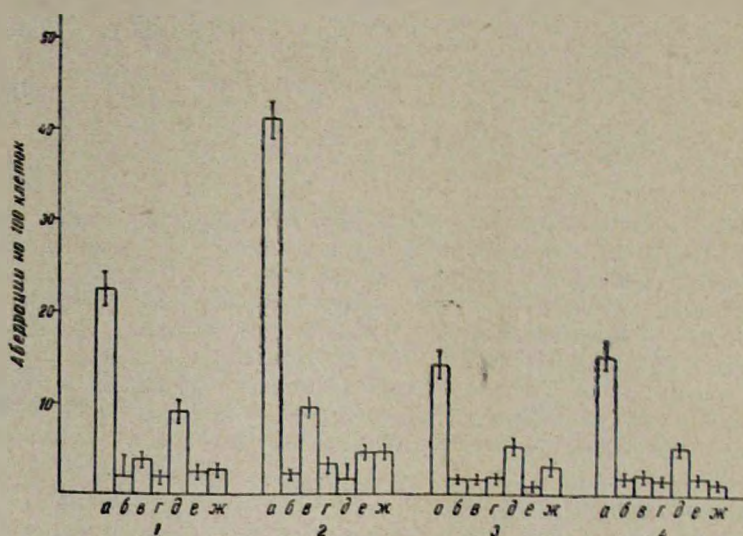


Рис. 3. Модификация радиационных повреждений хромосом *S. capillaris* с последующей модификацией ФУДР и тимидином в середине S-фазы. а—количество aberrаций на 100 клеток; б—хромосомные обмены; в—изолюкусные разрывы NI_{pd} ; г—изолюкусные разрывы со слиянием; д—хроматидные делеции; е—хроматидные обмены; ж—микрофрагменты. 1. Облучение прорастающих семян 25 час. 2. Облучение 25 час., обработка ФУДР 7 час. 3. Облучение 25 час., обработка тимидином 7 час. 4. Облучение 25 час., обработка ФУДР+тимидином 7 час.

Постобработка облученных клеток ФУДР в середине S-фазы значительно увеличивает выход хроматидных aberrаций (83,48%). Это указывает на то, что облучение и модификация даже в эти сроки затрагивают в основном клетки, находящиеся в середине S-фазы, когда большинство их находится в фазе синтеза ДНК.

Обработка облученных клеток тимидином и комбинацией ФУДР+тимидин в середине S-фазы достоверно снижает уровень aberrантных клеток по сравнению с вариантом с одним только облучением.

Число изолюкусных разрывов типа NI_{pd} увеличивается, а хроматидные обмены снижаются по сравнению с вариантами с одним облучением и облучением+ФУДР. При комбинированном действии облучения и тимидина хроматидные aberrации составили 69,32, хромосом-

ные—10,59%, а при действии облучения и комбинации ФУДР+тимидин—80,70 и 11,83% соответственно.

Влияние ФУДР и тимидина на выход радиационно индуцированных aberrаций хромосом в G_2 -фазе.

При дополнительном воздействии ФУДР в фазе G_2 как общее число хромосомных обменов, так и количество обменов каждого типа в расчете на 100 клеток изменяется (рис. 4). И в том и в другом случае количество индуцированных радиацией предмутационных потенциаль-

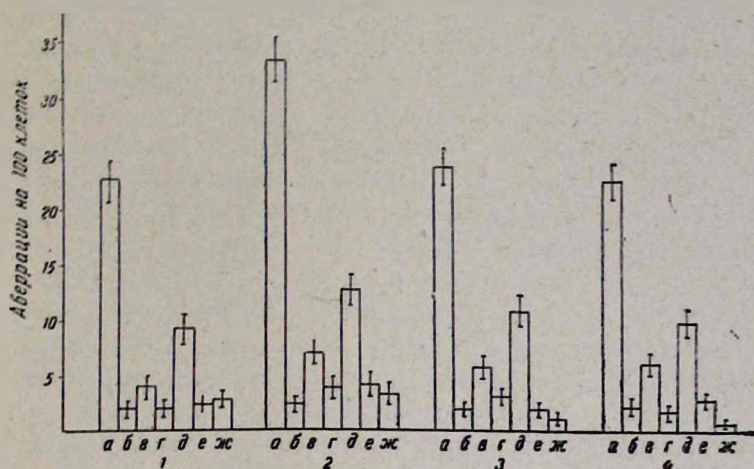


Рис. 4. Модификация радиационных повреждений хромосом *C. capillaris* с последующей модификацией ФУДР и тимидином в фазе— G_2 . а—количество aberrаций на 100 клеток; б—хромосомные обмены; в—изолокусные разрывы NU_{pd} ; г—изолокусные разрывы со слиянием; д—хроматидные делеции; е—хроматидные обмены; ж—микрофрагменты. 1. Облучение прорастающих семян 25 час., в середине S-фазы. 2. Облучение в середине S-фазы, обработка ФУДР 3 час. в фазе G_2 . 3. Облучение в середине S-фазы, обработка тимидином 3 час. в фазе G_2 . 4. Облучение в середине S-фазы, обработка ФУДР+тимидин 3 час. в фазе G_2 .

ных изменений, реализующихся в S-фазе в хроматидные aberrации, достоверно увеличивается. Дополнительное число перестроек, возникающих в присутствии ФУДР, обусловлено появлением простых и изолокусных хроматидных разрывов. Тимидин, а также комбинированное воздействие ФУДР+тимидин в фазе G_2 не оказывают влияния на количество aberrаций, индуцированных в середине S-фазы.

Данные по собственному цитогенетическому эффекту ФУДР находятся в соответствии с представлением о важном значении ингибирования синтеза ДНК в понимании общего процесса радиационного мутагенеза. Наблюдаемое в результате пострadiационного воздействия ФУДР дополнительное количество разрывов хромосом возникает вследствие подавления ингибитором репликативного и дополнительного синтеза ДНК [7—9]. Следовательно, радиация индуцирует повреждения в структуре хромосомальной ДНК, поскольку их восстановление осуществляется за счет синтеза дезоксирибонуклеотидов. Специфичность

действия ФУДР хорошо подтверждается экспериментом, в котором его собственный цитогенетический эффект полностью купировался тимидином. Можно полагать, что торможение неиндуцированного синтеза ДНК в S- и G₂-фазах в меристематических клетках *C. capillaris* приводит к возникновению хромосомных и хроматидных разрывов. Данные наших опытов показывают, что воздействие ФУДР примерно одинаково увеличивает число как изолюкусных, так и простых хроматидных делеций. Это, по-видимому, означает, что около половины односпиральных дефектов в ДНК, которые не могут быть репарированы в присутствии ФУДР, выдерживают до начала и середины фазы S, затем превращаются в хроматидные разрывы. Нам показано, что процесс модифицирования ФУДР и тимидином в фазах S и G₂ сопровождается изменением спектра повреждений, индуцированных облучением в начале и середине S-фазы. На фоне увеличения количества аббераций фрагментного характера (хроматидные, изолюкусные разрывы типа NU_{pd}, микрофрагменты) наблюдается снижение общего количества аббераций хромосомного типа, изолюкусных разрывов с сестринским соединением хроматид (типа U_{pd}) (рис. 2, 3). Относительное уменьшение выхода хромосомных транслокаций и изолюкусных разрывов типа U_{pd} при возрастании числа концевых хромосомных делеций и изолюкусных разрывов типа NU_{pd} можно рассматривать как доказательство того, что ФУДР и тимидин препятствуют процессу слияния концов хромосом при образовании этих аббераций (рис. 3). Известно, что модифицирующий эффект антиметаболитов-ингибиторов синтеза ДНК исчезает в случае добавления дефицитных предшественников [6].

В наших опытах это также подтвердилось. При обработке клеток в начале и в середине S-фазы тимидином и смесью ФУДР+тимидин исчезает не только модифицирующий эффект, но и достоверно снижается цитогенетический эффект самого облучения, индуцированного в начале и в середине фазы S. В этих опытах нами было установлено, что снижение выхода аббераций происходит в основном за счет хромосомных транслокаций и колец (рис. 2 и 3).

Данные, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют об одной общей черте—эффект подавления дополнительного синтеза ДНК в G₂-фазе, индуцированного радиацией в середине S-фазы, выражается в возрастании простых и изолюкусных делеций (рис. 4). Однако уровень модификации при индуцированном мутагенезе выше. Предполагается, что в этой фазе цикла в результате внутрихромосомного процесса происходит проверка первичной структуры ДНК, модифицированной предшествующим мутагенным воздействием [1, 10], с временной частичной деградацией одной из нитей ДНК с последующим дополнительным синтезом. ФУДР, подавляя дополнительный синтез, не дает возможности завершиться этому процессу, что и приводит к фиксации структурных мутаций. С позиций развиваемых представлений о механизме модификации ФУДР спонтанного мутагенеза, этот факт мо-

жет означать, что количество брешей, для застройки которых необходим дополнительный синтез ДНК, в поврежденных хромосомах выше, либо число дефектов, ведущих к разрывам, увеличивается под действием рентгеновских лучей. Так или иначе, скорость, с которой застраиваются эти бреши, зависящая в наших опытах от типа модификации, определяет вероятность возникновения хромосомных разрывов. В согласии с этим находятся также результаты тех опытов, где модифицирующий эффект тимидина был обнаружен только при его комбинировании с ФУДР. Можно полагать, что увеличение внутриклеточного пула предшественника, вследствие чего ускоряется дополнительный синтез ДНК, может быть достигнуто за счет включения экзогенного тимидина только тогда, когда ФУДР заблокирует эндогенный синтез.

Данные по сходному цитогенетическому эффекту комбинированного воздействия ФУДР и тимидина на радиационный мутагенез не могут быть, однако, интерпретированы однозначно, поскольку в том и в другом случае модификация осуществляется на разных этапах образования структурных мутаций хромосом. В случае радиационного мутагенеза, когда формирование aberrаций происходит в той фазе, на которую воздействовал мутаген [11], снижение выхода хромосомных обменов означает, что они образуются в принципе в момент модификации и локализованы в участках дополнительного синтеза.

Таким образом, в целом результаты настоящей работы находятся в соответствии с гипотезой [5], согласно которой хромосомный мутагенез происходит на основе регулярного генетического процесса, ограниченного определенными участками хромосомной ДНК.

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР

Поступило 19.VI 1978 г.

ՀԱՍՈՒԳԱՅՔԱՀԱՐՄԱՆ ԲՁՁԱԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ԶԵՎԱՓՈՆՈՒՄԸ 5-ՖՏՈՐ-2-ԴԵՁՕՔՍԻՈՒՐԻԴԻՆՈՎ ԵՎ ԹԻՄԻԴԻՆՈՎ
CREPIS CAPILLARIS L. ԲՁԻՋՆԵՐԻ Տ ԵՎ G₂ ՓՈՒԼԵՐՈՒՄ

Ռ. Ա. ԱԶԱՅԱՆ, Գ. Ի. ՄԻՐՋՈՅԱՆ

Պարզվել է, որ ՖՈՒԴՐ-ը ավելացնում է խոտորված բջիջների ընդհանուր ելքը Տ փուլի սկզբնական և միջին մասում, ի հաշիվ պարզ և իզոբրոմատիդային կտրվածքների, իջեցնելով բրոմոսոմային տիպի խոտորումների քանակը: Ծառագայթահարումից հետո, նույն փուլում, թիմիդինը և ՖՈՒԴՐ-թիմիդին կոմբինացիան նկատելի պակասեցնում են փոփոխված բջիջների քանակը, ցուցաբերելով պաշտպանիչ ազդեցություն: ՖՈՒԴՐ-ը G₂ փուլում ազդելիս նույնպես ավելացրել է բրոմատիդային խոտորումների քանակը պարզ և իզոբրոմատիդային կտրվածքների հաշվին: Սակայն թիմիդինը և ՖՈՒԴՐ- թիմիդին կոմբինացիան G₂-ում չեն ազդում ռենտգենյան ծառագայթահարումով Տ փուլի միջին մասում առաջացած խոտորումների ընդհանուր ելքի վրա:

MODIFICATION OF CYTOGENETIC EFFECT OF RADIATION BY 5-FLUORO-2-DEOXYURIDINE AND THYMIDINE IN S- AND G₂-PHASES OF CREPIS CAPILLARIS

R. A. AZATIAN, G. I. MIRZOYAN

5-fluoro-2-deoxyuridine (FUDR) increases the output of aberrant cells during the first and middle of the S-phase at the expense of the simple and isolocuc deleties but it decreases the quantity of chromosome aberration. In same phase thymidine and FUDR-thymidine combination influence after radiation essentially decrease the [quantity of aberration i. e. reveal the "protective" effect. In G₂—phase FUDR also increases the quantity of chromosome aberration, however, in G₂—phase thymidine and FUDR—thymidine combination don't reduce the output of aberrant cells, which are induced by X-ray treatment in the middle of S-phase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акифьев А. П. Молекулярные механизмы генетических процессов. 92. 1972.
2. Stich U. F., San R. Mutation Res., 10. 4, 389, 1970.
3. Парибок В. П., Томилин И. В. ДАН СССР, 195. 2. 489. 1970.
4. Carrier W. L., Setlow R. B. J. Bacteriol, 102, 1, 178, 1970.
5. Сойфер В. Н., Акифьев А. П. Общая биол., 37. 6. 854, 1976.
6. Митрофанов Ю. А., Отраднова В. В. Успехи совр. биологии, 80. 4. 39. 1975.
7. Акифьев А. П., Айнгорн Е. Д. Генетика, 7, 12. 94. 1971.
8. Айнгорн Е. Д., Акифьев А. П. Генетика, 8. 1. 120, 1972.
9. Митрофанов Ю. А., Котомина И. Ф. Генетика, 6, 3. 18. 1970.
10. Лучник Н. В. Радиобиология, 13, 2, 163, 1973.
11. Дубинин Н. П., Акифьев А. П. Успехи совр. биологии, 96. 2, 272, 1970.