

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОФЕИНА НА ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ХРОМОСОМ В ФАЗЕ G_1 У *CREPIS CAPILLARIS*

А. З. ВОСКАНЯН, С. Е. ЕГИАЗАРЯН, В. А. АВАКЯН

Выявлены некоторые особенности модифицирующего действия кофеина в фазе G_1 митотического цикла клеток *Crepis capillaris*. Кофеин способствует уменьшению числа изолюкусных разрывов с соединениями и увеличению таковых без соединений у семян, обработанных азотистым ипритом. При совместном действии кофеина и АДФ и АДФ в комбинации с HN_2 уменьшается процент перестроек без соединений и увеличивает-ся—с соединениями. Одновременно при воздействии HN_2 -АДФ проявляется защитный эффект АДФ.

Алкилирующие соединения с задержанным эффектом действия индуцируют хроматидные аберрации в фазе синтеза ДНК и не способны вызывать их в фазах G_1 и G_2 [16]. Сделано предположение, что эти соединения способны взаимодействовать с хромосомой как во время синтеза ДНК (фаза S), так и в его отсутствие (фаза G_1 , G_2) [1, 2, 7]. Однако при этом недостаточно хорошо освещены вопросы предмутационных повреждений хромосом и их восстановления.

Наша цель состояла в изучении на растительных объектах реализации потенциальных повреждений хромосом под действием азотистого иприта (HN_2) в фазе G_1 при помощи ингибитора репарационных процессов кофеина и предшественника АТФ универсального аккумулятора энергии аденозиндифосфата (АДФ). Действие HN_2 на животные организмы исследовано довольно подробно, а в медицинской практике HN_2 и его производные применяются как противораковый препарат.

Как известно, объединение синтезированных фрагментов ДНК в единую цепь осуществляется лигазами и ДНК-полимеразами, застраивающими «бреши». Эти реакции особенно требовательны к источникам энергии и находятся в специфической зависимости от наличия дополнительного количества АТФ [18]. Выбор АДФ основан на его более эффективном действии на процессы репарации по сравнению с АТФ [8].

Материал и методика. Исследования выполнены на *Crepis capillaris*. В эксперименте использованы: HN_2 — $2 \cdot 10^{-5}$, кофеин— $3 \cdot 10^{-2}$, АДФ— $3 \cdot 10^{-4}$ М.

Воздушно-сухие семена в течение 2 час. обрабатывали HN_2 , затем промывали проточной водой и разбивали на четыре партии с целью охватить разные интервалы времени всего периода фазы G_1 .

В первой партии сразу, во второй и в третьей через 2 и 4 час. после начала действия HN_2 семена обрабатывали кофеином, АДФ и комбинацией кофеин+АДФ. В

четвертой партии семена сразу после воздействия HN_2 обрабатывали указанными комбинациями кофеина и АДФ в течение 6 часов. После 10-минутного промывания их переносили на фильтровальную бумагу с раствором колхицина (0,01%) в чашки Петри и ставили в термостат на проращивание (26°). Корешки фиксировали в смеси спирт—уксусная кислота (3:1).

Результаты и обсуждение. Из приведенных (табл. 1, 2) данных видно, что в пределах одной стадии клеточного цикла наблюдается различная чувствительность клеток к модификатору (кофеин). При этом чем более отдалены сроки обработки кофеином после воздействия HN_2 , тем больше выражен его ингибирующий эффект. Максимальный эффект отмечен через 6 час. после начала действия HN_2 . Этот факт говорит о чувствительности потенциально поврежденных хромосом к модификатору в конце фазы G_1 .

Таблица 1

Частота клеток с перестройками

Варианты опыта	Интервал времени между обработкой HN_2 и модификаторами, час.	Продолжительность обработки модификаторами, час.	Количество	
			изученных метафаз	клеток с перестройками, %
HN_2	—	—	794	18,64 ± 1,34
HN_2 + кофеин	0	2	550	30,4 ± 1,91
HN_2 + кофеин + АДФ	0	2	445	22,0 ± 1,92
HN_2 + АДФ	0	2	719	10,71 ± 1,16
Кофеин	0	2	535	0,94 ± 0,41
Кофеин + АДФ	0	2	563	0,53 ± 0,31
АДФ	0	2	593	0,506 ± 0,29
HN_2 + кофеин	2	2	362	33,75 ± 2,43
HN_2 + кофеин + АДФ	2	2	300	23,3 ± 2,44
HN_2 + АДФ	2	2	827	11,67 ± 1,2
Кофеин	2	2	527	1,33 ± 0,5
Кофеин + АДФ	2	2	483	1,03 ± 0,46
АДФ	2	2	474	0,81 ± 0,42
HN_2 + кофеин	4	2	317	36,96 ± 2,69
HN_2 + кофеин + АДФ	4	2	572	18,72 ± 1,63
HN_2 + АДФ	4	2	514	13,6 ± 1,51
Кофеин	4	2	588	1,37 ± 0,47
Кофеин + АДФ	4	2	524	0,76 ± 0,37
АДФ	4	2	481	0,21 ± 0,21
HN_2 + кофеин	0	6	480	28,33 ± 1,4
HN_2 + кофеин + АДФ	0	6	555	21,62 ± 1,75
HN_2 + АДФ	0	6	676	9,02 ± 1,1
Кофеин	0	6	441	0,23 ± 0,22
Кофеин + АДФ	0	6	445	0,22 ± 0,22
АДФ	0	6	442	0,46 ± 0,16
Контроль	—	—	970	0,51 ± 0,23

При обработке клеток кофеином в течение 6 час. после начала действия HN_2 , хотя количество клеток с перестройками значительно меньше, однако число их больше, чем в других вариантах. Сравнительное изучение действия кофеина, АДФ и комбинации кофеин+АДФ после воздействия HN_2 выявляет весьма достоверные различия в результатах не только между вариантами, но и внутри их.

Типы aberrаций хромосом

Варианты опыта	Количество aberrаций на 100 клеток				
	хроматид- ные и ин- терстици- альные де- лелии	изоразрывы без соеди- нения кон- цов	изоразрывы с соедине- ниями и транслока- ции	микрофраг- менты	всего
HN ₂	5,04±0,77	1,64±0,14	13,48±1,21	0,39±0,24	2,04±1,56
HN ₂ + кофеин	12,9±1,43	5,64±0,98	9,28±1,3	5,46±0,96	33,4±2,01
HN ₂ + кофеин + АДФ	3,8±0,89	2,5±0,78	13,27±1,57	2,16±0,67	22,0±1,92
HN ₂ + АДФ	2,37±0,57	1,25±0,42	6,29±0,9	1,39±0,43	11,3±1,18
Кофеин	0,37±0,26	0,19±0,18	0,37±0,23	0	0,94±0,41
Кофеин + АДФ	0,36±0,25	0,18±0,17	0	0	0,53±0,31
АДФ	0,34±0,23	0,17±0,17	0	0	0,506±0,29
HN ₂ + кофеин	13,2±1,78	15,75±1,92	6,91±1,33	5,53±1,2	41,5±2,59
HN ₂ + кофеин + АДФ	7,0±1,47	2,0±0,81	13,7±1,98	1,33±0,66	24,0±2,46
HN ₂ + АДФ	3,03±0,95	0,605±0,035	9,44±1,08	0,97±0,34	14,02±1,3
Кофеин	0,76±0,38	0,57±0,3	0	0	1,33±0,5
Кофеин + АДФ	0,41±0,29	0,207±0,206	0,41±0,29	0	1,03±0,46
АДФ	0,21±0,21	0,21±0,21	0,21±0,21	0,21±0,21	0,84±0,42
HN ₂ + кофеин	9,15±1,64	8,2±1,59	18,3±2,72	5,36±1,26	39,43±2,79
HN ₂ + кофеин + АДФ	5,24±0,93	2,79±0,07	13,63±0,41	0,53±0,3	2,22±1,94
HN ₂ + АДФ	3,11±0,76	1,55±0,54	10,89±1,37	0,19±0,18	15,74±1,60
Кофеин	0,36±0,24	0,3±0,29	0,17±0,16	0,36±0,28	1,37±0,47
Кофеин + АДФ	0,19±0,18	0,19±0,18	0,19±0,18	0,19±0,18	0,76±0,37
АДФ	0,21±0,21	0	0	0,21±0,21	0,42±0,29
HN ₂ + кофеин	17,50±1,92	20,23±1,83	6,88±1,04	3,94±0,88	48,54±5,2
HN ₂ + кофеин + АДФ	3,78±0,25	1,08±0,43	21,82±1,75	0,36±0,25	28,83±1,92
HN ₂ + АДФ	1,33±0,44	0,44±0,24	7,39±1,05	0,29±0,24	9,47±1,13
Кофеин	0	0,23±0,22	0	0	0,23±0,22
Кофеин + АДФ	0	0	0	0,22±0,22	0,22±0,22
АДФ	0	0	0,23±0,22	0,23±0,22	0,46±0,16
Контроль	0,103±0,102	0,103±0,102	0,205±0,15	0	0,51±0,23

При обработке модификатором (кофеин) через 2 час. после начала действия HN₂ общее количество перестроек больше, чем в варианте с обработкой только HN₂: в комбинации HN₂+кофеин—на 15, HN₂+кофеин+АДФ—на 6%. В варианте с HN₂+АДФ—меньше на 4%. Эта закономерность наблюдается во всех вариантах опыта.

Сравнение данных всех вариантов между собой обнаружило небольшие, но достоверные различия между ними. Это подчеркивает роль кофеина при реализации потенциальных повреждений хромосом и активное участие АДФ в восстановительных процессах.

Анализ (табл. 2) спектра хромосомных aberrаций во всех вариантах показал, что воздействие кофеином приводит к возникновению в основном перестроек фрагментационного типа, при этом увеличивается процент хроматидных делеций, изоразрывов типа Nupd и микрофрагментов и уменьшается процент изоразрывов с соединениями и транслокаций.

Совместное воздействие кофеином и АДФ в комбинации с HN₂ выявляет иную картину. Здесь имеет место уменьшение процента фрагментированных хромосом и одновременное увеличение процента перестроек с соединениями.

При обработке $\text{HN}_2 + \text{АДФ}$ защитный эффект АДФ проявляется в полном отсутствии перестроек фрагментационного типа, чем он приближается к контролю.

Анализ данных контрольных вариантов показал, что частота аберраций, индуцируемых комбинацией кофеин+АДФ и АДФ, находится на уровне естественного контроля. По данным многих авторов, кофеин неэффективен в фазе G_1 в отношении радиационно поврежденных хромосом [3, 4, 9, 19]. Однако некоторые авторы отмечают наличие этого эффекта в указанной фазе [6, 11]. Гудков и Гродзинский показали подавление кофеином синтеза ДНК в фазе G_1 у гороха, используя цитогенетический метод учета хромосомных повреждений, а также радиоавтографически с применением H^3 -тимидина [6].

Исходя из наших экспериментальных данных мы предполагаем, что в начале стадии G_1 репарация более эффективна, чем в поздней. Ферменты, необходимые для репарации ДНК, синтезируются в начале этой фазы [18, 20]. Другой точки зрения придерживаются авторы, которые исходят из того, что в течение митотического цикла меняется проницаемость клеточной мембраны. На начальных этапах она слабее, чем на поздних. Авторы делают вывод, что в поздние сроки возможность проникновения кофеина в клетку больше и, следовательно, его воздействие эффективней [5, 13, 14].

Дополнительным аргументом в пользу существования эффекта кофеина и репарации хромосомных повреждений может служить отмеченное нами усиление процессов восстановления повреждений хромосом при воздействии HN_2 в комбинации с АДФ и кофеин+АДФ, особенно в случае с АДФ, т. е. если кофеин усиливает реализацию потенциальных повреждений, то АДФ, напротив, препятствует ей, способствуя восстановлению первоначальной структуры хромосом.

Анализируя спектр аберраций хромосом, можно заметить, что при воздействии комбинацией $\text{HN}_2 + \text{кофеин}$ по всем вариантам в основном преобладают перестройки фрагментационного типа, что не отмечается при комбинациях $\text{HN}_2 + \text{АДФ}$ и $\text{HN}_2 + \text{кофеин} + \text{АДФ}$. Здесь преобладают в большинстве случаев аберрации обменного характера. Мы полагаем, что перестройки фрагментационного типа являются следствием перепарированных разрывов ДНК, а формирование аберраций обменного характера—результатом кроссингового механизма рекомбинации [10].

Согласно Порошенко [12], в фазе G_1 межхроматидные обмены не могут происходить уже потому, что нет двух хроматид. Автор предполагает, что в этой фазе могут произойти лишь потенциальные изменения, а их реализация в хромосомные перестройки (обмен, разрыв и т. д.) осуществляется в периоде S. Данные настоящей работы согласуются с предположением Г. Г. Порошенко. Поэтому можно сказать, что стадия G_1 в биохимическом аспекте является одной из активных фаз митотического цикла клеток. И не случайно, что Фабре [15] при изучении действия гамма- и ультрафиолетовых лучей у температурочувстви-

тельных мутантов дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* приходит к выводу, что вскоре после облучения и до инициации фазы синтеза происходит внутригенная рекомбинация, предполагая при этом вытекающую отсюда возможность спаривания гомологичных хромосом и, следовательно, дубликацию хроматид.

Обсуждая литературные и полученные нами данные, мы приходим к выводу, что кофеин как ингибитор, использованный в стадии G_1 , действует избирательно, проявляя модифицирующий эффект или не проявляя его в зависимости от объекта. Кроме того, в одном интервале стадии G_1 он может быть эффективным, в другом не эффективным. Имеет значение также собственная концентрация и концентрация использованного мутагена, время и продолжительность обработки.

Как видим, единой точки зрения на время эффективного действия кофеина в настоящее время нет. Вполне возможно, что в различных случаях ингибирующее действие кофеина осуществляется разными путями.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 26.III 1979 г.

ԲԻՄԱՊԵՍ ՄԱԿԱԾՎԱԾ ՔՐՈՄՈՍՈՍՈՅԻՆ ԽԱՔԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՄՈՒԴՅԻԿՈՅԻԱՆ ԿՈՖԵԻՆՈՎ CREPIS CAPILLARIS-Ի G_1 —ՓԱԶԵՐՈՄ

Ա. Չ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ, Ս. Ե. ԵԳԻԱԶՅԱՆ, Վ. Ա. ԱՎԱԿՅԱՆ

Ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ կոֆեինը իր ազդեցությունը արդյունավետ է G_1 -փուլում բնականորեն: Սակայն նրա նախնական փուլերում ցուցաբերում է ավելի թույլ ներգործություն, քան վերջնական: Դա նշանակում է, որ կոֆեինը բնորոշ է կանխելու ադոսային իպրիտով մակաձված բրոմոսոմային խաթարումների ռեպարացիան G_1 նախնական փուլերում ավելի թույլ ձևով, քան վերջնական: Իսկ ԱՂՖ-ը գրեթե բոլոր համակցությունների դեպքում ցուցաբերում է պաշտպանիչ ազդեցություն:

MODIFICATION EFFECT OF CAFFEINE ON CHEMICALLY INDUCED ABERRATION OF PHASE G_1 CROMOSOME OF CREPIS CAPILLARIS

A. Z. VOSKANIAN, C. E. EGIAZARYAN, V. A. AVAKIAN

Some peculiarities of caffeine modificational effect in the G_1 —mitotic cycle of *Crepis capillaris* cells have been revealed. The caffeine after the treatment by nitrous yperite (HN2) promotes a decrease of isolocus breaks with combinations and an increase of those without combinations

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азатян Р. А., Восканян А. З., Авакян В. А., Акифьев А. П. Генетика, 14, 8, 1978.
2. Азатян Р. А., Восканян А. З., Закарян М. С., Акифьев А. П. Радиобиология, 16, 3, 1976.

3. Айказян Э. В., Михельсон В. М., Жестяников В. Д. Радиационная-73. Опер.-информ. мат.-лы, 3, 1., 1974.
4. Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Антикаева Г. Ф. Радиобиология, 12, 4, 607, 1972.
5. Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Антикаева Г. Ф. Генетика, 12, 4, 1976.
6. Гудков И. И., Гродзинский Д. М. Радиобиология, 12, 260, 1972.
7. Дубинина Л. Г., Дубинин Н. П. Генетика, 4, 2, 5, 1968.
8. Елисеев Н. Н., Козырева Е. В., Яшкин П. И. Радиобиология. Информ. бюлл. АН СССР, 1977.
9. Крупнова Г. Ф., Алехина Г. М. Радиационная-73. Опер.-информ. мат.-лы, 1., 1974.
10. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Генетика, 12, 8, 1976.
11. Мурадян А. А. Сб. Экспериментальный мутагенез, вып. 4, Ереван, 1978.
12. Порошенко Г. Г. Итоги науки и техники. 2. М., 1977.
13. Эйдус Л. Х. Молекулярный механизм повреждения клеток и защиты от действия радиации. Пуцшно, 1971.
14. Эйдус Л. Х. Радиобиология, 11, 6, 857, 1971.
15. Fabre N. Nature, 272, 56, 795, 1978.
16. Kihlman B. A. Adv. Genet., 261, 1962.
17. Lieberman S., Abrams R., Hunt N., Ove P. S. Biol. chem., 238, 12, 3955, 1963.
18. Pisetsky D., Berkower S., Wickner R., Hurwitz S. J. Mol. Biol., 71, 557, 1972.
19. Wolff S. Scott D. Exptl. cell. Res. SS, 1, 9, 1969.
20. Zetterberg A., Killander D. Exp. cell. Res., 39, 1, 22, 1965.