

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОФЕИНА НА ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ХРОМОСОМ В НАЧАЛЕ S-ФАЗЫ

А. З. ВОСКАНЯН, В. А. АВАКЯН, С. Е. ЕГИАЗАРЯН, Г. М. АРАКЕЛОВ

Выявлены некоторые особенности модифицирующего действия кофеина в начале S-фазы митотического цикла. Кофеин способствует уменьшению числа изолюкусных разрывов с соединениями и увеличению таковых без соединений в меристематических клетках корешков *S. capillaris*, обработанных азотистым ипритом. При совместном действии кофеина с АДФ и АДФ в комбинации с HN_2 уменьшается процент перестроек без соединений и увеличивается—с соединениями. Одновременно при воздействии HN_2 +АДФ проявляется защитный эффект АДФ.

Ключевые слова: репарация, аберрации хромосом, ингибиторы, химический мутагенез.

При исследовании процессов, происходящих в хромосоме, в частности реализации потенциальных повреждений ДНК, важное значение придается методу химической модификации.

Настоящая работа проведена с целью изучения на семенах *S. capillaris* процессов реализации и репарации потенциальных повреждений хромосом, возникших под действием азотистого иприта (HN_2) в начале фазы S, при помощи кофеина, ^3H -тимидина и аденозиндифосфата (АДФ).

Материал и методика. Воздушно-сухие семена *S. capillaris* после 10-часового замачивания в течение 2 ч обрабатывали HN_2 , затем промывали проточной водой и разбивали на четыре партии с целью охватить начальные этапы фазы S. В первой партии сразу, а во второй и третьей через 2 и 4 ч после начала действия семена обрабатывали кофеином, АДФ и комбинацией кофеина + АДФ в течение двух часов. В четвертой партии сразу после воздействия HN_2 их обрабатывали указанными комбинациями в течение 6 часов. После 10-минутного промывания 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).

Параллельно ставился опыт с ^3H -тимидином в тех же вариантах и комбинациях. Корешки фиксировали 0,5 М HClO_4 . Количественный анализ включения ^3H -тимидина проводили на счетчике РЖБ-2-01. Фиксацию корешков как в первом, так и во втором эксперименте проводили через 36 ч после замачивания семян.

В экспериментах охвачены все временные отрезки фазы S, так как синтез ДНК в течение всего периода S имеет промежуточные пики и спады [11]. Применены следующие концентрации: HN_2 — $2 \cdot 10^{-5}$, кофеин— $3 \cdot 10^{-2}$, АДФ— $3 \cdot 10^{-4}$ М, ^3H -тимидин—0,25 мк кюри/мл.

Результаты и обсуждение. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что на начальных этапах фазы S чувствительность клеток к дей-

Таблица 1

Типы aberrаций хромосом

Варианты опыта		Интервал времени между обработкой HN_2 и модификаторами, ч	Продолжительность обработки модификаторами, ч	Количество изученных метафаз	Число клеток с перестройками	Число aberrаций на 100 клеток				
						хроматидные и интестинальные делеции	изоразрывы без соединения концов	изоразрывы с соединениями и транслокациями	микрофрагменты	всего
II		—	12—14	441	21,3±1,9	5,4±1,1	1,1±0,5	17,7±1,8	0,9±0,5	22,9±2,0
I	HN_2 + кофеин	0	12—14	473	30,2±2,1	13,5±1,5	10,1±1,1	10,1±1,1	4,9±0,9	38,7±2,2
	HN_2 + кофеин + АДФ	0	12—14	567	15,2±1,5	6,5±0,6	2,3±0,2	6,0±0,6	1,0±0,1	15,9±1,5
	HN_2 + АДФ	0	12—14	690	10,1±1,1	2,5±0,5	1,5±0,4	5,6±0,8	1,2±0,4	10,1±1,0
II	HN_2 + кофеин	2	14—16	347	30,3±2,4	16,1±1,9	16,1±1,9	9,2±1,5	8,1±0,5	49,6±2,7
	HN_2 + кофеин + АДФ	2	14—16	603	13,1±1,8	2,2±0,6	1,5±0,5	9,5±1,2	1,8±0,5	14,8±1,4
	HN_2 + АДФ	2	14—16	760	10,5±1,1	1,3±0,3	0,7±0,3	14,5±1,3	1,0±0,4	10,8±0,1
III	HN_2 + кофеин	2	16—18	408	53,9±2,5	35,3±2,4	23,3±2,4	17,9±1,4	15,9±1,4	90,3±1,4
	HN_2 + кофеин + АДФ	2	16—18	479	19,2±1,8	4,8±1,0	1,0±0,5	14,8±1,6	1,7±0,6	22,3±1,9
	HN_2 + АДФ	2	16—18	474	12,2±1,5	3,2±0,8	1,5±0,3	9,1±1,0	0,4±0,2	19,9±1,8
IV	HN_2 + кофеин	0	12—18	310	56,4±2,8	43,9±2,8	27,1±2,5	18,1±2,2	14,5±2,0	103,5±0,6
	HN_2 + кофеин	0	12—18	678	23,6±1,5	3,4±0,7	1,5±0,5	20,5±0,5	1,5±0,5	26,8±1,7
	HN_2 + АДФ	0	12—18	548	10,6±1,3	2,7±0,7	0,9±0,4	6,5±1,0	1,1±0,5	11,3±1,4

ствию кофеина бывает различной. Чем ближе пик синтеза ДНК, т. е. чем более отдалены сроки обработки кофеином, тем больше выражен его ингибирующий эффект. Максимальный эффект отмечен при 6-часовой обработке.

Сравнительное изучение действия АДФ и комбинации кофеин+АДФ после воздействия HN_2 выявляет весьма достоверные различия не только между вариантами, но и внутри их.

Анализ спектра aberrаций хромосом всех вариантов 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.

При обработке HN_2 +АДФ защитный эффект АДФ выражается в отсутствии перестроек фрагментационного типа. Совместное действие кофеина и АДФ в комбинации с HN_2 выявляет иную картину. Здесь имеет место уменьшение процента фрагментированных хромосом и одновременно увеличение перестроек с соединениями.

Анализ данных контрольных вариантов показал, что частота aberrаций, индуцируемых комбинацией кофеин+АДФ и АДФ, находится на уровне естественного контроля.

Наши экспериментальные данные наводят на мысль, что кофеин является активным ингибитором не только для фазы G_1 [2], но и для фазы S (начальные этапы).

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

Анализируя спектр aberrаций хромосом, можно заметить, что при воздействии комбинацией HN_2 +кофеин в основном преобладают перестройки фрагментационного типа, чего не отмечается при АДФ. Здесь преобладают в большинстве случаев aberrации обменного характера. Мы полагаем, что перестройки фрагментационного типа являются следствием нерепарированных разрывов ДНК, а формирование aberrаций обменного характера—результатом кроссингового механизма рекомбинаций [8].

Литературные и полученные нами данные свидетельствуют о том, что кофеин как ингибитор, использованный в начале фазы S, действует избирательно, т. е. эффективность модификации зависит от этапа в пределах одной стадии клеточного цикла и времени воздействия модификатором после обработки HN_2 .

В отношении структурных повреждений хромосом показано, что кофеин sensibilизирует эффект радиации на стадиях G_2 и S как на растительных клетках [3—7, 14], так и клетках млекопитающих [1, 9, 10]

и в большинстве случаев не увеличивает выход перестроек хромосом в стадии G₁.

В нашей работе, как уже отмечалось, в качестве мутагена использован HN₂, при котором модифицирующий эффект наблюдается как в G₁, так и в начале S-фазы, что говорит о различиях в механизмах действия радиационного и химического мутагенеза.

Наши исследования не ограничились изучением количества структурных мутаций. Килман предполагает, что при изучении хромосомных aberrаций, индуцированных радиацией и химическими мутагенами, кофеин, использованный при этом в качестве модификатора, ингибирует действие тимидина в репарационном синтезе ДНК. Исходя из этого, мы использовали меченый тимидин как специфический предшественник синтеза ДНК.

В табл. 2 представлены четыре варианта с 12-ю комбинациями с ³H-тимидином. Количественный анализ данных всех вариантов (табл. 1, 2) выявил параллелизм между возникновением хромосомных aberrаций и импульсами включения ³H-тимидина. Во всех комбинациях с участием кофеина (HN₂+кофеин, HN₂+кофеин+АДФ) включение ³H-тимидина меньше, чем в комбинациях без него (HN₂+АДФ).

Таблица 2
Включение ³H-тимидина в хромосомы

Варианты опыта	Интервал времени между обработкой HN ₂ и модификаторами, ч	Продолжительность обработки модификаторами, ч	Число	
			корешков	импульсов
	—	10—12	30	119
HN ₂ + кофеин + ³ H — тимидин	0	12—14	30	91
HN ₂ + кофеин + АДФ + ³ H — тимидин	0	12—14	30	127
HN ₂ + АДФ + ³ H — тимидин	0	12—14	30	135
HN ₂ + кофеин + ³ H — тимидин	2	14—16	30	105
HN ₂ + кофеин + АДФ + ³ H — тимидин	2	14—16	30	127
HN ₂ + АДФ + ³ H — тимидин	2	14—16	30	155
HN ₂ + кофеин + ³ H — тимидин	2	16—18	30	93
HN ₂ + кофеин + АДФ + ³ H — тимидин	2	16—18	30	116
HN ₂ + АДФ + ³ H — тимидин	2	16—18	30	157
HN ₂ + кофеин + ³ H — тимидин	0	12—18	30	102
HN ₂ + кофеин + АДФ + ³ H — тимидин	0	12—18	30	120
HN ₂ + АДФ + ³ H — тимидин	0	12—18	30	201

На ранних этапах (12—14, 14—16 ч) периода S включение ³H-тимидина в ДНК при комбинации HN₂+АДФ меньше, чем на промежуточном (16—18 ч) или последнем (12—18 ч). А при комбинациях HN₂+кофеин+АДФ, HN₂+кофеин частота включения ³H-тимидина находится примерно на одном уровне.

Данные наших экспериментов подтверждают предположение, что репарация происходит на уровне синтеза ДНК [13, 14], и если это так, то, естественно, чем больше клеток с репликацией ДНК, тем больше включение ³H-тимидина.

Таким образом, кофеин ингибирует действие тимидина и процессы репарации хромосом в начале фазы S, а АДФ, наоборот, активно стимулирует процессы репарации, т. е. если кофеин препятствует включению H^3 -тимидина, то АДФ способствует этому.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 8.II 1980 г.

ՔԻՄԻԱՊԵՍ ՄԱԿԱԾՎԱԾ ՔՐՈՄՈՍՈՄԱՅԻՆ ԽԱԹԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՄՈՒԴՅՈՒԿԱՑԻԱՆ ԿՈՅՆԵՆՈՎ Տ ՖԱԶԱՅԻ ՍԿԶԲԵԱԿԵՏԵՐՈՒՄ

Ա. Զ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ, Վ. Ա. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ս. Ե. ԵՂԻԱԶԱՐՅԱՆ, Գ. Մ. ԱՌԱՔԵԼՈՎ

Ուսումնասիրվել է կոֆեինի և ԱԴՖ-ի մոդիֆիկացնող ազդեցությունը S ֆազայի սկզբնական փուլում՝ *S. capillaris*-ի բջիջները նախօրոք ազոտային իպրիտով (HN_2) մշակելու դեպքում:

Պարզվել է որ կոֆեինը S ֆազայի նախնական փուլերում ցուցաբերում է ավելի թույլ ներգործություն, քան միջանկյալ փուլերում: Նշանակում է կոֆեինը ընդունակ է կանխելու ազոտային իպրիտով մակածված բրոմսոմային խաթարումների ռեպարացիան S ֆազայի սկզբնական փուլում ավելի թույլ ձևով, քան միջանկյալ փուլերում: ԱԴՖ-ը գրեթե բոլոր համակցություններում ցուցաբերում է պաշտպանիչ էֆեկտ:

Թիմիդինի կիրառումից ստացված տվյալները ապացուցում են վերը արված եզրակացությունները:

THE MODIFICATING EFFECT OF CAFFEINE ON CHEMICALLY INDUCED DAMAGES OF CHROMOSOMES AT THE S PHASE BEGINNING

A. Z. VOSKANIAN, V. A. AVAKIAN, I. E. EGIAZARIAN, G. M. ARAKELOV

A modifying effect of caffeine at periods of phase S of mitotic cycle have been studied when the cells were treated by nitrogenous mustard gas.

At the beginning of phase S caffeine effect is weaker than in the middle. This means that caffeine is capable to stop those processes which promote the restoration of original structure of chromosome after the cells were treated by HN_2 .

In the case of application of marked thymidine data have been obtained proving above presented conclusions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Айказян Э. В., Михельсон В. М., Жестяников В. Д. Цитология, 15, 7, 881, 1973.
2. Восканян А. В., Егиазарян С. Е., Авакян В. А. Биолог. ж. Армении, 32, 10, 1979.
3. Ганасси Е. Э., Аптикаева Г. Ф., Заичкина С. И. Радиационная-72. Оперативно-информ. мат-лы, 17, Л., 1973.
4. Ганасси Е. Э., Заичкина С. И., Аптикаева Г. Ф. Радиобиология, 13, 4, 586, 1973.
5. Елисеевко Н. Н. Радиобиология, 10, 4, 1970.

6. Крупнова Г. Ф., Алехина Г. М. Радиационная-73, Оперативно-информ. мат-лы, 27, Л., 1974.
7. Крупнова Г. Ф., Сейтхожаев А. Н. Цитология, 16, 8, 1005, 1974.
8. Митрофанов Ю. А., Восканян А. З. Генетика, 12, 8, 1976.
9. Шалумашвили М. А. Генетика, 8, 8, 43, 1972.
10. Шалумашвили М. А., Тарасов В. А., Мясова З. Н. Радиобиология, 11, 1, 64, 1971.
11. Шабалкин И. П. Цитология, 19, 5, 1977.
12. Kihlman B. A. Caffein and Chromosome. Amsterdam, 1979.
13. Metainy E. L., Takagi A. M., Tano S., Yamaguchi H. Mutat Res., 13, 337, 1971.
14. Yamamoto K., Yamaguchi H. Mutat Res., 8, 428, 1969.