

Изложенные в настоящей работе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что рибосомные мутации, по-видимому, являются более перспективными для повышения эффективности трансформации  $\lambda$ -мутантов, чем РНК-полимеразные мутации. Сконструированный штамм М-с77, для которого характерны дефектность по протеазной активности в отношении чужеродных белков и высокая способность к трансформации, что особенно ценно на начальных этапах создания генно-инженерных систем, может быть рекомендован для использования в биотехнологических процессах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барсесян А. А., Оганесян Г. Г. Биолог. журн. Армении, 35, 1136—1141, 1983.
2. Барсесян А. А., Оганесян Г. Г., Оганесян М. Г. Биолог. журн. Армении, 35, 479—484, 1983.
3. Маниатиас Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование, М., 1984.
4. Миллер Дж. В кн.: Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
5. Оганесян Г. Г., Барсесян А. А., Оганесян М. Г. Биолог. журн. Армении, 36, 398—404, 1984.
6. Рыжовская А. С., Кайдалови Н. В., Анухин Ю. М., Клячко Е. В., Лилищ В. А., Стронгин А. Я. Молекуляр. биология, 22, 201—208, 1988.
7. Chung C. H., Goldberg A. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 4931—4935, 1981.
8. Gottesman S., Zipser D. J. Bacteriol., 133, 844—857, 1978.
9. Falkinham III J. O. J. Bacteriol., 139, 1051—1057, 1979.
10. Kowitz J. D., Goldberg A. L. J. Biol. Chem., 257, 4187—4195, 1982.
11. Larimore F. S., Waxman L., Goldberg A. L. J. Biol. Chem., 257, 4187—4195, 1982.
12. Leboy P. S., Cox D. C., Flaks J. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 1367—1374, 1964.
13. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. Nucleic Acids Res., 11, 4677—4688, 1983.

Получено 24.VIII 1989 г.

Биолог. журн. Армении, № 9 (43) 1990

УДК 575.324.23:599.9

### КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МОДИФИКАЦИИ ДЕЙСТВИЯ МУТАГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Р. М. АРУТЮНЯН, Л. Г. АБРАМЯН, Т. Ф. САРКИСЯН, Т. Ф. ЗАСУХИНА,  
Г. Д. СЕРЕДЕННИ, А. Д. ДУРНЕВ

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии,  
Институт общей генетики АН СССР, Москва,  
НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Исследованы различия в модификации мутагенного действия фотрина и диоксидина природными и синтетическими протекторами по тестям внеплазменного синтеза ДНК, включения метки в ДНК и возникновение одностранных разрывов в ДНК на культуре лимфоцитов периферической крови человека.

Հետազոտված են ֆոտրինի և դիօքսիդինի մուտագենի ազդեցության արտերկրային պրոտեկտորների մարդու ակտիվների արյան շիֆթերների (սպուտումի) իրաբանական և օրնիտիկ պրոտեկտորների ազդեցությանը անտիմուտագենի և ժեմեյնգ ախտերով ՉՆՔ-ի արտապլազմային օրնիտիկ ՉՆՔ-ի մեջ ՅՈՒՐՔՐ-ի կրակի կրակի և մեջ թեյանի ՉՆՔ-ի կարգումների անալիզները:

Сокращения: ГАП—гидроксиапатит, ТХУ—трихлоруксусная кислота, ДРИ-ДНК—репарационный индекс.

The differences in the modification of mutagenic action of phosfon and oxidin<sub>2</sub> by syntral and synthetic protectors are demonstrated. The unscheduled synthesis of DNA, incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine and strand-breaks of DNA in human lymphocytes culturis were investigated.

*Мутагены химический—культура лимфоцитов человека—протекторы—репарация ДНК.*

В настоящее время нет общепринятой теории о вкладе тех или иных первичных повреждений ДНК в процесс образования хромосомных aberrаций и СХО, однако не вызывает сомнений возможность модификации их эффектов, индуцированных мутагенами. Поэтому нас интересовало сравнение эффектов модификации на цитогенетическом уровне с возникновением однонитевых разрывов, внеплановым синтезом ДНК и репликацией ДНК.

В работе приводятся результаты исследования мутагенного действия фотрина и диоксидина и его модификации природными и синтетическими протекторами на культуре лимфоцитов периферической крови человека, а также данные о роли свободных форм кислорода и антиоксидантов в механизмах мутагенеза и антимутагенеза.

*Материал и методика.* В экспериментах использована культура лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Гепаринизированную кровь отстаивали при комнатной температуре 40 мин—1 ч, затем отбирали сыворотку вместе с клетками и культивировали по стандартной методике [9]. Плотность посева— $1 \cdot 10^6$  клеток/мл.

Индукцию однонитевых разрывов исследовали методом хроматографии клеточных лизатов на колонках с ГАП.

Репаративную активность клеток определяли по уровню резистентного к оксимочевине синтеза ДНК (внеплановый синтез). В первом случае клетки метили в логарифмической фазе роста <sup>3</sup>H-тимидином (удельная активность 18,6 Ки/ммоль)—конечная концентрация 1,3—1,5 мкКи/мл в течение 22 ч, потом метку отмывали. Во втором случае, после отмывания мутагена, в культуральную среду добавляли оксимочевину (5 мМ) для подавления репликативного синтеза, а через 20 минут вносили метку и концентрации 5 мкКи/мл на 3 часа.

Мутагенную обработку проводили за 46 часу культивирования. Протекторы и мутагены вводили в культуру одновременно и инкубировали 28—30 часов. Затем клетки отмывали, часть их фиксировали сразу же, а другую инкубировали в свежей среде 24 ч для изучения восстановления повреждений ДНК. Клетки фиксировали методом щелочного лизиса 15 мин при комнатной температуре в темноте. Лизирующий раствор: 0,03 N NaOH, 0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9 M NaCl с pH=11,8—12,0. Лизат нейтрализовали до pH 7,0 путем добавления 0,2 N HCl, обрабатывали ультразвуком (УЗДН-2Т, 22 кГц, 10 с). В пробы добавляли SDS (додецилсульфат натрия) до 4%. Пробу наносили на предварительно уравновешенные 0,01 M натрий-фосфатным буфером колонки с ГАП и промывали 0,01 M и 0,06 M буфером для освобождения от свободной метки и солей. Хроматографию проводили посредством ступенчатого градиента натрий фосфатного буфера с pH 6,8 при 60°C. Однонитевую ДНК элюировали 0,12 M буфером, а двунитевую—0,45 M буфером. В собранные фракции добавляли бычий сывороточный альбумин, ТХУ до 5%, затем осаждали на нитроцеллюлозные фильтры («Синпор №6», диаметр пор 0,4 мкм, промывали 50%-ной ТХУ, фиксировали этанолом и считали на счетчике методом жидкостной сцинтилляции (в толуеновом сцинтиляторе) [11]. О возникновении однонитевых разрывов в ДНК судили по уменьшению доли двунитевой ДНК по сравнению с контролем.

Для оценки индуцированного внепланового (репаративного) синтеза в клетках сравнивали репаративный синтез в обработанных и необработанных (контроль) химическими соединениями клетках. С этой целью после инкубации с меткой  $1 \cdot 10^6$  клеток

лизировали 10 мин в 1% SDS, осаждали на фильтры («Сыпор № 6»), определяли счет радиоактивной метки в кислотонерастворимой фракции после промывания холодной 5%-ной ТХУ и флюксировали этанолом [7].

Сравнивали также включение  $^3\text{H}$ -тимидина во всех вариантах опыта в общий пул клеток в условиях отсутствия оксимочевины в тех же пробах крови.

Изучались эффекты следующих мутагенов и протекторов

Фотрин (2,2,4,6-пентаэтилпиридино-6-морфолиноциклотрифосфатазтриен)-пентафункциональное алкилирующее соединение, цитостатик (действует подавляюще на синтез ДНК). Имеется много работ, посвященных изучению эффектов фотрина в культуре клеток человека [1, 3].

Диоксидин (1,4-ди-N-окись 2,3-бис(оксиметил)хинокалинал)-антибактериальный препарат, применяется в педиатрической практике, имеет выраженные мутагенные свойства [6].

Бемитил (2-этилтиобензамидола гидробромид) проявил четкий защитный эффект в культуре лимфоцитов человека и клетках костного мозга мышей от мутагенного действия ряда соединений, в том числе фотрина и диоксидина [5]. Механизм этого эффекта, возможно, связан со способностью препарата снижать уровень индуцированных активных форм кислорода.

Гаммафос (аминэтилвизиопропилтиофосфорная кислота—2,3 или WR 2721), благодаря своей малой токсичности и радиозащитным свойствам используется в качестве протектора в онкологической клинике [8].

Интерферон рекомбинантный человеческий—природный протектор. Широко известна антимутагенная, антипролиферативная, антивирусная активность интерферона [2, 10].

Использовались нецитотоксические дозы веществ: фотрин— $0,5 \cdot 10^{-5}$  M, диоксидин— $1,3 \cdot 10^{-4}$  M, бемитил и гаммафос— $0,7 \cdot 10^{-2}$  M, интерферон—37 ед/мл.

**Результаты и обсуждение.** Фотрин и диоксидин в изученных концентрациях оказывали мутагенное действие на культуру клеток человека.

Инкубация клеток с фотрином вызывала понижение уровня двунизовой ДНК до 80—81% относительно контроля, после инкубации в свежей среде наблюдалось незначительное восстановление. Бемитил проявил хорошее защитное действие в этом варианте. Такая же закономерность обнаружена цитогенетическими методами. Гаммафос защищал от повреждающего действия фотрина на ДНК слабее бемитила. Одновременное введение с фотрином интерферона снижало уровень индуцированных однонитевых разрывов в ДНК, хотя постинкубация не стимулировала дальнейшую репарацию ДНК.

Разрывы в ДНК, вызываемые диоксидином (двунизовая ДНК—82% от контроля), практически не репарировались. Бемитил защищал от мутагенного действия диоксидина слабее, чем в варианте с фотрином, но репарация поврежденной несколько стимулировалась (91%). Гаммафос лучше предохранял ДНК от возникновения однонитевых разрывов, но еще более выраженным оказалось защитное действие интерферона.

В вариантах с одним интерфероном или только с бемитилом, или гаммафосом индукции разрывов не наблюдалось.

Таким образом, интерферон—эффективный и универсальный протектор, гаммафос защищает ДНК слабее, а защитный эффект бемитила лучше проявляется в вариантах с фотрином. Критерием этих эффектов являлись возникновение и репарация однонитевых разрывов в цепи ДНК, определяемые методом хроматографии на гидроксипатите. Не

менее интересные. на наш взгляд, данные были получены при анализе индуцированного (внепланового) синтеза ДНК сразу после обработки указанными веществами во всех вариантах с мутагенами и протекторами. В качестве показателя, отражающего способность клеток к репарации поврежденной ДНК, нами был взят ДРИ:

имп мип (клетки, обработанные веществами)

имп мип (клетки необработанные)

Показано, что резкие изменения ДНК-репарационного индекса наблюдаются в вариантах с протекторами, обработанными фотрином. Отмечено почти полное отсутствие изменений в вариантах с протекторами, обработанными диоксидом (рис. 1).

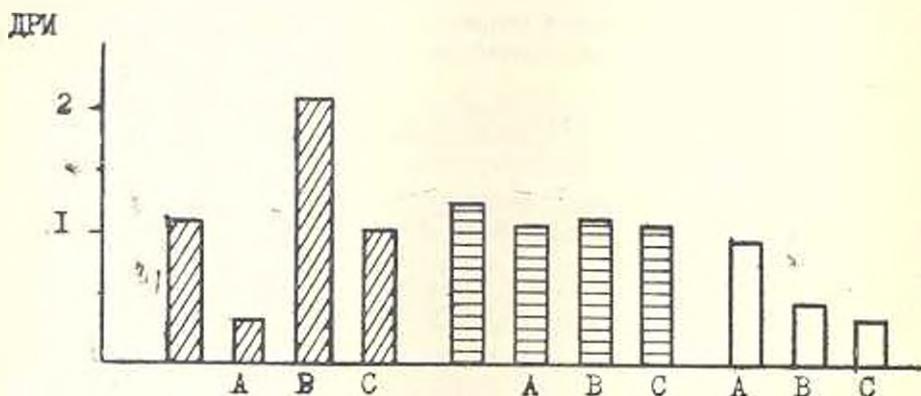


Рис. 1. Значения ДНК-репарационного индекса в лимфоцитах после индукции с мутагенами и протекторами.

□ — фотрин, ▨ — диоксин, А — бемитил, В — 2721, С — интерферон.

Внутри вариантов, обработанных фотрином, наблюдались следующие зависимости. Бемитил, который резко снижает уровень односторонних разрывов, в три раза снижает уровень репарационного индекса относительно контроля. Менее значительный эффект гаммафоса сопровождается неожиданным удвоением уровня внепланового синтеза. И, наконец, в случае с интерфероном изменений ДРИ не наблюдалось. Сравнивая эти результаты с уровнями включения  $^3\text{H}$ -тимидина в условиях отсутствия подавления репликативного синтеза ДНК оксимочевой, можно заметить, что включение подавлено в вариантах мутаген + бемитил (рис. 2). В вариантах с гаммафосом наблюдалось интенсивное включение метки по сравнению с контролем. Можно предположить, что эффект ингибирования бемитилом процессов репарации и репликации и в то же время хорошая защита ДНК клеток от повреждений (разрывов) связаны с тем, что в комплексе с фотрином он сильно «тормозит» различные процессы в клетке, в том числе, вероятно, и мутагенные, подобно тому, как пурамицил модифицирует мутагенное действие фотуринна в отношении СХО посредством ингибирования репарации [4]. Стимулирующее действие гаммафоса на репаративный синтез и включение тимидина, возможно, связаны с тем, что у части клеток, которые к 46

часу культивирования (когда вносятся мутагены и протекторы) не вышли еще из синтетической фазы. И только в случае интерферон+фотрин можно с большой уверенностью сказать, что защитный эффект интерферона связан с его стабилизирующим действием на структуру ДНК.

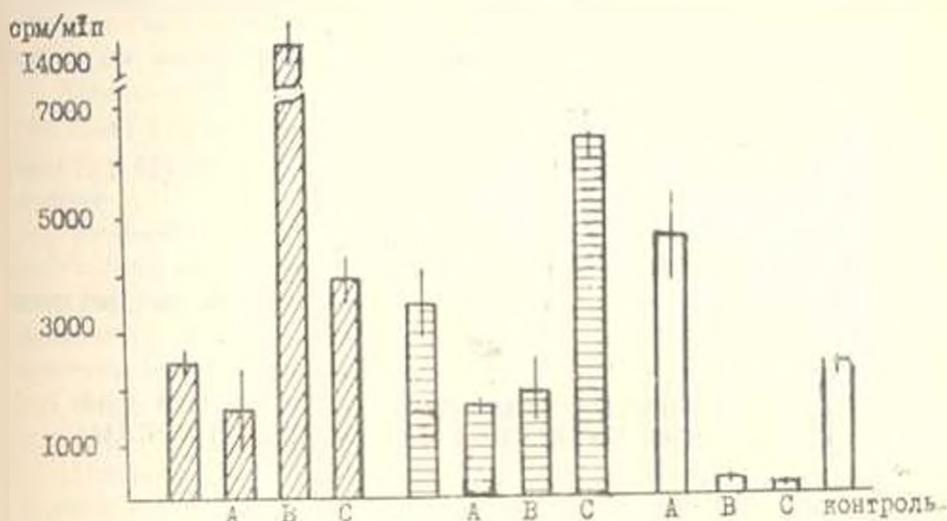


Рис. 2. Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток после инкубации с мутагенами и протекторами.

[diagonal lines] — фотрин, [horizontal lines] — диоксидин. А — бемитил, В — WB 2721, + интерферон

Внутри вариантов, обработанных диоксидином, как уже отмечалось, во внепластовом синтезе резких различий не было, в отношении включения метки в пробах без оксимочевины заслуживает внимания вариант диоксидин+интерферон, где этот процесс интенсивно протекал.

Интересно сравнить также эффекты самих протекторов. Бемитил практически не повышал уровень внепластового синтеза и активировал включение метки, гаммафос и интерферон снижали уровень ДРН относительно контроля и, кроме того, ингибировали включение тимидина в условиях отсутствия оксимочевины.

Итак, примененный комплекс тестов позволил в максимальной степени выявить специфичность каждого из модификаторов, относящихся к различным классам соединений, показать разную природу модификации каждым из изученных протекторов для двух мутагенов, имеющих разный характер действия на ДНК. Проблема заключается в том, чтобы оценить соотношение репаративных систем клетки в наблюдаемом защитном эффекте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Р. М. В кн. Модификация химическим мутагеном в клетках человека. 164, Ереван, 1985.
2. Засухина Г. Д., Македанов Г. П. и др. В кн. Мутагены и репарация в системе вирус—клетка 230, М., 1983.
3. Кириченко О. П., Чеботирев А. Н. Генетика, 12, 10, 155—160, 1976.

4. Титенко Ю. Р. Автореф. канд. дисс., 24, М., 1987.
5. Середкина С. Б., Дурнев А. Д., Дубовская О. Ю., Корнина Л. Г., Величковский Г. Т. Химико-фарм. журн., 12, 1245—1428, 1986.
6. Фоминштейн А. М., Золотарева Г. Н., Ревазова Ю. А. и др. Химико-фарм. журн., 12, 2, 24—29, 1978.
7. Чеботарева А. И., Титенко И. В., Селезнева Т. Г., Фоменко В. Н., Катасова Л. М. Цитология и генетика, 20, 2, 109—115, 1986.
8. Harris J. W., Phillips T. L. Radiat. Res., 46, 362—379, 1971.
9. Hungerford D. A. Stain—Technol., 40, 6, 333—333, 1955.
10. Ortaldo R. Moby Radiat. Res., 81, 232—265, 1984.
11. Rydberg B. Radiat. Res., 61, 271—281, 1975.

Поступило 3.1 1990 г.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАГЕНОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В. А. АВАКЯН, Р. А. АЗАТЯН, В. А. АМИРБЕКЯН,  
А. З. ВОСКАНЯН, Р. Б. АИРАПЕТЯН

Институт земледелия Министерства с-х Армении, г. Эчмиадзин

На различных тест-системах выявлена мутагенная активность большинства из применяемых в республике пестицидов как на хромосомном, так и на организменном уровне. Установлено, что комбинированное применение пестицидов и фитогормона гибберелловой кислоты на модельных объектах приводит к снижению уровня мутационной изменчивости. Промышленные выбросы и выхлопные газы автотранспорта оказывают отрицательное влияние на растения.

Показана достаточно высокая чувствительность и надежность биосферных и модельных тест-систем.

Տարբեր տեսակ-սխեմաների վրա բացահայտվել է հանրապետությունում կիրառվող պեստիցիդների մեծ մասի մոտոպոն սկտիվությունը ինչպես բրոմսոսմային, այնպես էլ օրգանիզմի մակարդակով: Յուրջ է տրված, որ պեստիցիդների և ֆիտոհորմոն հիբերելայիթիկ ճամակցված ազդեցությունը մոդելային օբյեկտների վրա առաջացնում է մոտացիոն փոփոխականության մակարդակի իջեցում: Ինդուստրիալ և ավտոտրանսպորտի արտանետումների նեղատիվ ազդեցությունը բույսերի վրա:

Ինչպես սուր, այնպես էլ շարունակարար փորձարկումները վկայում են կենսոլորտային և մոդելային տեսակ-սխեմաների բարձր զգայնությունը և ռոստ-իտիվներ:

The mutagenic activity of the majority of pesticides being in use in the Republic on both chromosome and organism levels has been found out on different test-systems. It has been found that the combined use of pesticides and phytohormone of gibberellic acid on model objects brings to the decrease of the level of mutational changeability. The industrial wastes and traffic gases have negative influence on plants.

Quite a high sensibility and fidelity of biospheric and model test-systems are shown.