

relatively stable karyotypic structure of polyploid cell populations of spontaneous origin during 20 cell passages. An entropy index was used as a measure of karyotypic heterogeneity and general structure indefiniteness of genetic systems — cell populations. A definite correlation between an increase in the genome number in a cell and a change in a set of quantitative characters was determined.

1. *Harris M.* Mutation rates in cells at different ploidy level // *J. Cell Physiol.*—1971.—78, N 2.— P. 177—184.
2. *Harris M.* Polyploid series mammalian cells // *Exp. Cell Res.*—1977.—66, N 2.— P. 329—336.
3. *Mc Burney M. W., Whitmore G. E.* Selection for temperature-sensitive mutants of diploid and tetraploid mammalian cells // *J. Cell Physiol.*—1974.—83, N 1.— P. 69—74.
4. *Петрова О. Н., Мануилова Е. С., Шаниро Н. И.* Гибридизация клеток китайского хомячка, чувствительных к ультрафиолетовому облучению // *Генетика.*—1977.—13, № 4.— С. 637—645.
5. *Morrow J., Stocco D., Barron E.* Spontaneous mutation rate to thioguanine resistance is decreased in polyploid Hamster cells // *J. Cell Physiol.*—1978.—96, N 1.— P. 81—85.
6. *Tompson K. V. A., Holliday R.* The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts: Evidence against the somatic mutation theory of cellular ageing // *Exp. Cell Res.*—1978.—112, N 2.— P. 281—287.
7. *Бродский В. Я., Урываева И. В.* Клеточная полиплоидия: Пролиферация и дифференцировка.— М.: Наука, 1981.—260 с.
8. *Иашивили Г. Д., Черников В. Г., Пичугина Е. М.* Изучение активности ядрышкообразующих районов хромосом китайского хомячка в клонах различной ploidy // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1983.—95, № 3.— С. 79—81.
9. *Савченко В. К.* Ассоциативный отбор и его роль в эволюции и селекции // *Журн. общ. биологии.*—1980.—41, № 3.— С. 406—417.
10. *Савченко В. К.* Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях.— Минск: Наука и техника, 1984.—224 с.
11. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.—264 с.
12. *Puck T. T., Marcus P. F.* Action of X-rays on mammalian cells // *J. Exp. Med.*—1956.—103, N 5.— P. 653—657.
13. *Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood / P. S. Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellmann et al.* // *Exp. Cell Res.*—1960.—20, N 3.— P. 613—616.
14. *Вентцель Е. С.* Теория вероятностей.— М.: Наука, 1969.—358 с.
15. *Интенсивность отбора и частота резких кариотипических изменений в популяциях соматических клеток при клонировании / Ю. Б. Вахтин, Т. Н. Игнатова, И. И. Фридлянская, И. Н. Швембергер* // *Цитология.*—1965.—7, № 2.— С. 258—259.
16. *Вахтин Ю. Б.* Генетическая теория клеточных популяций.— Л.: Наука, 1980.—168 с.
17. *Глебов О. К., Абрамян Д. С.* Природа фенотипической изменчивости соматических клеток в культуре: нестабильные фенотипические изменения // *Цитология.*—1984.—26, № 3.— С. 235—251.

Ин-т генетики и цитологии АН БССР, Минск

Получено 17.06.85

УДК 575.224.232

ОСОБЕННОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ γ-ЛУЧЕЙ И N-НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРЕЗКАХ ФАЗЫ СИНТЕЗА ДНК

Х. А. Хакимов, А.-К. Э. Эргашев, Г. П. Македонов, А. П. Акифьев

Введение. В исследованиях по генетической и клеточной инженерии у эукариотических организмов немаловажное значение имеют данные о той или иной реакции отдельных фаз клеточного цикла на внешние воздействия. Особенный интерес при этом представляют работы, связанные с изучением чувствительности различных отрезков самой фазы синтеза ДНК к действию мутагенов. Известно, что различные структурные гены и повторяющиеся последовательности, не кодирующие белки, но, возможно, играющие регуляторную роль, могут реплицироваться в различных периодах фазы S [1—4].

Мы поставили своей задачей изучить мутагенное действие ионизирующей радиации и нитрозометилмочевины на синхронизированные клетки проростков пшеницы в ранней, средней и поздней частях и в течение полной фазы S. Таким образом, можно оценить вклад дифференциального повреждения различных последовательностей ДНК в образование генных и хромосомных мутаций. Для усиления генетической эффективности ионизирующей радиации использовали аналог тимидина 5-бром-2'-дезоксуридин (БУДР) [5—8].

Материалы и методы. Одно- и двухдневные проростки озимой пшеницы сорта Киянка синхронизировали с помощью 5-фтор-2'-дезоксуридина (ФУДР) в концен-

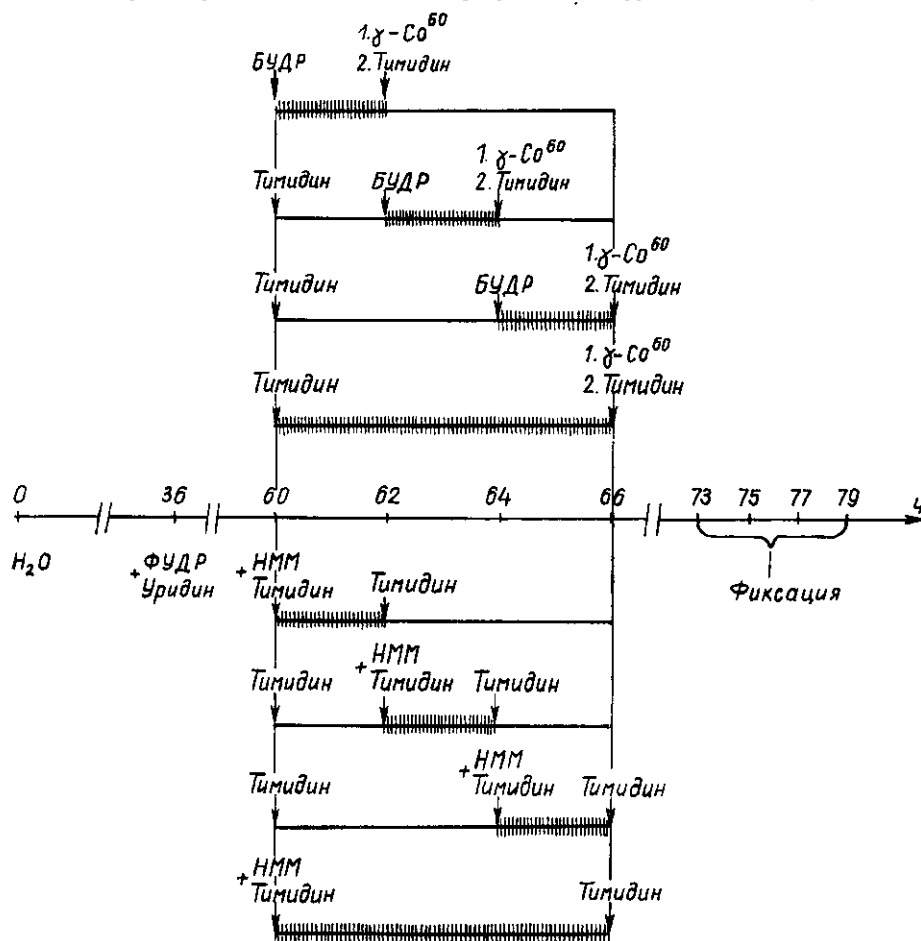


Рис. 1. Схема экспериментов по анализу цитогенетического действия γ -облучения и N-нитрозометилмочевины на синхронизированные клетки проростков пшеницы.
Fig. 1. The general scheme of experiments on the analysis of the cytogenetical action of γ -irradiation and N-nitrosomethylurea on synchronized cells of wheat seedlings.

трации 1 мкг/мл в течение 24 ч. Одновременно в среде присутствовал уридин (0,25 мкг/мл). Затем проростки проращивали в среде с тимидином (10 мкг/мл) или БУДР (10 мкг/мл).

Схема экспериментов по действию γ -облучения и N-нитрозометилмочевины (НММ) представлена на рис. 1. Облучение проводили в дозе 4 Гр (источник γ - Co^{60} , мощность дозы 0,5 Гр/мин). В качестве химического мутагена использовали N-нитрозометилмочевину в концентрации 0,01 % при времени обработки 2 ч.

Корешки фиксировали через 13, 15, 17 и 19 ч после отмывания ФУДР в смеси уксусная кислота — этиловый спирт (1:3), окрашивали ацетокармином и анализировали хромосомные aberrации в стадии анафазы на временных давленных препаратах. При анализе учитывали фрагменты — одиночные и парные, и мосты — хроматидные и хромосомные.

Для оценки количества ДНК-синтезирующих клеток после действия ФУДР использовали метод автордиографии с 3H -тимидином ($18,5 \cdot 10^4$ Бк/мл, удельная радиоактивность $10,7 \cdot 10^{11}$ Бк/мМ). Корешки инкубировали в растворе с 3H -тимидином в

течение 30 мин после удаления ФУДР в начале, середине и конце фазы S. Контролем служили корешки, не обработанные ФУДР. Временные давленные препараты переводили на сухом льду в постоянные и покрывали ядерной эмульсией типа М [9]. Экспозицию проводили в течение 10 дней при 4°C. Подсчет доли меченых клеток проводили в 10 корешках, просматривая при этом 2000—3000 клеток.

Результаты и обсуждение. Оценка синхронизирующего действия ФУДР на клетки корневой меристемы проростков пшеницы. Корешки подвергали воздействию ФУДР, а затем проращивали в среде с тимидином или БУДР. Материал фиксировали с 5 до 24 ч после отмывания ФУДР с интервалом в 1 ч и опре-

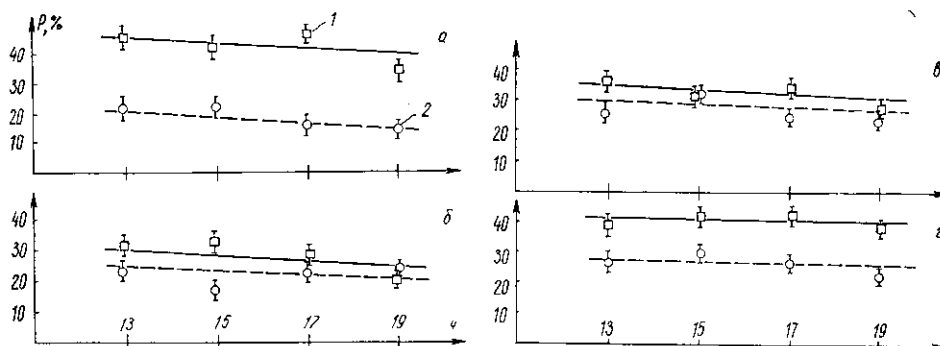


Рис. 2. Выход aberrantных клеток в разные сроки фиксации при γ -облучении синхронизированных меристематических клеток пшеницы, включавших БУДР (1) и тимидин (2) в ранней (а), средней (б), поздней (в) и в течение полной фазы S (г).

Fig. 2. Aberrant cells (%) in different fixation periods after the γ -irradiation of synchronized meristematic wheat cells which incorporated BUdR (1) and thymidine (2) at the early S (a), middle S (б), late S (в) and during the total S phase (г).

деляли митотическую активность клеток меристемы. Через 13 ч отмечено появление пика митотической активности: количество митозов в этот срок фиксации при инкубировании клеток с тимидином превосходило контроль в 3 раза, а при инкубировании с БУДР — в 2,5 раза.

В экспериментах с использованием ^3H -тимидина в несинхронизированных клетках корневой меристемы было обнаружено 16—18% ДНК-синтезирующих клеток. После 24 ч воздействия ФУДР количество меченых клеток повысилось примерно до 70%. Учитывая, что добавление ФУДР в инкубационную среду блокирует как вступление клеток в S-фазу, так и выход из нее, но в то же время практически не препятствует движению клеток по другим фазам клеточного цикла, можно заключить, что по окончании синхронизирующего действия ФУДР на рубеже G_1 —S (или в самом начале S) находилось не менее 50% клеток корневой меристемы. При импульсном мечении ^3H -тимидином в середине S-фазы популяция содержала 62, а в конце — 56% меченых клеток. Эти данные указывают на то, что основная масса клеток, синхронизированных на рубеже G_1 —S, остальные периоды S-фазы проходит также достаточно синхронно.

Мутагенное действие γ -облучения и γ -облучения совместно с БУДР. В контрольных вариантах опыта было обнаружено от 0,5 до 1% aberrantных клеток независимо от сроков фиксации материала после окончания синхронизирующего действия ФУДР. Обработка клеток БУДР не вызывала ни в одном случае мутагенного эффекта. Как следует из рис. 2, при фиксации клеток через 13 и 15 ч количество радиационно индуцированных aberrаций в ранней S выше, чем в более поздние сроки фиксации. Что касается действия облучения в средней и поздней S, то выход aberrаций практически не зависел от срока фиксации. Спектр aberrаций во всех вариантах опыта был представлен главным образом одиночными фрагментами, которые составляли от 80 до 97% всех хромосомных aberrаций.

Радиосенсибилизирующее действие БУДР проявляется при включении его в течение полной S-фазы, но особенно четко — в ранней S (рис. 2, табл. 1). Число aberrантных клеток при этом увеличивается в 2,2 раза, а число aberrаций на 100 клеток — в 2,8 раза. Это означает, что при включении БУДР в раннем отрезке S-фазы под действием γ -лучей увеличивается не только число мутирующих клеток, но и количество перестроек в пораженных клетках.

Следует заметить, что радиосенсибилизирующее действие БУДР при включении его как в течение полной фазы S, так и в начальном периоде S-фазы обнаруживается во всех выбранных нами сроках фиксации. Включение БУДР в средней и поздней S-фазе не вызывает радиосенсибилизации.

Таблица 1

Коэффициенты радиосенсибилизирующего действия БУДР, усредненные по четырем точкам фиксации
The coefficients of the radiosensitizing effect of BUDR (averaged on the 4 points of fixation)

K_i	S-фаза			
	ранняя	средняя	поздняя	полная
K_1	$2,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
K_2	$1,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
K_3	$2,8 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$

Примечание. Коэффициенты сенсибилизации БУДР определяли как отношение соответствующего показателя при действии БУДР к таковому при действии тимидина и характеризуют соответственно: K_1 — выход aberrантных клеток; K_2 — количество aberrаций на 1 aberrантную клетку; K_3 — количество aberrаций на 100 клеток.

Таблица 2

Выход aberrантных клеток проростков пшеницы при действии НММ, %

A distribution of aberrant cells (%) of wheat seedlings after N-nitrosomethylurea action

Фиксация, ч	S-фаза			
	ранняя	средняя	поздняя	полная
13	$11,8 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,1$
15	$11,9 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,1$
17	$16,8 \pm 0,1$	$16,0 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$
19	$13,5 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,1$	$14,9 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,1$

Мутагенное действие НММ. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. Можно отметить следующее: резко выраженная специфичность чувствительности отдельных отрезков фазы S к действию НММ, подобная показанной нами при комбинированном действии БУДР и γ -лучей, отсутствует. Однако обработка НММ клеток в ранней и средней S приводила к повышению мутабельности хромосом в поздних сроках фиксации. То же явление наблюдали и при фиксации через 19 ч клеток, обработанных НММ в поздней S. Эти данные можно было бы объяснить спецификой S-зависимого [10] эффекта НММ, т. е. чем большее количество клеток или отрезков хромосом реплицируется в промежутке времени между мутагенным воздействием и фиксацией материала, тем большее количество повреждений, индуцированных НММ, могут реализоваться в aberrации. Но этому объяс-

нению противоречат результаты опыта с воздействием НММ в течение полной S-фазы. Однако следует учесть при этом, что митотическая активность клеток, обработанных в течение полной S, в 1,5—2 раза ниже, чем в других вариантах опыта при фиксации через 17 и 19 ч (табл. 3). Это может означать, что в данном варианте опыта клетки, полностью реплицировавшие ДНК после действия НММ, еще не вступили в митоз. Так или иначе, на основании имеющихся данных, мы не можем говорить о дифференциальной чувствительности отдельных отрезков S-фазы к НММ.

Таблица 3

Митотическая активность синхронизированных клеток проростков пшеницы при действии НММ

A mitotic activity of wheat seedlings synchronized cells after the N-nitrosomethylurea action

Фиксация, ч	S-фаза			
	ранняя	средняя	поздняя	полная
13	3,9±0,7	6,4±0,4	6,7±0,5	4,8±0,2
15	6,6±0,5	9,4±0,5	9,1±0,6	4,8±0,3
17	8,9±0,8	11,3±0,6	7,9±0,5	5,9±0,4
19	12,7±0,8	14,6±0,8	12,4±0,4	6,1±0,3

В заключение отметим, что главным результатом настоящей работы является обнаружение специфически локализованного в начале S-фазы радиосенсибилизирующего эффекта БУДР по тесту хромосомных аберраций. Ранее в работах [11—13] были приведены данные о том, что радиосенсибилизирующее действие БУДР обусловлено его включением в особые участки ДНК, где происходит спонтанный дополнительный синтез ДНК в G₁- и G₂-фазах. Сопоставляя наши результаты с данными этих работ, можно заключить, что такие участки реплицируются в ранней S-фазе.

В этой связи задачей нашей дальнейшей работы является определение нуклеотидных последовательностей ДНК, реплицирующихся в данной системе в начале фазы S, и их роли в хромосомном мутагенезе.

Данные экспериментов по действию γ -облучения и НММ указывают на перспективность использованного в настоящей работе подхода к изучению мутагенной специфичности.

PECULIARITIES OF THE MUTAGENIC EFFECT OF γ -RAYS AND N-NITROSOMETHYLUREA IN DIFFERENT PERIODS OF THE DNA SYNTHESIS PHASE

Kh. A. Khakimov, A.-K. E. Ergashev, G. P. Makedonov, A. P. Akifjev

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Institute of Experimental Biology of Plants,

Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

S u m m a r y

The sensitiveness of the DNA synthesis phase and its different periods to the mutagenic action of γ -irradiation in combination with 5-bromo-2-deoxyuridine (BUDR) and N-nitrosomethylurea was studied in 5-fluorodesoxyuridine-synchronized cells of winter wheat seedlings. In experiments with irradiation the radiosensitizing effect of BUDR in the early S phase was observed. This effect is not found in the middle and late S phases. Such differences in the sensitiveness of different periods of the S phase to the mutagenic action were absent in the experiment with NMU.

1. Adegoke J. A., Taylor J. H. Sequence programming of DNA replication over the S-phase of chinese hamster cells // Exp. Cell Res.—1977.—104, N 1.—P. 47—54.
2. Mueller G. C., Kajiwara K. Early- and later-replicating DNA complexes in HeLa nuclei // Biochim. et biophys. acta.—1966.—114, N 1.—P. 108—115.
3. Eremenko T., Timofeeva M. Y., Volpe P. Organization, replication and modification of the human genome: synthesis and methylation of palindromic, repeated and unique HeLa DNA sequences during the S-phase // Mol. Biol. Repts.—1980.—6, N 3.—P. 131—136.
4. Худодий Г. А., Хакимов Х. А., Акифьев А. П. Структурные основы репликации ДНК в клетках эукариотов // Тез. докл. III нац. конф. по цитогенетике.—Пловдив, 1984.—Т. 1.—С. 215—222.
5. Djordjevic B., Szybalski W. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the DNA of human cells and its effect on radiation // J. Exp. Med.—1960.—112, N 3.—P. 509—533.
6. Kaplan H. S., Smith K. C., Tomlin P. A. Effect of galogenated pyrimidines on radio-sensitivity of *E. coli* // Rad. Res.—1962.—16, N 1.—P. 98—113.
7. Kihlman B. A. Different effects of 5-FudR and 5-BudR on the frequencies of chromatid aberrations obtained in *Vicia faba* after irradiation with X-rays // Exp. Cell Res.—1962.—27, N 3.—P. 604—612.
8. Окада Ш. Радиационная биохимия клетки.—М.: Мир, 1974.—407 с.
9. Жинкин Л. Н. Применение радиоактивных изотопов в гистологии // Радиоактивные индикаторы в гистологии.—Л.: Медгиз, 1959.—С. 5—33.
10. Дубинин Н. П., Акифьев А. П. Предмутационные потенциальные изменения хромосом // Успехи соврем. биологии.—1970.—69, № 2.—С. 272—283.
11. Тарасов В. А., Сафонова Г. М. Сенсibiliзирующее действие 5-БУДР в постсинтетическом периоде митотического цикла при γ -облучении клеток *Cr. capillaris* // Генетика.—1973.—9, № 2.—С. 35—44.
12. Сафонова Г. М., Мясова Э. Н., Тарасов В. А. Сенсibiliзирующее действие 5-бром-дезоксуридина в постсинтетическом периоде митотического цикла при УФ-облучении клеток китайского хомячка, культивируемых *in vitro* // Там же.—№ 3.—С. 34—40.
13. Македонов Г. П., Тарасов В. А. Направленная модификация поврежденного участка ДНК в индукции структурных мутаций хромосом // Там же.—1982.—18, № 7.—С. 1101—1106.

Ин-т хим. физики АН СССР, Москва

Получено 1.11.85

Ин-т эксперим. биологии растений АН УзССР, Ташкент

Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» В IV кв. 1986 г. ВЫПУСТИТ В СВЕТ КНИГУ:

ЗА ТУЛА Д. Г., СЕМЕРНИКОВ В. А. ИММУНОЛОГИЯ ПЕРЕКРЕСТНО РЕАГИРУЮЩИХ АНТИГЕНОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОК БЛАСТОМ. Язык русский. 20 л. 3 р. 20 к.

Монография посвящена изучению антигенного сходства сапрофитного микроорганизма *Bacillus megaterium* H и клеток злокачественных опухолей. Приведены результаты исследований авторов и литературные данные антигенной специфичности, иммуногенной активности и локализации в микробной клетке антигенов, перекрестно реагирующих с антигенами экспериментальных опухолей человека. Показана принципиальная возможность использования перекрестно реагирующих антигенов *Bac. megaterium* H для иммунодиагностики опухолевых заболеваний. Обоснован направленный поиск и совершенствование новых специфических и неспецифических модуляторов противоопухолевого иммунитета.

Для микробиологов, иммунологов, онкологов и практических врачей.

Предварительные заказы на эту книгу принимают все магазины книготоргов, «Книга — почтой» и «Академкнига», а также магазины — опорные пункты издательства: «Наукова думка» (252001 Киев 1, ул. Кирова, 4), «Книжный мир» (310003 Харьков 3, пл. Советской Украины, 2/2), «Техническая книга» (270001 Одесса 1, ул. Ленина, 17), № 200 (340048 Донецк 48, ул. Артема, 147а), № 19 290006 Львов 6, пл. Рынок, 10). Магазины во Львове и Киеве высылают книги иногородним заказчикам наложенным платежом.