

Л. Г. ДУБИНИНА, академик Н. П. ДУБИНИИ

МОДИФИЦИРОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО И РАДИАЦИОННОГО МУТАГЕНЕЗА И МЕТАБОЛИЗМ

Чувствительность хромосом к радиации и к химическим мутагенам различна в разные фазы клеточного цикла. Для алкилирующих соединений подчеркивается особое значение фазы синтеза ДНК⁽¹⁾, для некоторых из них показана высокая чувствительность ранних стадий предсинтеза⁽²⁾. Считается, что эффективность радиации особенно велика в фазе постсинтеза⁽³⁾.

Исследуя мутагенез после обработки этиленимином (ЭИ) или гамма-лучами сухих и растущих семян *Crepis capillaris*, мы обнаружили особый тип модифицирования мутационного процесса. Было показано существование определенной временной последовательности в изменениях общего

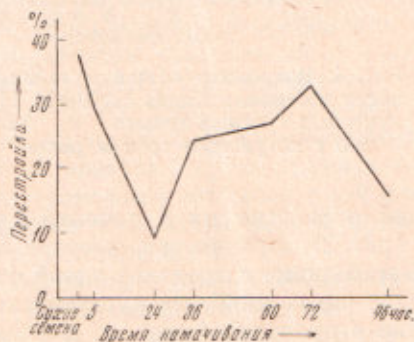


Рис. 1. Изменение общей частоты перестроек хромосом (мутабильности) в семенах *Crepis capillaris* разных сроков намачивания при обработке ЭИ $2,3 \cdot 10^{-2} M$

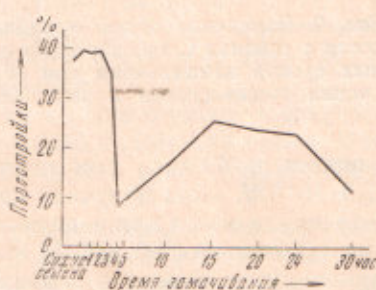


Рис. 2. Изменение общей мутабильности в семенах *Crepis capillaris*, обработанных ЭИ $2,3 \cdot 10^{-2} M$ по разным срокам роста

выхода, а для алкилирующих соединений — и типов структурных мутаций, что наступало независимо от смены фаз клеточного цикла. Эти факты были обнаружены в опытах, где изучалась мутабильность в семенах, искусственно задержанных в стадии предсинтеза (фаза G_1), в сравнении с мутабильностью в семенах при их нормальном прохождении через все фазы клеточного цикла. В обоих случаях при разной длительности процессов, несмотря на наличие или отсутствие смены фаз клеточного цикла, была получена в принципе однозначная картина модифицирования мутационного процесса.

Задержка клеток зародыша в фазе G_1 достигалась в наших опытах путем намачивания семян под водой, где метаболизм в силу частичной аноксии оказывался подавленным. В таких набухших и при этом медленно растущих семенах на протяжении 96 час. намачивания синтез ДНК не начинался. В этих условиях для семян разного срока намачивания при обработке их в течение 3 час. ЭИ $2,3 \cdot 10^{-2} M$ была получена картина определенных изменений в чувствительности семян (рис. 1). Максимальный выход мутаций появлялся после обработки сухих семян. К 24 час. нама-

чивания частота мутаций упала до минимума, после чего начала подниматься, достигнув второго максимума к 72 час., и вновь упала к 96 час. намачивания. При обработке воздушно-сухих семян и семян после их намачивания до 24 час. под действием ЭИ возникает смесь хромосомных и хроматидных мутаций. Начиная с 24 час. намачивания, хромосомы теряют способность реагировать образованием мутаций хромосомного типа, начинают возникать только хроматидные перестройки.

Если семена замачиваются обычным способом и затем нормально растут при свободном доступе кислорода, за 30 час. проходят все фазы клеточного цикла. Синтез ДНК в этих условиях начинается через 10—16 час. после начала замачивания. При исследовании мутабельности в семенах в течение разных сроков ро-

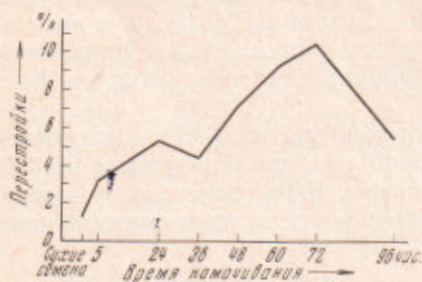


Рис. 3. Изменение общей мутабельности в семенах *Crepis capillaris* разных сроков намачивания при облучении гамма-лучами в дозе 500 г

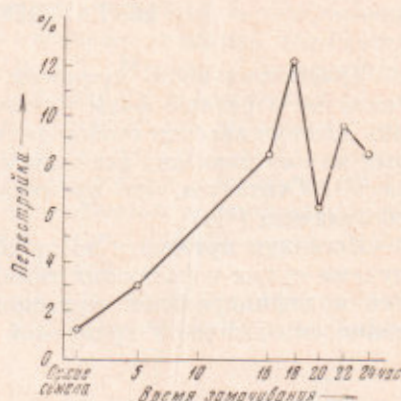


Рис. 4. Изменение общей мутабельности в семенах *Crepis capillaris*, облученных гамма-лучами в дозе 500 г по разным срокам роста

ста, вплоть до 30 час., при последующей обработке их в течение 3 час. ЭИ $2,3 \cdot 10^{-2}$ М, была получена картина (рис. 2), поразительно повторявшая ту, что имела место при задержанном метаболизме в пределах одной фазы G_1 , на протяжении 96 час. В этом случае опять наиболее чувствительны воздушно-сухие семена и семена, росшие в пределах 4 час., т. е. ранняя стадия фазы G_1 . К 5 час. роста семян *Crepis capillaris* частота мутаций резко падает, к 15 час. она достигает второго максимума и вновь падает к 30 час. Как в условиях нормального роста, так и при намачивании падение уровня мутаций (к 5 и к 24 час. соответственно) происходит задолго до наступления синтеза ДНК. Эти точки на кривых мутабельности характеризуются, кроме того, изменением качественной стороны в индуцированном мутагенезе. В эти периоды ЭИ теряет способность вызывать мутации хромосомного типа. Для радиационного мутагенеза картина модификации мутабельности при тех же условиях другая. Здесь сухие семена оказываются наименее чувствительными при облучении гамма-лучами (доза 500 г), затем вплоть до 72 час. при намачивании и до 18 час. при нормальном росте происходит постепенное увеличение частоты мутаций (рис. 3, 4). Обычно считается, что при облучении чувствительность увеличивается в клетках по мере их продвижения к фазе синтеза ДНК (фаза ДНК). Такую картину трактуют как результат восстановительных процессов, осуществляющих репарацию первичных повреждений соответственно длительности времени, прошедшего от момента воздействия мутагеном до митоза (4). В нашем случае в пределах фазы G_1 при намачивании семян это имеет место для части кривой. В этом случае частота мутаций постепенно растет и ее максимум приходится на 72 часа. Однако после 72 час. намачивания частота мутаций снижалась. При нормальном росте максимум мутаций падал на фазу S (18 час. роста), после чего также имело место уменьшение числа мутаций. Факт наибольшей чувствительности к радиа-

ции хромосом в фазе S был установлен для клеток китайского хомячка (6). Все это показывает, что наряду с процессом репараций картина мутабельности по разным срокам после облучения в значительной мере определяется чувствительностью этих разных сроков развития.

Существенной стороной изученной нами картины модификаций мутационного процесса служит то, что она и для радиации и для алкилирующих соединений возникает без связи с типами перестроек хромосом. Для радиационного мутагенеза показано, что появление хроматидных перестроек и перестроек хромосомного типа зависит от того, на какую фазу клеточного цикла действовало облучение. В первом случае требуется облучение ядер в фазах синтеза ДНК и постсинтеза (фаза G₂), во втором — в фазе G₁. Однако вся картина модификации уровня мутабельности при намачивании осуществляется при условии появления перестроек только хромосомного типа. При нормальном росте семян принципиально та же картина возникает в период: сухие семена — 10 час. роста — появление перестроек хромосомного типа, а с 16 час. роста и до 24 час. в семенах — смесь хроматидных и хромосомных мутаций. В это время в асинхронной популяции имеется смесь клеток в фазах G₂, S, G₁. В них при воздействии мутагена, несмотря на смесь из разных фаз цикла, мутабельность модифицируется параллельно. Это ярко показывает, что модифицирование мутабельности при смене состояний метаболизма происходит вне зависимости от фаз клеточного цикла и от типов перестроек хромосом. Как это было уже показано, при воздействии алкилирующими соединениями также получен параллелизм в модификации мутабельности вне зависимости от типов перестроек хромосом как в пределах удлинённой фазы G₁, так и при смене фаз цикла. В обоих случаях вначале появляется смесь хромосомных и хроматидных перестроек, а затем хромосомы к 5 час. и соответственно к 24 час. образуют только хроматидные перестройки.

В литературе широко принята концепция о связи степени чувствительности хромосом к мутагену с той или иной фазой клеточного цикла. В свете данных настоящей работы природа этих связей требует более внимательного исследования.

Полученные данные показывают, что установление связи определенной чувствительности хромосом к мутагену для данной фазы клеточного цикла еще не доказывает наличия причинной зависимости. Наши опыты показали, что при росте семян наиболее радиочувствительной является фаза S. Однако в намоченных семенах получено такое же повышение мутабельности уже в пределах фазы G₁. Очевидно, что истинной причиной такого параллелизма было прохождение в определенной временной последовательности метаболических состояний, сменяющихся вне зависимости от границ клеточных фаз. Длительность прохождения этих состояний определяется физиологическим состоянием при прорастании.

Наши данные показали, что как эффект радиации, так и мутагенный эффект алкилирующих соединений специфически модифицируются по разным метаболическим стадиям. В наших опытах этот факт установлен по их способности вызывать перестройки хромосом. Для радиации наиболее чувствительной была фаза S, а для ЭИ — ранняя стадия G₁. Вполне возможно, что разные условия клетки способствуют или тормозят мутирование разных генов. В этом случае специфика изменений, обнаруженная нами для мутабельности хромосом, должна сопровождаться общей специфичностью мутационного процесса.

Факты, полученные в настоящей и в более ранних наших работах (6), как и в работах других исследователей (7), показывают, что особенности мутагенных воздействий алкилирующих соединений могут быть широко модифицированы при изменении внутриклеточных условий и внешних факторов.

В проведенных нами экспериментах показано, что модифицирование мутационного процесса в клетках, обработанных алкилирующими соеди-

нениями, может быть достигнуто, если задерживать растущие клетки в фазе G₁, если отдалить путем хранения сухих семян время наступления синтеза ДНК от момента воздействия мутагеном, если отмыть токсические продукты гидролиза молекул мутагена и т. д. Все это показывает, что хотя химический мутагенез широко исследуется и является способом получения ценных мутантов у растений и у микроорганизмов, мы лишь сейчас находим новые пути для управления этим видом индуцированной наследственной изменчивости. Изучение условий, модифицирующих химический мутагенез, имеет также первостепенное значение для исследования природы потенциальных изменений и сущности процессов фиксации мутаций.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 I 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. A. Kihlman, *Actions of Chemicals on Dividing Cells*, New Jersey, 1966.
² S. H. Revell, *Hereditas*, 6 (Suppl.), 107 (1953). ³ D. Scott, H. J. Evans, *Mut. Res.*, 4, 5, 579 (1967). ⁴ R. F. Kimball, *Mut. Res.*, 2, 413 (1965). ⁵ W. C. Dewey, R. M. Humphrey *Radiation Res.*, 16, 503 (1962). ⁶ Н. П. Дубинин, Л. Г. Дубинин, *ДАН*, 179, № 5, 1221 (1968). ⁷ C. F. Konzak, R. A. Nilan et al., *Fundamental Aspects of Radiosensitivity*, Brookhaven Symp. in Biol., 14, 128 (1961).