

УДК 576.312.38+575.24

ГЕНЕТИКА

Л. Г. ДУБИНИНА, академик Н. П. ДУБИНИН, О. П. ЧЕРНИКОВА

ЗАЩИТА И СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ МУТАЦИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭТИЛЕНИМИНА

Изучение вопроса о природе длительного последствия при мутагенных эффектах является в настоящее время одним из главных направлений в разработке теории мутаций (¹⁻⁴). Основным в объяснении того факта, что мутации могут возникать спустя длительное время после воздействия мутагеном на клетку, служит идея, что первыми возникают потенциальные изменения, которые спустя некоторое время реализуются в истинные мутации (⁵⁻⁸). В качестве альтернативного, а иногда дополнительного объяснения тех же фактов выдвигается возможность длительного существования молекул мутагена и их вторичных продуктов (^{9, 10}).

Ранее были проведены опыты по длительному промыванию семян *Sterpis capillaris* после того, как семена были однократно обработаны алкилирующим соединением этиленимином (ЭИ) в концентрации $2,3 \cdot 10^{-2}$ мол/л. Было показано, что на стадиях клеточного цикла, в которые клетка пришла после промывания, т. е. заведомого удаления молекул мутагена, объем мутирования не уменьшался (¹¹). Для этилметансульфоната было показано, что его гидролитические продукты в воде не активны в мутагенном отношении и что мутагенные свойства его молекул быстро исчезают в клетках прорастающих семян кукурузы (¹²).

Опираясь на эти факты, представило интерес изучить мутагенные свойства гомогенатов, полученных из клеток, предварительно обработанных мутагеном (^{10, 12}). Если такие гомогенаты, изготовленные в разное время после обработки клеток мутагеном, индуцируют мутации, стало быть в клетках, из которых они были приготовлены, оставались молекулы мутагена или их вторичные продукты. В случае, если гомогенаты теряют мутагенные свойства, а процесс мутирования тем не менее продолжается, тогда причину последствия следует искать в реализации потенциальных изменений.

Изучив влияние гомогенатов, приготовленных из клеток проростков *Sterpis capillaris*, предварительно обработанных алкилирующими соединениями, мы исследовали природу мутагенного последствия. Однако, кроме того, при изучении некоторых типов гомогенатов мы неожиданно натолкнулись на факт существования особой системы естественной защиты против генетических эффектов алкилирующих соединений.

Опыты проводились с проростками *Sterpis capillaris*. Семена замачивали водой. Проростки 26 час. роста в течение 40 мин. обрабатывали раствором ЭИ в концентрации $9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л. Промывание проточной водой длилось 30 мин., после чего рост продолжался еще 24 часа. Такие проростки 50-часового возраста состоят из двух в биохимическом отношении резко отличных частей. Одна часть — это растущая меристема корня и вторая — это кожура семени. Кожура семени у некоторых растений содержит мутагенные вещества, которых нет в меристеме корня, как, например, у черно-семенной *Vicia faba* (¹³). При особых условиях проявляется сенсibiliзация промутагенных веществ в кожуре семени у *Sterpis capillaris* (¹⁴). Учет различий между кожурой семени и меристемой корня показывает, что надо было готовить три рода гомогенатов: гомогенат р.л — растертые клетки проростков, отделенных от кожуры семени; гомогенат р.к — растертая

кожура семени, отделенная от проростков; гомогенат р.п.к — растертые проростки вместе с кожурой семени. Сами клетки в проростках *Speris carillaris*, обработанных ЭИ в возрасте 26 час., из которых готовили гомогенаты на 50 час. роста, характеризовались наличием большого количества мутаций ($21,34 \pm 2,30\%$). Полученными свежими гомогенатами в течение двух часов обрабатывали нормальные 26-часовые проростки, которые после этого продолжали расти на растворе колхицина ($0,01\%$). Через

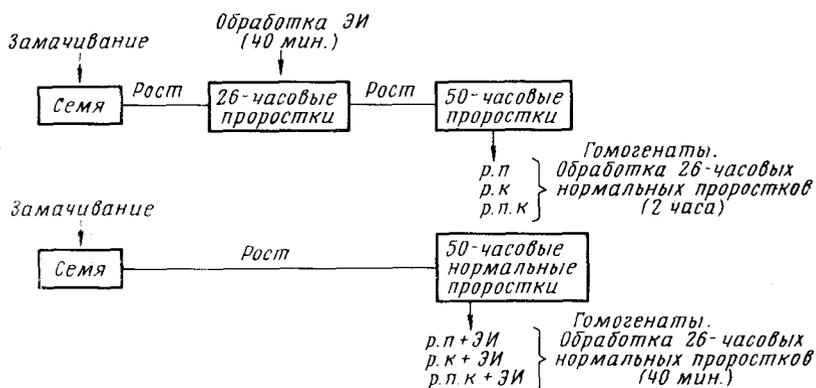


Рис. 1. Схема опытов

12 час. такие обработанные гомогенатом проростки фиксировали в смеси 3 частей спирта и 1 части ледяной уксусной кислоты. Гомогенаты готовили путем растирания в ступке со стеклянным песком, обрабатывали из расчета 10 растертых проростков на 1 обрабатываемый корешок. Все опыты сопровождалось контрольными. Анализировали перестройки хромосом в метафазах первого митоза. Схема опытов представлена на рис. 1.

Эксперименты по воздействию тремя категориями гомогенатов (р.п., р.к., р.п.к.) были проведены в нескольких повторностях. Частота мутаций во всех трех опытных сериях составляла для р.п. $0,37\%$, для р.к. $0,61\%$, для р.п.к. $0,18$ и не отличалась от контрольной (табл. 1). Средняя частота

Таблица 1

Отсутствие мутагенного эффекта при обработке клеток гомогенатами из проростков 50-часового возраста, предварительно обработанных ЭИ на 26 час. роста

Обработка	Мутабельность в проростках		
	число изученных метафаз	число перестроек	перестройки, %
Р. п.	1869	7	$0,37 \pm 0,14$
Р. к.	2265	14	$0,61 \pm 0,16$
Р. п. к.	2134	4	$0,18 \pm 0,09$
Всего	6268	25	$0,39 \pm 0,08$
Контроль	7420	22	$0,30 \pm 0,06$
ЭИ $9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л	1282	363	$28,31 \pm 1,48$

мутаций по трем опытным вариантам была равна $0,39 \pm 0,08\%$; по контрольным она составляла $0,30 \pm 0,08\%$. В этих же условиях обработка ЭИ $9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л привела к появлению $28,3\%$ мутаций. Результаты этих опытов отчетливо показали, что метаболизм в условиях роста проростков в течение 24 час. после того, как 26-часовые проростки были обработаны ЭИ, приводит к исчезновению в клетках проростков каких-либо мутагенных продуктов. Ни отдельные проростки, ни кожура проросших семян, ни

комбинация того и другого не несут в себе мутагенных свойств. Сопоставляя эти результаты с данными о том, что обработка ЭИ в стадии G₁ дает выход как хромосомных, так и хроматидных изменений (¹¹, ¹⁵), а также с опытами по хранению семян, обработанных ЭИ (⁸), видно, что объяснение этих фактов должно базироваться на теории потенциальных изменений.

Большой интерес представляло решение вопроса, какой эффект имеет непосредственное взаимодействие ЭИ с веществами гомогенатов р.п., р.к. и р.п.к. В этом случае равный объем ЭИ ($9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л) добавляли к гомогенатам из нормальных проростков 50-часового возраста и такими смесями обрабатывали нормальные 26-часовые проростки. В полученной смеси концентрация ЭИ равнялась $0,5 \cdot 9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л. Обычная обработка проростков такой концентрацией ЭИ вызывала 9,6% мутаций при фиксации корешков через 12 час. после обработки. Казалось бы, что обработка такими смесями должна дать максимальный эффект ЭИ по сравнению с эффектами гомогенатов из проростков, росших то или иное время после обработки ЭИ.

Таблица 2

Мутагенные свойства смесей гомогенатов из нормальных проростков 50-часового возраста с этиленимином

Обработка	Мутабельность в проростках		
	число изученных метафаз	число перестроек	перестройки, %
Р. п. + ЭИ	5071	28	0,55 ± 0,10
Р. к. + ЭИ	1184	487	41,13 ± 1,86
Р. п. к. + ЭИ	7902	83	1,05 ± 0,11
Контроль	12095	26	0,22 ± 0,04
ЭИ $0,5 \cdot 9,3 \cdot 10^{-3}$ мол/л	1599	155	9,69 ± 0,77

Результаты этих опытов оказались неожиданными. Было открыто явление индивидуального модифицирования мутагенного эффекта при добавлении ЭИ в каждый из трех гомогенатов (табл. 2). При обработке нормальных 26-часовых проростков смесью гомогената р.к.+ ЭИ частота мутаций составила $41,13 \pm 1,86\%$, при этом отмечается резкое подавление митотического цикла. Уже указывалось, что у некоторых растений кожура содержит вещества, обладающие промутагенными или мутагенными свойствами. Очевидно, что при взаимодействии ЭИ с растертой кожурой образуются высокомутагенные соединения, которые приводят к сенсibilизации его действия, что и выражается в резком увеличении выхода мутаций.

Новые факты были получены по взаимодействию между ЭИ и веществами из клеток растертых проростков, отделенных от кожуры. Оказалось, что ЭИ, введенный в гомогенат р.п., полностью теряет мутагенные свойства. Если смесь гомогенат р.к.+ ЭИ вызывала 41,13% мутаций, то смесь гомогената р.п.+ ЭИ — всего лишь 0,55%. Из этого следует, что протоплазма клеток растертых проростков содержит соединения, которые практически мгновенно нейтрализуют все молекулы мутагена. Большой интерес представили опыты со смесью р.п.к.+ ЭИ. В этом случае смесь, по-видимому, должна содержать, с одной стороны, активированные вещества защиты (р.п.), и, с другой, активированные вещества, сенсibilизирующие мутагенез (р.к.). Как же проявится действие этой смеси при обработке ею нормальных проростков? Оказалось, что смесь гомогената р.п.к.+ ЭИ в этих опытах практически не индуцирует мутации (даст 1%) (табл. 2). Это показывает, что громадный потенциал сенсibilизированной мутагенности, возникающей при соединении р.к. с + ЭИ, был нейтрализован.

ван реакцией с защитными веществами из разрушенных клеток проростков.

Проведенные опыты установили существование особого типа внутриклеточной защиты. Дополнительные опыты показали, что эти вещества возникают при метаболизме на определенной стадии в прорастающих семенах. Изучение биохимической природы этих соединений, общего механизма действия этой ранее не известной системы естественной защиты и ее роли в интактной клетке представляет большой интерес как для разработки проблемы защиты, так и для понимания природы мутаций.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
29 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Дубинин, Генетика, 5, № 8, 5 (1969). ² Н. П. Дубинин, Е. Г. Сапрыкина, ДАН, 158, № 4, 956 (1964). ³ Н. П. Дубинин, А. П. Акифьев и др., Генетика, 4, № 6, 22 (1968). ⁴ Д. Д. Ромашов, В. Н. Беляева, Генетика, № 4, 4 (1966). ⁵ С. Р. Swanson, Genetics, 40, 493 (1955). ⁶ Н. П. Дубинин, Л. Г. Дубинина, ДАН, 179, № 5, 1221 (1968). ⁷ К. Н. Гарина, Н. И. Романова, Генетика, 6, № 6, 87 (1970). ⁸ А. И. Корытова, О. Ф. Михайлов, Н. П. Дубинин, Генетика, 7, № 8, 10 (1971). ⁹ E. E. Froese-Gertzen, S. F. Konzak et al., Radiation Bot., № 4, 61 (1964). ¹⁰ В. С. Андреев, Б. Н. Сидоров, Н. Н. Соколов, Генетика, 6, 28 (1966). ¹¹ Л. Г. Дубинина, Автореф. кандидатской диссертации, М., 1969. ¹² G. Ficsor, W. C. Beckman, Genetics, 60, № 4, Part 2, 176 (1968). ¹³ Н. П. Дубинин, В. К. Щербаков, ДАН, 160, № 4, 218 (1965). ¹⁴ В. В. Шевченко, Е. М. Протопопова и др., Генетика, 7, № 4, 20 (1971). ¹⁵ Л. Г. Дубинина, Генетика, 6, № 8, 35 (1970).