

Л. Г. ДУБИНИНА

ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА И ПРОБЛЕМА ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ АНАЛИЗЕ МУТАГЕННОСТИ ФАКТОРОВ БИОСФЕРЫ

(Представлено академиком Н. В. Цициным 11 IV 1974)

Современная связь теории мутаций с учением о биосфере требует разработки тест-систем для определения мутагенности факторов среды. При изучении наследственности человека особую роль играет изучение мутагенеза в культуре клеток человека.

В настоящей работе на метафазных хромосомах лейкоцитов периферической крови человека *in vitro* проведено цитогенетическое исследование радиационного и химического мутагенеза в I, II и III клеточных циклах при фиксации клеток на 54, 72 и 96 час. роста культуры после введения фитогемагглютинина. Из мутагенных факторов использовали рентгеновские лучи в дозе 200 р (условия облучения: напряжение 210 кв, сила тока 15 ма, фильтр Cu 0,5 мм, фокусное расстояние 35 см, мощность дозы 57,6 р/мин, экспозиция 3 мин. 28 сек.), алкилирующее соединение тиоТЭФ в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ M, комбинированное воздействие радиации и тиоТЭФ. Обработывали культуры в разные временные отрезки первого клеточного цикла. Эти исследования сочетались с радиоавтографическим анализом репликации хромосом на протяжении трех клеточных поколений.

Вопрос о радиационном мутагенезе в пределах I клеточного цикла изучался рядом авторов (¹⁻⁴). В наших опытах показана высокая мутабельность хромосом в фазе G₁ и в фазе G₂, низкая мутабельность для фазы синтеза ДНК. Кривая радиочувствительности, свойственная хромосомам в течение I клеточного цикла при их фиксации на 54-м часу, оказалась свойственна клеткам, приходящим в I митоз на 72-м часу роста культуры (рис. 1). Это свидетельствовало о том, что для субпопуляций, имеющих разную длительность клеточного цикла, свойствен одинаковый период G₁. Анализ смены перестроек хромосомного типа на хроматидные для клеток, приходящих в I митоз на 72-м часу, показал, что наступление фазы S соответствует субпопуляции I митоза на 54-м часу (рис. 2). Изучение длительности клеточного цикла, равного 66 час., подтвердило концепцию о совпадении времени наступления фазы S для разных субпопуляций, приходящих в разное время в I митоз. Радиоавтография и радиационный анализ клеток, приходящих в митоз на 96-м часу, показали, что после фазы S эта субпопуляция находится в длительной фазе G₂. Длительность I клеточного цикла заметно варьирует для разных субпопуляций клеток. Имеются все переходы по длине цикла от 48 до 120 час. Проводя фиксации на 54-м, 72-м и 96-м час. мы в комплексной динамике популяции клеток имели лишь отдельные субпопуляции в первом митозе.

Изучение мутагенного влияния алкилирующего соединения тиоТЭФ позволило обнаружить эффективность мутагена при обработке фаз G₁ и S клеточного цикла (рис. 3): в фазе G₁ преимущественно возникали хроматидные мутации, число хромосомных изменений было невелико; в фазе S возникали только хроматидные мутации. Воздействие радиации на нестимулированные лейкоциты популяции клеток на 72-м и 96-м час. роста вызывало уменьшение числа перестроек хромосом (⁵⁻⁶), связанного

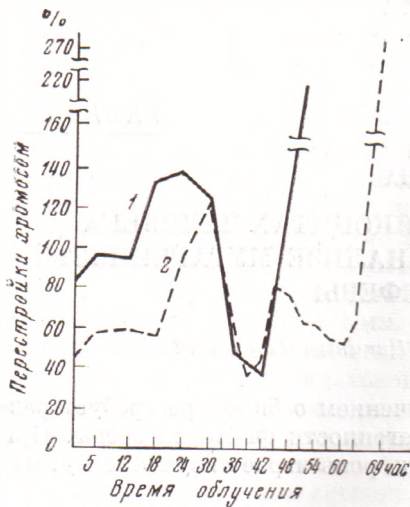


Рис. 1

Рис. 1. Динамика изменения уровня общей мутабельности при воздействии радиации; фиксация на 54-м (1) и 72-м (2) час.

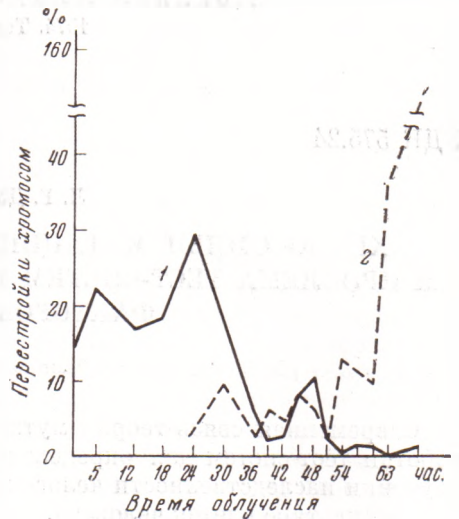


Рис. 2

Рис. 2. Динамика изменения числа хромосомных (1) и хроматидных (2) перестроек при фиксации на 72-м часу

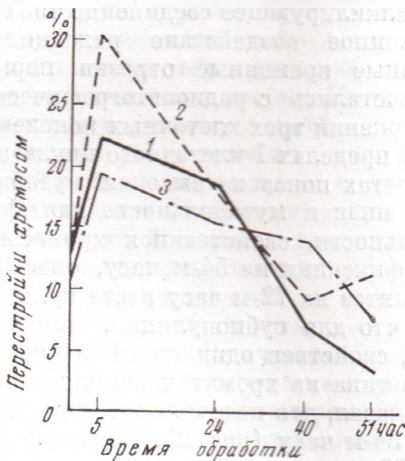


Рис. 3

Рис. 3. Изменение числа перестроек хромосом, индуцированных тию ТЭФ, при фиксации на 54-м (1), 72-м (2) и 96-м (3) час.

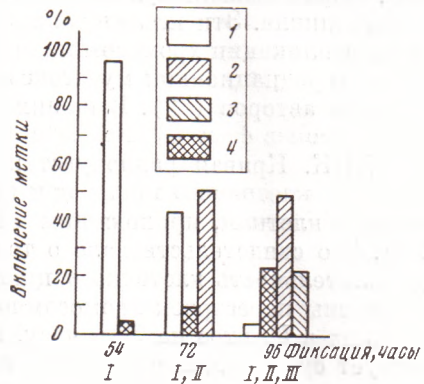


Рис. 4

Рис. 4. Распределение метки в хромосомах в разных клеточных циклах после введения ^3H -тимидина вместе с тиюТЭФ на 40-м часу роста культуры. I—III — клеточные циклы. 1 — метафазы, меченные по двум хроматидам, 2 — по одной хроматиде, 3 — в половине набора хромосом по одной хроматиде, 4 — немеченные

с переходом части клеток во II и III митозы. В случае развития клеточных популяций исследование по числу aberrаций обнаружило иную картину после обработок клеток тиюТЭФ: в фазах G_0 и G_1 уровень мутаций не уменьшается, а в фазе S (40 час. роста) происходит нарастание числа мутаций. Это относится к фиксациям материала на 54-м, 72-м и 96-м час. Радиоавтографический анализ при введении метки вместе с тиюТЭФ на 40-м часу роста культуры показал, что клетки I митоза практически от-

сутствуют на 96-м часу фиксации (рис. 4). После обработки хромосом тиоТЭФ в I клеточном цикле хроматидные мутации в виде концевых делеций и хроматидных обменов заново возникают во II и III клеточных поколениях.

Проблема комбинированного действия имеет большое значение для анализа мутагенов среды, поскольку влияние факторов биосферы на мутации осуществляется одновременно. Такое воздействие показало на разных объектах явления аддитивности, защиты и сенсбилизации. В наших экспериментах по влиянию радиации и тиоТЭФ на лейкоциты в разных временных отрезках фазы G₁ и фазы S в метафазах I митоза на 54-м часу роста обнаружено явление защиты. Исследование метафаз I митоза с более длительным клеточным циклом, на 72-м часу, показало сенсбилизацию после комбинированной обработки.

Проведенный анализ и учет литературных данных позволяют сформулировать принципы использования культуры лейкоцитов человека в качестве тест-системы по определению мутагенности факторов среды. При изучении эффектов радиации можно ограничиться анализом мутаций в коротком, первом клеточном цикле. Разные авторы используют фиксацию I митоза в сроки от 48 до 60 час. Для сравнимости результатов разных лабораторий следует выбрать одно время фиксации, например на 54-м часу роста культуры. Исследование химических мутагенов также предполагает изучение мутабельности в I клеточном цикле и мутагенного последствия во II и III клеточном цикле. Это достигается сравнением числа мутаций при фиксации клеток на 54-м, 72-м и 96-м час. роста культуры.

Изучение комбинированного влияния радиации и химических мутагенов предполагает установление числа мутаций в условиях I митоза для популяции клеток с коротким клеточным циклом (54 часа) и для клеток с циклом, равным 72 час. Это дает возможность изучить динамику потенциальных поражений. Для второй фиксации необходимо учитывать соотношение клеток I и II митоза с помощью радиоавтографии.

Использование неизученных видов радиации, новых химических мутагенов, высоких концентраций известных мутагенов, специфических взаимодействий мутагенов при комбинированной обработке делает возможным различные сдвиги в динамике клеточной популяции. В этих условиях необходимо выяснить ход репликации хромосом с помощью радиоавтографии и провести контрольный радиационный анализ с целью установления того времени, когда происходит смена типов перестроек хромосом. Такой подход позволит выявить эффект мутагена в свете данных о движении популяций лейкоцитов по фазам I клеточного цикла, времени наступления и удельного веса вторых и третьих митозов.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ З. А. Жемилев, *Генетика*, № 5, 67 (1967). ² K. Lindahl-Kiessling, B. Santesson, J. A. Vöök, *Chromosoma*, v. 31, № 3, 280 (1970). ³ А. В. Севаньяков, *Генетика*, т. 7, № 4, 129 (1971). ⁴ Л. Г. Дубинина, Н. И. Петрова, О. П. Черникова, Отчет № Б246299 за 1972 г. в ВНИИЦ по теме № 72038455. ⁵ K. E. Buckton, M. C. Pike, *Nature*, v. 202, 714 (1964). ⁶ M. S. Sasaki, A. Norman, *Nature*, v. 210, № 5039, 913 (1966).