

Н.К. КУЦОКОНЬ¹, В.Ф. БЕЗРУКОВ²,
Л.М. ЛАЗАРЕНКО², Н.М. РАШИДОВ¹,
Д.М. ГРОДЗИНСЬКИЙ¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ,

²Київський національний університет ім. Т.Г. Шевченка

КІЛЬКІСТЬ АБЕРАЦІЙ НА АБЕРАНТНУ КЛІТИНУ ЯК ПАРАМЕТР ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ.

1. Характеристика дозових залежностей



Внаслідок забруднення природного середовища генотоксичними чинниками важливе значення надається аналізу хромосомної нестабільності. Як параметри хромосомної нестабільності найчастіше враховують частоту аберантних клітин, спектр хромосомних аберрацій, середню кількість аберрацій на аберантну клітину та розподіл аберрацій по клітинах. Робота проведена з метою порівняльної характеристики частоти аберантних клітин та середньої кількості аберрацій на аберантну клітину як показників хромосомної нестабільності. В *Allium*-тесті проаналізовано динаміку змін цих параметрів, індукованих мутагенними факторами різної природи: фізичних (α -опромінення ^{241}Am , γ -опромінення ^{60}Co) та хімічного (тіофосфамід). Порівняльна характеристика частоти аберантних клітин та пошкодженості аберантної клітини свідчить, що вони мають різну динаміку, характеризують дещо різні механізми хромосомної нестабільності *Allium* сера *L*. Обидва ці параметри є взаємодоповнюючими критеріями хромосомної нестабільності.

© КУЦОКОНЬ Н.К., БЕЗРУКОВ В.Ф., ЛАЗАРЕНКО Л.М.,
РАШИДОВ Н.М., ГРОДЗИНСЬКИЙ Д.М., 2003

Вступ. У зв'язку з забрудненням природного середовища генотоксичними речовинами проблема хромосомної нестабільності є невідкладно актуальною. Особливо гостро вона стосується України, де екологічна ситуація ускладнюється радіаційним забрудненням внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Хромосомна нестабільність має місце при розвитку зложісних новоутворень [1], тому вивченю її надається велике значення [2].

Як параметри хромосомної нестабільності найчастіше визначають залежно від методу частоту аберантних анафаз (ЧАА) або метафаз, спектр хромосомних аберрацій; іноді аналізують середню кількість аберрацій на аберантну клітину (КАБАК) (пошкодженість аберантної клітини) та розподіл цитогенетичних пошкоджень по клітинах [3–9]. ЧАА — частка клітин з аберраціями від 100 проаналізованих, виражена в процентах, відображає пошкодженість популяції клітин, КАБАК відображає ступінь пошкодженості саме аберантної (тобто пошкодженої) клітини. Обидва ці показники є параметрами нестабільності геному; вони характеризують дещо різні її сторони. Зростання ЧАА не завжди супроводжується аналогічними змінами КАБАК, і, навпаки, при майже незмінних значеннях ЧАА спостерігається зростання КАБАК [6, 9]. Деякі мутагени здатні сильніше впливати на частоту клітин з аберраціями, в той час як інші здатні індукувати нові пошкодження у вже пошкоджених клітинах [10]. В інших роботах підвищення частоти клітин з аберраціями, індуковане гамма-опроміненням та тіоТЕФ, супроводжувалось зростанням кількості пошкоджень хромосом на клітину [8, 11]. Це свідчить про різні механізми, шляхи реалізації геномної нестабільності на хромосомному рівні.

Мета нашої роботи полягала у порівняльній характеристиці ЧАА та КАБАК як показників хромосомної нестабільності.

Матеріали та методи. Аналізували ЧАА та КАБАК, індуковані мутагенними факторами різної природи, а саме: тіофосфамідом (тіоТЕФ), америцієм-241 ($^{241}\text{AmCl}_3$), γ -опроміненням. Насіння *Allium* сера *L*. пророцювали в розчині тіоТЕФ в концентраціях 1 мг/л — 40 мг/л та в розчині $^{241}\text{AmCl}_3$ концентрацій $1,5 \cdot 10^{-6}$ — $1,5 \cdot 10^{-4}$ мг/л (активність розчинів $8,75 \cdot 10^4$ — $1,75 \cdot 10^7$ Бк/л). В експерименті з γ -опроміненням повітряно-сухе насіння цибулі піддавали дії γ -променів від джерела ^{60}Co у відносно низьких (1—50 Гр) та високих дозах (50—300 Гр). В усіх дослідах контролем було насіння, що проростало в тих же умовах, що й

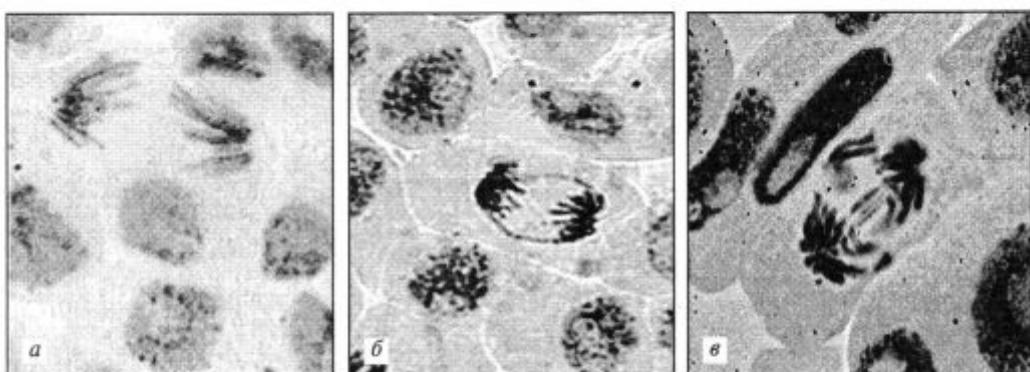


Рис. 1. Клітини кореневої меристеми *Allium cepa* L.: *a* — нормальні анафази; *б* — рання телофаза з двома аберраціями; *в* — рання телофаза з множинними аберраціями

експериментальне, але без впливу мутагенного фактора. Пророшування, фіксацію матеріалу та приготування давлених препаратів проводили за раніше використаними та модифікованими нами методиками [12–14]. На 72-гу годину після замочування визначали схожість насіння як відсоток пророслого насіння.

Аналіз проводили анафазним методом в перших мітозах. Враховували ЧАА як відсоток клітин в анафазі, що містили порушення хромосом. Аберрації класифікували за видами: фрагменти одиничні, фрагменти парні, хроматидні одиничні мости, хромосомні парні мости, мости з фрагментами — одинарними чи парними [15]. При обчисленні КАБАК враховували клітини з 0, 1, 2 та множинними невизначеніми хромосомними аберраціями (>2 аберрації). Статистичну обробку даних проводили за загальнонормативними методиками, для показника ЧАА розраховували похибку долі, для параметра КАБАК — стандартну похибку [16].

Результати досліджень. ЧАА визначається як частка клітин, що містять хромосомні аберрації. При цьому клітина може містити 0, 1, 2 і більше аберрацій (рис. 1). При аналізі ЧАА як параметра хромосомної нестабільності ця різниця в кількості пошкоджень на клітину ніяким чином не враховується. Звертає на себе увагу те, що при анафазному методі обліку в клітинах можливо визначити одну чи кілька аберрацій, але не завжди легко визначати кількість аберрацій, якщо їх в клітині багато. Тому такі пошкодження відносять до множинних невизначеніх пошкоджень.

На рис. 2 зображене розподіл клітин з різною кількістю хромосомних аберрацій у контролі, за-

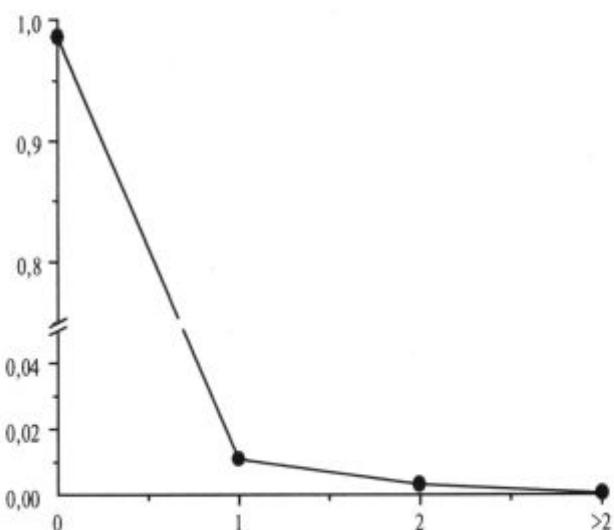


Рис. 2. Поклітинний розподіл аберрацій в клітинах кореневої меристеми *A. cepa* при пророшуванні насіння в дистильованій воді: по вертикальній — частка клітин, по горизонтальній — число аберрацій в клітині

відсутності дії мутагенних чинників. При цьому середнє значення КАБАК складало від 1 до 1,6 аберрацій на аберантну клітину.

Результати порівняльного аналізу характеру зміни значень параметрів КАБАК та ЧАА в залежності від величини мутагенного навантаження представлені на рис. 3–5. На рис. 3 представлена графіки залежності ЧАА та КАБАК від дози γ -опромінення. Динаміка залежності цих параметрів показує незначне зростання КАБАК в діапазоні відносно низьких доз (всі значення перебували в межах стандартної похибки експерименту). В той же час за критерієм ЧАА статистично значимі ефекти виявляються вже у дозі 5 Гр. В діапа-

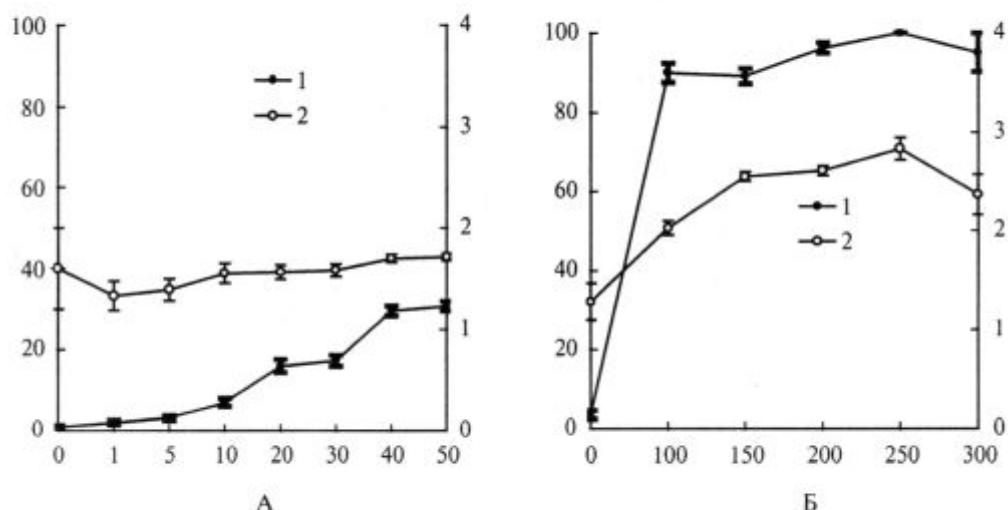


Рис. 3. Вплив γ -опромінення на частоту аберантних анафаз (1) (по вертикалі зліва, %) та середню КАБАК (2) (по вертикалі справа) в клітинах кореневої меристеми *A. serpentina*. По горизонталі — доза, Гр: А — діапазон відносно низьких доз; Б — діапазон високих доз

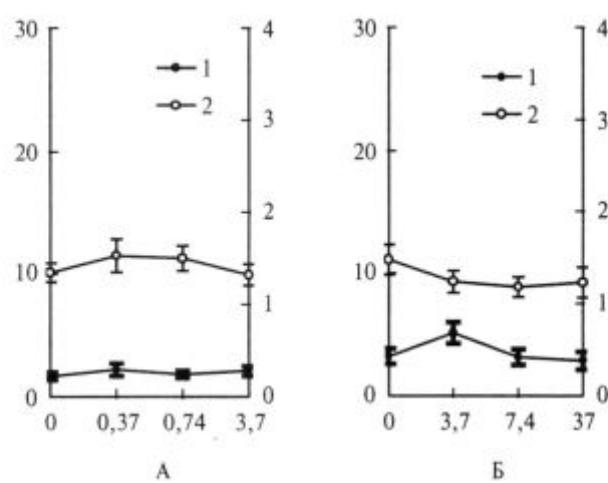


Рис. 4. Вплив α -опромінення ^{241}Am на частоту аберантних анафаз (1) (по вертикалі зліва, %) та середню КАБАК (2) (по вертикалі справа) в клітинах кореневої меристеми *A. serpentina*. По горизонталі — доза внутрішнього опромінення, сГр: А — діапазон низьких доз; Б — діапазон високих доз

зоні високих доз рівень КАБАК помітно зростає з дозою, як і рівень ЧАА, що досягає високих значень: при опроміненні в дозі вище 100 Гр виявилися пошкодженими майже всі клітини. При дозі 300 Гр спостерігається деяке зниження рівня КАБАК, що можна пояснити недостатністю вибірки; внаслідок сильного зниження мітотичного індексу було виявлено менше 20 анафаз.

Порівняння залежностей ЧАА та КАБАК від дози внутрішнього опромінення ^{241}Am (рис. 4)

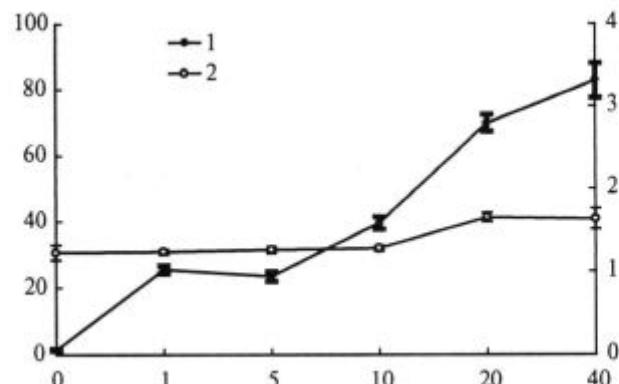
показує відсутність зв'язку між дозою та ефектом. Під впливом зростання концентрації тіоТЕФ частота анафаз з абертаціями значно підвищується, в той же час нарощання КАБАК відбувалося набагато повільніше (рис. 5).

На рис. 6 представлено розподілі клітин з різною кількістю хромосомних абертацій в залежності від дози мутагенного чинника. При нарощанні концентрації тіоТЕФ (рис. 6) поступово збільшується кількість клітин, що містять одну абертацію, в той же час при зростанні дози γ -опромінення значно зростає кількість клітин з багатьма абертаціями. З рис. 6 видно, що КАБАК чітко відображає процеси формування абертацій, виявляючи у випадку з γ -опроміненням більш високі значення. Зазначимо, що апроксимацію даних поклітинного розподілу абертацій до теоретичних моделей буде проведено у подальшій роботі.

Обговорення одержаних даних. Поклітинний розподіл абертацій є характеристикою певної сукупності пошкоджених клітин. При цьому середнє значення кількості абертацій на клітину з абертаціями називають пошкодженістю аберантної клітини. Цей показник являє собою середню характеристику пошкодженості аберантних клітин. Іншою середньою характеристикою нестабільності хромосом всієї сукупності клітин є частота аберантних клітин. Очевидно, що ці дві середні величини є якісно відмінними кількісними характеристиками хромосомної нестабільності.

Характерною рисою динаміки КАБАК в усіх розглянутих нами варіантах є нижча залежність від сили мутагенного чинника, ніж залежність ЧАА від останнього. КАБАК — це середня величина, що є статистичною характеристикою сукупності пошкоджених клітин. Розподіл клітин за кількістю аберрацій залежно від дози також може бути додатковою характеристикою нестабільноті геному [5]. Результати аналізу залежностей КАБАК та ЧАА від сили мутагенного чинника показують, що параметр пошкодженості клітини є досить чутливим, і його динаміка залежить від природи мутагенного чинника, про що свідчать дані експериментів з тіоТЕФ та високими дозами γ -опромінення; динаміка КАБАК з посиленням мутагенного фактора в них відрізняється, а найвищі значення ЧАА були досить близькими. ТіоТЕФ, як відомо, є мутагеном алкілюючої дії. Алкілюючі агенти викликають цілий спектр пошкоджень ДНК: модифікацію основ, утворення апуринових та апіrimідинових ділянок, етерифікацію фосфатних груп, утворення розривів ДНК, внутрішньо- та міжмолекулярних зшивок та

зшивок ДНК — білок [17], в результаті чого виникають мутації. Алкілюючі сполуки здатні викликати багато однониткових розривів ДНК. Такі пошкодження можуть виявлятися у вигляді хромосомних аберрацій переважно після проходження клітинами другого мітозу [18]. Очевидно, внаслід-



док цього середній показник КАБАК, обчисленний в перших міозах у клітинах, які оброблені тіоТЕФ, не набував високих значень.

Іонізуючі випромінювання здатні взаємодіяти з ДНК як прямим, так і непрямим (вільнорадикальним) механізмом [19]. α -Частинки, будучи щільноіонізуючим опроміненням, на відміну від різкоіонізуючих γ -променів, здатні проникати в тканину на глибину лише 80 мкм. Але енергія α -частинок є надзвичайно високою, наприклад, енергія α -частинки ^{241}Am становить 5,45 МеВ, γ -променів ^{60}Co — 1,25 МеВ. Це означає, що в одиниці об'єму клітини α -випромінення здатне викликати набагато більше пошкоджень, ніж γ -промені. Отже вивчені нами мутагени радикально відмінні за механізмом дії на ДНК і, як наслідок цього, на стабільність геному.

При дії α -опромінення не було виявлено значимих змін за показниками ЧАА та КАБАК. Очевидно, в умовах нашого експерименту в клітинах проростків не накопичувались кількості ^{241}Am , необхідні для виявлення його впливу на цитогенетичні параметри. Можливо, абсорбція америцію відбувається переважно на клітинних стінках, тому що цей елемент, не будучи біогенным, може й не мати спеціальних механізмів проникнення всередину клітини. Крім того, клітини, в яких відбувся α -розділ, могли елімінувати, не входячи в міоз. В роботі [20] було виявлено зростання ЧАА в проростках гороху при вищій активності ^{241}Am , ніж та, що використана в нашому експерименті. Очевидно саме тому, на відміну від авторів [21], які вважають, що трансуранові елементи (^{241}Am , ^{241}Pu) здатні викликати значні пошкодження в лімфоцитах людей, нами не було виявлено нарощання КАБАК при невисоких дозах α -опромінення ^{241}Am (0,37–3,7 сГр).

Показник пошкодженості аберантної клітини є важливим для отримання інформації про механізми проходження мутаційного процесу взагалі та хромосомної нестабільності зокрема. Якщо низьким значенням ЧАА відповідає високий рівень КАБАК, це вказує на те, що пошкоджувальний вплив стосується вже пошкоджених клітин, не поширюючись на клітини непошкоджені. Якщо ж, навпаки, високим значенням ЧАА відповідають більш низькі рівні КАБАК, то це свідчить про залучення до мутаційного процесу нових клітин.

Порівняльна характеристика ЧАА та КАБАК в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.

свідчить, що вони мають різну динаміку, характеризують дещо різні механізми хромосомної нестабільності, тому обидва ці параметри повинні враховуватись як взаємодоповнюючі критерії хромосомної нестабільності.

SUMMARY. Analysis of chromosome instability (CI) is of great importance in view of pollution of the environment by genotoxic factors. Frequency of aberrant cells, spectrum of chromosome aberrations, damages of aberrant cell and distribution of aberrations in the cells are the most conventional parameters of CI. We have carried out the comparative analysis of the frequency of aberrant cells and the dynamics of aberrant cell damages induced by different mutagenic factors (α -irradiation from ^{241}Am , γ -irradiation from ^{60}Co and tioTEPA) in *Allium*-test. This comparative analysis denotes that the studied parameters have different dynamics characterizing different mechanism of CI in *Allium cepa* L.

РЕЗЮМЕ. В связи с загрязнением окружающей среды генотоксическими факторами важное значение приобретает анализ хромосомной нестабильности (ХН). В качестве параметров ХН наиболее часто используют частоту аберантных клеток, спектр хромосомных aberrаций, поврежденность аберантной клетки и поклеточное распределение aberrаций. Работу проводили с целью сравнительной характеристики частоты клеток с aberrациями и поврежденности аберантной клетки как показателей ХН. В *Allium*-тесте анализировали динамику изменений изучаемых параметров, индуцированных мутагенными факторами различной природы: физических (α -облучение ^{241}Am , γ -облучение ^{60}Co) и химического (тиоТЭФ). Сравнительная характеристика частоты аберантных клеток и поврежденности аберантной клетки свидетельствует о том, что эти параметры имеют различную динамику, характеризуют несколько различные механизмы ХН *Allium cepa* L. Оба этих параметра являются взаимодополняющими критериями ХН.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jackson A.L, Loeb L.A. The mutation rate and cancer // Genetics. — 1998. — 148, № 4. — P. 1483–1490.
2. Барилляк И.Р., Рушковский С.Р. Роль генетической нестабильности в инициации и развитии рака // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — Київ; Луганськ; Харків, 1999. — 4, № 24. — С. 32–46.
3. Орлова Н.Н. Мутационный процесс в семенах лукаватуна *Allium fistulosum* при хранении их в разных условиях : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1967. — 21 с.
4. Бочков Н.П., Яковенко К.Н., Чеботарев А.Н., Фунес Кравицто Ф., Журков В.С. Распределение поврежденных хромосом по клеткам при действии химических мутагенов *in vitro* и *in vivo* у человека // Генетика. — 1972. — 8, № 12. — С. 160–167.
5. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. — М.: Медицина, 1989. — 270 с.

6. Гераськин С.А., Зяблицкая Е.Л., Удалова А.А. Закономерности индукции γ -излучением структурных мутаций в корневой меристеме проростков семян гексаплоидной пшеницы // Радиац. биология. Радиоэкология. — 1995. — 35, № 2. — С. 137–149.
7. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д., Платовская В.И. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. — 2001. — 37, № 4. — С. 549–557.
8. Асташева Н.П., Храмцова Л.К. Закономерности образования aberrаций хромосом в лимфоцитах крупного рогатого скота *in vitro* // Радиац. биология. Радиоэкология. — 2002. — 42, № 3. — С. 251–253.
9. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф., Храпунов С.М. Вплив формальдегіду на рівень хромосомних aberracij у цибулі батун (*Allium fistulosum* L.) // Вісн. Київ. ун-ту. — 1996. — 26. — С. 96–101.
10. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Спирин Е.В. Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиац. биология. Радиоэкология. — 2002. — 42, № 4. — С. 364–368.
11. Малашенко А.М., Бескова Т.Б. Изучение межлинейных различий у мышей по чувствительности к ТиоТЭФ: опыт с рекомбинантными линиями // Генетика. — 1995. — 31, № 7. — С. 965–970.
12. Куцоконь Н.К., Неумержицька Л.В., Барилляк І.Р. Цитогенетична дія тіофосфаміду в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — Київ; Луганськ, 2001. — Вип. 5 (37). — С. 36–40.
13. Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Гродзинский Д.М. Цитогенетические эффекты ^{241}Am в *Allium*-тесте // Радиац. биология. Радиоэкология. — 2002. — 42, № 6. — С. 675–677.
14. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
15. Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике : Метод. пособие. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1974. — 150 с.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
17. Съяксте Т.Г., Съяксте Н.И. Химические соединения, повреждающие ДНК. — Рига : Зинатне, 1991. — 152 с.
18. Митрофанов Ю.П. Индуцированная изменчивость хромосом эукариот. — М.: Наука, 1994. — 140 с.
19. Стрельчук С.И. Основы мутагенеза. — К.: Высш. шк., 1986. — 310 с.
20. Кальченко В.А. Генетические эффекты облучения популяций растений при радиоактивном загрязнении среды : Дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1998.
21. Бездробная Л.К., Цыганок Т.В., Романова Е.П., Тарасенко Л.В., Федорченко В.И. Динамическое исследование цитогенетических эффектов в лимфоцитах крови людей, несанкционированно проживающих в зоне отчуждения ЧАЭС // Генетические последствия чрезвычайных радиац. ситуаций : Тез. докл. Международ. конф. — М., 2002. — С. 17–18.

Надійшла 15.12.02