

УДК 575.224.4

ДИНАМІКА ЗМІН СПЕКТРА АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ, ІНДУКОВАНИХ МІТОМІЦИНОМ С У *ALLIUM SERA L.*

В.М. ШКАРУПА, Л.В. НЕУМЕРЖИЦЬКА, С.В. КЛИМЕНКО, Т.В. СЕМІГЛАЗОВА

ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”
Україна, 04050, Київ, вул. Мельникова, 53
e-mail: Shkarupa_vlad@bigmir.net

*Досліджували особливості спектра аберацій хромосом, індукованих мітоміцином С у клітинах кореневої меристеми *Allium sera L.* Аналізували дозові залежності за критеріями: частка всіх та парних мостів, пошкодженість аберантної клітини, частота мультиаберантних клітин. У спектрі аберацій хромосом, індукованих мутагеном, переважають хроматидні аберації обмінного типу. При збільшенні концентрації мутагену спостерігали зменшення частки всіх мостів порівняно з контролем при зростанні частки парних мостів. Зміни кількості аберацій на аберантну клітину при збільшенні дози мутагену не були такими значними як за критерієм частота аберантних клітин. Дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних клітин спостерігали лише за умов значного мутагенного навантаження.*

*Ключові слова: *Allium sera L.*, мітоміцин С, аберації хромосом.*

Вступ. У цитогенетичних дослідженнях як параметри хромосомної нестабільності зазвичай використовують частоту аберантних клітин чи аберацій хромосом. Але враховуються також такі показники як кількість аберацій на аберантну клітину, типи аберацій та їхнє співвідношення, частота мультиаберантних клітин, особливості розподілу аберацій по клітинах, що значно збільшує інформативність аналізу. Аналіз усієї сукупності даних дає повніше уявлення про характер цитогенетичних пошкоджень. Наявність такої інформації дозволяє встановити залежності частоти аберацій від дози та умов індукованого мутагенезу і перевірити гіпотези стосовно механізмів утворення аберацій хромосом [1].

Метою роботи було проаналізувати особливості та динаміку змін спектра аберацій хромосом, індукованих алкілувальним агентом мітоміцином С у різних концентраціях в клітинах кореневої меристеми *Allium sera L.*

Матеріали і методи

Цитогенетичні ефекти пролонгованої дії (протягом 72 годин) мітоміцину С в діапазоні концентрацій 0,0005 мг/л – 1 мг/л (13 діючих концентрацій) досліджували в клітинах кореневої меристеми проростків насіння *Allium sera L.* Матеріал та методика проведених експериментів описані раніше [2]. Середню кількість аберацій на аберантну клітину (пошкодженість аберантної клітини – ПАК) визначали за відношенням загальної кількості аберацій до кількості аберантних клітин. При обчисленні ПАК всі клітини з множинними невизначеними абераціями та ті, які містили більше 5 аберацій умовно зараховували до класу із шістьма абераціями. Такий підхід, хоч він і занижує рівень кількості аберацій на аберантну клітину, було використано тому, що точна ідентифікація пошкоджень

© В.М. ШКАРУПА, Л.В. НЕУМЕРЖИЦЬКА, С.В. КЛИМЕНКО, Т.В. СЕМІГЛАЗОВА, 2011

в анафазній клітині, як правило, значно ускладнюється зі зростанням кількості аберацій в ній і стає практично неможливою, коли їх більше, ніж 5. До мультиаберагантних клітин (МАК) зараховували клітини, що містили більше 5 аберацій та клітини із множинними невизначеними абераціями. У спектрі аберацій виділяли одиничні та парні мости і фрагменти. Статистичну значущість відмінностей між вибірковими частками оцінювали за допомогою F-критерія.

Результати та обговорення

Мітоміцин С є алкілувальним мутагеном, характерною ознакою дії якого є утворення зшивок ДНК-ДНК внаслідок алкілювання гуанілових залишків ДНК. Серед

кластогенних пошкоджень, індукованих мітоміцином С, спостерігали аберації як хроматидного, так і хромосомного типів – із значним переважанням хроматидних аберацій обмінного типу. У спектрі індукованих мутагеном пошкоджень хромосом виявляли такі морфологічні структури: фрагменти одиничні, фрагменти парні, одиничні мости, парні мости, мости з фрагментами (одиничними чи парними) або без них, мультиаберагантні клітини. Деякі з названих перебудов подано на рис. 1.

Порівняння співвідношення мостів і фрагментів дає можливість отримати певне уявлення про закономірності відповіді клітин *Allium cepa* L. на дію хімічних мута-

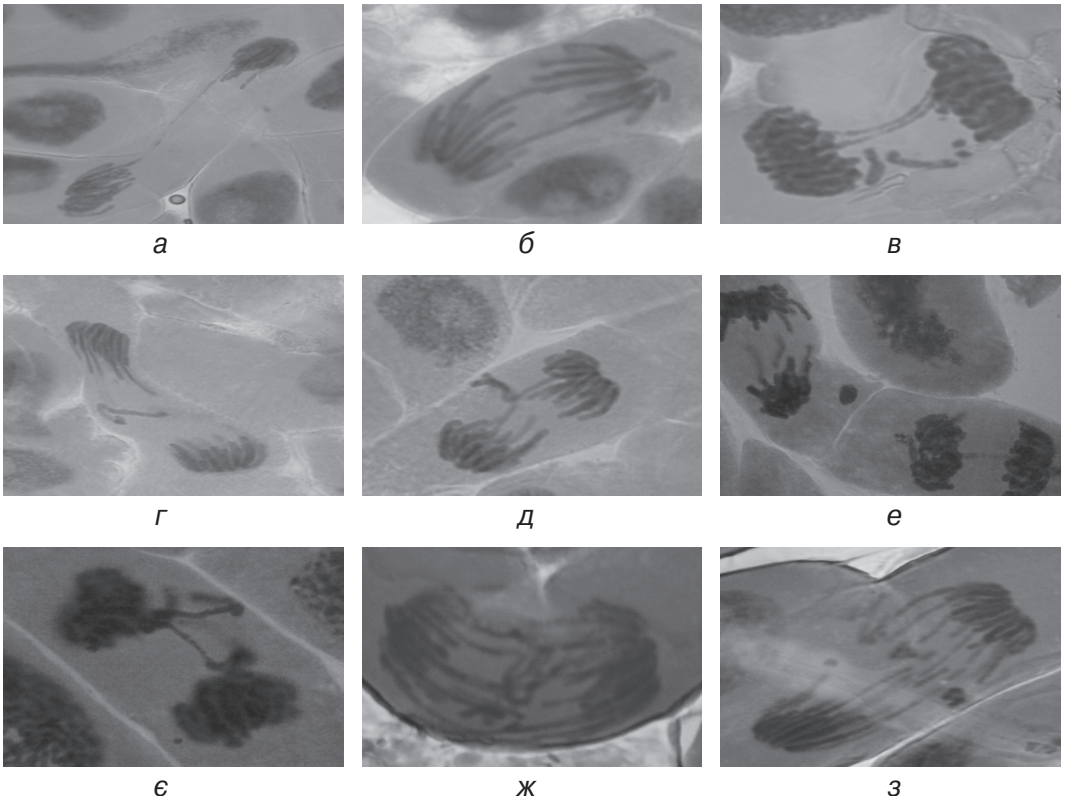


Рис. 1. Типи аберацій хромосом, індукованих мітоміцином С в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.: а, б – одиничні мости; в – парний міст з парними фрагментами та вагрантні хромосоми; г–е – фрагменти; є – невизначені аберації; ж, з – невизначені множинні аберації. Зб. $\times 1000$

генів. У цитогенетичних дослідженнях спонтанного мутагенезу виявлено два основних типи індукції генетичних пошкоджень [3]. Перший з них – пов’язаний з появою первинних розривів, поділяють на два підтипи. *Allium cepa* L. належить до видів, у яких хромосоми чутливі до дії природних хімічних мутагенів на різних фазах клітинного циклу, що призводить до утворення як хроматидних, так і хромосомних перебудов (на відміну від таких об’єктів як *Vicia faba* L. або клітини людини *in vitro*, для яких характерне утворення хроматидних перебудов). Другий тип мутаційного процесу пов’язаний з вторинними механізмами в утворенні перебудов хромосом – процесами злиття центричних та ацентричних фрагментів. У представників роду *Allium* ці процеси відбуваються інтенсивно, внаслідок чого серед аберацій хромосом є значна кількість дицентриків, які утворюються в результаті злиття центричних фрагментів (у інших видів – *Triticum* L., *Vicia faba var minor* L. ці процеси пригнічені, в результаті чого у них переважають

фрагменти). Таке злиття, як було показано, – процес енергозалежний. Оскільки утворення мостів зростало на фоні зниження частоти аберантних клітин, автори розглядали мости як показник інтенсивності репарації [3]. Ця точка зору підтверджується результатами спостережень вікової динаміки утворення мостів при природному старінні насіння батуну за умов γ -опромінення [4].

Динаміку співвідношення мостів та фрагментів залежно від концентрації мутагену наведено на рис. 2. У контролі частота мостів становила 80 % як серед загальної кількості аберацій, так і серед загальної кількості ідентифікованих мостів та фрагментів. При дії мітоміцину С, в цілому, спостерігали тенденцію зменшення частки мостів, порівняно з контролем. У контролі співвідношення фрагменти/мости 1:4. При дії мутагену в найменшій концентрації воно змінюється до 1:3. Разом з тим, привертає увагу збільшення частки мостів (86,8 %) при подальшому зростанні концентрації 0,001 мг/л. Саме в цьому діапа-

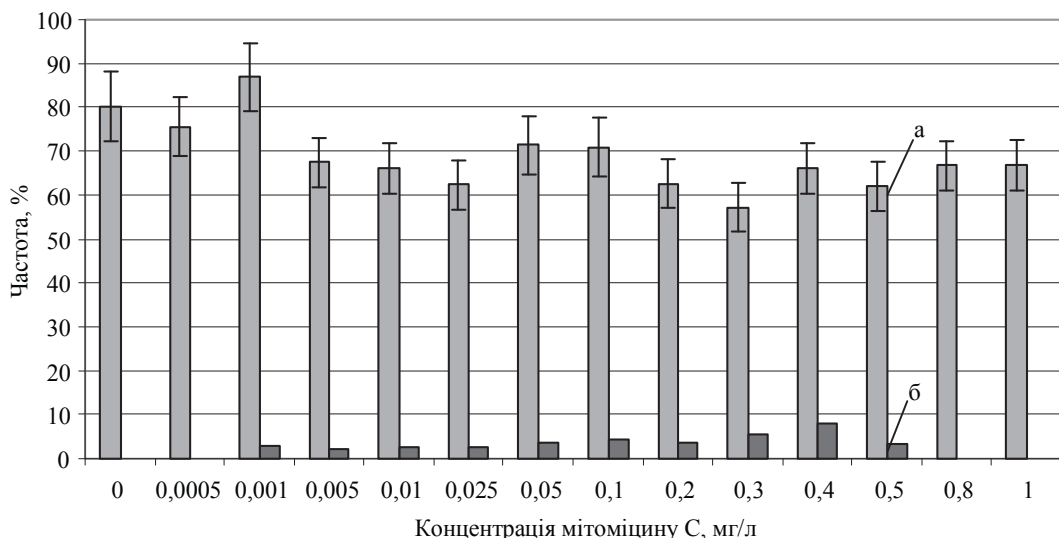


Рис. 2. Динаміка співвідношення мостів та фрагментів у спектрі аберацій хромосом у клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. залежно від концентрації мітоміцину С: а – частка мостів (від загальної кількості мостів і фрагментів); б – частка парних мостів (від загальної кількості мостів)

зоні концентрацій відбувається зміна характеру концентраційної залежності за критеріями частота аберантних ана-телофаз (ЧАА) та кількість аберацій/100 клітин, особливістю якої є зменшення мутагенної ефективності. При подальшому зростанні концентрації мітоміцину С співвідношення мости/фрагменти коливається в межах 1:1,3 – 1:2,5.

Динаміку співвідношення парних та одиничних мостів залежно від концентрації мутагену наведено на рис. 2. Амплітуди коливань значень частки парних та всіх ідентифікованих мостів відрізнялись. Спостерігали тенденцію збільшення частки хромосомних дицентриків при збільшенні концентрації мутагену (крім дії трьох найвищих концентрацій).

У контролі та при дії мутагену в найменшій концентрації не виявлено парних мостів. При подальшому збільшенні концентрації мітоміцину С до 0,4 мг/л, частка парних мостів коливалась у межах 2,2 % – 8,1 %. При 0,5 мг/л вона зменшувалась до 3,2 %, а при дії найвищих концентрацій (0,8 мг/л та 1 мг/л) парні мости були відсутні. Аберації хромосомного типу (парні мости та фрагменти) – результат нерепарованих пошкоджень хромосом, які відбулись у G1 періоді мітотичного циклу. При анафазному методі не завжди вдається розрізнити парні фрагменти від одиничних, але мости хромосомного типу досить чітко відрізняються від мостів хроматидного типу. Це дозволяє думати про те, в якому періоді інтерфази відбувається пошкодження хромосом. Крім того, парні мости можна опосередковано розглядати як показник інтенсивності дореplikативної репарації ДНК [4].

Варто зазначити, що цитогенетичні критерії: частота аберантних клітин, частота аберацій на аберантну клітину, частота МАК, будучи параметрами хромосомної нестабільності, характеризують дещо різні її сторони. Деякі мутагени здатні сильніше

впливати на частоту клітин з абераціями, в той час як інші здатні індукувати нові пошкодження у вже пошкоджених клітинах [5, 6]. За даними літератури, зростання частоти аберантних клітин не завжди супроводжується аналогічними змінами середньої кількості аберацій на аберантну клітину; і – навпаки, при майже незмінних значеннях частоти аберантних клітин може спостерігатися зростання кількості аберацій на аберантну клітину [5, 7, 8]. В інших роботах зазначалось, що підвищення частоти клітин з абераціями, індуковане γ -опроміненням та тіофосфамідом, супроводжується зростанням кількості аберацій хромосом на клітину [9, 10]. Все це може свідчити про існування різних механізмів, шляхів реалізації геномної нестабільності на хромосомному рівні при дії мутагенних чинників різних типів. В табл. наведено дані щодо динаміки змін ПАК та частоти МАК при дії мітоміцину С.

Спостерігали зростання ПАК із збільшенням концентрації мутагену, яка досягає свого максимального значення (3,08) при концентрації 0,5 мг/л. Динаміка змін ПАК при збільшенні концентрації мутагену, аналогічна динаміці змін ЧАА лише в діапазоні до виходу кривої на плато. Привертає увагу те, що в діапазоні низьких концентрацій мутагену, як і для критерію ЧАА спостерігали зміну характеру дозової залежності ПАК. В контролі та при дії двох найменших концентрацій мітоміцину С (0,0005 мг/л та 0,001 мг/л) МАК не виявлено. У діапазоні концентрацій мутагену 0,005 мг/л – 0,05 мг/л частота появи МАК не має дозозалежного характеру (2,1 % – 3,0 %). Лише за умов значного мутагенного навантаження в діапазоні з 0,1 мг/л (5,5 % МАК) до 0,5 мг/л (15,4 % МАК) відбувається дозозалежне зростання частки МАК. При дії найвищих концентрацій мутагену (0,8 мг/л та 1 мг/л) МАК клітин не спостерігали, що і обумовлює зменшення ПАК в цьому діапазоні. Це може бути обумовлено значною

Таблиця. Порівняльна динаміка цитогенетичних показників у клітинах *Allium sera* L. при дії мітоміцину С

Концентрація, мг/л	Частота аберантних анателофаз, %	Пошкодженість аберантної клітини, абераций/ аберантну клітину	Частота мультиаберантних клітин, %
0	1,28±0,34	1,21	0
0,0005	3,37±0,45*	1,31	0
0,001	5,39±0,65*	1,24	0
0,005	11,12±0,78*	1,35	2,20±1,09
0,01	15,73±1,02*	1,38	2,99±1,20
0,025	21,99±1,08*	1,44	2,80±0,92
0,05	40,59±1,70*	1,69	2,08±0,59
0,1	62,35±1,67*	2,19	5,52±1,00
0,2	92,09±0,93*	2,78	8,39±1,00
0,3	86,42±1,90*	2,72	14,64±2,11
0,4	88,20±2,43*	2,77	15,29±2,87
0,5	90,70±4,43*	3,08	15,38±5,78
0,8	85,71±7,63*	2,22	0
1	84,62±10,0*	2,18	0

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

затримкою мітозу сильно пошкоджених клітин та збільшенням цитотоксичності при дії цих концентрацій препарату.

Висновки

У спектрі абераций хромосом, індукованих мітоміцином С, переважають хроматидні аберації обмінного типу. При зростанні концентрації мутагену зменшується частка всіх мостів порівняно з контролем при збільшенні частки парних мостів. Зміни кількості абераций на аберантну клітину із збільшенням концентрації мітоміцину С не були такими значними, як за критерієм частота аберантних клітин. Характерною особливістю цитогенетичної дії мітоміцину є індуція мультиаберантних клітин. Проте дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних клітин спостерігається лише за умов значного мутагенного навантаження.

Перелік літератури

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 270 с.
2. Шкарупа В.М., Бариляк І.Р. Залежність концентрація – кластогенний ефект при дії мітоміцину С на клітини апікальної меристеми *Allium sera* L. // Вісник УТГіС. – 2006. – Т.4, № 2. – С.181–187.
3. Дубинин Н.П., Руднева С.В., Щербаков В.К. Специфическая модификация спектра структурных мутаций хромосом, возникающих при естественном мутировании // Генетика. – 1967. – № 9. – С.35–39.
4. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Динамика хромосомной нестабильности батуна (*Allium fistulosum* L.): гамма-облучение семян разного срока хранения // Цитология и генетика. – 2006. – №4. – С.31–36.
5. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. и др. Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 4. – С. 364–368.
6. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф., Храпунов С.М. Зміни рівня хромосомних абераций у батуна, пов'язані зі старінням насіння // Міжнародний симп. «Біологічні механізми старіння». – Харків. – 1996. – С.88.
7. Лазаренко Л.М. Цитогенетична оцінка мутабельності *Allium fistulosum* L. (Liliaceae, Magnoliophyta) при старінні насіння: дис. ... канд. біол. наук: 14.03.09. – Київ, 1999 – 120 с.
8. Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М. Кількість абераций на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабильності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитология и генетика. – 2003. – № 4. – С. 20–25.
9. Асташева Н.П., Храпцова Л.К. Закономерности образования абераций хромосом в лимфоцитах крупного рогатого скота *in vitro* / Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 3. – С. 251–253.
10. Малашенко А.М., Бескова Т.Б. Изучение межлинейных различий у мышей по чувствительности к ТiоТЭФ: опыт с рекомбинантными линиями // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 7. – С. 965–970.

Представлено Л.Л. Лукаш
Надійшла 14.06.2010

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА
АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ,
ИНДУЦИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С
У *ALLIUM CEPA* L.

В.Н. Шкарупа, Л.В. Неумержицкая,
С.В. Клименко, Т.В. Семиглазова

ГУ "Научный центр радиационной медицины АМН
Украины"
Украина, 04050, Киев, ул. Мельникова, 53,
e-mail: Shkarupa_vlad@bigmir.net

Исследовали особенности спектра абераций хромосом, индуцированных митомицином С в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L. Анализировали дозовые зависимости по критериям: доля всех и парных мостов, поврежденность аберрантной клетки, частота мультиаберрантных клеток. В спектре абераций хромосом, индуцированных мутагеном, преобладают хроматидные аберации обменного типа. При увеличении концентрации мутагена наблюдается уменьшение доли всех мостов в сравнении с контролем при увеличении доли парных мостов. Изменения количества абераций на аберрантную клетку при увеличении дозы мутагена не были такими значительными, как по критерию частота аберрантных клеток. Дозозависимое увеличение частоты мультиаберрантных клеток наблюдается только при условии значительной мутагенной нагрузки.

Ключевые слова: *Allium cepa* L., митомицин С, аберации хромосом.

DYNAMICS OF CHANGES IN CHROMOSOME
ABERRATION SPECTRUM INDUCED BY MY-
TOMICIN C IN *ALLIUM CEPA* L.

V.M. Shkarupa, L.V. Neumergitskaya, S.V. Klymenko, T.V. Semiglazova

CI "Research Centre for Radiation Medicine,
Academy of Medical Sciences of Ukraine"
Ukraine, 04050, Kyiv, Melnikova St., 53
e-mail: Shkarupa_vlad@bigmir.net

Features of chromosome aberration spectrum induced by mytomicin C in cells root meristem of *Allium cepa* L. have been investigated. Dose response were analyzed according criterion a share of all and double bridges, quantity of aberrations per aberrant cell, frequency of multiaberrant cells. In the chromosome aberration spectrum induced by mutagen prevail chromatide aberrations of exchange type. With the increasing of concentration of mutagens reduction of a share of all bridges in comparison with the control over increase in a share of double bridges is observed. Changes of quantity of aberrations per aberrant cell with increasing a doze of mutagen were not so much significant, as on criterion of frequency of aberrant cells. Doze dependences of the increase in frequency of multiaberrant cells is observed only under condition of significant mutagen loading.

Key words: *Allium cepa* L., mytomicin C, aberrations of chromosomes.