

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ
ЕСТЕСТВЕННЫХ МОДИФИКАТОРОВ МУТАГЕНЕЗА
В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА.
ДЕЙСТВИЕ АМИНОБЕНЗАМИДА ПРИ ИНДУКЦИИ АБЕРРАЦИЙ
ХРОМОСОМ ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ**

Исследована сенсбилизация аминокбензамидом цитогенетической активности регулятора роста растений — гибберелловой кислоты в культуре лимфоцитов человека. Показано двух-трехкратное повышение уровня хромосомных aberrаций, индуцируемых гибберелловой кислотой, независимо от времени введения в культуру аминокбензамида.

Введение. Одним из направлений модификации химического мутагенеза является исследование соединений, повышающих чувствительность клеток к мутагенам.

Изучение подобных веществ, усиливающих эффект мутагенов в лимфоцитах человека, дает возможность получения дополнительных количественных параметров действия соединений, проявляющих слабый мутагенный эффект.

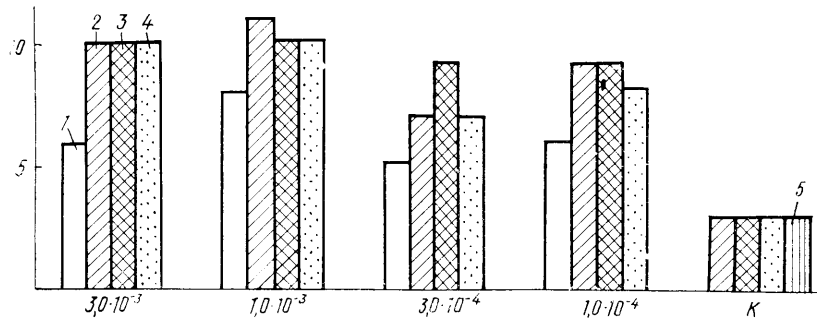
Ранее нами было проведено исследование сенсбилизующего действия кофенна в культуре лимфоцитов, обработанных регулятором роста растений — гибберелловой кислотой (ГК) [1]. В настоящей работе изучен модифицирующий эффект аминокбензамида (АБ) на индукцию хромосомных aberrаций гибберелловой кислотой, проявившей себя в качестве слабого мутагенного соединения в лимфоцитах человека [2].

Материал и метод. Использовали кровь клинически здоровых доноров в возрасте до 35 лет, культивирование которой проводили по общепринятой методике [3] в течение 76 ч. За 28 ч до фиксации в культуру вводили различные концентрации ГК (от $3,0 \cdot 10^{-3}$ до $1,0 \cdot 10^{-4}$ М). В качестве модификатора действия ГК использовали ингибитор репарации ДНК — аминокбензамид. Исследовали две его концентрации — 1 и 10 мМ. В культуру АБ вводили в три срока: на 29-м, 46-м и 72-м часу культивирования. Анализировали aberrации хромосом, индуцируемые ГК и АБ в клетках I и II митозов (M_1 и M_2), а также проводили учет сестринских хроматидных обменов (СХО). Для этого на 28-м часу культивирования культуру лимфоцитов обрабатывали бромдезоксинуридином в концентрации 10 мМ. Дифференциальную окраску препаратов проводили по методике Чеботарева и соавт. [4]. Статистический анализ результатов проводили по критерию χ^2 .

Результаты исследований и их обсуждение. Введение аминокбензамида в культуру лимфоцитов, обработанных различными концентрациями ГК, приводит к повышению уровня как aberrантных метафаз (АМ), так и общего числа разрывов на 100 клеток (таблица). Выявлено, что введение АБ в культуру лимфоцитов на всех трех сроках культивирования четко повышает aberrации хромосом, индуцируемые ГК. При этом для концентрации АБ в 10 мМ это повышение статистически достоверно при действии всех концентраций ГК. Так, самая высокая концентрация ГК ($3,0 \cdot 10^{-3}$ М) вызывает 4,0 % aberrантных метафаз. С введением АБ в культуру лимфоцитов на всех сроках культивирования увеличивается в 2—3 раза доля aberrантных метафаз (12,0; 9,0; 12,68 %). При этом выявлено также повышение общего числа разрывов на 100 клеток в вариантах ГК+АБ (соответственно от 4, 66 до 15, 0; 10,0; 13,66 %). Введение же только АБ в культуру лимфоцитов на всех трех сроках — 29, 46, 72 ч культивирования) не вызывает достоверного возрастания общего числа разрывов и aberrантных метафаз по сравнению с контролем.

с Г. Г. ЗАЛИНЯН, Р. М. АРУТЮНЯН, Г. Г. САРКИСЯН, 1990

На рисунке приведены результаты анализа aberrаций хромосом при обработке культуры лимфоцитов ГК с введением АБ в концентрации 1 мМ. При совместном действии ГК с АБ концентрации 1 мМ не всегда прослеживается достоверное повышение как aberrантных метафаз, так и общего числа разрывов. Так, две концентрации ГК ($3,0 \times 10^{-3}$ и $1,0 \cdot 10^{-3}$ М) вызывают соответственно 5,0 и 7,0 % АМ, в вариантах ГК+АБ частота АМ возрастает соответственно до 8 и 10 %. Про-



Модифицирующий эффект 3-аминобензамида (1 мМ) при индукции хромосомных aberrаций гибберелловой кислотой:

по вертикали — проц. aberrантных метафаз; по горизонтали — концентрация ГК; 1 — ГК; 2 — ГК+АБ 29 ч; 3 — ГК+АБ 46 ч; 4 — ГК+АБ 72 ч; 5 — контроль

исходит также повышение общего числа разрывов от 6 до 10 % и соответственно от 8 до 11 % при тех же концентрациях ГК. Относительно схожая картина наблюдается и при остальных двух концентрациях ГК ($3,0 \cdot 10^{-4}$ и $1,0 \cdot 10^{-4}$ М). Однако при этих концентрациях не получено статистически достоверного отличия результатов в вариантах ГК+АБ от вариантов, обработанных только ГК.

Результаты анализа aberrаций хромосом при обработке культуры лимфоцитов гибберелловой кислотой и 3-аминобензамидом (10 мМ)

Концентрация ГК, М	Количество просмотренных клеток	Клетки $M_1 + M_2$		Количество просмотренных клеток M_1	Клетки M_1		Количество просмотренных клеток M_2	Клетки M_2	
		Aberrантные метафазы, %	Общее число разрывов		Aberrантные метафазы, %	Общее число разрывов		Aberrантные метафазы, %	Общее число разрывов
$3,0 \cdot 10^{-3}$	150	4,0	4,66	115	4,35	5,22	35	2,86	2,86
+АБ (29 ч)	100	12,0	15,0	63	9,53	12,7	37	16,22	18,62
+АБ (46 ч)	100	9,0	10,0	80	8,75	8,75	20	10,0	15,0
+АБ (72 ч)	205	12,68	13,66	190	12,10	18,16	15	20,0	20,0
$1,0 \cdot 10^{-3}$	200	3,0	3,0	135	3,70	3,70	65	1,54	1,54
+АБ (29 ч)	100	9,0	11,0	59	8,47	11,86	41	9,76	9,76
+АБ (46 ч)	235	10,21	10,21	209	11,48	11,48	226	0	0
+АБ (72 ч)	230	10,43	10,87	132	12,88	13,64	98	7,14	7,14
$3,0 \cdot 10^{-4}$	175	4,0	4,0	125	4,0	4,0	50	4,0	4,0
+АБ (29 ч)	100	11,0	13,0	60	10,0	11,66	40	12,50	15,0
+АБ (46 ч)	115	12,17	12,17	90	15,55	15,55	25	0	0
+АБ (72 ч)	200	9,50	9,50	119	15,13	15,13	81	3,70	3,70
$1,0 \cdot 10^{-4}$	115	2,61	2,61	75	4,0	4,0	40	0	0
+АБ (29 ч)	100	9,0	9,0	80	8,75	8,75	20	10,0	15,0
+АБ (46 ч)	230	10,87	11,74	172	12,79	13,37	58	5,17	6,90
+АБ (72 ч)	140	10,0	10,0	70	12,86	12,86	70	7,14	7,14
АБ (29 ч)	100	3,0	3,0	82	3,66	3,66	18	0	0
АБ (46 ч)	200	2,5	3,0	175	2,86	3,43	25	0	0
АБ (72 ч)	180	2,78	2,78	142	2,82	2,82	38	2,63	2,63
Контроль	100	2,0	2,0	52	3,85	3,85	48	0	0

Было проведено и отдельное исследование цитогенетического эффекта в клетках, прошедших одно и два деления за счет дифференциального окрашивания хроматид.

Полученные результаты исследования АБ на цитогенетический эффект ГК в клетках, прошедших первый митоз (M_1), выявили, что с добавлением АБ в концентрации 1 мМ наблюдается в основном повышение частоты aberrантных метафаз и общего числа разрывов. В то же время при добавлении АБ в концентрации 10 мМ во всех вариантах $GK+AB$ в клетках M_1 наблюдается четкое повышение частоты АМ и общего числа разрывов. В клетках же, прошедших оба митоза (M_2), не обнаруживается однозначной картины модификации. Поэтому делать определенные выводы об усилении эффекта ГК в клетках, прошедших два митоза (M_2), не представляется возможным.

Исследование динамики числа СХО на клетку в вариантах, обработанных $GK+AB$, не выявило статистически четкого повышения СХО по сравнению с вариантами, в которые вводили только ГК. Во всех вариантах эксперимента показано повышение СХО на клетку по сравнению с контролем.

Показанный сенситизирующий эффект АБ при действии ГК, очевидно, имеет иную модифицирующую природу, чем при действии кофеина. Кофеин сильнее модифицировал на стадии G_2 , чем S, уровни aberrации хромосом, индуцированных алкилирующими агентами [5, 6].

Имеются данные литературы о том, что АБ проявляет свое действие за счет ингибирования поли(АДФ-рибозо/полимеразы). В работах некоторых авторов [7] не выявлено модификации эффекта рентгеновского облучения на стадии G_0 введением АБ. Авторы приводят данные о том, что АБ резко повышает уровни aberrаций хромосом после облучения на стадии G_1 , S и G_2 .

Данные об отсутствии эффекта АБ на стадии G_0 подтверждаются в работе Мак Ларена и Легатора [8].

Результаты свидетельствуют о том, что у больных с синдромом Дауна поли(АДП)рибоза может играть более значительную роль в репарации ДНК, чем в лимфоцитах здоровых лиц. Авторы объясняют это тем, что у больных с синдромом Дауна поли(АДП)рибоза не может, по-видимому, быть вовлечена в репарацию поврежденных ДНК, что приводит к формированию хромосомных aberrаций в стадии G_0 клеточного цикла.

Выводы. Проведенное исследование модифицирующего эффекта АБ на цитогенетическое действие ГК выявило, что концентрация АБ в 10 мМ при всех исследуемых концентрациях ГК повышает уровни как хромосомных aberrации, так и общего числа разрывов на всех трех сроках его введения.

При введении АБ в концентрации 1 мМ только при двух концентрациях ГК ($3,0 \cdot 10^{-3}$ и $1,0 \cdot 10^{-3}$ М) наблюдается достоверное повышение уровней хромосомных aberrаций. При остальных же концентрациях ГК четкого статистически достоверного повышения уровней хромосомных aberrаций и общего числа разрывов с добавлением АБ (1 мМ) не выявлено. Добавление же только АБ (1 и 10 мМ) в культуру лимфоцитов не вызывает достоверного повышения aberrаций хромосом по сравнению с контролем.

На основании полученных данных можно определить, что в отличие от кофеина, повышающего частоту хромосомных aberrаций и общего числа разрыва в 4–5 раз, АБ является менее сильным модификатором цитогенетического действия слабого мутагенного соединения — ГК.

SUMMARY. The 3-aminobenzamide-sensibilization of the cytogenetic activity of gibberellic acid in the culture of human lymphocytes has been investigated. Two-three-fold increase of the chromosome aberrations induced by gibberellic acid, irrespective of the time of 3-aminobenzamide addition to the cultures (the 28th, 46th, 72th hrs of the cultivation) is shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян Р. М., Залинян Г. Г. Цитогенетический эффект естественных модификаторов мутагенеза в культуре лимфоцитов человека. Действие кофеина при индукции aberrаций хромосом гибберелловой кислотой // Цитология и генетика.— 1987.— 21, № 2.— С. 101—105.
2. Залинян Г. Г., Мартиросян А. В. Цитогенетическая активность некоторых регуляторов роста растений в клетках человека // Биол. журн. Армении.— 1987.— 40, № 8.— С. 694.
3. Hungerford D. A. Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosome by treatment with KCl // Stain Technol.— 1965.— 30.— P. 333—338.
4. Чеботарев А. Н., Селезнева Т. Г., Платонова В. И. Модифицированный метод дифференциальной окраски сестринских хроматид // Бюл. экперим. биологии и медицины.— 1977.— 85, № 2.— С. 242—243.
5. Influence of caffeine and 3-aminobenzamide in G_2 on the frequency of chromosomal aberrations induced by thiotepa, mitomycin C and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in human lymphocytes / K. Hansson, B. A. Kihlman, C. Tanzarella, F. Palitti // Mutat. Res.— 1984.— 126.— P. 251—258.
6. Kihlman V. A., Hansson K., Andersson H. C. The effects of posttreatment with caffeine during S and G_2 on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root-tips of *Vicia faba* and in human lymphocytes in vitro // Mutat. Res.— 1982.— 104, N 4/5.— P. 323—330.
7. 3-aminobenzamide does not affect X-ray-induced cytogenetic damage in G_0 human lymphocytes / G. E. Pantelias, G. Politis, C. D. Sabani et al. // Mutat. Res.— 1986.— 174.— P. 121—124.
8. MacLaren R. A., Au W. W., Legator M. S. 3-aminobenzamide enhances X-ray induction of chromosome aberrations in Down syndrome lymphocytes. / Abst. Int. symp. of ADP-ribosylation, 1989.— P. 81.