

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ

УДК 575.224.4 / 575.224.6

ДАЛИВЕЛЯ Ольга Вячеславовна

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОИЗОНКОТИНОВОЙ
КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ РЕПАРАЦИИ ПРИ ХИМИЧЕСКОМ
МУТАГЕНЕЗЕ У *Drosophila melanogaster***

03.00.15 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск – 2000

Работа выполнена в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси

Научный руководитель: *доктор биологических наук
Кужир Т.Д.*

Официальные оппоненты: *доктор биологических наук,
профессор Моссэ И.Б.*

*кандидат биологических наук,
доцент Кукушкина Л.М.*

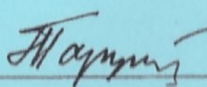
Оппонирующая организация: *НИИ наследственных и врож-
денных заболеваний МЗ РБ*

Защита состоится « ____ » _____ 2001 г. в ____ часов на
заседании Совета по защите диссертаций Д 01.31.01 в Институте генетики и
цитологии НАН Беларуси по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.
Тел.: 284-18-56

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке
им. Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2000 г.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций,
Кандидат биологических наук



Л.А. Тарутина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. В условиях интенсивной химизации биосферы заслуживает пристального внимания проблема охраны наследственности человека, так же как и генофондов других видов. Наиболее радикальной, безопасной и, безусловно, необходимой мерой является удаление химических мутагенов из окружающей среды, что находится в непосредственной зависимости от успехов генетической токсикологии и наличия новых безотходных технологий. Другой возможный путь снижения генетического риска от воздействия химических агентов – разработка способов и средств нейтрализации мутагенности средовых факторов, что предполагает расширение исследований в области антимутагенеза. Антимутагенез как биологический процесс характеризуется снижением уровня спонтанных и индуцированных мутаций с помощью эволюционно сложившихся механизмов и систем, действующих на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Антимутагенез можно рассматривать также как комплекс мер генетической безопасности, включающих поиск, изучение и внедрение антимутагенов. Эта область исследований интенсивно развивается во всем мире.

Основное внимание сосредоточено на естественных антимутагенах, способствующих выведению мутагенов из организма, либо влияющих на метаболическую активацию промутагенов / проканцерогенов [De Flora, 1987; Ferguson, 1994, 1996; Stavrĭc, 1994]. Антимутагены с таким механизмом действия можно отнести к профилактическим средствам, прежде всего предупреждающим канцерогенез и другую патологию, обусловленную мутационной компонентой. Не менее важно подавление мутационного процесса за счет увеличения точности репликации и репарации ДНК. Исследования этой проблемы начаты в 80-х годах [Рапопорт и др., 1979] и проводятся в основном в системах *in vitro*. С практической точки зрения репарогены уникальны, так как могут применяться уже после мутагенного воздействия и идентификации мутагенного фактора. Этот механизм действия антимутагенов почти не изучен в половых клетках, хотя в этом случае защита наблюдается не только у данного организма, но и у его потомства.

Развитая химическая промышленность и интенсивное загрязнение среды повышает актуальность для Беларуси исследований по химическому мутагенезу и антимутагенезу, особенно в области выявления новых механизмов действия антимутагенов на организменном уровне, связанных с естественным защитным процессом – репарацией ДНК.

Связь работы с крупными научными программами и темами. Работа выполнена в лаборатории антимутагенеза Института генетики и цитологии НАН Беларуси в рамках следующих тем: "Изучение закономерностей модифицирующего действия антимутагенов при различных мутагенных воздействиях на дрозофиле и мышах" (№ гос. регистрации 01860021735); "Изучение закономерностей и механизмов подавления антимутагенами химического мутагенеза в половых и соматических клетках

высших организмов" (№ гос. регистрации 0109010213); "Изучение антимутагенной активности некоторых антиоксидантов при химическом мутагенезе у дрозофилы и мышей" (№ гос. регистрации 1998161); "Изучение влияния биологически активных веществ новых производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты на функционирование репарационных систем животных". Перечисленные темы координировались государственными программами "Флора и Фауна", "Биологическое разнообразие", "Функционирование биосистем", а также входили в международную программу ЮНЕСКО "Человек и биосфера".

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследовать влияние производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты глутапирона (ГП) и 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридина (ДГП) на химический мутагенез и репарационные процессы в половых клетках *Drosophila melanogaster*. В соответствии с целью исследований были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности химического мутагенеза и кластогенеза у *Drosophila melanogaster* под влиянием алкилирующего агента этилметансульфоната (ЭМС);
2. Идентифицировать аддукты и пути репарации ДНК, участвующие в формировании ЭМС-индуцированных разрывов хромосом.
3. Изучить влияние производных 1,4-ДГИНК на частоту ЭМС-индуцированных мутаций разного типа у самцов дрозофилы. Проанализировать чувствительность к антимутагенам их половых клеток в зависимости от стадий развития организма и сперматогенеза.
4. Изучить влияние производных 1,4-ДГИНК на процессы материнской репарации химически индуцированных повреждений ДНК, ответственных за возникновение разрывов хромосом и точковых мутаций.
5. Проанализировать чувствительность мужских и женских половых клеток к действию антимутагенов в зависимости от их репарационной способности, используя линии, дефектные по системам эксцизионной и пострепликативной репарации.

Объект и предмет исследования. Основной объект исследований – *Drosophila melanogaster*. В соответствии с поставленными задачами использовались различные линии дрозофилы, в том числе мутанты, дефектные по системам эксцизионной (*mei-9*) и пострепликативной (*mei-41*) репарации. Предмет исследования – антимутагены как средства, снижающие частоту мутаций; мутационный процесс и репарация ДНК.

Методология и методы проведенного исследования. Методология исследования основана на таких общебиологических явлениях, как материнский эффект, эффект хранения, зависимость метаболической и репарационной активности клеток от стадий сперматогенеза или развития организма.

В половых клетках дрозофилы учитывали разрывы хромосом, вызывающие летальность потомков в онтогенезе и потери половых хромосом (ППХ), а также рецессивные сцепленные с полом летальные мутации (РСПЛМ).

Научная новизна и значимость полученных результатов:

1. Обнаружен эффект хранения по частоте ЭМС-индуцированных летальных (ЭЛ ПЛ, ПЭЛ) и нелетальных (ППХ) разрывов хромосом, что указывает на идентичность молекулярных механизмов их образования.
2. Установлена зависимость кластогенности ЭМС от продукции 7-этилгуанина и AP-сайтов, а также противоположное влияние материнских систем эксцизионной и пострепликативной репарации на формирование ЭМС-индуцированных разрывов.
3. Показано, что эффективность изученных антимуутагенов зависит от стадии развития организма: чувствительность к антимуутагенам существенно повышается на личиночной стадии, где наиболее активно протекают все метаболические процессы.
4. Установлено, что у взрослых особей защитное действие производных 1,4-ДГИНК при химическом мутагенезе опосредовано материнскими системами репарации и проявляется на премейотических стадиях сперматогенеза в связи с активизацией репарационных процессов.
5. Обнаружено, что нарушения репарационных систем снижают чувствительность организма и его половых клеток к защитному действию изученных антимуутагенов.

Полученные результаты вносят вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах модификации химического мутагенеза под влиянием антимуутагенов. Высокой степенью новизны обладают результаты о влиянии изученных антимуутагенов на репарационные системы, что дает возможность подавлять химический мутагенез на его завершающем этапе после формирования аддуктов ДНК. Выявление связи между защитным действием производных 1,4-ДГИНК и репарацией ДНК в половых клетках позволяет ожидать положительного эффекта не только у данного индивидуума, но и у его потомства.

Практическая значимость полученных результатов:

1. Установлена повышенная чувствительность к антимуутагенному действию изученных препаратов личиночной стадии развития дрозофилы, что имеет большое значение для организации скрининга антимуутагенов.
2. Установлена приоритетность опосредованных механизмов действия изученных производных 1,4-ДГИНК при химическом мутагенезе, что повышает перспективность их изучения и испытания в других тест-системах в качестве индукторов и регуляторов защитных систем организма.
3. Показано, что производные 1,4-ДГИНК способны модулировать репарацию в половых клетках, что расширяет спектр их полезного действия и послужит основой для дальнейшей разработки рекомендаций по их применению при угрозе генетического риска в экологически неблагоприятной обстановке.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Закономерности становления разрывов хромосом и точковых мутаций под влиянием алкилирующего агента ЭМС определяются аддуктами и путями репарации ДНК. Динамика накопления разрывов хромосом соответствует скорости депуринизации ДНК в результате утраты 7-этилгуанина. Пострепликативная репарация может вносить вклад в ЭМС-кластогенез.

2. Модифицирующие эффекты производных 1,4-ДГИНК при обработке ими репарационно-активных самцов зависят от стадий сперматогенеза и развития организма. Обработка сперматозоидов не приводит к снижению частоты ЭМС-индуцированных точковых и хромосомных мутаций. Защитные эффекты устойчиво проявляются при обработке модификаторами личинок и премеитических половых клеток взрослых особей. Нарушения репарации ДНК снижают чувствительность к антимутагенам как личинок, так и премеитических стадий сперматогенеза.
3. Производные 1,4-ДГИНК проявляют выраженные защитные эффекты при обработке репарационно-активных самок, снижая частоту точковых мутаций и разрывов хромосом, индуцированных ЭМС у самцов. Дефекты эксцизионной и пострепликативной репарации в ооцитах препятствуют проявлению защитного действия модификаторов, что указывает на его связь с материнскими системами репарации.

Личный вклад соискателя. Экспериментальный материал получен совместно с руководителем данной работы д.б.н. Т.Д. Кужир. В некоторых исследованиях принимала участие м.н.с. Н.В. Савина. Все данные описаны, проанализированы, обсуждены и оформлены автором самостоятельно. Для статистического анализа результатов использован пакет прикладных программ АВ-STAT, а также специальные программы для персонального компьютера, созданные к.б.н. Б.Ю. Аношенко.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации представлялись на конференциях «Некоторые актуальные вопросы современной биологии» (Ярославль, 1990), «Генетика и селекция на рубеже XXI века» (Минск, 1999), "Биоантиоксидант" (Москва, 1992), "Современные проблемы генетики и селекции" (Минск, 1995); VI Всесоюзном совещании по проблемам биологии и генетики дрозофилы (Одесса, 1989); на заседании Секции генетических аспектов проблемы "Человек и биосфера" (Самарканд, 1990); научно-практической конференции стран Балтии и СНГ по проблемам антимутагенеза (Минск, 1993); на съездах ВОГИС и БОГИС (Минск, 1992; Горки, 1992, 1997); IV и VII международных конференциях по механизмам антимутагенеза и антиканцерогенеза (Канада, 1994; США, 2000); на 30 Ежегодной конференции по мутагенам окружающей среды (Будапешт, 2000).

Опубликованность результатов. Результаты исследований опубликованы в 9 статьях, а также материалах международных и республиканских конференций (тезисы 16 докладов). Всего по теме диссертации опубликовано 24 работы, общее количество страниц – 76,5.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав, заключения и списка использованных источников. Полный объем диссертации 132 стр., рисунков 17, таблиц 28, список использованных источников насчитывает 237 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОПИСАНИЕ МАТЕРИАЛОВ И МЕТОДОВ РАБОТЫ

В качестве модификаторов мутационного процесса использовались производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК), представители класса 1,4-

дигидропиридинов 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридин (ДГП) и динатриевая соль 2-(2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксамидо)-глутаровой кислоты (глутапирон, ГП), синтезированные в Латвийском институте органического синтеза под руководством академика Г.Я. Дубура. Модельным мутагеном служил этилметансульфонат (ЭМС) производства Sigma (CAS № 62-50-0).

Все опыты выполнены на *Drosophila melanogaster* с применением линий, имеющих дефекты в системах эксцизионной и пострепликативной репарации. Воздействию модификаторов подвергали самцов на стадиях личинок и имаго, а также самок. Взрослых особей кормили растворами препаратов в течение 2-х сут, тогда как личинки выращивались на питательной среде, содержащей модификаторы. Мутагеном обрабатывали только взрослых самцов путем кормления [Lewis, Baker, 1967]. Экспозиционная доза зависела от концентрации ЭМС (6–25 мМ) и продолжительности его воздействия (10–36 ч).

В соответствии с поставленными задачами, наряду с различными способами обработки, использовали такие приемы, как хранение обработанной ЭМС спермы в семяприемниках самок и фракционирование половых клеток по стадиям сперматогенеза [Wurgler et al., 1986].

В половых клетках дрозофилы учитывали мутационные события разного типа: (1) летальные разрывы хромосом, анализировали по частоте эмбриональной (ЭЛ), в том числе поздней (ПЛ), постэмбриональной (ПЭЛ) и суммарной (СЛ) летальности потомков в онтогенезе; (2) нелетальные разрывы хромосом, регистрировали по потерям половых хромосом (ППХ), приводящим к появлению в F₁ исключительного потомства; (3) точковые мутации – по частоте рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ). Различные типы мутаций учитывали в потомстве одних и тех же родителей, т.е. при строго идентичных условиях эксперимента. Потомство каждого обработанного самца анализировали индивидуально, что давало возможность оценить частоту мутаций в пуле половых клеток как всех, так и отдельных особей.

ИЗУЧЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ СТАНОВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭМС В ПОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ДРОЗОФИЛЫ

Для модификации химического мутагенеза, особенно его снижения, необходимо доскональное знание закономерностей самого мутационного процесса. Поэтому первым этапом исследований было изучение процесса становления генных и хромосомных мутаций под влиянием ЭМС. Для достижения поставленной задачи использовался такой подход, как хранение мутагенизированной спермы у интактных самок. Согласно методике, через 1–2 суток после спаривания самцов удаляли, а оплодотворенных самок несколько раз пересаживали на новую питательную среду. Получали ряд последовательных посадок (яйцекладок), соответствующих определенным срокам хранения сперматозоидов у самок. Мутационный ответ учитывали в 1-ой посадке

(реализация сперматозоидов в первые 2-е суток после обработки), 3-ей, соответствующей 5–7-ми суткам хранения и 5-ой – 12–14 суткам хранения.

Предварительно, по частоте РСПЛМ определена биологическая доза мутагена и по формуле Aaron, Lee (1978) вычислена его молекулярная доза. Она зависела от концентрации мутагена и времени его воздействия. Так, при концентрации 25 мМ и экспозиции 10 часов ЭМС вызывал 17,46% мутаций, чему соответствует $19,4 \times 10^5$ этилирований на сперматозоид, а при экспозиции 20 часов – 27,35% РСПЛМ ($30,4 \times 10^5$ этилирований на сперматозоид). Принимая во внимание, что одна половая клетка содержит около 3×10^8 нуклеотидов, получено, что этим дозам соответствует $6,47 \times 10^{-3}$ и $10,13 \times 10^{-3}$ этилирований на нуклеотид.

При изучении динамики выхода ЭМС-индуцированных РСПЛМ и ЭЛ установлена разная реакция этих повреждений на хранение (рис.1). Так, если частота разрывов хромосом, вызывающих эмбриональную летальность, росла в зависимости от времени хранения, то частота РСПЛМ оставалась неизменной. Обнаруженный по частоте ЭЛ эффект хранения был подтвержден при анализе ПЭЛ и СЛ, а также по индукционному фактору, который отражает вклад мутагена, независимо от спонтанного уровня событий (рис.2, 3).

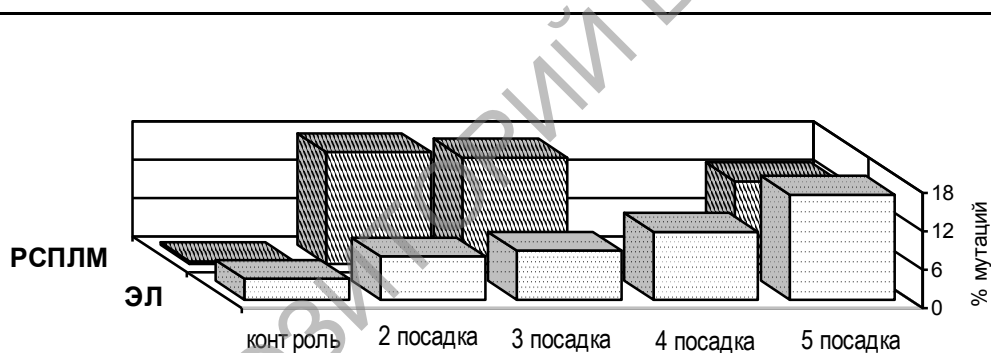


Рис.1. Динамика выхода ЭМС-индуцированных РСПЛМ и ЭЛ при хранении обработанной спермы у самок в течение 2-х недель

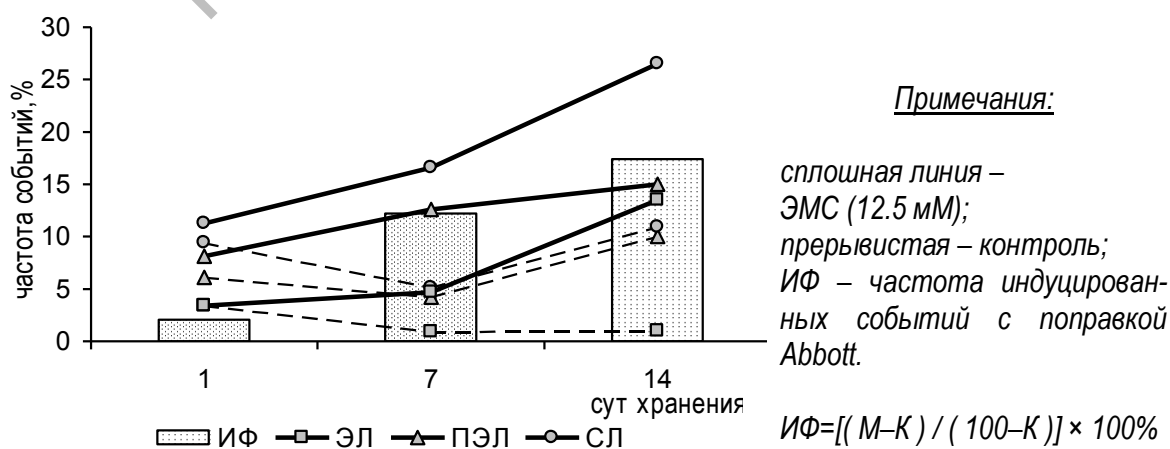


Рис. 2. Эффект хранения по летальности потомков в онтогенезе (эмпирические данные; частота индуцированных событий – ИФ)

Эта же закономерность несмотря на низкую частоту анализируемых событий была подтверждена при анализе нелетальных разрывов хромосом (рис.3). Сравнение динамики выхода эмпирических событий и образования AP-сайтов в результате гидролиза 7-этилгуанина показало, что процессы накопления AP-сайтов и ЭМС-индуцированных разрывов имеют общие тенденции, что указывает на взаимосвязь этих событий (рис.4).



Рис.3. Влияние хранения на выход летальных и нелетальных разрывов хромосом, индуцированных ЭМС

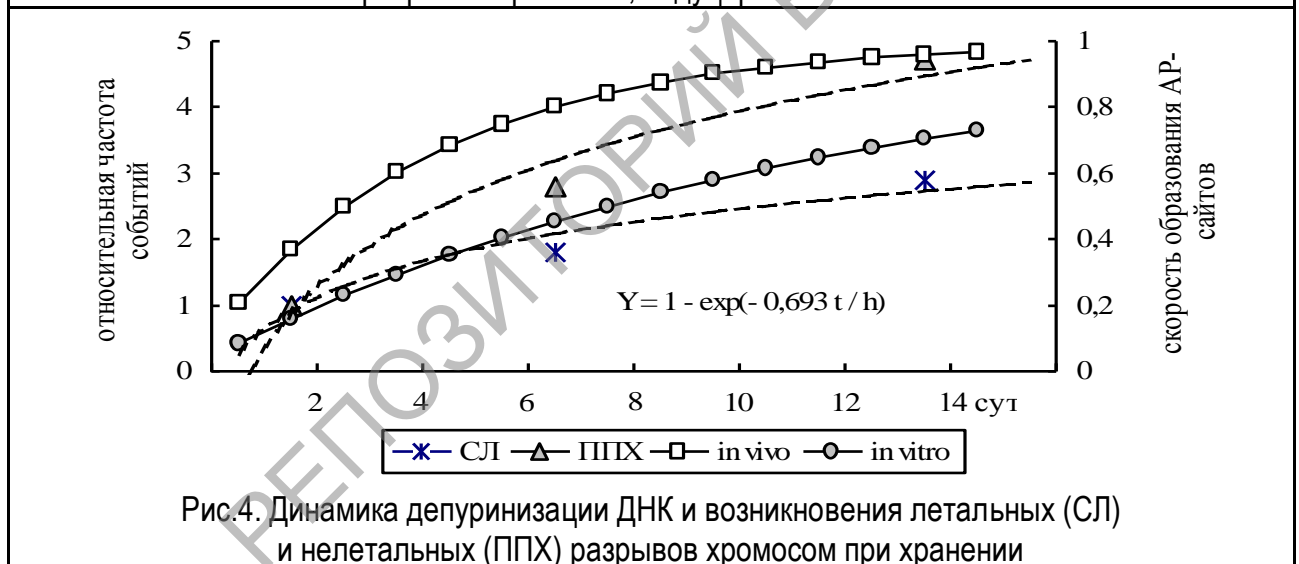


Рис.4. Динамика депуринизации ДНК и возникновения летальных (СЛ) и нелетальных (ППХ) разрывов хромосом при хранении

Таким образом, показано, что, в отличие от ЭМС-индуцированных точечных мутаций, уровень летальных (ЭЛ, ПЛ, ПЭЛ) и нелетальных (ППХ) разрывов хромосом, возрастает при хранении мутагенизированной спермы у самок в соответствии с динамикой утраты 7-этилгуанина и образования AP-сайтов.

ВЛИЯНИЕ ДЕФЕКТОВ МАТЕРИНСКИХ РЕПАРАЦИОННЫХ СИСТЕМ НА ЭМС-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ДРОЗОФИЛЫ

Репарация первичных повреждений, индуцированных в сперматозоидах, происходит после оплодотворения с помощью ферментов, накопленных ооцитом. Для оценки вклада репарации ДНК в ЭМС-кластогенез изучали влияние дефектов материнской репарации на формирование разрывов хромосом. С этой целью определили динамику ЭМС-индуцированной ЭЛ, ПЛ, ПЭЛ и СЛ при хранении обработанных

сперматозоидов у самок с различной репарационной способностью (табл.1). Показано, что на фоне дефекта эксцизионной репарации наблюдается повышение частоты ПЛ и ПЭЛ, а также СЛ (z-критерий Cochran=4.52*), а на фоне дефекта пострепликативной репарации понижение частоты ЭЛ, ПЭЛ и СЛ (z-критерий Cochran=4.25*). Повышение частоты разрывов хромосом на фоне дефекта эксцизионной репарации может быть вызвано снижением AP-эндонуклеазной активности и согласуется с данными других авторов. Понижение частоты анализируемых событий на фоне дефекта пострепликативной репарации выявлено впервые и требует дополнительных пояснений. Известно, что пострепликативная репарация осуществляется двумя путями – рекомбинационным (безошибочным) и с помощью синтеза *de novo*. И та, и другая ветвь способствует репликации ДНК, но оставляет первичное повреждение нерепарированным. Кроме того, рекомбинационная ветвь в процессе работы сама производит пробелы, которые нуждаются в застраивании.

Таблица 1

Влияние дефектов материнских систем репарации на ЭМС-кластогенез

| Вариант обработки | Выборка яиц | Летальность потомков в онтогенезе, % | | | |
|--|-------------|--------------------------------------|-------|--------|--------|
| | | ЭЛ | ПЛ | ПЭЛ | СЛ |
| <i>Berlin wild (mei-9⁺)</i> | | | | | |
| Контроль | 11171 | 8.33 | 0.62 | 10.86 | 18.25 |
| EMS 25 мМ | 9906 | 14.20 | 1.79 | 17.81 | 29.42 |
| <i>mei-9^{LI}</i> (дефект эксцизионной репарации) | | | | | |
| Контроль | 7735 | 3.93 | 0.56 | 11.08 | 14.62 |
| EMS 25 мМ | 7695 | 13.26 | 2.40* | 19.61* | 29.92 |
| Критерий z по СЛ = 4.52* | | | | | |
| <i>Berlin wild; bw, st (mei-41⁺)</i> | | | | | |
| Контроль | 11570 | 7.90 | 0.53 | 9.25 | 16.50 |
| EMS 25 мМ | 11309 | 15.30 | 1.49 | 18.57 | 30.65 |
| <i>mei-41^{DS}</i> (дефект пострепликативной репарации) | | | | | |
| Контроль | 11835 | 7.00 | 1.67 | 12.26 | 18.40 |
| EMS 25 мМ | 11719 | 13.53* | 2.36 | 17.22* | 28.36* |
| Критерий z по СЛ = 4.25* | | | | | |

*P < 0.01

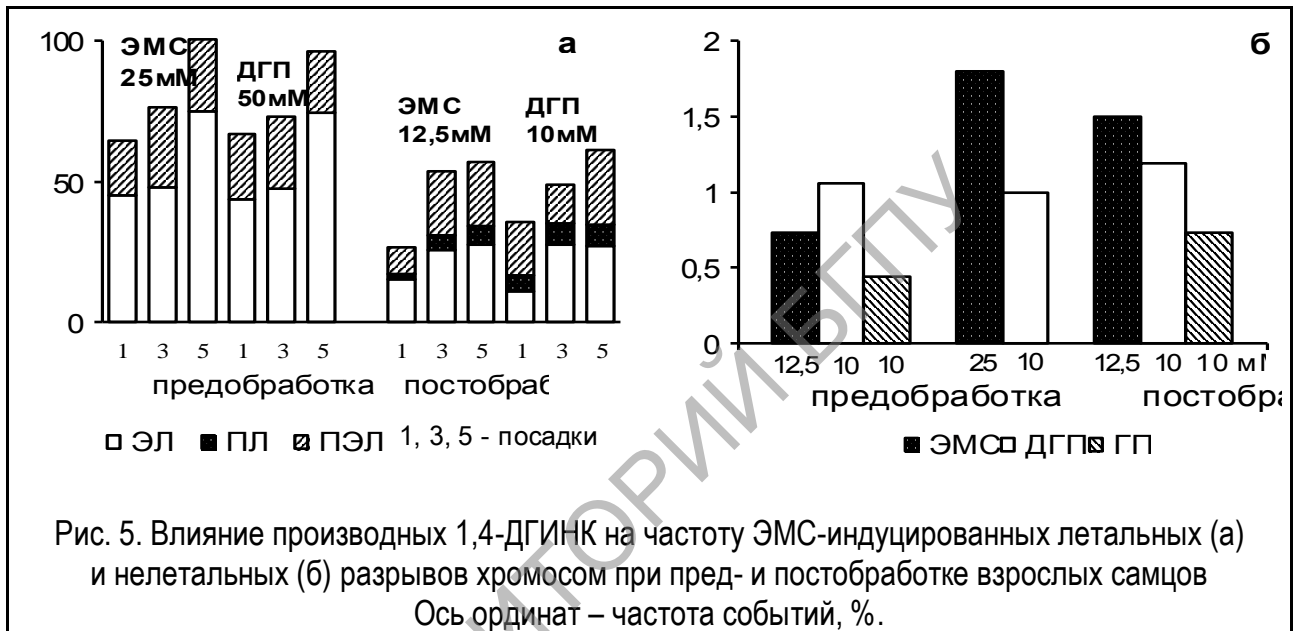
Нерепарированные пробелы являются дополнительным источником разрывов хромосом. Снижение мутабельности половых клеток на фоне мутации *mei-41* может быть обусловлено и другими причинами. Нарушение рекомбинационного пути пострепликативной репарации может компенсироваться более активной работой ферментов, исправляющих возникшие повреждения путем синтеза *de novo*. Кроме того, они могут быть исправлены другими репарационными системами, в частности, с помощью безошибочной эксцизионной репарации.

Таким образом, показано, что в ЭМС-кластогенезе участвуют материнские системы репарации. Дефект эксцизионной репарации увеличивает частоту разрывов хромосом, тогда как дефект пострепликативной репарации при некоторых условиях может уменьшать выход ЭМС-индуцированных хромосомных повреждений.

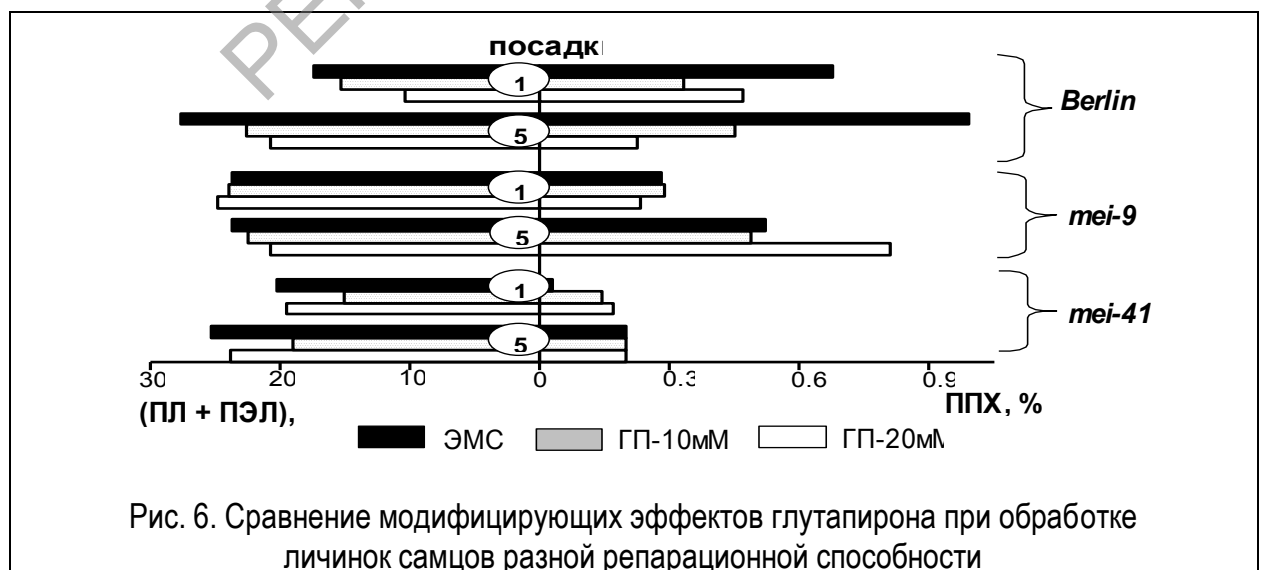
МОДИФИКАЦИЯ АНТИМУТАГЕНАМИ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА ПРИ ОБРАБОТКЕ САМЦОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА

При изучении влияния АМ на частоту ЭМС-индуцированных разрывов хромосом у самцов использовали: пред- и постобработку самцов имаго, обработку их личиночной стадии развития, линии дрозофилы, имеющие дефекты различных репарационных путей.

При воздействии на самцов имаго ни пред-, ни постобработка модификаторами не влияла на частоту летальных разрывов хромосом в сперматозоидах дрозофилы (рис.5а). Небольшие защитные эффекты ГП и ДГП наблюдались по частоте ППХ (рис.5б), хотя они не были достаточно стабильными.



Обработка личинок разными дозами ГП приводила к устойчивым эффектам в том случае, если их репарационные системы функционировали нормально (рис.6). Дефекты систем репарации снижали защитное действие антимуtagена.



Таким образом, при воздействии на зрелые половые клетки самцов, изученные производные 1,4-ДГИНК не изменяли уровень ЭМС-индуцированных летальных раз-

рывов хромосом и незначительно снижали частоту ППХ. Наоборот, при воздействии на личинки, наблюдался устойчивый защитный эффект обоих препаратов по этим тестам, который однако, зависел от репарационной способности особей, что доказано и с помощью теста Cochran (табл.2).

Таблица 2

Чувствительность к глутапирону личинок с разной репарационной способностью

| Линия самцов | Варианты сравнения | z – критерий Cochran на стадиях: | | | |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|--------|-------|--------|
| | | ЭЛ | ПЛ | ПЭЛ | СЛ |
| +/ <i>Y B^S</i> | ЭМС; ГП-10+ЭМС | 4.35** | 4.40** | 0.13 | 2.67** |
| | ЭМС; ГП-20+ЭМС | 5.72** | 3.27** | 2.25* | 5.73** |
| <i>mei-9/ Y B^S</i> | ЭМС; ГП-10+ЭМС | 1.15 | 1.00 | 1.41 | 1.80 |
| | ЭМС; ГП-20 +ЭМС | 0.05 | 1.52 | 0.60 | 0.49 |
| <i>mei-41/ Y B^S</i> | ЭМС; ГП-10+ЭМС | 3.95* | 1.07 | 1.78 | 1.28 |
| | ЭМС; ГП-20 +ЭМС | 1.35 | 1.38 | 0.11 | 1.03 |

*P<0.05; **P<0.01

При изучении модифицирующего эффекта ГП по тесту РСПМ анализировали реакцию различных стадий сперматогенеза на химическое воздействие, для чего использовали методику фракционирования половых клеток. При обработке самцов ЭМС обрабатывается весь пул половых клеток. Пересаживая в течение 10 дней обработанного самца каждые двое суток к виргинным самкам, получали последовательные посадки, в которых реализовывались половые клетки, обработанные на разных стадиях сперматогенеза. Анализировали частоту мутаций в 1-ой посадке, соответствующей ответу зрелых сперматозоидов, и 4-5-ой посадках, в которых учитывался ответ клеток, обработанных на премейотических стадиях сперматогенеза. Параллельно анализировали плодовитость особей (рис.7).

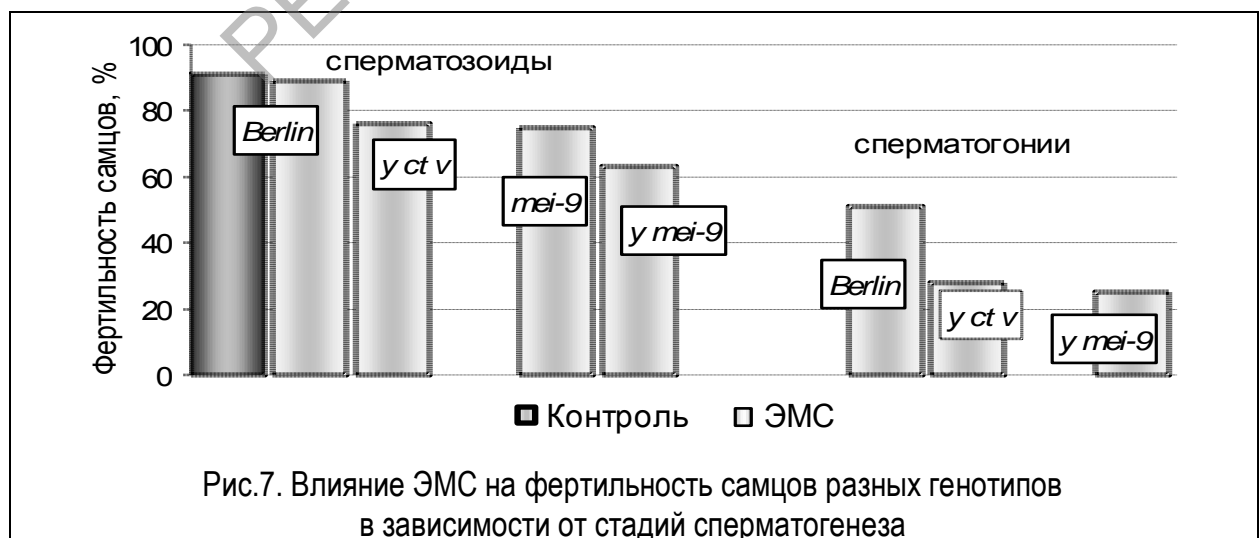


Рис.7. Влияние ЭМС на фертильность самцов разных генотипов в зависимости от стадий сперматогенеза

Показано, что фертильность самцов на премейотических стадиях сперматогенеза значительно ниже, чем на постмейотических вне зависимости от репарационной активности особи. ГП не понижал плодовитость и выживаемость самцов (табл.3).

Анализ влияния глутапирона на выживаемость и плодовитость самцов

| | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| z-критерий Cochran | Самцы <i>yellow, y ct v</i> | по выживаемости | 4.92** (P<0.01) |
| | | по стерильности | 1.12 |
| | Самцы <i>y mei-9^a</i> | по выживаемости | 1.63 |
| | | по стерильности | 0.22 |

При изучении влияния ГП на мутабельность половых клеток, различающихся по репарационной способности, защитный эффект был зарегистрирован только у самцов без явных дефектов репарации на премейотических стадиях сперматогенеза (табл.4).

Таблица 4

Влияние глутапирона на частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ у нормальных и дефектных по эксцизионной репарации самцов, обработанных на стадии имаго

| Доза ГП, мМ | Количество | | Частота РСПЛМ, % | Количество | | Частота РСПЛМ, % |
|---|---------------|---------|---------------------|------------------------------|---------|------------------------|
| | хромосом | летелей | | хромосом | летелей | |
| Предварительная обработка + ЭМС (12.5 мМ, 21 час) | | | | | | |
| ♀ <i>Basc</i> × ♂ <i>y ct v</i> | | | | | | |
| | сперматозоиды | | | сперматоциты + сперматогонии | | |
| – | 1226 | 360 | 29.36 | 576 | 121 | 21.01** |
| 5 | 1225 | 354 | 28.90 | 318 | 50 | 15.72 |
| – | 492 | 141 | 28.78 | 66 | 17 | 25.76 |
| 5 | 1372 | 349 | 25.44 | 371 | 85 | 22.91 |
| Тест Cochran (z) для ДГП–5 | | | 1.06 | 1.92* | | |
| ♀ <i>Basc</i> × ♂ <i>y mei-9</i> | | | | | | |
| – | 1188 | 255 | 21.46 | 687 | 174 | 25.33 |
| 5 | 1256 | 250 | 19.90 | 734 | 156 | 21.25 |
| – | 538 | 139 | 25.84 | 592 | 136 | 22.97 |
| 5 | 752 | 226 | 30.05 | 675 | 174 | 25.78 |
| – | 1151 | 108 | 9.38 | 339 | 46 | 13.57 |
| 5 | 1105 | 108 | 9.77 | 165 | 18 | 10.91 |
| – | 603 | 63 | 10.45 | 1485 | 104 | 7.00 |
| 5 | 632 | 77 | 12.18 | 1146 | 85 | 7.42 |
| Тест Cochran (z) для ДГП–5 | | | 0.79 | 0.44 | | |

*P<0.05; **P<0.01

При обработке личинок защитные эффекты обоих модификаторов стабильно проявлялись у нормальных по репарации личинок и не выявлены у личинок с дефектом эксцизионной репарации (табл.5).

Таким образом, изученные модификаторы снижали частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ на премейотических стадиях сперматогенеза, а также при обработке личинок. Дефект эксцизионной репарации препятствовал проявлению их защитного действия как в сперматогониях взрослых самцов, так и у личинок.

Влияние ГП и ДГП на частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ у нормальных и дефектных по эксцизионной репарации самцов, обработанных на стадии личинок

| Антимутаген | Количество | | Частота РСПЛМ, % |
|---------------------------------|------------|---------|---------------------|
| | хромосом | леталей | |
| ЭМС (10–25мМ, 10–24 час.) | | | |
| ♀ <i>Basc</i> × ♂ <i>Berlin</i> | | | |
| – | 574 | 260 | 45.30 |
| ДГП–30 мМ | 1061 | 324 | 30.54* |
| ДГП–90 мМ | 1064 | 264 | 24.81* |
| – | 584 | 102 | 17.46 |
| ДГП–60 мМ | 333 | 33 | 9.91* |
| – | 876 | 155 | 17.69 |
| ГП–10 мМ | 835 | 124 | 14.85 |
| – | 785 | 172 | 21.91 |
| ГП–10 мМ | 880 | 170 | 19.43 |
| Тест Cochran (z) для ГП–10 | | | 2.29* |
| ♀ <i>Basc</i> × ♂ <i>mei-9</i> | | | |
| – | 868 | 151 | 17.40 |
| ГП–5 мМ | 839 | 135 | 16.09 |
| ГП–10 мМ | 691 | 122 | 17.66 |

*P<0,05

Полученные данные свидетельствуют о том, что защитные эффекты ДГП и ГП против алкилирующего агента ЭМС обусловлены их влиянием на репарационные процессы, участвующие в ЭМС-мутагенезе и кластогенезе.

ВЛИЯНИЕ АНТИМУТАГЕНОВ НА СИСТЕМЫ МАТЕРИНСКОЙ РЕПАРАЦИИ ПРИ ЭМС-КЛАСТОГЕНЕЗЕ И МУТАГЕНЕЗЕ

В экспериментах по изучению влияния антиоксидантов на материнскую репарацию антимутагенной обработке подвергались самки, в то время как мутагеном обрабатывали самцов, что полностью исключало взаимодействие мутагена и антимутагена в организме. Использовали такие приемы, как эффект хранения, материнский эффект, а также самок с различными дефектами репарации. Показано, что защитные эффекты производных 1,4-ДГИНК по тестам, регистрирующим разрывы хромосом, проявлялись только при обработке репарационно-нормальных самок, в то время как дефекты репарационных систем нивелировали эти эффекты (табл.6). Эта тенденция подтверждена при вычислении эффективности антимутагенного действия модификаторов. Так, показатель РФ для ГП (10 мМ) у нормальных самок составляет ~ 20%, у самок *mei-9* не отличается от положительного контроля, а у самок *mei-41* имеет отрицательную величину.

Отмечен достаточно большой размах колебаний наблюдаемых эффектов у самок с дефектами репарации. В связи с этим проведен анализ факторов, которые могли повлиять на проявление защитного действия антимутагенов (рис.8, 9). Корреляционный

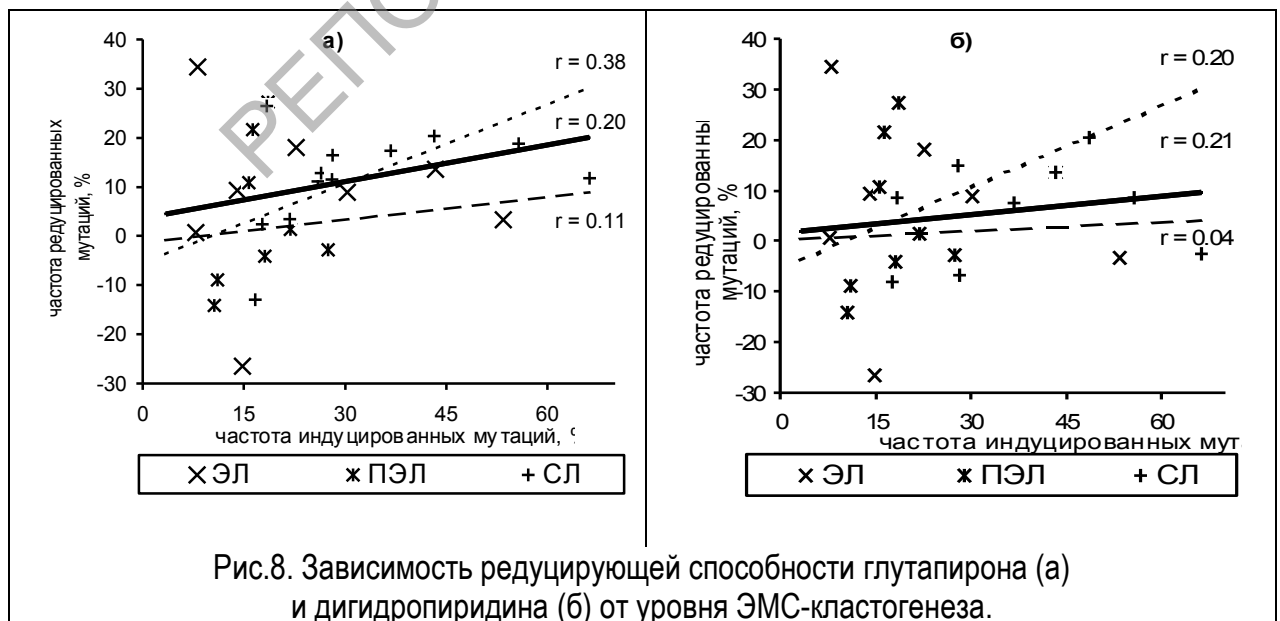
анализ показал, что степень подавления кластогенеза не зависит от уровня ЭМС-индуцированных событий (рис.8). Главной погрешностью учета эмбриональных леталей является возможная примесь неоплодотворенных яиц вследствие нарушения фертильности самца. Поздняя эмбриональная летальность не связана с физиологическим состоянием особей и целиком определяется генетической компонентой. Установлено, что модифицирующие эффекты изученных антимуутагенов по тестам эмбриональной и поздней эмбриональной летальности соответствуют друг другу у самок всех генотипов (рис.9).

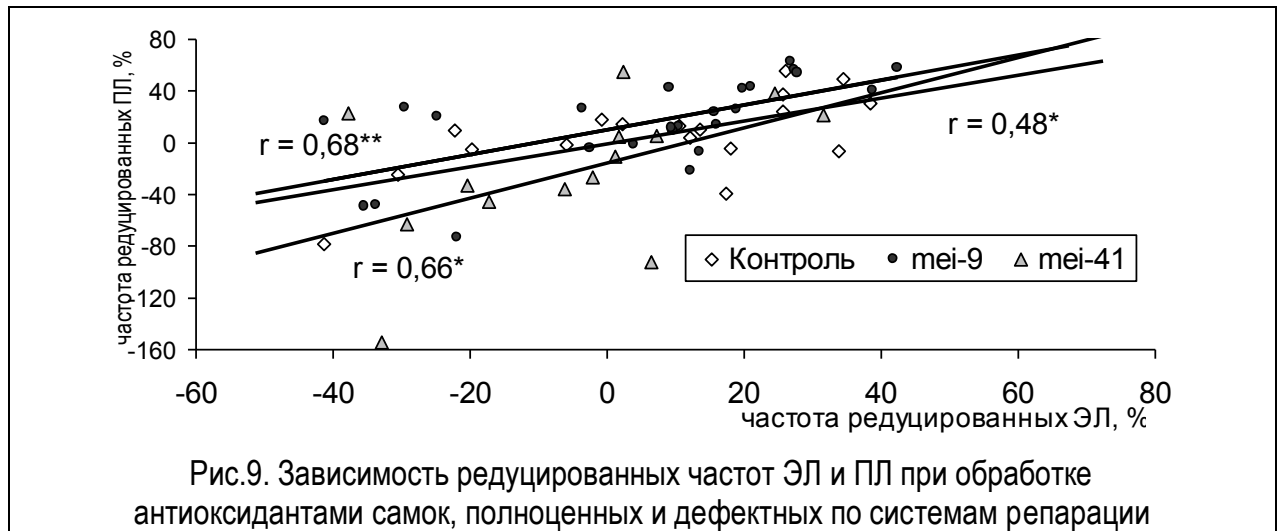
Таблица 6

Влияние антиоксидантов на материнскую репарацию первичных повреждений, ответственных за возникновение разрывов хромосом (средние значения показателей)

| Вариант обработки | Выборка яиц | Летальность потомков, % | | | |
|--|-------------|-------------------------|------|-------|--------|
| | | ЭЛ | ПЛ | ПЭЛ | СЛ |
| самки <i>mei-9⁺mei-41⁺</i> | | | | | |
| Сахароза, ЭМС | 13954 | 23.10 | 2.85 | 20.73 | 38.61 |
| ДГП, ЭМС | 13625 | 21.06 | 2.72 | 17.44 | 34.19* |
| ГП, ЭМС | 11041 | 18.31 | 1.95 | 14.71 | 29.65* |
| самки <i>mei-9^{L1}</i> | | | | | |
| Сахароза, ЭМС | 3323 | 10.32 | 2.42 | 10.25 | 19.26 |
| ДГП, ЭМС | 2755 | 10.49 | 2.70 | 9.29 | 18.58 |
| ГП, ЭМС | 2651 | 9.77 | 2.56 | 9.52 | 18.11 |
| самки <i>mei-41^{D5}</i> | | | | | |
| Сахароза, ЭМС | 4810 | 11.08 | 1.88 | 9.13 | 19.11 |
| ДГП, ЭМС | 3269 | 12.76 | 2.45 | 10.52 | 21.81 |
| ГП, ЭМС | 3183 | 10.43 | 2.88 | 11.80 | 20.92 |

*P < 0.01





При исследовании влияния ГП на материнскую репарацию ЭМС-индуцированных генных мутаций наблюдалось значительное снижение (от 20 до 70%) частоты РСПЛМ вне зависимости от уровня ЭМС-мутагенеза (табл.7).

Таблица 7

Влияние глутапирона на материнскую репарацию ЭМС-индуцированных генных мутаций при обработке репарационно-активных самок

| Обработка самок | | Обработка самцов | | Число хромосом | Частота РСПЛМ (%) |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-------------------|
| вариант | экспозиция (час) | доза ЭМС, мМ | экспозиция (час) | | |
| ♀ <i>uct v</i> × ♂ <i>Basc</i> | | | | | |
| Сахароза 3% | 48 | 6 | 24 | 405 | 20.00 |
| ГП 10 мМ | 48 | 6 | 24 | 811 | 18.86 |
| ♀ <i>Berlin</i> × ♂ <i>Basc</i> | | | | | |
| Сахароза 3% | 48 | 6 | 24 | 510 | 24.12 |
| ГП 10 мМ | 48 | 6 | 24 | 790 | 17.85** |
| Сахароза 3% | 72 | 10 | 8 | 1426 | 3.90 |
| ГП 10 мМ | 72 | 10 | 8 | 1519 | 1.05** |
| Тест Cochran (z) для ГП 10 мМ | | | | 4.21** | |

**P<0.01

Таким образом, при обработке репарационно-активных самок дрозофилы, изученные производные 1,4-ДГИНК существенно подавляли уровень летальных разрывов хромосом и точковых мутаций, индуцированных этилметансульфонатом в сперматозоидах. Дефекты репарации в ооцитах приводили к исчезновению защитного действия модификаторов, что указывает на его связь с материнскими системами репарации.

В таблице 8 представлены в обобщенном виде результаты экспериментов, которые показывают, что для производных 1,4-ДГИНК характерны опосредованные механизмы действия, в частности, влияние на репарацию ДНК.

Возможные механизмы действия антимуагенов в половых клетках дрозофилы

| Особенности модификации химического мутагенеза производными 1,4-ДГИНК | Механизмы действия |
|---|---|
| 1. Защитные эффекты изученных соединений наиболее выражены и устойчиво проявляются при предварительной обработке личинок | <u>Опосредованные механизмы действия</u> (индукция антимуагеновых компонентов и/или репарационных систем) |
| 2. Нивелирование защитных эффектов при обработке личинок с дефектами репарации | <u>Стимуляция или индукция репарационных систем</u> у личинок с полноценными системами репарации |
| 3. Предобработка антимуагеном всего пула половых клеток взрослых самцов приводит к снижению ЭМС-мутагенеза только на премейотических стадиях сперматогенеза | Влияние на <u>репарацию ДНК</u> , активно протекающую именно на этих стадиях |
| 4. При воздействии на репарационно-активных самок антимуагены снижают уровень разрывов хромосом и генных мутаций, индуцированных в сперматозоидах самцов | Влияние на <u>репарацию ДНК</u> , осуществляемую материнскими системами |
| 5. Дефекты репарации мужских и женских половых клеток снижают их чувствительность к защитному действию антимуагенов | Влияние на <u>репарацию ДНК</u> , так как эффективность защитного действия антимуагенов зависит от состояния репарационных систем |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью разносторонних биологических подходов (эффекты хранения и материнской репарации, дифференциальная чувствительность стадий сперматогенеза к мутагенам, обусловленная их репарационной способностью) и тест-систем, позволяющих учитывать различные генетические события в половых клетках, исследован процесс становления ЭМС-индуцированных точковых и хромосомных мутаций, показана их связь с определенными аддуктами ДНК и зависимость от активности эксцизионной и пострепликативной репарации.

Пользуясь этими же методами, которые сочетались с различными способами обработки дрозофилы модификаторами (воздействие на личинки или имаго самцов, обработка самок), изучен процесс модификации химического мутагенеза в половых клетках. Выявленные закономерности позволяют связать защитное действие производных 1,4-ДГИНК с их влиянием на репарацию первичных повреждений ДНК, ответственных за образование разрывов хромосом и точковых мутаций.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

1. Показано, что в отличие от ЭМС-индуцированных точковых мутаций, частота которых остается неизменной, уровень летальных (ЭЛ, ПЛ, ПЭЛ) и нелетальных (ППХ) разрывов хромосом, возрастает при хранении мутагенизированной спер-

мы у самок в соответствии с динамикой утраты 7-этилгуанина и образования AP-сайтов [2, 4, 10, 11].

2. Установлено, что ЭМС-кластогенез контролируется материнскими системами репарации, при этом дефект эксцизионной репарации приводит к повышению, а дефект пострепликативной репарации – к понижению частоты ЭМС-индуцированных разрывов хромосом [1, 3, 14, 20].
3. Производные 1,4-ДГИНК при воздействии на зрелые половые клетки самцов не изменяли уровень ЭМС-индуцированных летальных разрывов хромосом и незначительно снижали частоту ППХ. Наоборот, при воздействии на личинки, наблюдался устойчивый защитный эффект ДГП и ГП по этим тестам, который, однако, зависел от репарационной способности особей. Дефекты репарации у личинок редуцировали их чувствительность к антикластогенному действию глутапирона [4, 5, 16].
4. Показано, что обработка самцов глутапином приводила к снижению частоты ЭМС-индуцированных точковых мутаций (РСПМ) только на премейотических стадиях сперматогенеза. Защитный эффект ДГП и ГП по отношению к точковым мутациям стабильно проявлялся при обработке репарационно-активных личинок. Дефект эксцизионной репарации препятствовал их антимуtagenному действию как на премейотических стадиях сперматогенеза, так и у личинок [4–6, 8, 9, 16, 18, 22, 23].
5. При обработке модификаторами репарационно-нормальных самок дрозофилы изученные производные 1,4-ДГИНК существенно подавляли уровень ЭМС-индуцированных летальных разрывов хромосом и точковых мутаций. Дефекты репарации в ооцитах снижали их чувствительность к антимутагенам, что указывает на связь их защитного действия с материнскими системами репарации [1, 4–9, 12, 13, 17, 19, 23, 24].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Кузир Т.Д., Даливеля О.В. Влияние антиоксидантов на формирование индуцированных этилметансульфонатом разрывов хромосом в зависимости от систем материнской репарации у *D. melanogaster* // Вестник РАМН. – 1993. – №1. – С. 56 – 64.
2. Кузир Т.Д., Даливеля О.В. Закономерности процесса становления ЭМС-индуцированных мутаций в половых клетках *Drosophila melanogaster* // Доклады АНБ. – 1993. – Т. 37, № 4. – С. 77 – 82.
3. Кузир Т.Д., Даливеля О.В. Участие систем материнской репарации в реализации инактивирующего действия этилметансульфоната у *Drosophila melanogaster* // Доклады АНБ. – 1993. – Т. 37, №5. – С. 72 – 76.
4. Кузир Т.Д., Даливеля О.В. Эффект хранения при ЭМС-мутагенезе у *Drosophila melanogaster* и возможности его модификации // Проблемы генетики: Сб. науч. ст. / Мн.: "Навука і тэхніка", 1994. – С. 204 – 216.
5. Гончарова Р.И., Кузир Т.Д., Даливеля О.В., Дубур Г.Я., Улдрикус Я.Р. Производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) – ингибиторы химического мутагенеза // Вестник РАМН. – 1995. – №1. – С. 9 – 20.
6. Даливеля О.В., Савина Н.В. Модификация функционирования алкилтрансфераз под влиянием глутапирона у дрозофилы // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы междунар. конф. / Минск, 1998. – С. 29 – 31.
7. Даливеля О.В. Влияние антиоксидантов на пострепликативную репарацию, вовлеченную в ЭМС-кластогенез // Генетика и селекция на рубеже XXI века: сб. работ молодых ученых / под редакцией академика Н.А.Картеля / Мн:ИПЭ, 1999. – С. 100 – 104.
8. Кузир Т.Д., Даливеля О.В., Савина Н.В. Модификация процессов репарации при химическом мутагенезе у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1999. – Т. 35, №7. – С. 919 – 924.
9. Kuzhir T.D., O.V. Dalivelya, N.V. Savina. Modification of repair processes in chemical mutagenesis of *Drosophila melanogaster* // Russian Journal of Genetics. – 1999. – Vol.35, No.7. – P. 919 – 924.

Тезисы докладов:

10. Кузир Т.Д., Даливеля О.В. Влияние эффекта хранения на выход разрывов хромосом, индуцированных этилметансульфонатом (ЭМС) в сперматозоидах *Drosophila melanogaster* // VI Всесоюзное совещание по проблемам биологии и генетики дрозофилы: Тез. докл., Одесса, 7–12 сентября 1989 г. / Одесса, 1989. – С. 53–54.
11. Даливеля О.В. Влияние эффекта хранения на выход разрывов хромосом, индуцированных этилметансульфонатом в половых клетках дрозофилы // Некоторые актуальные вопросы современной биологии: Тез. докл. VI научно-практической конференции молодых ученых, Ярославль, 1–6 февраля 1990 г. / Ярославль, 1990. – С. 4.

12. Кужир Т.Д., Даливеля О.В. Влияние генотипической среды на реализацию разрывов хромосом, индуцированных ЭМС в сперматозоидах дрозофилы // Генетические последствия загрязнения окружающей среды мутагенными факторами: Тез. докл. Всесоюзной конференции / Самарканд, 1990. – С. 56.
13. Кужир Т.Д., Даливеля О.В., Макаренко В.С. Модификация антиоксидантами (АО) эффекта хранения при ЭМС-мутагенезе у дрозофилы // Генетические последствия загрязнения окружающей среды мутагенными факторами: Тез. докл. Всесоюзной конференции / Самарканд, 1990. – С. 60.
14. Даливеля О.В. Особенности становления ЭМС-индуцированных мутаций при хранении мутагенизированных сперматозоидов у самок дрозофилы // VI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров: Тез. докл., Горки, 2–4 июля 1992 г. / Горки, 1992. – С.5.
15. Кужир Т.Д., Даливеля О.В., Плеханова Л.Г. Влияние фенозана на реализацию ЭМС-индуцированных разрывов хромосом у дрозофилы // Биоантиоксидант: Тез. докл. IV конференции, Москва, 2–4 июня 1992 г. / Москва, 1993. – Т. 2. – С. 146.
16. Кужир Т.Д., Даливеля О.В., Улдрикис Я.Р. Влияние производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты на становление ЭМС-индуцированных мутаций у дрозофилы // Биоантиоксидант: Тез. докл. IV конференции, Москва, 2–4 июня 1992 г. / Москва, 1993. – Т. 2. – С. 147–148.
17. Dalivelya O.V., Kuzhir T.D. Effects of 1,4-dihydroisonicotinic acid (1,4-DHINA) derivatives on maternal repair of EMS-induced chromosome breakage in *D. melanogaster* // Abstracts of 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Bunff, Canada, 4–9 September 1994 / Bunff, 1994. – P.44.
18. Kuzhir T.D., Dalivelya O.V., Savina N.V. Effect of 1,4-DHINA derivatives on repair of DNA adducts responsible for EMS-induced point mutations in *Drosophila* males // Abstracts of 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Bunff, Canada, 4–9 September 1994 / Bunff, 1994. – P.45.
19. Даливеля О.В. Влияние глутапирона на материнскую репарацию ЭМС-индуцированных разрывов хромосом у *Drosophila melanogaster* // Материалы I-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС), Саратов, 20–25 декабря 1994 г. / Генетика (приложение) . – 1994. – Т. 30. – С.40.
20. Даливеля О.В., Савина Н.В. Зависимость эффективности ЭМС от активности систем эксцизионной репарации у *D. melanogaster* // Современные проблемы генетики и селекции: Тез. докл. республиканской конф., Минск, 4–6 июля 1995 г. / Минск, 1995. – С. 19.
21. Даливеля О.В. Влияние производных 1,4-дигидропиридина на частоту микроядер, химически индуцированных в клетках костного мозга мышей // VII съезд БОГИС: Тез. докл., Горки, 16–19 июля 1997г. / Минск, 1997. – С.36.
22. Савина Н.В., Даливеля О.В. Пути модификации репарационных процессов при химическом мутагенезе у дрозофилы // Экология и молодежь (Исследования экосистем в условиях радиоактивного и техногенного загрязнения окружающей сре-

ды): Материалы I междунар. конф., 17–19 марта 1998 г. / Гомель, 1998. – Т1, ч.2. – С.131 – 132.

23. Dalivelya O. Some antioxidants inhibit EMS-mutagenesis in *Drosophila* germ cells // “Challenges of mutation research for the XXIst century”: Abs. of 30th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, August, 22–26, 2000, Budapest, Hungary/ Budapest, 2000 – post. 153. – P.155.
24. Dalivelya O., Savina N., Kuzhir T. Modulation of DNA repair under chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster* // Abs. of 7th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis & Anticarcinogenesis, 23–27 September 2000, Grand Rapids, Michigan, USA/ Grand Rapids, 2000 – P. 95.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

РЕЗЮМЕ

Даливеля Ольга Вячеславовна

«Влияние производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты на процессы репарации при химическом мутагенезе у *Drosophila melanogaster*»

Ключевые слова: мутаген, химический мутагенез, алкилирующий агент, этилметансульфонат, антимутаген, антимутагенез, репарация ДНК, эффект хранения, эффект материнской репарации, дрозофила, половая клетка, генная мутация, разрыв хромосомы

Объект исследования – лабораторные линии *Drosophila melanogaster*, в том числе с дефектами в системах эксцизионной (*mei-9*) и пострепликативной (*mei-41*) репарации.

Предмет исследования – антимутагены как средства, снижающие частоту мутаций; мутационный процесс и репарация ДНК.

Цель работы – исследовать влияние производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты глутапирона (ГП) и 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридина (ДГП) на химический мутагенез и репарационные процессы в половых клетках *Drosophila melanogaster*.

Методы исследования – хранение мутагенизированных сперматозоидов в семяприемниках самок; фракционирование половых клеток, обработанных на разных стадиях сперматогенеза, учет летальных и нелетальных разрывов хромосом; анализ рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций.

Полученные результаты и их новизна. Впервые проведено комплексное исследование закономерностей ЭМС-индуцированного мутагенеза в половых клетках дрозофилы и установлена связь образования разрывов хромосом с индукцией AP-сайтов, а также противоположное влияние на кластогенез материнских систем эксцизионной и пострепликативной репарации. Впервые установлено, что ГП и ДГП снижают уровень ЭМС-мутагенеза и кластогенеза у самцов при обработке их личинок, премейотических половых клеток взрослых особей, и при воздействии на самок. Дефекты репарации у личинок, в сперматогониях и ооцитах снижают чувствительность организма и половых клеток к защитному действию антимутагенов. Данные свидетельствуют о том, что защитные эффекты изученных модификаторов опосредованы их влиянием на процессы репарации ДНК.

Степень использования. Результаты диссертации могут использоваться при организации скрининга антимутагенов. Изученные антимутагены могут быть рекомендованы для дальнейших исследований и применения в качестве репарогенов.

Область применения – общая генетика, медицинская генетика, экология

РЭЗЮМЭ

Далівеля Вольга Вячаславаўна

«Уплыў вытворных 1,4-дыгідраізанікатынавай кіслаты на рэпарацыйныя працэсы пры хімічным мутагенэзе ў *Drosophila melanogaster*»

Ключавыя словы: мутаген, хімічны мутагенэз, алкіліруючы агент, этылметансульфанат, антымутаген, антымутагенэз, рэпарацыя ДНК, эфект захоўвання, эфект матчынай рэпарацыі, дразафіла, палавая клетка, генная мутацыя, разрыў храмасомы

Аб'ект даследаванняў – лабараторныя лініі *Drosophila melanogaster*, у тым ліку з парушэннямі ў сістэмах эксцызійнай (*mei-9*) і пострэплікатыўнай (*mei-41*) рэпарацыі.

Прадмет даследаванняў – антымутагены як сродкі зніжэння частаты мутацый; мутацыйны працэс і рэпарацыя ДНК.

Мэта працы – даследаваць уплыў вытворных 1,4-дыгідраізанікатынавай кіслаты глутапірону (ГП) і 2,6-дыметыл-3,5-дыэтоксікарбаніл-4-(натрый карбаксілата)-1,4-дыгідрапірыдыну (ДГП) на хімічны мутагенэз і рэпарацыйныя працэсы ў палавых клетках *Drosophila melanogaster*.

Метады даследавання – захоўванне мутагенізаваных сперматазоідаў у сперматэке самак; фракцыяніраванне палавых клетак дарослых самцоў, якія былі апрацаваны на розных стадыях сперматагенэзу; улік лятальных і нелятальных разрываў храмасом, аналіз рэцэсіўных счэпленых з полам лятальных мутацый.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню праведзена комплекснае даследаванне заканамернасцей ЭМС-індукаванага мутагенэзу ў палавых клетках самцоў дразафілы і ўсталявана сувязь паміж узнікненнем разрываў храмасом і індукцыяй AP-сайтаў, а таксама супрацьлеглы ўплыў матчыных сістэм эксцызійнай і пострэплікатыўнай рэпарацыі на кластагенэз. Упершыню паказана, што ГП і ДГП зніжаюць узровень ЭМС-мутагенэза і кластагенэза ў палавых клетках самцоў, калі уплываюць на самак, альбо апрацоўваюцца лічынкі ці прэмеятычныя палавыя клеткі дарослых самцоў. Дэфекты рэпарацыі ў лічынак, у сперматагоніях і аацытах памяншаюць адчувальнасць арганізмаў і палавых клетак да ахоўнага дзеяння антымутагенаў. Атрыманыя дадзеныя сведчуць пра тое, што ахоўныя эфекты вывучаных мадыфікатараў апасродкаваны іх уплывам на працэсы рэпарацыі ДНК.

Ступень выкарыстання. Атрыманыя дадзеныя прапануецца выкарыстоўваць пры арганізацыі скрынінга антымутагенаў. Даследаваныя антымутагены рэкамендуюцца для наступнага вывучэння з мэтай выкарыстання іх у якасці рэпарагенаў.

Галіна выкарыстання – агульная генэтыка, медыцынская генэтыка, экалогія.

SUMMARY

Dalivelya Olga Vyacheslavovna

“The effect of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives on repair processes under chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*”

Key words: *mutagen, chemical mutagenesis, alkylating agent, ethyl methanesulfonate, antimutagen, antimutagenesis, DNA repair, storage effect, maternal repair, Drosophila, germ cell, gene mutation, chromosome break.*

Object of investigation – laboratory lines of *Drosophila melanogaster* including those with defects in the systems of excision (*mei-9*) and post-replicative (*mei-41*) repair.

Subject of investigation – antimutagens as agents reducing the mutation frequency; mutation process and DNA repair.

Aim of work – to study the effect of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives, glutapyrone (GP) and 2,6-dimethyl-3,5-dioxy-carbonyl-4(sodium carboxylate)-1,4-dihydropyridine (DHP), on chemical mutagenesis and repair processes in *Drosophila* germ cells.

Methods of investigations – storage of mutagenized spermatozoa in receptacula seminis of females; separating germ cells treated at different stages of spermatogenesis, count of lethal and non-lethal chromosome breaks; analysis of sex-linked recessive lethals.

Obtained results and their novelty. For the first time a complex research on regularities of EMS-induced mutagenesis in *Drosophila* germ cells was pursued. Relation between chromosome break formation and AP-site induction, as well as opposite effect on clastogenesis of maternal excision and post-replicative repair systems was revealed. For the first time it was established that GP and DHP reduce the level of EMS-mutagenesis and clastogenesis in males by treating their larvae, premeiotic germ cells of adults and by acting on females. Defects of repair in larvae, in spermatogonia and oocytes reduce sensitivity of organism and germ cells to antimutagen protective action. The findings point to the fact that antimutagenic effects of the tested modifiers are mediated by their influence on DNA repair.

Degree of application. The results of thesis can be used in organizing antimutagen screening. The studied antimutagens may be recommended for further research and application as repair-agents.

Field of application – general genetics, medical genetics, ecology.