

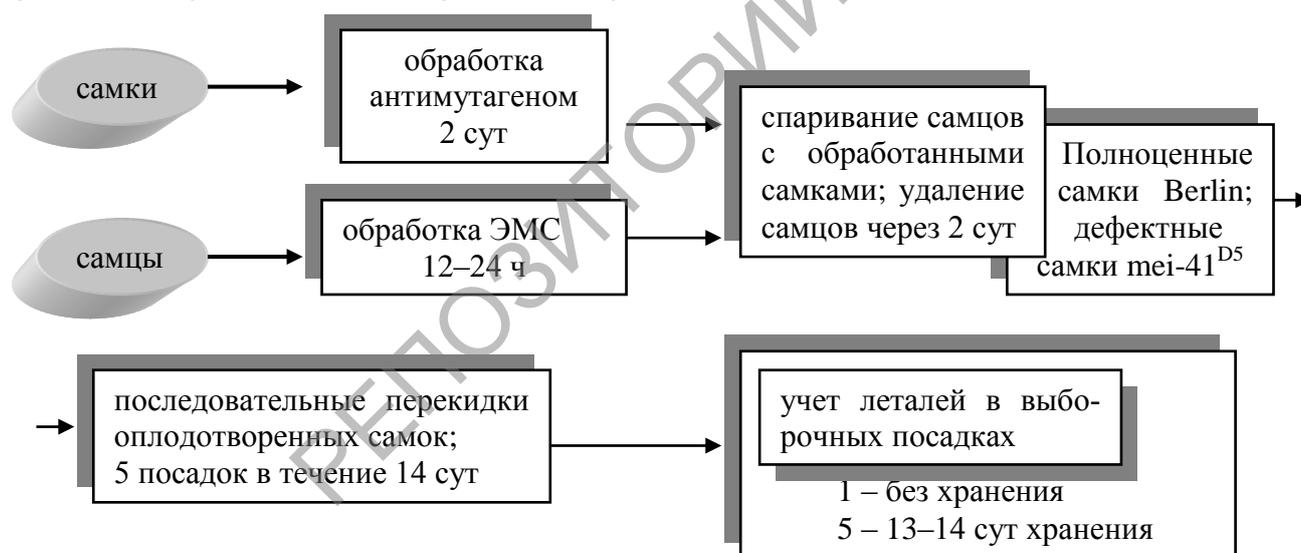
## ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ПОСТРЕПЛИКАТИВНУЮ РЕПАРАЦИЮ, ВОВЛЕЧЕННУЮ В ЭМС–КЛАСТОГЕНЕЗ

Даливеля О.В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси.  
220072, Минск, ул. Академическая, 27

Поиск и изучение антимуtagens необходимы для снижения генетических повреждений, которые неизбежно возникают при химическом загрязнении среды. Для того, чтобы предложить какое-либо соединение в качестве антимутгена необходимо выяснить основные механизмы его действия. Наименее изучено влияние антимуtagens на процессы репарации и репликации ДНК, играющие важнейшую роль в мутагенезе. В данной работе исследовалось модифицирующее действие двух производных 1.4-дигидроизоникотиновой кислоты на пострепликативную репарацию ЭМС-индуцированных разрывов хромосом у *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы. В качестве модификаторов изучались антиоксиданты 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-карбоксиламино)-глутаровой кислоты (глутапирон, ГП). Этилметансульфонат (ЭМС), монофункциональный алкилирующий агент, использовали как модельный мутаген. Эксперименты проводили с двумя линиями дрозофилы: *Berlin wild* – дикий тип, особи полноценны по всем репарационным системам; *mei-41<sup>D5</sup>* – X-хромосома содержит мутацию, ответственную за дефект пострепликативной репарации. Способы обработки и проведения экспериментов представлены на схеме.



Обработка растворами химических веществ проводилась путем кормления имаго. В качестве контроля использовали 1–3%-й раствор сахарозы.

Для полной реализации кластогенного потенциала ЭМС применяли метод хранения мутагенизированных сперматозоидов в семяприемниках самок [1,2]. В индивидуальных культурах в выборочных посадках учитывали эмбриональную (ЭЛ), позднюю эмбриональную (ПЛ), постэмбриональную (ПЭЛ) и суммарную (СЛ) летальность, для чего считали количество отложенных яиц; через 48 ч – неразвившихся яиц (в том числе темных, погибших на поздних стадиях эмбрионального развития); через 8–10 сут – всех вылетевших потомков.

Эффективность действия антимуtagens оценивали по редуционному фактору (РФ), который отражает долю удаленных антимутгеном мутаций и вычисляется по формуле:

$$P\Phi = \frac{M - (AM + M)}{M} \times 100\%,$$

где М – частота мутаций, индуцированных мутагеном,  
 AM+M – в варианте комбинированного воздействия антимуtagена и мутагена.

Частоты мутационных событий в разных вариантах одного эксперимента сравнивали по критерию хи-квадрат ( $\chi^2$ ); при анализе сопряженных выборок применяли тест Cochran; взаимосвязь изучаемых параметров определяли с помощью корреляционного анализа [3,4].

Результаты исследований: Схема эксперимента исключала взаимодействие модификатора и мутагена в организме и позволяла проследить за влиянием антиоксидантов на системы материнской репарации. Данные эксперимента представлены в таблице.

| Доза AM,<br>мМ             | Хранение<br>сут. | Количество<br>яиц | Летальность, % |         |                   |           |
|----------------------------|------------------|-------------------|----------------|---------|-------------------|-----------|
|                            |                  |                   | эмбриональная  |         | постэмбриональная | суммарная |
|                            |                  |                   | общая          | поздняя |                   |           |
| <i>Berlin wild</i>         |                  |                   |                |         |                   |           |
| сах.3%                     | 1–2              | 1816              | 8.15           | 1.77    | 11.09             | 18.34     |
| ДГП-10                     | 1–2              | 1984              | 5.34           | 0.90    | 12.09             | 16.78**   |
| ГП-10                      | 1–2              | 1476              | 6.03           | 0.79    | 7.93              | 13.48**   |
| сах.3%                     | 13–14            | 634               | 30.28          | 1.78    | 18.55             | 43.22     |
| ДГП-10                     | 13–14            | 348               | 27.59          | 3.82    | 13.49             | 37.36*    |
| ГП-10                      | 13–14            | 584               | 20.03          | 1.89    | 17.99             | 34.42**   |
| Тест Cochran (z)           | для ДГП          |                   | 3.18**         | 1.12    | -0.60             | 2.02*     |
|                            | для ГП           |                   | 4.58**         | 1.93    | 2.52**            | 4.90**    |
| <i>mei-41<sup>D5</sup></i> |                  |                   |                |         |                   |           |
| сах.3%                     | 1–2              | 1841              | 5.27           | 1.52    | 7.63              | 12.49     |
| ДГП-10                     | 1–2              | 1207              | 3.98           | 0.94    | 8.63              | 12.26     |
| ГП-10                      | 1–2              | 1408              | 6.18           | 2.22    | 9.84              | 15.41     |
| сах.3%                     | 13–14            | 1519              | 17.38          | 1.65    | 12.35             | 27.58     |
| ДГП-10                     | 13–14            | 614               | 23.94          | 1.27    | 13.28             | 34.04**   |
| ГП-10                      | 13–14            | 584               | 16.27          | 3.17    | 14.31             | 28.25     |
| Тест Cochran (z)           | для ДГП          |                   | -1.92          | 1.44    | -1.07             | -4.08**   |
|                            | для ГП           |                   | -0.25          | -2.36*  | -2.37*            | -3.55**   |

\* – P < 0.05; \*\* – P < 0.01

Оба препарата при обработке самок *Berlin wild* существенно снижали частоту ЭМС-индуцированных леталей. Обработка самок *mei-41*, имеющих дефект в системах пострепликативной репарации, не влияла на уровень ЭМС-кlastогенеза в половых клетках самцов или потенцировала действие мутагена. На рис.1 представлены РФ, полученные для ГП и ДГП на основании данных нескольких экспериментов. У нормальных самок оба модификатора проявляли защитное действие, в то время как при обработке самок *mei-41* наблюдались нейтральные или противоположные эффекты. РФ изученных соединений у репарационно-дефектных самок имел большой размах колебаний по повторностям, тогда как у нормальных мух этот показатель был стабилен, что подтверждает устойчивые эффекты антимуtagенов на фоне нормально функционирующих репарационных систем.

Для того, чтобы исключить возможное влияние некоторых факторов на проявление модифицирующего действия антиоксидантов был проведен дополнительный статистический анализ.

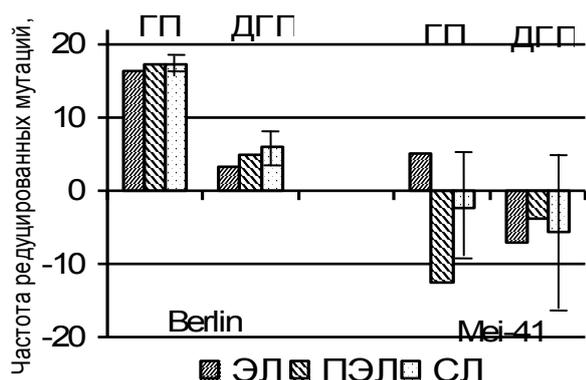


Рис.1 Сравнение эффективности действия ДГП и ГП у самок с разной репарационной способностью.

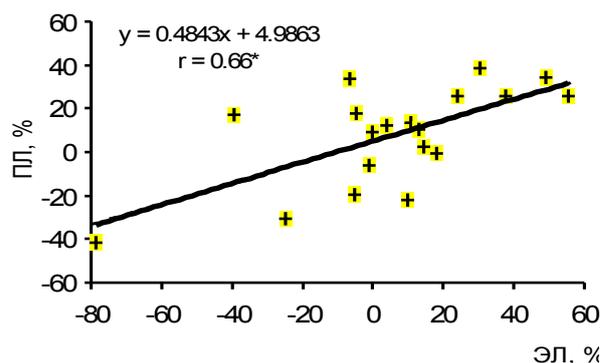


Рис.2 Зависимость редуцированных частот ЭЛ и ПЛ при обработке антиоксидантами самок, полноценных по репарации

Главной погрешностью учета эмбриональных леталей является возможная примесь неоплодотворенных яиц, которые могут возникнуть вследствие нарушения мутагеном фертильности самца. Поздняя эмбриональная летальность не связана с физиологическим состоянием особей и целиком определяется генетической компонентой [5,6]. На рис.2 представлены результаты корреляционного анализа, которые

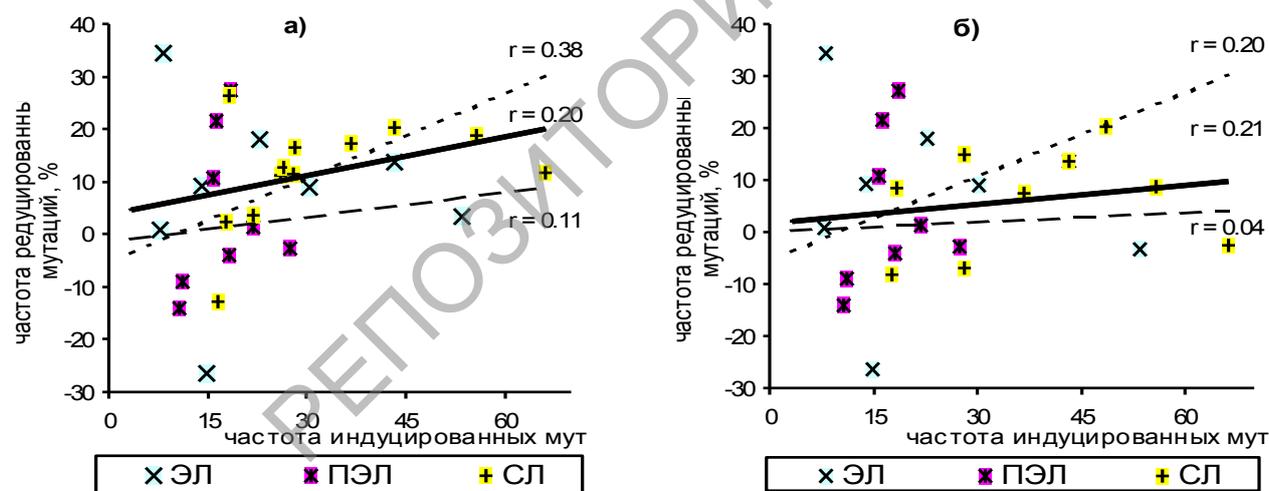


Рис.3 Зависимость редуцирующей способности глутапирана (а) и дигидропиридина (б) от уровня ЭМС-кластогенеза.

показывают, что модифицирующие эффекты (по показателям РФ), полученные по тестам эмбриональной и поздней эмбриональной летальности достоверно соответствуют друг другу. Исследовали также зависимость степени подавления ЭМС-индуцированного кластогенеза от уровня индуцированных мутаций. На примере ГП (а) и ДГП (б) (рис.3) показано, что при обработке репарационно-активных самок эффективность действия антимуагенов не зависит от уровня ЭМС-кластогенеза. Тем не менее, высокий уровень нарушений способствует выявлению защитного действия антиоксидантов.

Таким образом, влияние ГП и ДГП на ЭМС-кластогенез может быть опосредовано материнскими системами репарации. Антимуагеновое действие антиоксидантов стабильно проявлялось при обработке репарационно-полноценных самок, при-

чем ГП был более эффективным. Повреждения репарационных систем приводили к исчезновению защитного эффекта. Снижение частоты ЭМС-индуцированных разрывов хромосом при обработке антимуtagensами репарационно-активных самок наблюдалось как в первые сутки после скрещивания, так и через 13–14 сут. хранения, когда модификатор был полностью выведен из организма, что предполагает включение каких-то внутриклеточных механизмов, стимулирующих работу репарационных систем.

#### Литература

1. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978. – 464 с.
2. Würgler F.E., Frei H., Graf U. // Chemical Mutagenesis. Principles and methods for their detection. N. Y., London: Plenum Press, 1986. Vol.10. P.381–425.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976. – 598 с.
5. Würgler F.E., Sobels F.H., Vogel E. // Handbook of mutagenicity test procedures (by ed. Kilbey B.G., Legator M., Nichols W., Ramel C.). Amsterdam, New York, Oxford, 1984. P.555–601.
6. Литвинова Е.М. // Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. Новосибирск: Наука, 1977. С.19–61.