

УДК 575.224.4 / 575.224.6

МОДУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ ДНК НА ПРИМЕРЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

О.В. ДАЛИВЕЛЯ, Н.В. САВИНА, Т.Д. КУЖИР, Р.И. ГОНЧАРОВА

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск

Для изучения влияния некоторых производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) на репарацию ДНК при химическом мутагенезе в половых клетках дрозофилы проводили: 1) обработку антимутагенами самок и анализ их действия на материнскую репарацию первичных повреждений ДНК, индуцированных в сперматозоидах; 2) обработку антимутагенами личинок и анализ их влияния на ЭМС-индуцированную мутабельность сперматозоидов; 3) сравнение влияния антимутагенов на чувствительность к мутагену различных стадий сперматогенеза при обработке взрослых самцов; 4) сравнение чувствительности к антимутагенам особей с нормальной и нарушенной репарацией ДНК. Показано, что эти соединения снижают уровень ЭМС-индуцированных повреждений хромосом и точковых мутаций в сперматозоидах дрозофилы, влияя на материнские системы репарации; ингибируют эффекты ЭМС в зрелых половых клетках самцов при предварительном воздействии на личинок, а при предобработке взрослых самцов подавляют частоту ЭМС-индуцированных мутаций только на премейотических стадиях сперматогенеза. Дефекты в системах репарации уменьшают чувствительность женских и мужских гамет к действию антимутагенов. Результаты свидетельствуют о том, что антимутагенный потенциал производных 1,4-ДГИНК реализуется благодаря их влиянию на репарацию ДНК.

Введение. Растущее загрязнение окружающей среды различными агентами физической и химической природы приводит к повышению уровня мутагенеза и неблагоприятным последствиям для жизнедеятельности различных организмов и здоровья человека. Снижение генотоксических эффектов осуществляется благодаря развитым в процессе эволюции системам естественной клеточной и организменной защиты [1]. Целостность и стабильность наследственных структур поддерживается матричными процессами, среди которых большое значение имеет репарация ДНК. Установлено, что дефекты в системах репарации приводят к различной патологии. Например, нарушения в системе эксцизионной репарации нуклеотидов (*nucleotide excision repair*) и, прежде всего, ее ветви, ответственной за «глобальную» репарацию (*global genome excision repair*), ассоциированы с пигментной ксеродермой, а изменения репарации, связанной с транскрипцией (*transcription-coupled repair*), наблюдаются при синдроме Cockayne [2]. Оба синдрома характеризуются повышенной чувствительностью клеток к УФ лучам и увеличенной частотой хромосомных повреждений. Известно также, что гетерозиготность популяции человека по некоторым генам, вовлеченным в репарацию неспаренных оснований (*mismatch repair*), сопряжена с онкологическим риском [3]; дефекты или нарушения их функций приводят к развитию наследственного неполипозного колоректального рака [4, 5]. Пока не найдены заболевания, обусловленные дефектами в системе эксцизионной репарации оснований (*base excision repair*) [2]. Однако известно, например, что именно эта система удаляет основную часть индуцированных ионизирующей радиацией первичных повреждений ДНК (в том числе окисленные основания и однонитевые разрывы) уже в течение первого часа после облучения [2, 6]. Модуляция репарации ДНК может быть одним из эффективных и перспективных

путей оптимизации мутационного процесса и коррекции терапии некоторых заболеваний.

Одним из подходов к решению этой проблемы является изучение репарогенной активности антимутагенов. Исследования в этом направлении активно проводятся во всем мире. Неоднократно детально обсуждались полученные *in vitro* данные о влиянии на репарационные процессы парааминобензойной кислоты, α -токоферола, интерферона, некоторых растительных компонентов. Специфичность действия, которую проявляют большинство известных антимутагенов по отношению к тест-системам и мутагенам среды, характерна также и для модуляторов репарации ДНК. Это видно на примере ванилина, коричневого альдегида, изотиоцианатов [7–9]. Понятно, что метаболические реакции организма существенно модифицируют как повреждающее действие самого мутагенного фактора, так и эффекты антимутагенов. Поэтому целью данной работы являлось изучение модуляции репарации ДНК с привлечением в качестве объекта плодовой мушки дрозофилы. Это позволило проследить за мутационным процессом и его изменениями в половых клетках целостного организма, что особенно важно для прогнозирования эффектов не только у данной особи, но и у ее потомства.

Материалы и методы. *Химические соединения.* В качестве модуляторов репарации ДНК изучались производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) синтезированные в Латвийском Институте органического синтеза под руководством академика, д.х.н. Г.Я. Дубура: 1) 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридин (ДГП); 2) динатриевая соль 2-(2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксамидо) глутаровой кислоты – глутапирон (ГП). Оба препарата растворимы в воде. Следует отметить также, что производные 1,4-дигидропиридина, к которым относятся изученные соединения, являются аналогами дигидроникотинамида [10], что предопределяет их антиоксидантную и биологическую активность [11–13]. В качестве модельного химического мутагена использовали моnofункциональный алкилирующий агент этилметансульфонат (ЭМС) производства Sigma (CAS No. 62-50-0).

Объект исследований. Опыты выполнены на *Drosophila melanogaster*, использованы следующие линии дрозофилы: *Berlin wild* – дикий тип, *Basc* (содержащая запиратели кроссинговера в X-хромосоме и маркированная генами w^aB); *u ct v*, X-хромосома которой несет рецессивные гены, обеспечивающие желтую окраску тела, вырезку на крыле и ярко-красный цвет глаз; *mei-9^{L1}* и *u mei-9^a* – с дефектами эксцизионной репарации; *mei-41^{D5}* – с дефектом пострепликативной репарации [14]. В некоторых случаях использованы самцы, Y-хромосома которых содержит транслоцированный участок X-хромосомы, маркированный геном B^S .

Способы обработки. Самцов обрабатывали антимутагенами на стадиях личинок и имаго; самок – только на стадии имаго. Для обработки личинок антимутагены в необходимой концентрации добавлялись в питательную среду, на которой происходило развитие мух от яйца до имаго, при этом воздействию подвергались премейотические стадии сперматогенеза. Обработку имаго (самцов или самок) проводили путем кормления в течение 2 суток антимутагенами, растворенными в 3% сахарозе. Взрослые самцы подвергались обработке химическим мутагеном, экспозиционная доза ЭМС варьировала за счет разных концентраций (от 6 до 25 мМ) и продолжительности кормления (8 – 24 ч).

Анализ мутационных событий. В F_1 учитывали эмбриональную летальность (ЭЛ) по частоте всех неразвившихся яиц, позднюю эмбриональную летальность (ПЛ) по частоте темных яиц, погибших на поздних стадиях эмбриогенеза, постэмбриональную летальность (ПЭЛ) по отношению погибших личинок к живым, а

также суммарную летальность потомков в онтогенезе (СЛ). Кроме того, анализировали потери половых хромосом (ППХ) по частоте исключительного потомства, а именно, стерильных самцов ХО. Те и другие события обусловлены разрывами и перестройками хромосом [15] и позволяют оценивать кластогенные или антикластогенные эффекты тестируемых соединений.

В тех же семьях анализировали частоту рецессивных сцепленных с полом летальных мутации (РСПЛМ) по отсутствию определенного фенотипического класса мух в F₂: 1) самцов дикого типа при скрещивании в качестве родителей ♀ *Basc* × ♂ *Berlin*; 2) желтых самцов при скрещивании ♀ *Basc* × ♂ *y*; 3) самцов *w^aB* при скрещивании ♀ *Berlin* × ♂ *Basc*. Анализ частоты мутаций, также как и предыдущих показателей, проводили в индивидуальных культурах; обнаруженные летальные мутации подтверждались в F₃.

В некоторых экспериментах применяли хранение мутагенизированных сперматозоидов в семяприемниках самок, для чего получали ряд последовательных посадок, как описано ранее [14, 16, 17]. Мутационный ответ учитывали в выборочных посадках: 1-я соответствовала реализации сперматозоидов в течение первых 2-х суток после обработки, 3-я – 5–7-ми суткам и 5-я – 12–14-ти суткам хранения. В другой серии опытов проводили фракционирование мужских гамет по стадиям сперматогенеза по известной методике [15, 18]. Частота мутаций учитывалась в 1-й посадке, соответствующей ответу зрелых сперматозоидов, и суммарно в 4–5-й посадках, то есть в клетках, обработанных на премейотических стадиях сперматогенеза.

Частоты мутационных событий в разных вариантах одного эксперимента сравнивали по критерию хи-квадрат (χ^2); при анализе сопряженных выборок применяли тест Cochran. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерных программ, разработанных к.б.н. Б.Ю. Аношенко, а также стандартного программного обеспечения Microsoft-office.

Эффективность действия антимуагенов оценивали по редуциционному фактору (РФ), который характеризует степень подавления химического мутагенеза под влиянием модификатора.

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

где М – частота мутаций, индуцированных мутагеном; АМ + М – частота мутаций, регистрируемая в варианте комбинированного воздействия антимуагена и мутагена.

Результаты исследований и их обсуждение.

1. Влияние антимуагенов на системы материнской репарации ДНК.

Известно, что первичные повреждения ДНК, индуцированные в сперматозоидах, сохраняются до оплодотворения и затем репарируются ферментами, накопленными в ооцитах [14]. Это явление, названное эффектом материнской репарации, широко используется при изучении репарационных процессов в половых клетках.

При обработке самок с полноценной репарацией оба препарата существенно редуцировали частоты ЭМС-индуцированных разрывов хромосом, приводящих к летальности потомков в онтогенезе. Так, данные табл. 1 показывают, что глутапирон практически во всех посадках существенно уменьшал ЭЛ и ПЭЛ, вызванную мутагенной обработкой самцов. Воздействие ДГП на самок дикого типа оказалось неэффективным в первой посадке (без хранения), но антикластогенный эффект проявился при хранении мутагенизированной спермы в течение 5–6-ти и 13–14-ти суток (3-я и 5-я посадки, соответственно). Достоверность антикластогенного действия обоих препаратов подтверждена по тесту Cochran.

**Влияние ДГП и ГП на материнскую репарацию разрывов хромосом
(♀ Berlin × ♂ Berlin; ЭМС 25 мМ, экспозиция 24 ч)**

Доза АМ, мМ	Коли- чество яиц	Летальность, %				
		эмбриональная		ПЭЛ	СЛ	РФ, %
		ЭЛ	ПЛ			
<i>0–1 сут. хранения</i>						
Сах.3%	1686	7.89	1.77	10.62	17.67	
ДГП 10	1774	7.95	1.45	12.12	19.11	
ГП 10	1917	9.44	1.87	6.68	15.49**	12.32
<i>4–5 сут. хранения</i>						
Сах.3%	2401	22.78	2.47	18.12	36.78	
ДГП 10	3704	18.68	2.59	18.86	34.02*	0.08
ГП 10	2956	16.95	1.88	16.21	30.41*	17.32
<i>11–12 сут. хранения</i>						
Сах.3%	2135	43.37	5.77	21.84	55.74	
ДГП 10	1588	37.47	5.16	21.55	50.94**	8.61
ГП 10	1262	32.25	3.61	19.18	45.25**	18.82
Тест Cochran (z) для ДГП 10 мМ				2.72**		
для ГП 10 мМ				7.54**		

*P<0.05; **P<0.01 (между вариантами воздействия ЭМС на самцов и комбинированного воздействия ЭМС на самцов, а антимуутагена на самок)

На рис. 1 проиллюстрировано модифицирующее действие ДГП и ГП по средним величинам анализируемых показателей у репарационно-активных и дефектных по системам эксцизионной и пострепликативной репарации самок. Видно, что оба соединения проявляли защитное действие против ЭМС, если воздействию подвергались самки дикого типа. При обработке самок mei-9L1 они, как правило, не влияли на частоту летальных разрывов хромосом, индуцированных в сперматозоидах, а при обработке самок mei-41D5 – потенцировали действие мутагена. На диаграмме отмечены ошибки средних величин суммарной летальности потомков двух типов: первая (меньшая) вычислена по отношению к общей выборке яиц; вторая дает представление о колебаниях показателя по повторностям (т.е. посадкам и экспериментам). Заметим, что если у нормальных самок размах этих колебаний был незначительным, то эффекты антимуутагенов у самок с дефектами репарации были менее устойчивыми, а для самок mei-9 даже разнонаправленными.

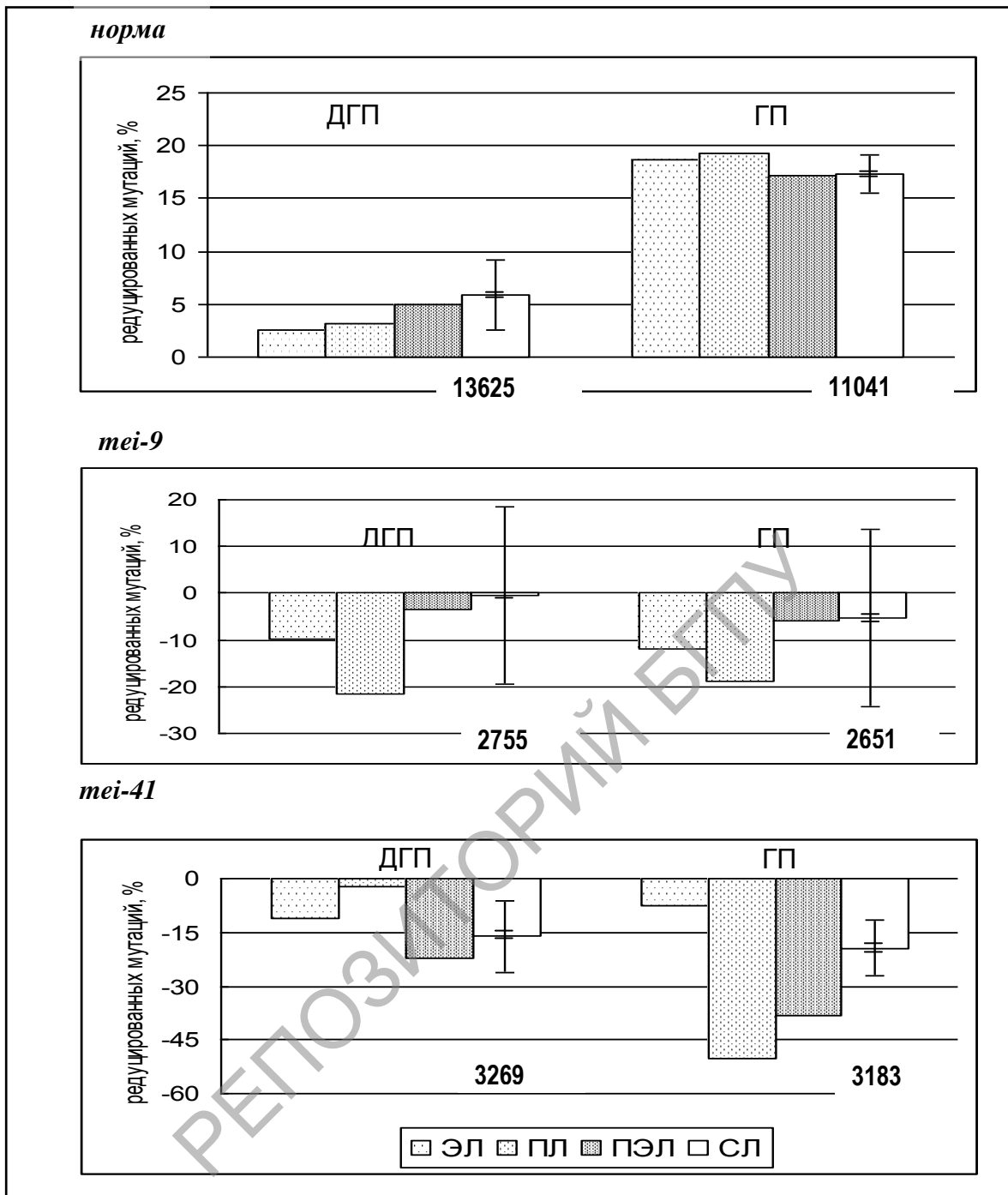


Рис. 1. Эффективность действия антимуагенов на материнскую репарацию в зависимости от репарационной способности самок

По оси абсцисс показано количество просчитанных яиц; по оси ординат – РФ (уровень редуцированных событий на разных стадиях онтогенеза, %)

Наблюдаемые колебания могли быть обусловлены некоторыми недостатками используемой тест-системы. Известно, например, что в пуле неразвившихся яиц встречаются неоплодотворенные, и более адекватным показателем генетических событий служит поздняя эмбриональная летальность [15]. Однако, корреляционный анализ показал полное соответствие результатов, полученных при определении ЭЛ и ПЛ (рис. 2 а); при этом отсутствовала корреляция между эффективностью антимуагенного действия (РФ) и уровнем ЭМС-индуцированных событий (рис. 2.б).

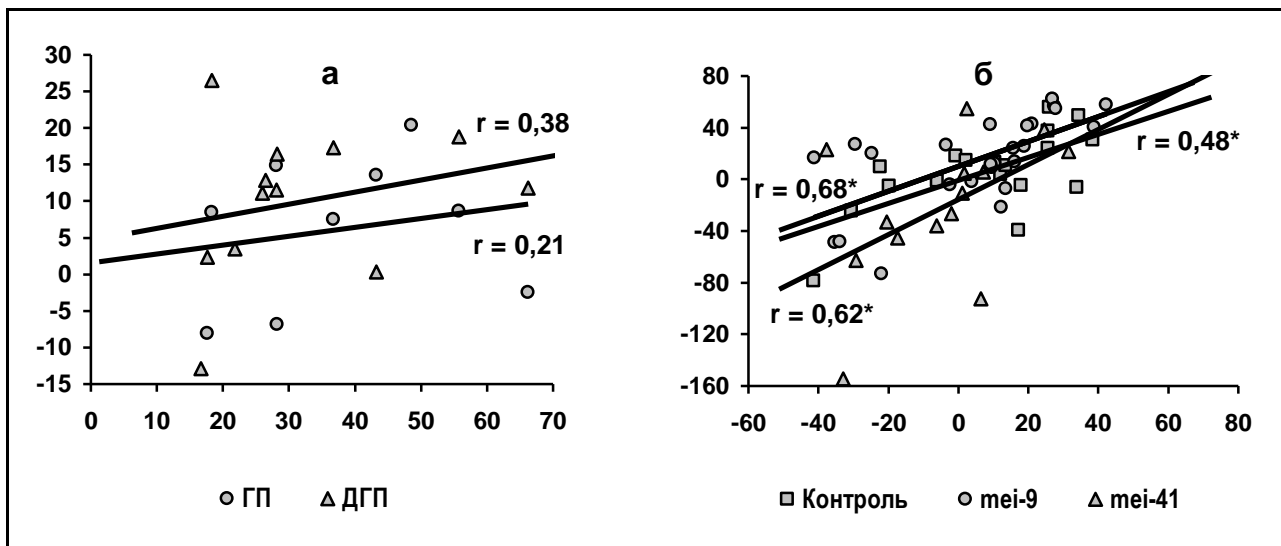


Рис. 2. Зависимость эффективности антимуутагенов от уровня ЭМС-кластогенеза (а) и тест-системы (б).

а) Ось ординат – частота редуцированных событий, вызывающих летальность потомков в отнтогенезе (СЛ, %); ось абсцисс – уровень ЭМС-индуцированной СЛ, %;
 б) Ось ординат – частота редуцированных поздних эмбриональных леталей (ПЛ, %); ось абсцисс – частота редуцированных эмбриональных леталей (ЭЛ, %).

Таким образом, воздействуя на нормально функционирующие материнские системы репарации, можно добиться снижения уровня летальных повреждений хромосом, индуцированных ЭМС у самцов. Оба соединения (ДГП и ГП) в той или иной степени снижают их частоты при хранении мутагенизированных сперматозоидов у самок дикого типа; дефекты репарации уменьшают чувствительность самок к антимуутагенам.

Данные табл. 2 показывают, что обработка глутапироном самок дикого типа снижает частоту РСПЛМ, индуцированных ЭМС у самцов *Basc*. Достоверные антимуутагенные эффекты получены как при достаточно высоком (24%), так и при низком (~4%) уровне индуцированного мутагенеза. Максимальная эффективность защитного действия препарата достигала 70%. Отсюда следует, что ГП способствует материнской репарации аддуктов ДНК, индуцированных в сперматозоидах и ответственных за точковые мутации.

Таблица 2

Влияние глутапирона на материнскую репарацию ЭМС-индуцированных генных мутаций при обработке репарационно-активных самок (♀ Berlin × ♂ Basc)

Обработка самок		Обработка самцов		Число хромосом	Частота РСПЛМ (%)
Вариант	экспозиция (час)	доза ЭМС, мМ	экспозиция (час)		
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 (между вариантами воздействия ЭМС на самцов и комбинированного воздействия ЭМС на самцов, а антимуутагена на самок)

2. Влияние антимуtagens на репарационные системы самцов дрозофилы.

При изучении принципиальной возможности модифицировать процесс становления ЭМС-индуцированных мутаций у самцов применяли несколько подходов: а) сравнивали влияние антимутагенной обработки имаго и личинок; б) использовали особей, имеющих дефекты различных путей репарации ДНК; в) изучали чувствительность к мутагенной и антимутагенной обработке стадий сперматогенеза, резко различающихся по активности репарационных процессов.

В первой серии экспериментов самцы выращивались на питательной среде с растворенными в ней производными 1,4-ДГИНК, что обеспечивало воздействие антимуtagens на личиночную стадию развития примерно в течение 4 суток. В табл. 3 представлены данные по модификации эмбриональной летальности, индуцированной ЭМС у самцов дикого типа, предварительно обработанных разными дозами ДГП. К 7–8-ми суткам хранения обработанных сперматозоидов у интактных самок ДГП в дозах 5, 60 и 90 мМ редуцировал частоту ЭМС-индуцированных летальных событий на 18–24%.

Обработка репарационно-активных личинок $+Y B^S$ глутапионом (10–20 мМ) приводила к снижению уровня летальности потомков на всех стадиях онтогенеза (табл. 4). В этом случае антимутагенное действие проявлялось сразу после спаривания, и защитный эффект поддерживался в течение двухнедельного хранения. При обработке личинок, имеющих дефекты в системах эксцизионной ($mei-9/Y \cdot B^S$) и пострепликативной ($mei-41/Y \cdot B^S$) репарации, не удалось выявить достоверного снижения частоты ЭМС-индуцированных разрывов хромосом, приводящих к летальности потомков F_1 . Анализ влияния ГП на выход ЭМС-индуцированных потерь половых хромосом выявил аналогичные результаты, что хорошо видно на рис. 3.

Таблица 3

Влияние обработки ДГП личинок самцов на выход ЭМС-индуцированных летальных разрывов хромосом при хранении обработанной спермы у самок
(♀ *Basc* × ♂ *Berlin*, ЭМС 25 мМ, экспозиция 24 ч)

Доза ДГП, мМ	Хранение, сут	Количество яиц		Частота ЭЛ, %
		отложенных	неразвившихся	
–	1–2	2131	144	6.76
5	1–2	2070	116	5.60
–	7–8	1100	181	16.45
5	7–8	1037	127	12.47*
–	1–2	3270	413	12.63
60	1–2	4876	750	15.38
90	1–2	4077	498	12.21
–	7–8	2253	459	20.37
60	7–8	2455	433	18.04*
90	7–8	2423	406	16.76*

* $P < 0.01$ (между вариантами воздействия ЭМС на имаго и предварительного воздействия антимуtagens на личинки)

Влияние обработки глутапироном личинок, различающихся по репарационной способности, на выход ЭМС-индуцированных летальных разрывов хромосом при хранении обработанной спермы у самок (ЭМС 12.5 мМ, экспозиция 16 ч)

Доза ГП, мМ	Хранение, сут.	Летальность, %			
		эмбриональная		пост-эмбриональная	суммарная
		общая	поздняя		
$\text{♀ Berlin} \times \text{♂ +/ Y B}^S$					
–	0–1	6.09	0.75	16.74	21.81
10	0–1	6.90	0.19	15.20	21.05
20	0–1	8.12	1.74	8.83	16.23*
–	13–14	47.49	14.18	15.65	55.71
10	13–14	18.84	2.79	19.77	34.88*
20	13–14	21.60	3.88	17.54	35.35*
$\text{♀ Berlin} \times \text{♂ mei-9/ Y B}^S$					
–	0–1	29.98	5.92	18.89	43.24
10	0–1	24.68	6.67	18.49	38.61
20	0–1	24.88	2.87	22.55	41.82
–	13–14	28.02	4.11	20.48	42.81
10	13–14	27.44	6.46	17.09	39.84
20	13–14	40.57	6.18	15.57	49.82
$\text{♀ Berlin} \times \text{♂ mei-41/ Y B}^S$					
–	0–1	13.20	3.04	17.90	28.74
10	0–1	6.80	1.03	14.17	20.00
20	0–1	11.38	0.89	18.21	27.51
–	13–14	47.64	6.49	20.14	58.18
10	13–14	23.77	4.81	14.89	35.12
20	13–14	43.33	6.42	18.63	53.89

* $P < 0.01$ (между вариантами воздействия ЭМС на имаго и предварительного воздействия антимуагенов на личинки)

При тех же способах обработки изучали влияние антимуагенов на выход ЭМС-индуцированных РСПЛМ (табл. 5). ДГП при воздействии на личинок дикого типа достоверно снижал уровень мутаций, причем степень редукции увеличивалась с дозой. При обработке таких же личинок ГП наблюдалась тенденция к снижению частоты ЭМС-индуцированных мутаций, которая полностью исчезала, если обрабатывались личинки *mei-9*. Таким образом, показано, что обработка премейотических клеток личинок производными 1,4-ДГИНК снижает уровень ЭМС-индуцированных летальных и нелетальных разрывов хромосом, а также точковых мутаций в сперматозоидах репарационно-активных особей и не влияет на выход этих событий, если воздействию подвергаются личинки, у которых нарушен процесс репарации ДНК.

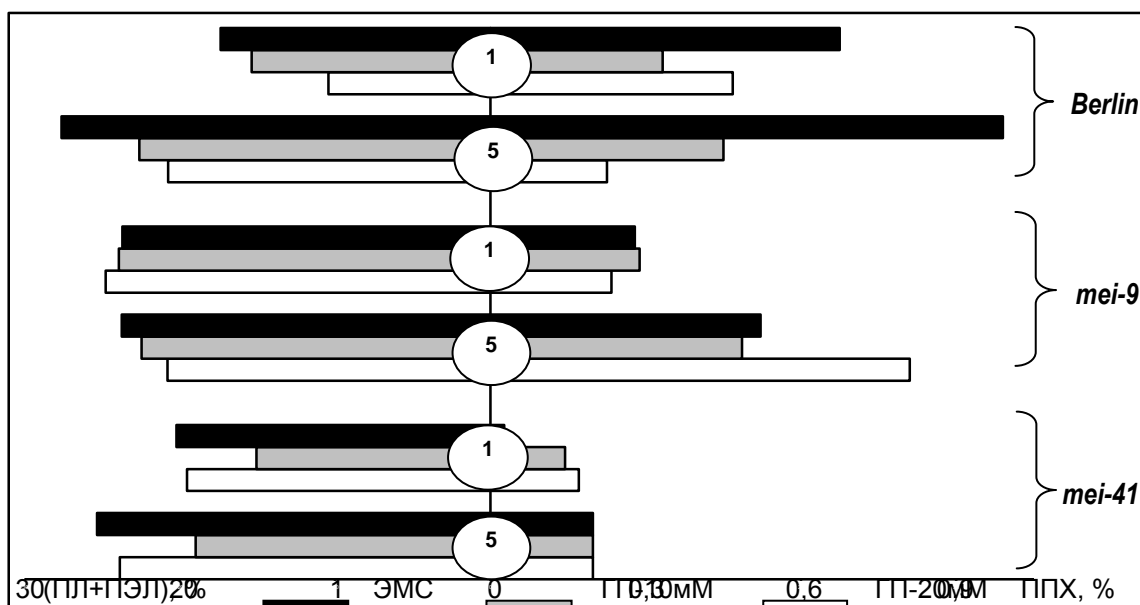


Рис. 3. Сравнение модифицирующих эффектов глутапирона на ЭМС кластогенез при обработке личинок, различающихся по репарационной способности

По оси ординат представлены посадки: 1-я посадка – без хранения; 5-я посадка – хранение спермы у самок в течение 14 суток; по оси абсцисс – суммарный уровень поздней эмбриональной и постэмбриональной летальности потомков (ПЛ+ПЭЛ, %) и частота потерь половых хромосом (ППХ, %).

Таблица 5

Влияние обработки ГП и ДГП личинок, различающихся по репарационной способности, на выход ЭМС-индуцированных РСПЛМ у самцов-имаго (ЭМС 10–25 мМ, экспозиция 10–24 ч)

Антимутаген	Количество		Частота РСПЛМ, %
	хромосом	леталей	
♀ <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*
–	785	172	21.91
ГП–10 мМ	880	170	19.43
ГП–30 мМ	448	86	19.20
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<0.01 (между вариантами воздействия ЭМС на имаго и предварительного воздействия антимуагенов на личинки)

Модифицирующий эффект ГП по отношению к ЭМС-индуцированным РСПЛМ изучался также при обработке взрослых самцов, у которых пул половых клеток представлен всеми стадиями сперматогенеза. Результаты табл. 6 показывают, что при предварительном кормлении самцов этим препаратом (5мМ) снижение частоты ЭМС-индуцированных мутаций происходит только в премейотических клетках. Достоверность защитного эффекта ГП на этих стадиях доказана с помощью теста Cochran при $P=0.056$. У самцов, дефектных по эксцизионной репарации, препарат не влиял на уровень мутабельности как пост-, так и премейотических клеток.

Таким образом, изученные производные 1,4-ДГИНК у самцов проявляли защитное действие при вполне определенных условиях: 1) при предварительном воздействии на взрослых особей они снижали мутабельность половых клеток без явных дефектов репарации на премейотических стадиях сперматогенеза; 2) при обработке личинок дрозофилы эффект антимуагенов проявлялся у особей с полноценной репарацией и был отмечен как по отношению к разрывам хромосом, так и точковым мутациям.

Таблица 6

Влияние глутапирона на частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ в зависимости от стадий сперматогенеза и репарационной способности самцов (ЭМС 12.5 мМ, экспозиция 21 час)

доза ГП, мМ	Количество		Частота РСПЛМ, %	Количество		Частота РСПЛМ, %
	хромосом	леталей		хромосом	леталей	
<i>♀ Basc × ♂ 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 × ♂ 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
Тест Cochran (z) для ДГП–5			0.79			0.44

* $P=0.05$ (между вариантами воздействия на премейотические клетки ЭМС и ЭМС в комбинации с антимуагеном); ** $P<0.01$ (между вариантами воздействия ЭМС на сперматозоиды и премейотические клетки).

Как показывают литературные и наши собственные данные, летальность потомков на разных стадиях онтогенеза вызвана разрывами хромосом и связана, в основном, с алкилированием молекулы азота в 7-м положении гуанина ДНК и последующим образованием апуриновых брешей [14, 16], которые являются мишенью для эксцизионной репарации. В отличие от этого, метод РСПЛМ позволяет учитывать внутрилукусные изменения, возникающие под влиянием ЭМС [19]. О

точковой природе этих мутаций свидетельствует также прямолинейная зависимость их частоты от молекулярной дозы мутагена [20] и отсутствие эффекта хранения по этому тесту [16]. Известно, что наиболее значительный вклад в алкилирующий мутагенез вносит O⁶-алкилгуанин; более того, доказана корреляция между частотой РСПЛМ у дрозофилы и образованием этого аддукта в половых клетках самцов [21]. Репарация O⁶-алкилгуанина у разных организмов, в том числе у дрозофилы, осуществляется алкилтрансферазами [22–24]. Хотя процесс становления точковых мутаций у дрозофилы может зависеть и от эффективности эксцизионной репарации [21], ее вклад, по-видимому, не столь значителен по сравнению с действием алкилтрансфераз. Таким образом, в данной работе учитывались разные типы мутационных событий, имеющих неодинаковую молекулярную природу и в репарации которых могли участвовать различные репарационные системы.

Описанные подходы позволили нам установить связь защитного действия антимуагенов дигидропиридинового ряда с репарацией ДНК в половых клетках *in vivo*. Нами показано, что эти соединения способны стимулировать материнскую репарацию, снижая уровень ЭМС-индуцированных повреждений хромосом и точковых мутаций; повышают точность репарации ДНК на премейотических стадиях сперматогенеза (как при обработке взрослых особей, так и личинок); защитные эффекты этих соединений проявляются на фоне нормально функционирующих систем репарации; дефекты репарации, обусловленные фенотипом *mei-9* или *mei-41*, понижают чувствительность как женских, так и мужских гамет к действию антимуагенов. Кроме того, изученные антимуагены обладают пролонгированным действием, которое проявляется как при обработке личинок, так и при обработке самок и последующем длительном хранении у них мутагенизированной спермы. Эти эффекты являются наиболее интригующими и подтверждают высказанное ранее предположение, что антимуагены способны модифицировать экспрессию генов, ответственных за репарацию ДНК и другие защитные системы [1].

Недавно, на VIII международной конференции по механизмам антимуагеноза и антиканцерогенеза (Pisa, 2003), было доложено, что некоторые антимуагены растительного происхождения, действительно, влияют на экспрессию генов репарации. Так, с помощью ПЦР-анализа показано, что *N*-ацетил-*L*-цистеин (NAC) при трансплацентарном воздействии на плод подавляет сверхэкспрессию некоторых генов, обеспечивающих ответ на окислительный стресс, репарацию ДНК и другие реакции у новорожденных животных [25]. И наоборот, эпигаллокатехин галлат (компонент зеленого чая) активизирует работу 15-ти из 140 протестированных генов, имеющих отношение к репарации ДНК [26], при этом максимальная индукция наблюдается через 4–8 часов после обработки лимфобластоидных клеток, и экспрессия генов уменьшается до контрольного уровня через 24 часа. Результаты указывают, что этот механизм хотя бы частично обуславливает антиканцерогенный эффект данного фенольного соединения.

Как известно, регуляция экспрессии генов происходит на уровне транскрипции. Однако, представляет определенный интерес посттрансляционная модификация ДНК и некоторых ферментов за счет поли-ADP-рибозилирования, которое свойственно высшим эукариотическим организмам и осуществляется с помощью поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP) [27, 28]. В экспериментах на животных и клетках человека, дефектных по этому ферменту, установлено, что наблюдаемая у них геномная нестабильность связана с изменениями в системе эксцизионной репарации оснований (BER) [29].

Модуляция PARP кажется наиболее вероятным механизмом влияния изученных производных 1,4-дигидропиридина на репарационные процессы. Первоначально такое предположение было сделано на основании аналогии данных

соединений дигидроникотинамиду [30]. Известно, что никотинамид ингибирует PARP [31]. С другой стороны, никотинамид активирует синтез NAD^+ , который в свою очередь, является источником ADP-рибозы для синтеза PARP [27, 28]. По современным представлениям внутриклеточный баланс никотинамида и NAD^+ играет важнейшую роль для поддержания целостности генома и устойчивости клеток к стрессовым факторам среды [32], его сдвиг в ту или другую сторону влияет на синтез и деградацию PARP. Следует отметить, что антимуtagenная активность одного из производных 1,4-дигидропиридина подтверждена методами гель электрофореза единичной клетки и учета микроядер в лимфоцитах человека [33, 34], при этом установлена обратная зависимость эффекта от дозы антимуtagена. Изучение кинетики репарации ДНК показало, что основная часть первичных повреждений, вызванных ионизирующей радиацией и ЭМС, устраняется за первые 15–60 мин после их индукции, что вполне согласуется со скоростью BER [6]. С помощью иммуноцитохимического анализа удалось показать, что этот же препарат способен изменять содержание поли-ADP-рибозы, причем ее индукция происходит под влиянием меньших доз, что соответствует данным “comet assay” [35] и в целом подтверждает ранее высказанное предположение о вмешательстве антимуtagенов этой серии в энергетический баланс клеток и поли-ADP-рибозилирование. Возможно, это один из путей регуляция экспрессии генов репарации.

Выводы. Изученные соединения дигидропиридинового ряда оказывают влияние на процессы материнской репарации первичных повреждений ДНК, индуцированных ЭМС в сперматозоидах, что приводит к снижению частоты хромосомных повреждений и точковых мутаций. Защитный эффект этих препаратов показан также при воздействии на премейотические стадии сперматогенеза у личинок и имаго дрозофилы. Таким образом, для реализации антимуtagенного потенциала необходимы определенные условия, а именно, активизация репарационных процессов в половых клетках. Кроме того, дефекты в системах репарации, обусловленные мутантным фенотипом *mei-9* или *mei-41*, уменьшают их чувствительность к действию антимуtagенов. Представленные результаты указывают на связь антимуtagенного действия производных 1,4-ДГИНК с репарацией ДНК. Данные о модуляции репарационных процессов, полученные в половых клетках целостного организма, согласуются с эффектами одного из соединений в лимфоцитах человека [33, 34]. Предполагается [30] и частично доказано [35], что одним из механизмов влияния антимуtagенов данного класса на репарацию ДНК может быть их вмешательство в NAD(NADP)-зависимые биоэнергетические процессы клетки и поли-ADP-рибозилирование.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. G. Duburs и Y. Uldrikis (Латвийский Институт органического синтеза) за синтез и предоставление производных 1,4-дигидропиридина. Авторы признательны также проф. J. Rzeszowska-Wolny за плодотворное сотрудничество и организацию исследований антимуtagенной активности и некоторых молекулярных механизмов действия данных препаратов в Онкологическом центре Института им. Марии Склодовской-Кюри, Отделение в г. Гливице (Польша).

РЕЗЮМЕ

О.В. ДАЛИВЕЛЯ, Н.В. САВИНА, Т.Д. КУЖИР, Р.И. ГОНЧАРОВА

МОДУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ ДНК НА ПРИМЕРЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Исследовано влияние двух производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты на репарацию ДНК при химическом мутагенезе в половых клетках дрозофилы. Показано, что изученные соединения снижают уровень ЭМС-индуцированных повреждений хромосом и точковых мутаций в половых клетках дрозофилы путем стимуляции систем материнской репарации первичных повреждений ДНК, индуцированных в сперматозоидах, а также активизируя репарацию ДНК на премейотических стадиях сперматогенеза у личинок и имаго самцов дрозофилы. Дефекты в системах репарации уменьшают чувствительность женских и мужских гамет к действию антимутагенов.

Summary

O.V. DALIVELYA, N.V. SAVINA, T.D. KUZHIR, R.I. GONCHAROVA

DNA-REPAIR MODULATION USING DERIVATIVES OF 1,4-DIHYDROISONICOTINIC ACID AS AN EXAMPLE

The influence of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid on DNA-repair involved in chemical mutagenesis in *Drosophila* germ cells was investigated. The compounds tested decreased the level of EMS-induced chromosome breakage and point mutations due to stimulation of maternal repair of DNA primary damage induced in spermatozoa as well as due to activation of DNA-repair in larvae and imago premeiotic stages of *Drosophila* males. Deficiency of DNA-repair systems lead to decrease in female and male germ-cell sensitivity to antimutagen action.