

**ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРУ АБЕРАЦІЙ,
ІНДУКОВАНИХ ДІОКСИДИНОМ В КЛІТИНАХ
ALLIUM CERA L.**

І.Р. Бариляк, В.М. Шкарупа, Л.В. Неумержицька
*Науковий центр радіаційної медицини АМН України
(Київ)*

Вступ

Як параметри хромосомної нестабільності найчастіше визначають частоту аберантних клітин чи аберацій. Але аналіз цитогенетичних ефектів з врахуванням й інших цитогенетичних критеріїв (пошкодженість аберантної клітини, спектр аберацій та особливості їх розподілу по клітинах) збільшує інформативність аналізу, дає більш повне явлення про характер цитогенетичних пошкоджень. Наявність такої інформації дозволяє перевірити різні гіпотези залежності частоти аберацій від дози і умов індукованого мутагенезу чи механізмів утворення аберацій хромосом [1].

Метою роботи було провести аналіз спектру аберацій хромосом, індукованих прооксидантним мутагеном діоксидином в клітинах кореневої меристеми насіння *Allium sera L.*

Матеріали та методи дослідження

Матеріал та методика проведених експериментів описані раніше [2]. Середню кількість аберацій на аберантну клітину (пошкодженість аберантної клітини - ПАК) визначали за відношенням загальної кількості аберацій до кількості аберантних клітин. При обчисленні ПАК всі клітини з множинними невизначеними абераціями та ті, які містили більше 5 аберацій, умовно відносили до класу з 6 абераціями. Такий підхід, хоч він і занижує рівень кількості аберацій на аберантну клітину, було використано тому, що точна ідентифікація пошкоджень в анафазній клітині, як правило, значно ускладнюється зі зростанням кількості аберацій в ній і стає практично неможливою,

коли їх більше ніж 5. До мультиаберантних (МАК) відносили клітини, що містили більше 5 аберацій та клітини з множинними невизначеними абераціями.

Отримані результати та їх обговорення

Серед пошкоджень, індукованих діоксидином спостерігали аберації як хроматидного так і хромосомного типів. В спектрі перебудов хромосом, індукованих діоксидином переважали хроматидні аберації обмінного типу. Спостерігали наступні морфологічні структури пошкоджень: фрагменти одинарні, фрагменти парні, кільцеві хромосоми, одинарні мости, парні мости, мости з фрагментами (одинарними чи парними) або без них; виявлено також мультиаберантні клітини. Деякі з вказаних хромосомних перебудов представлені на рис. 1.

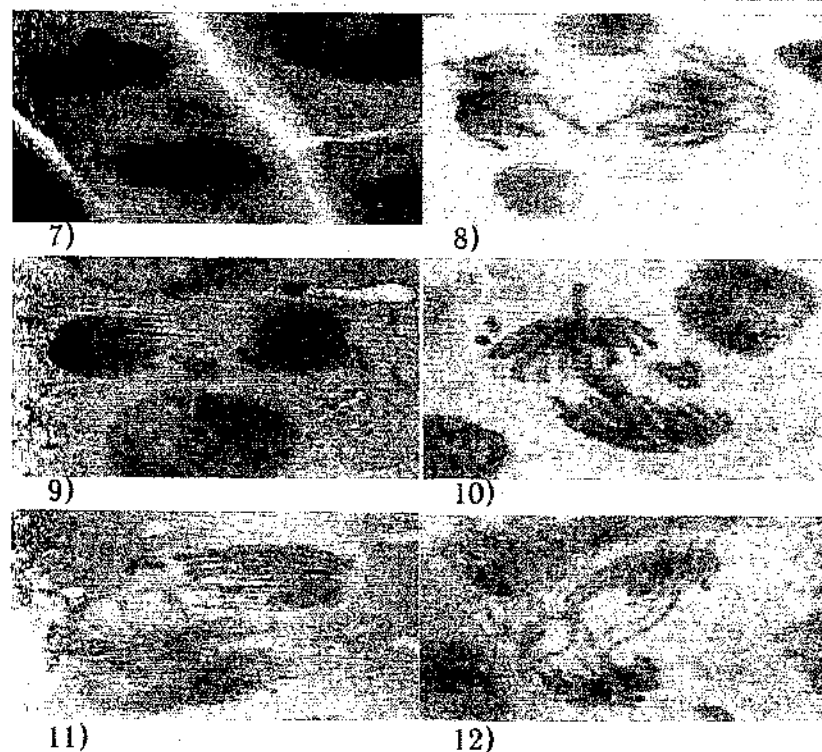
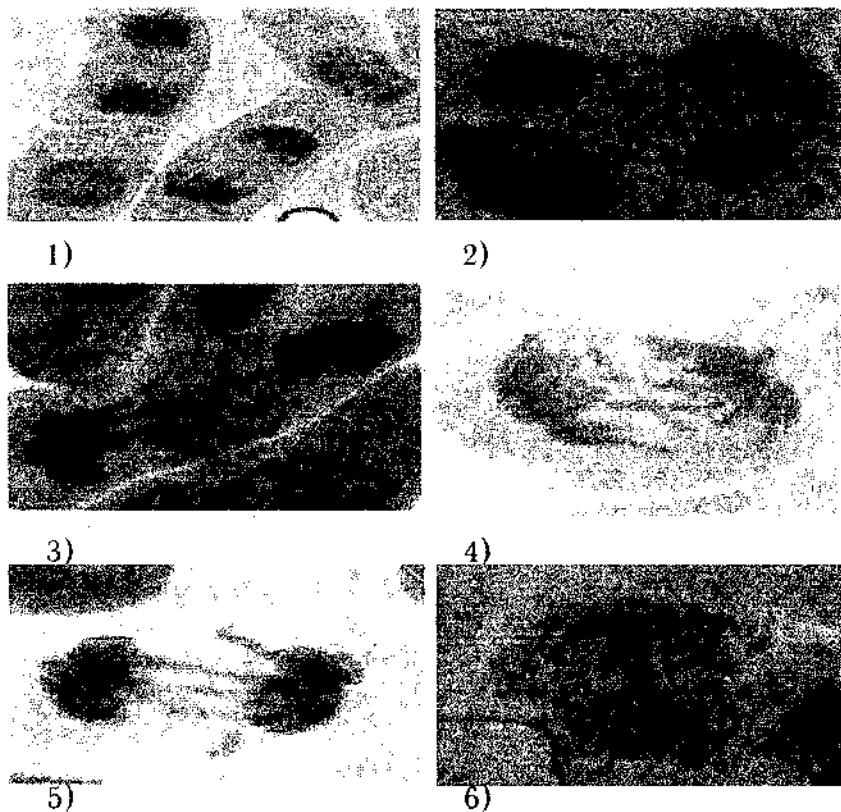


Рис. 1. Спектр аберацій хромосом, індукованих діоксидином в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.: 1,2 - одинарні мости; 3 - одинарні міст та фрагменти; 4 - одинарні мости і фрагмент; 5 - одинарні мости і фрагменти; 6 - кільцева хромосома; 7-9 - фрагменти; 10 - парний міст, фрагменти та вагрантні хромосоми; 11,12 - МАК. Фарбування ацетоорсеїном, зб. x 1000

Певне уявлення про механізми реакції клітин *Allium cepa* L. на дію хімічних мутагенів можна отримати при порівнянні частоти мостів та частки подвійних мостів. При цитологічних дослідженнях закономірностей спонтанного мутаційного процесу були виявлені два основних типи мутування [3]. Перший з них пов'язаний з появою первинних розривів і розділяється на два підтипи. *Allium cepa* L. відноситься до видів в яких хромосоми чутливі до дії природних хімічних мутагенів на різних фазах клітинного циклу, що призводить до утворення як хро-

матидних, так і хромосомних перебудов (на відміну від таких об'єктів як *Vicia faba* L., клітини людини *in vitro*, в яких розриви виникають при двонитковому стані хромосоми, що призводить до утворення тільки хроматидних перебудов). Другий тип мутаційного процесу пов'язаний з вторинними механізмами в утворенні перебудов хромосом, а саме - процесами злиття центричних та ацентричних фрагментів [3]. У представників роду *Allium* ці процеси здійснюються на високому рівні, внаслідок чого у них є значна кількість дицентриків, які з'являються в результаті злиття центричних фрагментів (у інших видів - *Triticum* L., *Vicia faba var minor* L., ці процеси частково пригнічені, в результаті чого у них переважають фрагменти). Таке злиття, як це було показано, - процес енергозалежний [3]. Оскільки утворення мостів зростало на фоні зниження ЧАА, автори розглядали мости як показник інтенсивності репарації. Ця точка зору підтверджується результатами спостережень вікової динаміки утворення мостів при природньому старінні насіння батуну та за умов γ -опромінення [4, 5]. Процеси злиття центричних фрагментів у представників роду *Allium* відбуваються досить інтенсивно: в дуже молодому насінні (віком 1-1,5 місяців) іноді всі аберації представлені мостами. При старінні насіння на фоні загального зростання кількості аберацій всіх видів частка мостів знижується [4]. Динаміка співвідношення мостів та фрагментів в залежності від концентрації діоксидину представлена на рис. 2.

В контролі, частота мостів становила 82,61% як серед загальної кількості аберацій так і серед загальної кількості ідентифікованих мостів та фрагментів. При дії діоксидину спостерігається вірогідне зменшення частки мостів та, відповідно, збільшення частки фрагментів. В контролі співвідношення фрагменти/мости дорівнює майже 1: 5. При дії найменшої концентрації мутагену (0,1 мг/л), воно змінюється до 1: 2,6, а при концентрації 90 мг/л - практично до 1: 1. Такі зміни можуть свідчити про те, що при збільшенні концентрації мутагену, порушується забезпечення енергетичних процесів в клітинах, які призводять до злиття розривів хромосом. Це

також дозволяє припустити, що одним з найбільш ймовірних наслідків збільшення діючих концентрацій мутагену в клітині є зниження ефективності репарації.



Рис. 2. Зміни спектру аберацій в клітинах *Allium* сера L. в залежності від концентрації діоксидину.

Разом з тим, слід відмітити збільшення частки мостів до 76,67% при концентрації діоксидину - 0,5 мг/л порівняно з 70,69% при концентрації 0,1 мг/л. Співвідношення фрагменти/мости для загальної кількості ідентифікованих аберацій цих типів дорівнює 1: 3,3 та 1: 2,6 відповідно. Саме при концентрації 0,5 мг/л відбувається різка зміна характеру дозової залежності по критеріям ЧАА, та кількість аберацій/100 клітин внаслідок зменшення мутагенної ефективності діоксидину. Спостерігається також певне зменшення співвідношення фрагменти/мости при дії найвищої концентрації мутагену (100 мг/л) порівняно з попередньою (90 мг/л): 1: 1,5 та 1: 1 відповідно.

В контролі всі аберації були хроматидного типу, хоча за даними літератури, для *Allium* сера L. можлива наявність аберацій цього типу при спонтанному мутагенезі [4]. Аберації хромосомного типу (парні мости та фрагменти) - результат нерепарованих пошкоджень хромосом, які відбулись в G1- періоді інтерфази. При анафазному методі не завжди вдається розрізнити подвійні фрагменти від одиничних, але мости хромосом-

ного типу досить чітко відрізняються від мостів хроматидного типу. Це дозволяє судити про те, в якому періоді інтерфази відбувається пошкодження хромосом. Крім того, подвійні мости можна розглядати як опосередкований показник інтенсивності дореplikативної репарації [5].

При дії діоксидину у найменшій концентрації (0,1 мг/л) частота парних мостів складала 2,44% (серед всіх мостів). При збільшенні концентрації мутагену в п'ять разів (0,5 мг/л), частота парних мостів складала вже 4,35%. Проте, при подальшому зростанні концентрації, частота хромосомних дицентриків була приблизно на однаковому рівні. Хоча і спостерігалось їх збільшення до 6,54% при 60 мг/л, при наступному зростанні концентрації частота парних мостів коливалась в діапазоні від 4,6% до 5,8%. Як правило, амплітуди коливань частоти хромосомних дицентриків не синхронні коливанням частоти суми всіх дицентриків (рис. 2).

Цитогенетичні критерії: частота аберантних клітин, частота аберацій, кількість аберацій на аберантну клітину, частота мультиаберантних клітин є параметрами нестабільності геному; вони характеризують дещо різні її сторони. Деякі мутагени здатні сильніше впливати на частоту клітин з абераціями, в той час як інші здатні індукувати нові пошкодження у вже пошкоджених клітинах [6, 7]. Зростання частоти аберантних клітин не завжди супроводжується аналогічними змінами середньої кількості аберацій на аберантну клітину; і - навпаки, при майже незмінних значеннях ЧАК може спостерігатися зростання кількості аберацій на аберантну клітину [4, 6, 8]. В інших роботах, підвищення частоти клітин з абераціями, індуковане γ -опроміненням та тіофосфамідом, супроводжувалось зростанням кількості аберацій хромосом на клітину [9, 10]. Все це може свідчити про існування різних механізмів, шляхів реалізації геномної нестабільності на хромосомному рівні при дії мутагенних чинників різних типів. В таблиці 1 представлені дані щодо динаміки змін ЧАА, ПАК та МАК при збільшенні концентрації діоксидину.

ЧАА зростає при збільшенні концентрації діоксидину в діапазоні 0,1 мг/л - 40 мг/л. В той же час, ПАК зростає лише в

діапазоні 0,1 мг/л - 10 мг/л, після чого відбувається поступове зменшення цього показника в діапазоні до 30 мг/л (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняльна динаміка показників цитогенетичних критеріїв в клітинах *Allium* сера L. із збільшенням концентрації діоксидину

Доза, мг/л	Всього клітин	ЧАА	Аберацій, n	Аберацій / 100 клітин	ПАК	МАК, n	МАК, %
0	2135	1,78	44	2,06	1,16	0	0
0,1	1760	2,44	57	3,24	1,33	0	0
0,5	1470	5,44	105	7,14	1,31	0	0
1	2176	6,07	199	9,15	1,51	1	0,76
5	1404	8,76	188	13,39	1,53	3	2,44
10	3089	12,58	654	21,17	1,72	12	3,16
20	2916	21,81	1049	35,97	1,65	19	2,99
30	2114	24,17	790	37,37	1,55	14	2,74
40	1746	29,55	830	47,54	1,61	16	3,10
50	2090	27,75	1040	49,76	1,79	28	4,83
60	1026	32,75	742	72,32	2,21	34	10,12
70	792	34,47	595	75,13	2,18	27	9,89
80	512	34,77	419	81,84	2,35	23	12,92
90	640	37,50	513	80,16	2,14	20	8,33
100	513	39,77	429	83,63	2,10	14	6,86

Це вказує на те, що в діапазоні концентрацій діоксидину до 10 мг/л - хромосомна нестабільність зростає за рахунок збільшення аберантних клітин та ПАК. В діапазоні 20 мг/л - 30 мг/л - в основному за рахунок появи аберацій в непошкоджених клітинах (оскільки на фоні збільшення ЧАА спостерігається зменшення ПАК). В діапазоні 40 мг/л - 50 мг/л ЧАА зменшується при збільшенні ПАК. В цьому випадку, зростання хромосомної нестабільності відбувається лише за рахунок появи нових аберацій у вже пошкоджених клітинах. В діапазоні високих концентрацій мутагену (80 мг/л - 100 мг/л) при незначному зростанні ЧАА, ПАК зменшується. Останнє може бути обумовлено затримкою мітозу у сильно пошкоджених клітинах.

В контролі та при дії двох найменших концентрацій діоксидину (0,1 мг/л та 0,5 мг/л) МАК не виявлено (табл. 1). При концентрації мутагену 1 мг/л спостерігали появу однієї мультиаберантної клітини. Проте, наявність лише однієї такої кліти-

ни не дає підстав твердити, що вона виникла внаслідок мутагенної дії діоксидину, оскільки подібна клітина могла з'явитися і в ході спонтанного мутаційного процесу. Досить значна частина МАК з'являється в діапазоні діючих концентрацій 5мг/л - 40 мг/л (2,44 % - 3,1 %). Однак, дозозалежних змін частоти МАК в цьому діапазоні не відбувається. Істотне дозозалежне зростання частоти МАК спостерігається при збільшенні концентрації лише починаючи з 50 мг/л (4,83%) і досягає свого максимуму (12,92%) при 80 мг/л.

Висновки

1. В спектрі перебудов хромосом, індукованих діоксидином переважають хроматидні аберації обмінного типу. При зростанні концентрації мутагену спостерігається зменшення частки всіх мостів порівняно з контролем при збільшенні частки парних мостів.

2. Зміни кількості аберацій на аберантну клітину з дозою мутагену не були такими значними, як за критерієм частота аберантних ана-телофаз. Наростання пошкодженості аберантної клітини відбувалося набагато повільніше.

3. Характерною особливістю цитогенетичної дії діоксидину є індукція мультиаберантних клітин. Проте, дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних спостерігається лише за умов значного мутагенного навантаження.

Література

1. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н.. *Наследственность человека и мутагены внешней среды* - М.: Медицина, 1989. - 270 с.
2. Шкарупа В.М., Неумержицька Л.В., Барияк І.Р. *Кількісний аналіз кластогенних ефектів, індукованих діоксидином. Характеристика кривої доза-ефект // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. праць.* - Київ, 2007. - Т. 1 - С. 555-560.
3. Дубинин Н.П., Руднева С.В., Щербаков В.К. *Специфическая модификация спектра структурных мутаций хромосом, возникающих при естественном мутировании // Генетика.* - 1967. - № 9. - С.35-39.

4. Лазаренко Л.М. *Цитогенетична оцінка мутабільності Allium fistulosum L. (Liliaceae, Magnoliophyta) при старінні насіння: дис. ... канд. біол. наук.* - Київ, 1999. - 120 с.

5. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. *Динамика хромосомной нестабильности батуна (Allium fistulosum L.): гамма-облучение семян разного срока хранения // Цитология и генетика.* - 2006. - № 4. - С.31-36.

6. *Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя / Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Спиринов Е.В. // Радиационная биология. Радиоэкология.* - 2002. - Т. 42, № 4. - С. 364 - 368.

7. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф., Храпунов С.М. *Зміни рівня хромосомних аберацій у батуна, пов'язані зі старінням насіння // Біологічні механізми старіння: матер. міжнарод. симп.* - Харків, 1996. - С. 88.

8. *Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності 1. Характеристика дозових залежностей / Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. // Цитология и генетика.* - 2003. - № 4. - С. 20 - 25.

9. Асташева Н.П., Храпцова Л.К. *Закономерности образования абераций хромосом в лимфоцитах крупного рогатого скота in vitro // Радиационная биология. Радиоэкология.* - 2002. - Т. 42, № 3. - С. 251 - 253.

10. Малащенко А.М., Бескова Т.Б. *Изучение межлинейных различий у мышей по чувствительности к ТiоТЭФ: опыт с рекомбинантными линиями // Генетика.* - 1995. - Т. 31, № 7. - С. 965 - 970.

Резюме

Барияк І.Р., Шкарупа В.М., Неумержицька Л.В. *Характеристика спектру аберацій, індукованих діоксидином в клітинах Allium сера L.* Досліджували особливості спектру аберацій хромосом, індукованих діоксидином в клітинах коренської меристеми Allium сера L. Аналізували дозові залежності за критеріями: частка всіх мостів та подвійних мостів, пошкодженість аберантної клітини, частота мультиаберантних клітин. В спектрі аберацій хромосом, індукованих мутагеном переважають хроматидні аберації обмінного типу. При зростанні концентрації мутагену спостерігається зменшення частки всіх мостів порівняно з

контролем при збільшенні частки парних мостів. Зміни кількості аберацій на аберантну клітину з дозою мутагену не були такими значними, як за критерієм частота аберантних клітин. Наростання пошкодженості аберантної клітини відбувається набагато повільніше. Дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних спостерігається лише за умов значного мутагенного навантаження.

Ключові слова: клітини *Allium cepa* L., аберації хромосом, діоксидин.

Резюме

Бариляк І.Р., Шкарупа В.М., Неумержицкая Л.В. *Характеристика спектра аберацій, індукцирваних двооксином в клітках *Allium cepa* L.*

Исследовали особенности спектра аберацій хромосом, індукцирваних двооксином в клітках корневої меристеми *Allium cepa* L. Аналізували дозові залежності по критеріям: доля всіх мостів і подвійних (парних) мостів, пошкодженість аберантної клітки, частота мультиаберантних кліток. В спектрі аберацій хромосом, індукцирваних мутагеном преобладають хроматидні аберації обмінного типу. При підвищенні концентрації мутагену спостерігається зменшення частоти всіх мостів в порівнянні з контролем при збільшенні частоти подвійних (парних) мостів. Зміни кількості аберацій на аберантну клітку при збільшенні дози мутагену не були такими значними, як по критерію частота аберантних кліток. Збільшення пошкодженості аберантної клітки відбувається значно повільніше. Дозозалежне збільшення частоти мультиаберантних кліток спостерігається тільки при умови значної мутагенної навантаженості.

Ключові слова: клітки *Allium cepa* L., аберації хромосом, діоксидин.

Summary

Barilyak I.R., Shkarupa V.M., Neumergitskaya L.V. *Characteristic of a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of dioxidin in cells root meristem *Allium cepa* L.*

Investigated features of a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of dioxidin in cells root meristem *Allium cepa* L. Analyzed the dose response by criteria: a share of all bridges and double bridges, quantity of aberrations per aberrant cell, frequency multiaberrant cells. In a spectrum of aberrations of the chromosomes induced of mutagen prevail chromatide aberrations of exchange type. At increase of concentration mutagens reduction of a share of all bridges in comparison with the control over increase in a share of double bridges is observed. Changes of quantity of aberrations per aberrant cell at increase in a doze of mutagen were not such significant, as by criterion frequency aberrant cells. The increase quantity of aberrations per aberrant cell occurs much more slowly. Doze dependences the increase in frequency of multiaberrant cells is observed only under condition of significant mutagen loading.

Key words: cells *Allium cepa* L., aberrations of chromosomes, dioxidin.

УДК 61.35:575.056.3

РЕЗУЛЬТАТИ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ПОДРУЖНИХ ПАР З ПЕРВИННИМ ТА ВТОРИННИМ НЕПЛІДДЯМ

**Н.Л. Гулеюк, І.Є. Гуменецький, Д.В. Заставна,
Н.В. Гельнер, І.А. Біль**

*Інститут спадкової патології АМН України (Львів)
Львівський міжобласний медико-генетичний центр
Львівський державний обласний перинатальний центр*

Вступ

За останні роки спостерігається неухильне зростання порушень репродукційної функції людини, яке відображається у збільшенні подружніх пар з первинним та вторинним непліддям та народженням дітей з вадами розвитку. На сьогоднішній день близько 14% подружніх пар страждають непліддям. Цитогенетичне обстеження є обов'язковим для неплідних пар, так як частота змін каріотипу серед них коливається в межах 2,5 - 10%. Характерними є транслокації, інверсії та кількісні аномалії хромосом [1,2]. Оскільки носії збалансованих перебудов хромосом в загальній популяції зустрічаються приблизно 1:400 або 1:500 новонароджених [цит.по 3], частота подружніх пар, в яких один з партнерів є носієм збалансованої транслокації, складає 1:100-200 [цит.по 3]. Винятком є інверсія прицентромерного гетерохроматина хромосоми 9 або 9ph (популяційна частота - 1-3%), яка на даний момент вважається варіантом норми [4].

Гоносомна моносомія Х-хромосоми (регулярна чи мозаїчна форми) - с.Тернера - є найчастішою генетично зумовленою формою жіночого непліддя. Частота регулярної Х-моносомії - 1:1500 живонароджених дівчат [5]. Характерні структурні перебудови Х-хромосоми, зокрема делеції та транслокації. Причому делеції зустрічаються в усіх ділянках, окрім Хр22.2-22.3 та Хq27-28. Транслокації Х; аутономи зустрічаються з частотою 1:30000 серед новонароджених. Характерною особливістю таких перебудов є те, що всі чоловіки-носії та більше