

ВАЙСФЕЛЬД Л.И.<sup>1✉</sup>, БОМЕ Н.А.<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4, e-mail: liv11@yandex.ru<sup>2</sup> Тюменский государственный университет, Россия, 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6, e-mail: bomena@mail.ru

✉ liv11@yandex.ru

## МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ФОСФЕМИДА НА КЛЕТОЧНОМ И ОРГАНИЗМЕННОМ УРОВНЯХ

Известно, что этиленимин и его производные алкилируют ДНК и белки [1, 2]. Этиленимин и этиленимины взаимодействуют с ДНК, индуцируют мутации у дрозофилы, высших растений, грибов, бактерий, вирусов и т. п. и вызывают абберации хромосом [3]. Химические соединения, вызывающие мутации и нарушения хромосом, получили название «химические мутагены». В 50–60-х годах за рубежом и позднее, с медленным возрождением генетики после пагубного периода «лысенкоизма», в СССР были развернуты цитогенетические исследования повреждений хромосом химическими мутагенами, именуемые перестройками, абберациями или структурными мутациями (по терминологии разных авторов). В механизме цитогенетического действия химических веществ и ионизирующей радиации было выявлено различие. При действии химических мутагенов в делящихся клетках, находившихся во время обработки в стадии митоза и на постсинтетической стадии ( $G_2$ ), перестроек хромосом не наблюдается. В асинхронной культуре перестроек не обнаруживают в течение 3–4 часов (в зависимости от объекта исследования) после обработки, так называемое «задержанное» действие. Перестройки обнаруживаются при вступлении в митоз клеток, обработанных в начале или в ходе синтеза ДНК (фаза S). В ана-телофазах между расходящимися хромосомами наблюдаются «мосты» хроматидного типа – одиночные с фрагментами или без них, возникшие в результате либо разрывов одной нити ДНК, либо при нарушении ее синтеза, которые сопровождаются непарными или парными фрагментами [4]. Большое число хромосом у многих объектов затрудняет идентификацию перестроек в метафазах. Поэтому у этих объектов изучают анафазы и телофазы. Для анализа экологического заражения окружающей среды ана-телофазный

метод достаточен. Примером может служить монография [5] и более современная работа по оценке загрязнения среды [6]. В Москве в 60–70-е годы обширные работы по цитогенетическому изучению химического и радиационного мутагенеза проводились Дубининым Н.П., его сотрудниками и учениками (Макеева Н.П., Сапрыкина Е.Н., Щербаков В.К., Кеслер Г.Н., Дубинина Л.Г., Лежачев Р.К., Митрофанов Ю.А., Немцева Л.С. и др.). Изучали цитогенетические эффекты производных этиленимина, лекарственных препаратов и других химических соединений, а также ионизирующей радиации. Из этого коллектива вышло большое число статей, сборников, несколько монографий. Л.Г. Дубинин ввел понятие «цепного процесса» в мутагенезе [4]. Параллельно в лабораториях Соколова Н.Н. и Сидорова Б.Н. (Андреев В.С., Шевченко В.В., Протопопова Е.М., Генералова М.В., Каграманян Р.Г., Гриних Л.И., Дурыманова С.Е. и др.) велись обширные работы на модельном объекте *Crepis capillaris* по индукции этиленимином хромосомных нарушений, их локализации в хромосомах, связи с фазами митотического цикла и с периодом синтеза ДНК при обработке этиленимином, тиоТЕФ и другими мутагенами. В начале 60-х годов, работая у Л.Г. Дубинина, было исследовано цитогенетический эффект фосфемиды (phosphemidum, синоним фосфазин) – ди-(этиленимид)-пиримидил-2-амидофосфорной кислоты. Препарат интересен тем, что содержит две этилениминные группы, соединенные валентными связями с азотом ( $N-CH_2-CH_2$ ), и пиримидиновое основание. Фосфемид был синтезирован в лаборатории противоопухолевых средств Всесоюзного научно-исследовательского химико-фармацевтического института [7]. Чернов В.А. с сотрудниками [7] показал, что фосфемид подавляет рост опухолей у крыс, мышей, кроликов, но при этом может

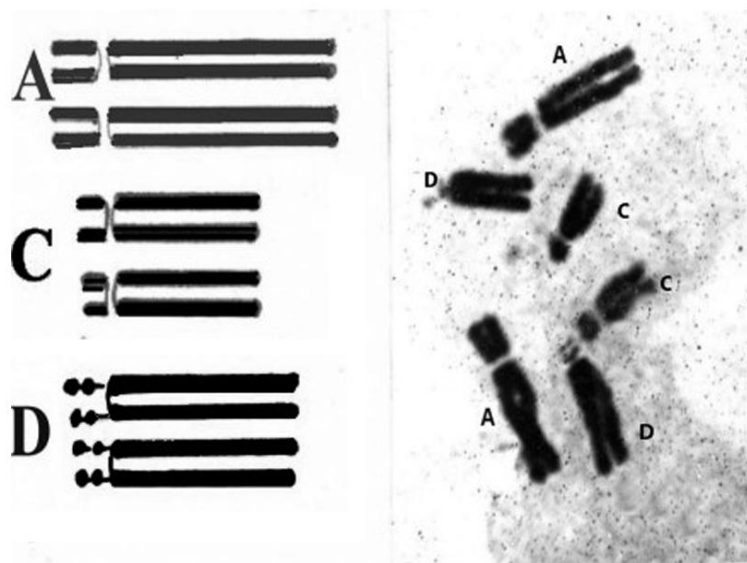
© ВАЙСФЕЛЬД Л.И., БОМЕ Н.А.

вызывать лейкопению, лейкоцитоз, влияет на эритропоэз.

Препарат представляет собой белый кристаллический порошок, растворимый в воде и спирте. Фосфемид до сих пор применяют для лечения онкологических заболеваний: лейкозов, лимфосаркомы, миелолейкоза, миеломной болезни, хорионэпителиомы, плазмоцитомы, трофобластической болезни [8]. Мы изучали цитогенетический эффект фосфемиды на первичной культуре эмбриональных тканей: фибробластах мыши и человека, анализировали хромосомные перестройки (ХП) в делящихся клетках на стадии анафазы или телофазы [9]. Фосфемид задерживал вступление клеток в митоз, подавлял митотическую активность (МА) фибробластов. Волны падения и подъема МА повторяли кривую в контроле, сдвинутую в сторону задержки фаз. Общий уровень МА в опыте с фосфазинном был ниже: в среднем составлял 54 % по отношению к контролю. Аналогичную динамику МА наблюдали в опытах по загрязнению окружающей среды [5]. В культуре фибробластов, как правило, не наблюдалось поражения веретена деления. На поздних сроках фиксации наблюдалось разрежение культуры в 3–4 раза (при оценке по числу ядер в поле зрения микроскопа). Фосфемид вызывал перестройки хромосом в течение длительного времени культивирования фибробластов. Перестройки появлялись, начиная с двух-трех часов после обработки. Рассмотрение типов перестроек показало достоверно, что в ана-телофазах выявлялись главным образом перестройки хроматидного типа. Их число возрастало в течение всего первого митотического цикла с максимумом в период прихода в митоз из фазы S основной части клеток и постепенно снижалось в более поздние сроки фиксации. На более поздних сроках фиксации обнаруживались отдельные двойные мосты. Они могли возникнуть как в результате удвоения хроматидных перестроек во втором цикле (в случае втягивания слипшихся хромосом в один из полюсов), так и в результате разрыва-слияния хромосом до стадии синтеза ДНК (фаза G<sub>1</sub>) [9]. Противоопухольевый эффект определяется хромосомными нарушениями в активно делящихся

клетках. Для анализа механизма нарушений хромосом необходимо было сопоставить период возникновения перестроек с фазами митотического цикла (МЦ). Желательно было бы найти объект, который, во-первых, был синхронизирован (или хотя бы относительно синхронизирован) в отношении фаз МЦ, во-вторых, удобен для анализа хромосом в метафазе. В этом отношении идеальным объектом представляются собой семена *Crepis capillaris* (L.) Wallr. (скерда). Выдающимся цитологом Навашиным М.С. [10] проведена серия работ по кариосистематике рода *Crepis* L. Изучено влияние длительного хранения семян в разных условиях влажности и температуры. Показано возникновение большого числа перестроек хромосом при старении семян. Поэтому мы использовали семена раннего урожая. Предполагалось, по результатам опытов с ионизирующей радиацией, что семена (но не проростки!) находятся в фазе G<sub>1</sub>. Однако фаза G<sub>1</sub> в семенах крепис неоднородна. Первые меченые ядра в семенах *Cr. capillaris* появляются через 10 часов после намачивания [11]. По мере прорастания семян в митоз приходят сначала клетки, которые были ближе по времени к синтезу ДНК. Если мутаген взаимодействует с хромосомой до начала синтеза ДНК, то после обработки семян мутагеном и образования проростков в метафазах должны появиться перестройки хромосомного типа. На метафазных пластинках *Cr. capillaris* хорошо различимы три пары гомологичных хромосом (рис.). Анализ перестроек в данном случае не вызывает сомнений. В работе [9] анализируется механизм повреждений хромосом и их связь с митотическим (клеточным) циклом. Ана-телофазным методом изучали асинхронные в отношении стадий митотического цикла объекты – первичную культуру эмбриональных клеток животных и человека, клетки меристемы кончика корня проростков растений.

Для индукции генетического разнообразия сельскохозяйственных культур обрабатывали фосфемидом семена яровой и озимой пшеницы. Анализировали фенотипические признаки первого и второго поколений.

Рис. Кариотип *Crepis capillaris* L.

### Материалы и методы

Исследовали воздушно-сухие семена *Cr. capillaris* урожая 1967 года в апреле (8 мес. хранения семян после сбора), июне (10 мес. хранения), июле (11 мес. хранения). В контроле и опыте анализировали перестройки хромосом в меристеме кончика корня. Определенный объем семян обрабатывали водным раствором фосфемиды в концентрации  $1 \times 10^{-2}$  М и  $2 \times 10^{-3}$  М при комнатной температуре (19–21°C) в течение трех часов. Затем семена промывали в водопроводной проточной воде в течение 45 минут и проращивали в растворе колхицина (0,01 %) при температуре 25°C. Отбирали проростки, «проклюнувшиеся» через 24, 27, 31, 36 часов после начала обработки, помещали их в отдельные чашки Петри для дальнейшего проращивания. Каждый «проклев» фиксировали в разные промежутки времени от 3 до 12 и даже через 36 часов после проклева. Для анализа хромосом на метафазных пластинках кончик корня (0,5–1 см) отрезали бритвой и помещали его в фиксатор: 96 %-ный этиловый спирт (3 части) + ледяная уксусная кислота (1 часть). Фиксатор сливали через 3–4 часа, проростки промывали 45 минут. Хранили корешки в 70 %-ном спирте. Готовили давленные временные препараты: кончики фиксированного корня окрашивали ацетокармином и раздавливали в растворе хлоралгидрата между предметным и покровным стеклом.

Анализировали перестройки хромосом на метафазных пластинках проростков в первом

делении после обработки семян ( $2n$ -кариотип). Подсчитывали все метафазы в каждом проростке. Оценивали также митотическую активность по числу проростков с метафазами. При концентрации фосфемиды  $2 \times 10^{-3}$  М проанализировано 929 проростков, при концентрации  $1 \times 10^{-2}$  М – 233 проростка, в контроле по всем срокам проанализировано 89 проростков. Митотическую активность проростков в контроле и опытах оценивали как по числу проростков с метафазами по отношению к числу просмотренных проростков, так и по числу метафаз по отношению ко всем просчитанным ядрам через 2, 4, 6, 8, 10 и 20 часов после начала замачивания. В каждом проростке просчитывали от 500 до 1000 ядер. Все данные статистически значимы.

### Результаты и обсуждение

**Естественный уровень – контроль** частоты метафаз с перестройками в разные годы урожаев (1966, 1967, 1969) колебался в пределах 90–99 %. В семенах урожая 1967 года наблюдалась тенденция к увеличению частоты перестроек по мере хранения семян. Митотическая активность (МА) в среднем составила около 95 %. Перестройки хромосомного типа встречались редко. За все годы обнаружено 50 таких перестроек. В семенах урожая 1967 года наблюдалась явная тенденция к увеличению частоты перестроек по мере хранения семян. МА в среднем составила около 95 %. Перестройки хромосомного типа встречались редко. За все годы обнаружено 50 таких перестроек. Нужно отме-

титель тенденцию к увеличению их числа при старении семян (урожай 1967 года, 19 месяцев хранения). Средний уровень метафаз с перестройками в разные годы был менее 2 %, перестроек хромосомного типа – менее 0,6 %. Воздействие фосфемид подавляло МА в проростках.

**После воздействия на семена фосфемид** в среднем по всем концентрациям и срокам фиксации в проростках проанализировано 17513 метафаз, среди них было 2306 метафаз с перестройками (13,17 %). Среди перестроек меньше одного процента составляли перестройки хромосомного типа – 0,113 %, сходного с естественной частотой. Частота метафаз с перестройками зависела от концентрации мутагена и возрастала с увеличением времени от момента «проклева» до фиксации проростков. При прорастиании семян в 2n-метафазах под воздействием фосфемид наблюдались перестройки только хроматидного типа. Воздействие фосфемид на семена подавляло МА в проростках. При концентрации фосфемид  $1 \times 10^{-3}$  М МА в среднем была 51,5 %, т. е. почти вдвое ниже, чем в контроле. В проклевках через 24, 27 часов частота митозов возрастала с возрастанием сроков фиксации от проклева. МА проростков, оцениваемая по числу метафаз по отношению к просчитанным ядрам через 2–10 часов после проклева, в контроле составила 2,11 % при подсчете 16000 ядер. В опытах с фосфемидом число митозов за этот же период (2–10 часов) было ниже в зависимости от концентрации фосфемид: при концентрации  $1 \times 10^{-2}$  М среди 16000 просчитанных ядер МА составила 0,73 %; при концентрации препарата  $5 \times 10^{-3}$  М – 0,82 % метафаз на 26500 ядер; при концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М было 1,42 % метафаз на 21000 ядер. Однако к 20 часам после начала обработки частота митозов повышалась как в контроле – 3,40 %, так и после обработки – 2,38 %. После обработки мутагеном в большей концентрации –  $5 \times 10^{-3}$  М встречались отдельные корешки с поражением всех метафаз или сильно пораженные отдельные метафазы. Торможение МА, как и в культуре фибробластов [9], указывает на возможность взаимодействия мутагена с белками, приводящими клетку к делению, без поражения веретена при более слабой концентрации. Напротив, более высокая концентрация мутагена приводила к фрагментации хромосом и разрушению веретена. Длительность общего подавления МА у исследо-

ванных объектов говорит в пользу сохранения мутагена в клетках.

**Динамика перестроек хромосом** (ПХ) под действием мутагена в разные сроки фиксации после проклева [9, 12]. Отбирали первые проклюнувшиеся проростки через 24 часа и 27 часов от начала обработки. Фиксировали 24-часовой проклев через 3, 6, 8 часов. Частота метафаз с перестройками нарастала с 9,4 % (через 3 часа), до 14–17 % через 6 и 8 часов. При 27-часовом проклев частота метафаз с перестройками колебалась от 21 % через 3 часа до 15 % через 5 часов, т.е. наблюдалась тенденция к повышению ПХ на более ранних сроках проклева и понижению на более поздних сроках фиксации от проклева. Все перестройки были хроматидного типа, общая частота перестроек хромосомного типа достоверно не превышала средний контрольный уровень: на 15138 метафаз всего 18 перестроек хромосомного типа – 0,119 %. Таким образом, фосфемид действовал в фазе S, как и большинство химических мутагенов. Возможно, мутаген сохраняется в семенах, связавшись с белками и другими компонентами клетки, тормозит переход из фазы G<sub>1</sub> к фазе S или тормозит прохождение синтеза ДНК, благодаря чему воздействие на хромосому оказывается более длительным и повреждается синтез большего числа локусов. В 60-е – 70-е годы выдающимися учеными Н.Н. Соколовым, Б.Н. Сидоровым с сотрудниками [13, 14] была проведена серия работ по воздействию этиленмина в ряде клеточных поколений в проростках *Cr. capillaris*. При выращивании проростков в растворе колхицина в течение 5 клеточных поколений они обнаруживали «неразмноженные», т.е. новообразованные, а не удвоенные перестройки хроматидного типа в тетраплоидных и большей пloidности клетках. В следующей работе приготавливали в качестве мутагена «кашицу» из обработанных ранее проростков. После обработки «кашицей» интактных корешков в первом же митозе обнаруживали перестройки хроматидного типа, т.е. вновь возникшие. Эти опыты показали, что этиленмин сохраняется в клетках в виде активных вторичных мутагенов. Казалось бы, столько было работ по химическому мутагенезу на клетках растений, фибробластах человека и мыши, что уже и делать там нечего. Однако остается еще проблема специфичности действия химического мутагена. Остается невыясненным, как мутаген взаимодействует с хроматидой: во время расхождения

нитей хромосомы или путем присоединения оснований к хромосоме; возможно, мутаген повреждает структурные белки хромосомы. Изложенные данные показали цитогенетические особенности действия мутагена на разных модельных объектах. Цитогенетический эффект фосфемиды подтвержден на этих разных объектах.

Мы посчитали важным использовать фосфемид для достижения разнообразия сельскохозяйственной культуры – *озимой и яровой пшеницы*. Сухие семена пшеницы обрабатывали фосфемидом в концентрациях, близких к испытанным на цитогенетических объектах. На яровой и озимой пшенице в двух поколениях получено большое разнообразие признаков [15, 16]. Изучены энергия прорастания, полевые показатели, морфометрические параметры, количественные признаки, всхожесть семян, выживаемость и продуктивность растений. Фосфемид в исследуемых дозах не был токсичен для проростков, не препятствовал перезимовке и дальнейшему развитию растений в полевых услови-

ях, несмотря на снижение части показателей. Изучена длина корней и побегов, высота растений, морфометрические параметры листьев. Эффект фосфемиды зависел от сорта и от стадии развития растений. У яровой пшеницы в  $M_2$  наблюдали изменения по 12 признакам: растения низкорослые, высокорослые, карликовые; зачатки остей на колосе; колос длинный, спельтоидный; желтая соломина и колос; широкий флаговый лист; прочная соломина; позднеспелые; раннеспелые.

### Выводы

Цитогенетический анализ четко показал, что фосфемид у культивируемых фибробластов и в клетках проростков *Cr. capillaris* индуцирует перестройки хромосом и подавляет митотическую активность. Фосфемид является эффективным мутагеном. Обработка фосфемидом семян сортов и гибридов яровой и озимой пшеницы вызывала большое разнообразие селекционно-ценных признаков.

### Литература

1. Росс У. Биологические алкилирующие вещества. Химия и пути поисков соединений с избирательной токсичностью. – М.: Медицина, 1964. – 259 с.
2. Волощук Т.П., Панковский Ю.В., Потопальский А.И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот этиленмином и его производными // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25, № 6. – С. 464–473.
3. Лавлес А. Генетические эффекты алкилирующих соединений. – М.: Наука, 1970. – 255 с.
4. Дубинина Л.Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaris*. – М.: Наука, 1978. – 187 с.
5. Лекавичус Р.К. Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды. – Вильнюс: Мокслас, 1983. – 223 с.
6. Калаев В.Н., Буторина А.К., Шелухина О.Ю. Оценка антропогенного загрязнения районов г. Старый Оскол по цитогенетическим показателям семенного семейства березы повислой // Экологическая генетика. – 2006. – Т. IV, вып. 2. – С. 9–21.
7. Чернов В.А. Цитотоксические вещества в химиотерапии злокачественных новообразований. – М.: Медицина, 1964. – 320 с.
8. Медицинский портал [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://medprep.info/>.
9. Вайсфельд Л.И. Цитогенетическое действие противоопухолевого препарата фосфемиды [Электронный ресурс] // Фундаментальная наука и практика. – 2010. – Т. 1, № 2. – С. 3–7. – Режим доступа: [http://teleconf.ru/index2.php?option=com\\_content&task=view&id=4577&pop=1&page=0&Itemid=55](http://teleconf.ru/index2.php?option=com_content&task=view&id=4577&pop=1&page=0&Itemid=55).
10. Навашин М.С. Проблемы кариологии и цитогенетики в исследованиях рода *Crepis*. – М.: Наука, 1985. – 349 с.
11. Протопопова Е.М., Шевченко В.В., Генералова М.В. Начало синтеза ДНК при прорастании семян *Crepis capillaris* // Генетика. – 1967. – № 6. – С. 19–23.
12. Weisfeld L.I. About Cytogenic Mechanism of Chemical Mutagenesis. Ecological Consequences of Increasing Crop Productivity: Plant Breeding and Biotic Diversity. – Toronto – New Jersey: Apple Academic Press, 2015. – P. 259–269.
13. Сидоров Б.Н., Соколов Н.Н., Андреев В.А. Мутагенный эффект этиленмина в ряде клеточных поколений // Генетика. – 1965. – № 1. – С. 121–122.
14. Андреев В.С., Сидоров Б.Н., Соколов Н.Н. Причины длительного мутагенного действия этиленмина // Генетика. – 1966. – № 4. – С. 28–36.
15. Боме Н.А., Вайсфельд Л.И., Арсентьев С.В. Развитие озимой пшеницы под влиянием химического мутагена фосфемиды // Междунар. научно-исслед. журнал. – 2015. – № 11 (42), часть 3. – С. 83–90.
16. Боме Н.А., Вайсфельд Л.И., Рипбергер Е.И., Арсентьев С.В. Чувствительность озимых и яровых форм *Triticum aestivum* L. к воздействию фосфемиды // Материалы Международного Конгресса «Экспо-хим-технология». РХТУ им. Д.И. Менделеева. Биотехнология «Состояние и перспективы развития». – 2015. – С. 82–83.

**WEISFELD L.I.<sup>1</sup>, BOME N.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Rus. Acad. Sci.,  
Russia, 119334, Moscow, Kosygin str., 4, e-mail: liv11@yandex.ru*

<sup>2</sup> *Tyumen State University,  
Russia, 625003, Tyumen, Volodarsky str., 6, e-mail: bomena@mail.ru*

**MUTAGENIC EFFECTS OF PHOSPHEMID AT THE CELLULAR AND ORGANISMAL LEVELS**

**Aim.** Study of cytogenetic effect of phosphemid on the fibroblast human and mice. Application of phosphemid for inducing mutagenesis wheat. **Methods.** We studied the cytogenetic effect of a alkylating agent, named phosphemide – di-(etilenimid)pyrimidy1-2-amidophosphoric acid, in cultured human fibroblasts and mouse and in seedlings plant *Crepis capillaris*. Besides we studied the seeds, seedlings and plants of spring and winter wheat. **Results.** We have shown that phosphemid inhibits mitotic cell division and it induces many aberrations in chromosomes. At plants of spring and winter wheat it was be shown, that a mutagen phosphemid was induced a wide range new characters, and among them were a number of useful characters for selection. **Conclusions.** It is proposed the use of a new chemical mutagen named phosphemid in order for obtaining a wide variety of crops and for creation new varieties.

**Keywords:** chemical mutagenesis, cytogenetics, wheat, plant selection, fibroblasts, *Crepis capillaris* (L.) Wallr.