



Межвидовые различия в чувствительности клеток костного мозга у мышей и крыс к индукции мутаций тиофосфамидом

Х.Х.Семенов, Н.Н.Каркищенко, Т.В.Бескова, Е.Л.Матвеевко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Контактная информация: matveyenkoel@mail.ru

Работа посвящена сравнительному исследованию частот аберраций хромосом в клетках костного мозга у мышей и крыс. В эксперименте использованы мыши линии C57BL/6Y – наиболее чувствительной к тиофосфамиду (тиоТЭФ) и крысы НУ/Y – низкоустойчивые к гипобарической гипоксии. Животные поддерживаются в коллекционном фонде НЦБМТ РАМН. Экспериментально установлено, что по уровню индуцированных аберраций хромосом в клетках костного мозга крысы с высокой степенью достоверности превосходили мышей, однако по частоте спонтанных хромосомных нарушений у этих близких видов различий не обнаружено.

Ключевые слова: мыши, крысы, индукция мутаций, хромосомные аберрации.

Профилактика наследственной патологии в целом, несомненно, является важнейшим разделом современной медицины и организации здравоохранения. Это и понятно. Здоровая наследственность – главное достояние нации. Основной угрозой для наследственности являются мутагены. Это различные факторы, способные вызывать наследуемые изменения генетических структур – мутации. Мутации могут возникать в соматических и генеративных клетках, а также клетках развивающегося зародыша и плода.

Основные медицинские последствия мутаций – наследственные болезни и бесплодие, злокачественные новообразования и нарушение иммунитета, врожденные пороки развития и спонтанные аборт. Так, вновь возникающие злокачественные новообразования ежегод-

но диагностируются у 300-500 тыс. жителей России. Бесплодием, имеющим генетические причины, страдает каждая 10-я супружеская пара, а спонтанными абортами заканчивается примерно половина состоявшихся беременностей. Инвалидами по причине врожденных пороков развития становятся от 300 до 500 тыс. человек в год. Опасность мутагенных воздействий трудно переоценить, более того, она с каждым годом нарастает. Под названием мутагены объединяют различные факторы, химической, физической или биологической природы. Конечно же главными действующими мутагенными факторами для нас являются лекарственные препараты. Важным звеном в профилактике наследственной патологии, иначе в защите наследственности, являются надежные тест-системы

для выявления мутагенной активности химических соединений. И хотя химический мутагенез был открыт в 40-х годах прошлого столетия [10, 14, 17], но до сих пор не разработана чувствительная экспериментальная тест-система, которая позволила бы достаточно надежно установить мутагенный эффект химических соединений и сделать практические выводы и рекомендации. Важным звеном в этом направлении исследований остается правильный выбор экспериментальной биомодели. В настоящее время для оценки мутагенной активности химических соединений используются главным образом лабораторные мыши и очень незначительно число исследований этого процесса у крыс. Вместе с тем как по срокам развития, так и по степени генетической изученности эти виды мало отличаются между собой. Вторым важным моментом является то, что исследования такого рода целесообразно проводить с использованием веществ с хорошо изученным действием. Таковым является тиофосфамид (тиоТЭФ) – соединение, несущее три функциональные этиленовые группы. Эффект тиоТЭФ изучен на мышах [4-11], на культуре фибробластов и на лейкоцитах человека [2, 3, 15]. Это соединение вызывало высокую частоту разрывов хромосом у всех указанных объектов.

В настоящем сообщении приведены данные о характере хромосомных нарушений, возникающих после воздействия тиофосфамидом в дозе 2,5 мг/кг в клетках костного мозга у мышей и крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на 10 недельных самцах мышей линии C57BL/6Y – наиболее

чувствительных к тиоТЭФ и крысах НУ/Y – низкоустойчивых к гипобарической гипоксии, поддерживаемых в коллекционном фонде НЦБМТ РАМН. Животных как до, так и во время опыта содержали в стандартных клетках Т2 (для мышей) и Т3 (для крыс) фирмы “Velaz” и кормили гранулированным комбикормом ПК-120. В опыте и контроле были использованы по 5 животных каждого вида и изучали по 100 клеток от каждой особи. Фармацевтический препарат тиофосфамид растворяли в физиологическом растворе в концентрации 2,5 мг/кг и вводили внутривентрально сразу после разведения. Для накопления метафаз за 2,5 часа до приготовления препаратов вводили 0,025% раствор колхицина по 0,01 мг на 1 грамм веса внутривентрально. Препараты были приготовлены по общепринятой стандартной методике [16]. Для цитогенетического анализа отбирали клетки, удовлетворяющие критериям, предложенным Бочковым Н.П. с соавторами [2]. В каждой метафазной пластинке регистрировали число клеток со структурными нарушениями хромосом. Принимая во внимание возможность артефактов, связанных со спецификой приготовления препаратов, клетки с анеуплоидией не учитывались. При анализе характера повреждений хромосом регистрировали гены (ахроматические пробелы), хроматидные обмены, а также фрагменты (одиночные и парные) и кольца.

Результаты и их обсуждения

Результаты цитогенетического исследования частот и типов хромосомных повреждений, возникающих как спонтанно, так и индуцированных тио-

ТЭФ в дозе 2,5 мг/кг в клетках костного мозга у мышей и крыс представлены в таблице. При анализе препаратов костного мозга контрольных животных обоих видов зарегистрировано незначительное число клеток со структурными aberrациями: 0,2% – у крыс и 0,4% – у мышей из 500 метафаз. Структурные aberrации представлены одиночными и редко парными фрагментами (рис.). Общий процент клеток с нарушениями составил в контроле у мышей – 0,8%, у крыс – 0,6%. Результаты анализа свидетельствуют, что различия по уровню спонтанных aberrаций хромосом в клетках

воздействия тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг показал, что частота клеток со структурными aberrациями хромосом у мышей составила 9,2%, против 0,4% в контроле. По этому типу нарушений отмечено достоверное отличие опыта от контроля ($p > 0,001$). При этом основную часть повреждений хромосом составляют одиночные и парные фрагменты (7,2%). Доля ахроматических пробелов (гепы) из 500 клеток у мышей составляет 1,8% в опыте и 0,4% в контроле.

Относительно более сложных структурных aberrаций – колец и обменов, следует заметить, что их доля значи-

Таблица

Частота и спектр хромосомных нарушений в клетках костного мозга мышей и крыс после введения тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг (через 24 часа)

Показатель	Вид животных							
	Мыши				Крысы			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
	общее число	%	общее число	%	общее число	%	общее число	%
Просмотрено клеток	500	100	500	100	500	100	500	100
Число клеток, содержащих только гепы	2	0,4	9	1,8	2	0,4	28	5,6
фрагменты	2	0,4	36	7,2	1	0,2	105	21,0
кольца	–	–	5	1,0	–	–	6	1,2
обмены	–	–	5	1,0	–	–	40	8,0
только структурные aberrации	2	0,4	46	9,2	1	0,2	151	30,2
повреждения, включая гепы	4	0,8	55	11,0	3	0,6	179	35,8

костного мозга мышей и крыс не достоверны. Анализ метафазных клеток костного мозга у этих видов животных после

тально ниже. Зарегистрированы обмены с вовлечением двух хромосом, сложных обменов с вовлечением трех и бо-

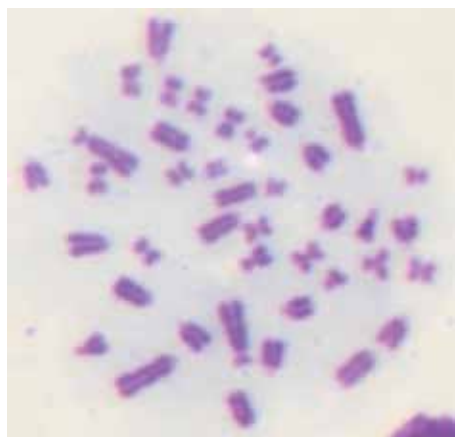
лее хромосом обнаружено не было. Таким образом, суммарное количество повреждений хромосом в клетках костного мозга у мышей в опыте достоверно превышает те же показатели у контрольной группы животных. Вместе с тем при просмотре препаратов из клеток костного мозга крыс после воздействия тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг было установлено, что число поврежденных клеток (не включая гепы) из 500 составило 30,2% против 9,2% у мышей и 0,6% в контрольной группе крыс. Следовательно, частота клеток со структурными aberrациями у крыс опытной группы с высокой степенью достоверности превосходит этот показатель у мышей и тем более у крыс контрольной группы. Основным типом aberrаций, индуцированных этим мутагеном у крыс, как и у мышей, были одиночные фрагменты, появляющиеся вследствие хроматидного разрыва. На долю кольцевых хромосом приходится наименьшая часть структурных aberrаций – 1,2%. Существенную часть (26,5%), индуцированных тиоТЭФ структурных aberrаций составляют обмены. У крыс также как и у мышей преобладают обмены с вовлечением двух хромосом. Сложные обмены с вовлечением трех и более хромосом встречаются редко. Что касается клеток со множественными aberrациями, свидетельствующими об эффективности действия мутагена, то только у крыс была зафиксирована 1 клетка со множественными повреждениями хромосом. Число клеток с тремя и четырьмя повреждениями на клетку было значительно больше. Количество клеток с гемами у крыс в опыте было зафиксировано 28 (5,6%), в контроле их было лишь 2 (0,4%). Также высока была раз-

ница по этому показателю между крысами и мышами в опыте: 28 и 9, соответственно.

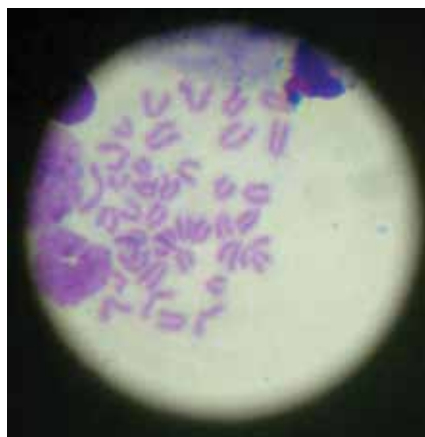
Наблюдаемое распределение клеток по типу и частоте aberrаций у исследуемых видов животных наглядно иллюстрирует представленная диаграмма (рис. 3), на которой отчетливо виден ответ клеток костного мозга мышей и крыс на воздействие тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг.

В целом проведенный анализ показал, что имеет место существенное межвидовое различие в чувствительности клеток костного мозга мышей и крыс к индукции мутаций тиофосфамидом. Частота хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс после воздействия тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг высоко достоверно превышала этот показатель мышей. В то же время, как свидетельствуют результаты исследований по спонтанному уровню aberrаций хромосом у этих близких видов различий не обнаружено.

Сравнительный анализ метафазных клеток костного мозга показал, что по уровню индуцированных тиофосфамидом хромосомных нарушений крысы высоко достоверно превосходили аналогичные показатели мышей, в то время как по числу спонтанных aberrаций хромосом различий между ними не установлено. Хорошо известно, что спонтанный и индуцированный мутагенные процессы находятся под генетическим контролем, причем гены, повышающие частоту мутирования (гены-мутаторы) в большинстве случаев оказываются дефективными генами систем генетической репарации [1]. Видимо, в геноме крыс значительно больше число дефективных генов, препятствующих генетической репарации, чем и обусловлено



А

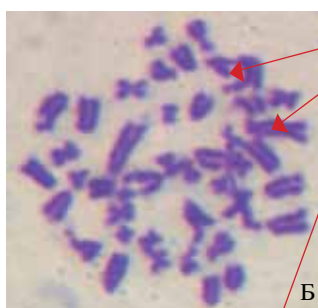


Б

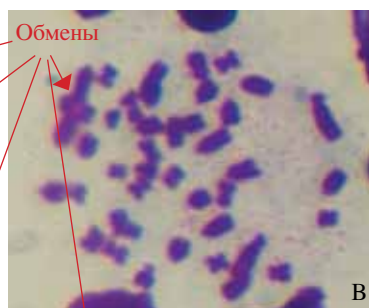
Рис. 1. Нормальный кариотип: А – крысы, Б – мыши



А



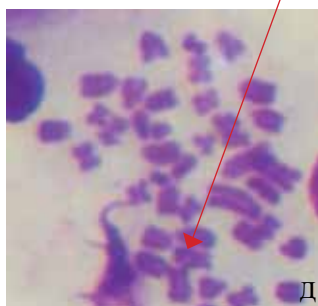
Б



В



Г



Д



Е

Рис. 2. Хромосомные aberrации. А – фрагмент, Б, В, Д, Е – обмен, Г – кольцо, Е – геп.

различие по частоте хромосомных нарушений между сравниваемыми видами.

Интересен еще и тот факт, что в наших ранних исследованиях на мышах была зарегистрирована положительная корреляция между ответом на мутаген и частотой спонтанных хромосомных нарушений. Она свидетельствует о генетической детерминированности ответа

на химический мутаген. Вместе с тем на крысах эта закономерность, по неизвестной причине, не была соблюдена. Напротив, частота спонтанных aberrаций хромосом у них была ниже, чем у мышей. Весьма важен вопрос о сравнительной чувствительности соматических и половых клеток. Ранее нами были проведены исследования частот доминантных

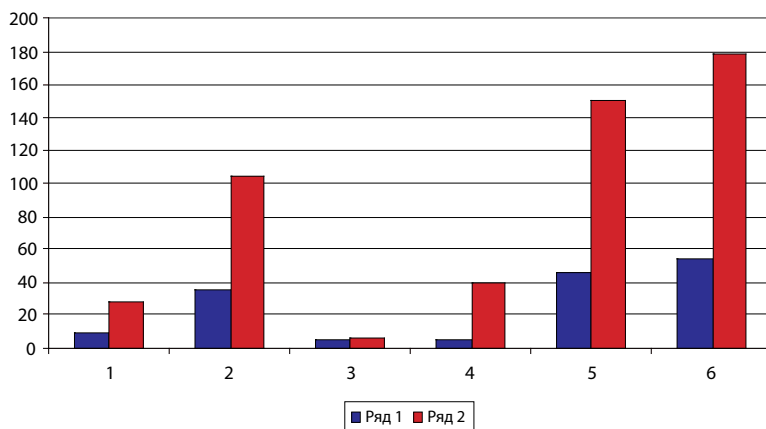


Рис. 3. Диаграмма частоты и спектра хромосомных нарушений в клетках костного мозга мышей и крыс после введения тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг. Условные обозначения: 1 – только гены; 2 – фрагменты; 3 – кольца; 4 – обмены; 5 – только структурные aberrации; 6 – повреждения, включая гены. Ряд 1 – мыши; Ряд 2 – крысы.

летелей (ДЛ), индуцированных тиоТЭФ в дозе 1,25 мг/кг в половых клетках самцов мышей [13] и крыс [12]. Установлено, что ДЛ, вызванных эффектом мутагена, составили у мышей – 38,86%, у крыс – 97,59%.

Согласно полученным экспериментальным данным можно заключить, что мужские половые клетки (сперматиды) по чувствительности к мутагену значительно превосходили соматические клетки и, что между исследуемыми видами животных по чувствительности к тиоТЭФ независимо от дозы сохранились те же соотношения, что и в варианте с клетками костного мозга.

Выводы

Проведено сравнительное исследование мышей C57BL/6Y и крыс НУ/Y по частоте хромосомных aberrаций в клетках костного мозга, индуцированных тиоТЭФ в дозе 2,5 мг/кг.

Полученные данные свидетельствуют, что эти близкие виды по ответу на

мутаген существенно различаются между собой.

Установлено, что по уровню индуцированных aberrаций хромосом крысы достоверно превосходили мышей, хотя по частоте спонтанных нарушений хромосом различий не наблюдалось.

Список литературы

1. *Ауэрбах Ш.* Проблемы мутагенеза. – М., 1978.
2. *Бочков Н.П., Козлов В.М., Севаньякаев А.В., Антошина М.М.* Анализ анеуплоидии в культурах эмбриональных фибробластов и лейкоцитов человека // Генетика, № 10, с. 120, 1966.
3. *Дубинин Н.П., Митрофанов Ю.А., Мануйлова Е.С.* Анализ мутагенного действия тиоТЭФ на клетки культуры тканей человека // Известия АН СССР, серия Биология, № 4, с. 477, 1967.
4. *Лильн И.Г., Бизикоева Ф.З., Полетаева И.И., Иванов В.И.* Поведение взрослых мышей разных линий после воздействия тиофосфамида во время органогенеза // Генетика, 199, т. 31, № 1, с. 101-110, 1995.
5. *Малашенко А.М.* Межлинейные различия в чувствительности мужских половых клеток у мышей к индукции доминантных летелей тиофосфамидом. // Генетика, т. XVI, № 9, с. 1577-83, 1980.

6. **Малашенко А.М., Семенов Х.Х.** Роль генотипа самок в проявлении доминантных летальных мутаций, индуцированных тиофосфамидом в сперматидях самцов мышей // Генетика, т. XVI, № 11, с. 2002-08, 1980.
7. **Малашенко А.М.** Некоторые закономерности химического мутагенеза у лабораторных млекопитающих // Вестник АМН СССР, 1982.
8. **Малашенко А.М., Бескова Т.Б.** Индукция хромосомных нарушений тиофосфамидом в сперматооогах мышей инбредных линий 101/HY, TPS/Y и CBA/LacY // Генетика, т. XXIV, № 3, с. 468-73, 1988.
9. **Малашенко А.М., Бескова Т.Б.** Изучение межлинейных различий у мышей по чувствительности к тиоТЭФ. Опыт с рекомбинантными линиями // Генетика, т. 31, № 7, 1995.
10. **Раннопорт И.А.** Карбонильные соединения и химический механизм мутаций // Генетика, 1946, т. 54, № 1, с. 65-67.
11. **Семенов Х.Х., Малашенко А.М.** Проявление доминантных летальных мутаций в раннем эмбриогенезе мыши // Генетика, т. XVII, № 3, 1981.
12. **Семенов Х.Х., Уолкер Д.** Индукция доминантных леталей в половых клетках самцов крыс тиофосфамидом // Тез. всесоюзн.конф. «Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований» – М., 1988, с. 124-127.
13. **Семенов Х.Х., Малашенко А.М.** Поиск гетерозиготных по транслокациям самок мышей среди потомков от самцов, подвергнутых воздействию химического мутагена (тиоТЭФ) // Цитология и генетика, т. XI, № 5, с 454-57, 1977.
14. **Auerbach Ch., Robson T.M.** Chemical production of mutation // Nature, 1946, vol. 157, p.302-305.
15. **Bochkow N.P., Kuleshov N.P.** Age sensitivity of human chromosomes to alkylating agents // Mutat. Res., 14 No. 3, 345, 1972.
16. **Ford C.E., Hamerton J.L.** Acolchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol., 31, 247, 1956.
17. **Öchlkers F.** Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemicalen // Ztch. Indukt. Abstamm. und Vererbungst. 1943. Bd. 81. S. 313-343.

Interspecific differences in bone marrow cells sensitiveness at mice and rats to Thiophosphamide mutation inductions

H.H.Semenov, N.N.Karkischenko, T.B.Beskova, E.L.Matveenko

Work is devoted comparative research of chromosomes aberrations frequencies in bone marrow cells at mice and rats. In experiment mice of strain C57BL/6Y – the most sensitive to Thiophosphamide and rats HY/Y – low steady to hypobaric hypoxia are used. Animals are supported in collections of Scientific Center of biomedical technologies of RAMS. It is experimentally established that in level of the induced aberrations of chromosomes in bone marrow cells of a rat with high degree of reliability surpassed mice, however on frequency of spontaneous chromosomal infringements at these close kinds of distinctions it is not revealed.

Key words: mice, rats, mutation inductions, aberrations of chromosomes.