

СЕСТРИНСКИЕ ХРОМАТИДНЫЕ ОБМЕНЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ТИОФОСФАМИДОМ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ

М. С. КАГРАМЯН

Лимфоциты периферической крови человека хранили на стадии G_0 до и после обработки мутагеном, а также в интервале между воздействиями при температурах 5, 21 и 37°. Установлено, что хранение культуры лимфоцитов в течение 24 ч при 37° до обработки мутагеном приводит к возрастанию частоты сестринских хроматидных обменов. Показано также отсутствие влияния фракционирования дозы мутагена при разделении ее на две равные фракции. Хранение культуры лимфоцитов после обработки тиофосфамидом не приводит к изменению уровня сестринских хроматидных обменов.

Ключевые слова: тиофосфамид, сестринские хроматидные обмены.

Как известно, сестринские хроматидные обмены (СХО) являются чувствительным объектом для тестирования мутагенной активности ряда химических веществ и, в частности, алкилирующих соединений. Для правильной интерпретации полученных количественных данных о СХО необходимо устранить влияние на их выход различий в условиях культивирования лимфоцитов.

Исходя из полученных нами ранее результатов, в которых было показано влияние хранения культуры лимфоцитов до обработки тиофосфамидом на уровень хромосомных аберраций, представлялось интересным выяснить зависимость частоты СХО от аналогичных условий культивирования.

Материал и методика. В экспериментах цельную венозную кровь смешивали со средой Игла в соотношении 1:14 с добавлением глутаминовой кислоты.

Варьирование условий хранения проводили в течение стадии G_0 до стимуляции фитогемагглютинином (ФГА). В дальнейшем содержимое пробирок заменяли культуральной смесью, содержащей среду Игла с глутамином, сыворотку крупного рогатого скота и ФГАР («Difco», США). В качестве мутагена использовали тиофосфамид в концентрации 10 мкг/мл с экспозицией его в культуре, равной двум часам (тиофосфамид был любезно предоставлен В. А. Черновым, Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт).

Лимфоциты фиксировали через 96 ч от начала культивирования смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). За 28 ч до фиксации в культуральную смесь вносили бромдезоксисуридин (БДУ) («Ferak», Зап. Берлин), в конечной концентрации 10 мкг/мл. Колхицин добавляли за два часа до фиксации, гипотоническую обработку проводили 0,55%-ным раствором KCl в течение 7 мин при комнатной температуре.

Клеточную суспензию наносили на охлажденные мокрые стекла и высушивали над пламенем горелки. Для получения дифференциального окрашивания сестринских хроматид использовали модифицированный метод, применяемый в лаборатории [3]. Анализировали мстафазы второго митотического цикла, содержащие 44—46 хромосом. Одновременно учитывали соотношение метафаз первого и второго митотических циклов. Достоверность полученных результатов определяли посредством дисперсионного анализа [2].

Для первого эксперимента была составлена схема, включающая три независимых подопыта. Такой подход оправдывался тем, что эксперименты ставили на единой крови, одних и тех же разведениях мутагена и что некоторые варианты в разных подопытах повторялись.

Во втором эксперименте, с целью уменьшения влияния неконтролируемых в эксперименте факторов, две повторности ставили с интервалом в один день.

Результаты и обсуждение. Частота СХО в зависимости от хранения культуры лимфоцитов до и после, а также в интервале между воздействиями тиофосфамидом. В табл. 1 под тестом «среднее число СХО

Таблица 1

Зависимость выхода сестринских хроматидных обменов от условий хранения лимфоцитов до и после мутагенной обработки (среднее $\pm$ стандартное отклонение)

№ под- опыта	Условия хранения	Среднее число СХО на клетку		$M_1 : M_2$
		1	2	
I	□□	17,2 $\pm$ 2,8	14,5 $\pm$ 0,0	2,0:1
	□-----□	11,8 $\pm$ 1,4	15,3 $\pm$ 1,8	8,1:1
	-----□□	22,2 $\pm$ 2,3	21,1 $\pm$ 1,8	2,7:1
	-----□-----□	17,0 $\pm$ 1,7	20,5 $\pm$ 1,8	8,1:1
II	□□	9,1 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,1	6,7:1
	□□-----	10,6 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 0,1	2,3:1
	-----□□	22,4 $\pm$ 0,6	17,8 $\pm$ 0,8	5,7:1
	-----□□-----	12,5 $\pm$ 11,8	11,2 $\pm$ 1,7	3,3:1
III	□□	10,7 $\pm$ 0,1	14,1 $\pm$ 2,4	5,2:1
	□□-----	10,2 $\pm$ 1,1	10,8 $\pm$ 0,3	3,0:1
	□-----□	12,7 $\pm$ 1,3	11,2 $\pm$ 1,1	6,1:1
	□-----□-----	13,0 $\pm$ 3,4	11,0 $\pm$ 2,0	3,3:1

□—экспозиция тиофосфамида, равная 1 часу, □□—экспозиция, равная 2 часам, -----—интервал времени, равный 24 часам, M_1 и M_2 —клетки 1- и 2-го митозов соответственно.

на клетку» единиц измерения предполагается средняя из 10 клеток, поскольку, как было показано ранее, если в качестве единицы измерения брать число СХО в отдельной клетке, то результаты будут иметь высокий коэффициент вариации и значимую асимметрию, то есть не будут отвечать нормальному распределению [4].

Результаты дисперсионного анализа первого подопыта свидетельствуют о достоверном повышении выхода СХО при предварительном

хранении культуры лимфоцитов в течение 24 ч до обработки мутагеном и последующей стимуляции ФГА ($n=1$, $P<0,05$) по сравнению с остальными вариантами. Одновременно установлено, что при разделении дозы мутагена на две с интервалом между обработками 24 ч не наблюдается снижения выхода СХО по сравнению с действием однократной дозы (этот вывод подтверждается при сравнении I-го варианта с 3-им в III подопыте).

Во втором подопыте наблюдается аналогичное увеличение выхода СХО при хранении культуры до обработки тиофосфамидом ($n=1$, $P<0,01$). В то же время имеет место статистическое взаимодействие таких факторов, как хранение до и после воздействия мутагеном, свидетельствующее о том, что хранение после обработки тиофосфамидом предварительно сенсibilизированных лимфоцитов приводит к снижению уровня СХО.

В третьем подопыте выход СХО при хранении культуры в интервале между воздействиями по сравнению с однократной обработкой не изменяется. То же самое наблюдается в варианте с культурой, хранившейся после обработки мутагеном в течение 24 ч по сравнению с нехранившейся.

Анализ соотношения клеток первого и второго митотических циклов свидетельствует о снижении скорости прохождения клеток по циклу после воздействия мутагеном.

В табл. 2 представлены данные о выходе СХО при длительном хранении лимфоцитов при различных условиях обработки раствором Хенкса взамен тиофосфамида (в данном случае делалась попытка макси-

Таблица 2

Зависимость выхода сестринских хроматидных обменов от условий хранения лимфоцитов до и после обработки раствором Хенкса
($(\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение})$)

№ подопыта	Условия хранения	Среднее число СХО на клетку		$M_1 : M_2$
		1	2	
I	□□	$7,6 \pm 0,0$	$8,3 \pm 1,8$	1,5:1
	□-----□	$4,3 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$	3,0:1
	-----□□	$5,0 \pm 1,1$	$5,9 \pm 2,1$	0,9:1
	-----□-----□	$8,0 \pm 0,8$	$7,8 \pm 1,4$	1,9:1
II	□□	$3,5 \pm 1,0$	$3,5 \pm 0,1$	1,7:1
	□□-----	$5,6 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,3$	1,2:1
	-----□□	$4,8 \pm 1,4$	$5,4 \pm 0,6$	1,4:1
	-----□□-----	$4,1 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,3$	0,9:1
III	□□	$5,4 \pm 1,1$	$5,9 \pm 0,1$	1,3:1
	□□-----	$4,5 \pm 1,8$	$5,4 \pm 0,3$	0,8:1
	□-----□	$4,7 \pm 0,1$	$5,8 \pm 1,1$	1,3:1
	□-----□-----	$5,0 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,3$	1,1:1

Обозначения те же, что для табл. 1.

Таблица 3

Зависимость частоты сестринских хроматидных обменов от длительности и температуры предварительного хранения культуры лимфоцитов до мутагенной обработки

Повторность	Длительность хранения, ч								
	1			24			48		
	Температура хранения, °C								
	5	21	37	5	21	37	5	21	37
I	18,2±2,6	16,8±0,7	13,4±2,0	18,7±2,6	24,2±3,8	22,9±2,8	17,5±3,7	18,2±3,7	17,1±2,2
II	16,6±3,4	13,8±2,6	19,9±2,3	15,5±2,7	18,6±1,4	23,3±2,5	19,3±2,8	15,1±2,7	16,9±2,0
Среднее	17,4	15,3	16,6	17,1	21,4	23,1	18,4	16,6	17,0
M_1, M_2									
I	4,5:1	2,6:1	3,2:1	4,0:1	5,7:1	3,5:1	1,7:1	8,0:1	2,4:1
II	5,7:1	4,6:1	1,9:1	1,8:1	1,3:1	2,7:1	1,8:1	2,7:1	1,3:1
Среднее	5,1:1	3,6:1	2,5:1	2,9:1	3,5:1	3,1:1	1,7:1	5,3:1	1,8:1

На каждый вариант просмотрено 20 клеток.

мально приблизить условия хранения и обработки контрольных вариантов и вариантов, в которых на культуру воздействовали мутагеном). Как следует из данных таблицы, хранение контрольных вариантов не приводит к изменению спонтанной частоты СХО, которая в среднем составила 5,4 обмена на клетку.

Анализ частоты СХО при хранении лимфоцитов до обработки тиофосфамидом при разных температурах. Данные о выходе СХО при хранении лимфоцитов до обработки мутагеном от времени и температуры, а также соотношение клеток первого и второго митотических циклов приводятся в табл. 3. Частота СХО зависит от длительности предварительного культивирования лимфоцитов ($n=2$, $P<0,01$). Максимум уровня СХО соответствует 24-часовому хранению при 37° ($P<0,01$). При хранении культуры без последующей обработки этот показатель не изменяется (табл. 4).

Таблица 4

Частота сестринских хроматидных обменов при хранении не обработанной тиофосфамидом культуры лимфоцитов при 37° на стадии G_0
(среднее $\pm$ стандартное отклонение)

Повторность	Длительность хранения, ч		
	1	24	48
Контроль—1	6,6 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 1,0	6,2 $\pm$ 1,1
Контроль—2	6,5 $\pm$ 1,1	8,0 $\pm$ 1,5	7,5 $\pm$ 1,3

В предыдущих работах нами было показано возрастание числа абберрантных метафаз и общего числа разрывов хромосом при хранении культуры в течение 48 ч при 37° до обработки тиофосфамидом.

Таким образом, увеличение сестринских хроматидных обменов, так же как и хромосомных абберраций, при длительной инкубации их до обработки мутагеном подтверждает связь механизма формирования структурных мутаций с физиологическим состоянием клеток.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР Поступило 8.VI 1981 г.

ՏՈՒՅՈՒՆԱՄԻԴՈՎ ԻՆԴՈՒԿՎԱՍԻ ՔՈՆԶՐԱԿԱՆ ՔՐՈՄԱՏԻԴԱՅԻՆ
ՓՈԽԱՆԱԿՈՒՄՆԵՐԸ ՄԱՐԴՈՒ ԶԵԹԱՆՎԱՍԻ ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ
ՊԱՀՄԱՆ ՏԱՐԲԵՐ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ. Ս. ՂԱՀՐԱՄԱՆՅԱՆ

Լիմֆոցիտների կուլտուրայի պահումը 24 ժ. ընթացքում 37° դեպքում, մինչև մուտագենով մշակելը, առաջացնում է քույրական քրոմատիդային փոխանակումների հաճախականության աճ, իսկ տիոֆոսֆամիդով մշակելուց հետո քույրական քրոմատիդային փոխանակումների բանակը չի փոփոխվում:

Ցույց է տրվում նաև էֆեկտի բացակայությունը մուտագենի դոզան երկու հավասար ֆրակցիաների բաժանելիս:

SISTER-CHROMATID EXCHANGES INDUCED IN UNSTIMULATED HUMAN LYMPHOCYTES BY THIOPHOSPHAMIDE UNDER VARIOUS STORAGE CONDITIONS

M. S. KAGRAMANIAN

It has been established that the frequency of sister-chromatide exchanges induced by thiophosphamide in the unstimulated human lymphocytes shows an increase after keeping the cells during 24 hours at 37°C, before the treatment with mutagen. It has been also shown that there is no influence of dose fractionation when the dose of mutagen splits into two equal fractions.

The preservation of lymphocytes after mutagen treatment does not result in the increase of sister chromatide exchange level.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Баракова Ф. С., Попова Л. К., Вениаминова Г. М. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 89, 2, 205, 1980.
2. Хикс Ч. Основные принципы планирования эксперимента. М., 407, 1967.
3. Чеботарев А. Н., Селезнева Т. Г., Платонова В. И. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 85, 2, 242, 1978.
4. Яковенко К. Н., Платонова В. И. Генетика, 15, 6, 1115, 1979.