

| Вещество | ЭФ-СК | | | МСК-СК | | |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | IC ₀ , мкМ/л | IC ₂₀ , мкМ/л | IC ₅₀ , мкМ/л | IC ₀ , мкМ/л | IC ₂₀ , мкМ/л | IC ₅₀ , мкМ/л |
| Митомицин С | 3,27±0,7* | 3,15±1,1* | 2,41±1,3* | 3,29±0,9* | 6,89±2,4* | 6,63±1,8* |
| Фенобарбитал | 0,11±0,1 | 0,09±0,1 | 0,23±0,2 | 0,22±0,1 | 0,19±0,1 | 0,16±0,1 |
| Циклоспорин | 2,13±0,8* | 2,11±0,6* | 1,12±0,9* | 3,48±1,9* | 3,13±1,8* | 5,12±3,4* |
| Дельтаметрин | 0,13±0,1 | 0,18±0,1 | 0,29±0,1 | 0,19±0,1 | 0,17±0,1 | 0,39±0,1* |
| Дифенконазол | 0,18±0,1 | 0,24±0,1 | 0,13±0,1 | 0,20±0,1 | 0,14±0,1 | 0,18±0,1 |
| Диметилсульфоксид | 0,44±0,2 | 0,27±0,1 | 0,25±0,1 | 0,34±0,1 | 1,14±0,8* | 1,26±0,9* |
| Мезотрион | 0,15±0,1 | 0,16±0,1 | 0,11±0,1 | 0,28±0,1 | 0,58±0,1* | 0,63±0,3* |
| Тиаметоксам | 0,29±0,1 | 0,14±0,1 | 0,17±0,1 | 0,16±0,1 | 0,22±0,1 | 0,23±0,1 |
| Пропиконазол | 0,14±0,1 | 0,12±0,1 | 0,17±0,1 | 0,19±0,1 | 0,16±0,1 | 0,11±0,1 |

*различия достоверны при ($p < 0,05$)

На основании полученных данных (таблица 2) вычисляли чувствительность, специфичность и прогностическую эффективность теста для культур ЭФ-СК и МСК-СК.

Чувствительность линии МСК-СК составила 0,910, ЭФ-СК – 0,725. Специфичность МСК-СК – 0,628, ЭФ-СК – 0,790.

Прогностическая эффективность линии МСК-СК составила 82,6%, что выше, чем у линии ЭФ-СК (70,5%).

Полученные данные позволили сделать вывод, что линия клеток МСК-СК является более чувствительной, прогностическая эффективность для данной культуры выше, несмотря на вероятность получения ложноположительных результатов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИТОМИЦИНА С STUDY OF CYTOTOXIC AND CYTOGENETIC PARAMETERS OF MITOMYCIN C

В. Ю. Зиновкина, Р. В. Богданов, В. М. Василькевич, М. В. Анисович, Т. И. Крыж
V. Zinovkina, R. Bogdanov, V. Vasilkevich, M. Anisovich, T. Kryzh

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь
zinovkina@mail.ru*

*Republican unitary enterprise «Scientific practical centre of hygiene,
Minsk, Republic of Belarus*

В хроническом эксперименте при внутрижелудочном и ингаляционном путях поступления изучены мутагенность и токсичность митомицина С. Цитотоксические и цитогенетические повреждения оценивали с использованием мазков периферической крови, мазков косного мозга и по изученным клинико-физиологическим показателям. В диапазоне выбранных доз при разных путях поступления установлено цитогенетическое и цитотоксическое действие митомицина С в микроядерном тесте при изучении лейкоцитов периферической крови, при этом увеличения числа клеток с признаками апоптоза и некроза не выявлено, что свидетельствует об отсутствии токсического действия мутагена. Митомицин С индуцировал статистически значимое увеличение числа клеток с хромосомными aberrациями. Существенных изменений клинико-физиологических показателей и относительной массы внутренних органов у экспериментальных животных не установлено.

Mutagenicity and toxicity of mitomycin C were studied in a chronic experiment with intragastric and inhalation routes of intake. Cytotoxic and cytogenetic damage was assessed using peripheral blood smears, bone marrow smears and according to the study of clinical and physiological parameters. In the range of selected doses for different routes of intake the cytogenetic and cytotoxic effects of mitomycin C were established in the micronucleus test in the study of peripheral blood leukocytes, while an increase in the number of cells with signs of apoptosis and necrosis was not detected, which indicates the absence of the toxic effect of the mutagen. Mitomycin C induced a statistically significant increase in the number of cells with chromosome aberrations. Significant violations of clinical and physiological parameters and the relative mass of internal organs in experimental animals have not been established.

Ключевые слова: митомицин С, мутагенность, токсичность, микроядерный тест, хромосомные aberrации.

Keywords: mitomycin C, mutagenicity, toxicity, micronucleus test, chromosomal aberrations.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-222-225>

Химические вещества на производстве составляют наиболее обширную группу антропогенных факторов внешней среды, в которую нередко входят и весьма токсичные соединения. Для исследования биологической активности соединений очень важен комплексный подход, состоящий из «батареи» тестов с использованием нескольких индикаторов токсичности и биологической активности на клеточном уровне. Комплексный подход позволяет провести анализ клеток по таким показателям как уровень клеточной гибели в популяции (доля апоптотических клеток, некротических клеток), количество клеток с микроядрами, распределение клеток по стадиям клеточного цикла и, соответственно, уровень пролиферации в данной популяции [1, 2]. В литературных данных практически отсутствуют сведения о токсическом и мутагенном действии митомицина С при пероральном и ингаляционном путях поступления.

Исследования по определению мутагенности и токсичности митомицина С при разных путях поступления проведены в хроническом эксперименте на белых нелинейных крысах. Изучение хронической токсичности позволяет получить информацию о возможной опасности для здоровья, возрастающей от повторяющихся воздействий в ходе эксперимента длительностью не менее 1/10 от продолжительности жизни грызунов.

Для проведения хронического эксперимента с митомицином С были сформированы 6 групп животных: 1. контрольная для ингаляционного введения; 2. контрольная для перорального введения; 3. группа, получающая исследуемое вещество ингаляционно в максимально выбранной дозе 3,12 мг/м³; 4. группа, получающая исследуемое вещество ингаляционно в минимально выбранной дозе 0,32 мг/м³; 5. группа, получающая исследуемое вещество перорально в максимально выбранной дозе 0,1 мг/кг; 6. группа, получающая исследуемое вещество перорально в минимально выбранной дозе 0,01 мг/кг. Дозы подбирались исходя из собственных предварительных исследований, а также данных научной литературы с таким учетом, чтобы за время хронического эксперимента отсутствовали видимые поведенческие характеристики токсического воздействия.

На тринадцатые сутки эксперимента у опытных животных прижизненно проводили забор периферической крови для приготовления цитогенетических препаратов клеток – мазков в соответствии с общепринятой методикой [3]. Забор крови проводился прижизненно из хвостовой вены животных.

Препараты мазков периферической крови экспериментальных животных готовили по стандартной методике и окрашивали красителем Гимза. Микроскопический анализ препаратов с митомицином С проводился с использованием микроскопа Olympus BH-2, окуляры $\times 10$ и $\times 20$, иммерсионный объектив $\times 100$ (иммерсионное масло Olympus $n_d=1.516$) и с использованием микроскопа Leica DM2000, окуляры $\times 10$ и $\times 20$, иммерсионный объектив $\times 100$ («масло иммерсионное» ООО «МиниМед»).

Для учета хромосомных aberrаций препараты костного мозга просматривали при малом увеличении (использовали объективы $10\times$, $20\times$) для отбора метафаз, пригодных для анализа. Большое увеличение (с иммерсионным объективом $100\times$) используется для анализа отдельных метафазных пластинок. Анализировали только пластинки с полным набором центромер. Каждую aberrацию отмечали в протоколе цитогенетического анализа. Координаты (нониусы) можно фиксировать как для всех анализируемых клеток, так и только для тех, в которых обнаружены aberrации.

Критериями при отказе от анализа клетки служили: неполное число центромер, неправильная проекция хромосомы и/или расщепление центромеры в результате чрезмерной обработки колхицином, чрезмерное наложение хромосом друг на друга, плохая фиксация хромосомом.

Сравнительный анализ aberrаций хромосом, ДНК-комет, микроядер и клеточной гибели в комплексных исследованиях показал, что более информативно описывают эффекты изучаемого мутагена рутинные цитогенетические критерии, характеризующие полный спектр и динамику патологии реализации генетических нарушений в течение S, G и M фаз клеточного цикла. В этой связи исследования были основаны на анализе частоты клеток с микроядрами и числа клеток, связанных с их формированием.

Цитогенетические повреждения лейкоцитов (микроядерный тест) учитывали согласно общепринятых методик [4]. От каждого животного анализировалось не менее 500 лейкоцитов (нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты), при этом определялось количество клеток с микроядрами. Отдельно подсчитывали количество клеток, содержащих 2 типа микроядер. К первому типу микроядер относили одиночные и множественные мелкие микроядра размером до 1/40 размера основного ядра. Они образованы фрагментами хромосом. Ко второму типу микроядер относили микроядра размером от 1/15 до 1/10 размера основного ядра [5]. Параллельно определяли частоту встречаемости лейкоцитов с признаками программируемой гибели и гибнущих путем некроза. Определялась также частота встречаемости сегментоядерных и юных лейкоцитов среди общего количества полиморфноядерных белых кровяных телец.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена непараметрическими методами с помощью компьютерной программы STATISTICA 13 (лицензия № AXA8111525627ARCN2ACD-M). Различия в сравниваемых группах считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Цитогенетический анализ клеток крови на тринадцатые сутки эксперимента показал отсутствие достоверного увеличения числа эритроцитов с микроядрами во всех экспериментальных группах.

При проведении цитогенетического анализа лейкоцитов животных, получавших митомицин С перорально в максимально выбранной дозе 0,1 мг/кг, по сравнению с контролем, отмечается достоверное увеличение ($p < 0,05$) клеток с мелкими микроядрами. Так, в контроле процент таких клеток составил $0,14 \pm 0,03$ %, а в опытной группе – $0,31 \pm 0,06$ %. Клетки, включающие мелкие микроядра, могут являться маркером повреждения хромосом и, следовательно, мутагенного действия митомицина С. Микроскопический анализ препаратов показал, что митомицин С при ингаляционном и пероральном путях поступления в диапазоне выбранных доз на данный период не вызывал достоверного увеличения клеток с признаками апоптоза и некроза, которые находись на уровне контроля, соответственно $0,40 \pm 0,09$ % и $0,79 \pm 0,12$ %, что указывает на отсутствие токсического действия данного вещества (таблица 1). Эксперимент был завершён на 29 сутки опыта.

Процент клеток с мелкими микроядрами был в 3 раза выше, чем процент клеток с крупными микроядрами.

Как видно из таблицы 2, в контроле, на 29 сутки по сравнению с 13 сутками отмечается увеличение числа клеток с крупными микроядрами, что, вероятно, связано с усилением процессов пролиферации, поскольку эксперимент проходил в весенний период.

Уровень клеток с мелкими микроядрами в контроле остался на уровне 13 суток, а у животных, получавших митомицин С в максимальной дозе при различных путях поступления достоверно увеличился, что указывает на эффект действия мутагена.

Таблица 1

Цитогенетические и цитотоксические показатели лейкоцитов периферической крови крыс при различных путях поступления митомицина С на 13 сутки эксперимента

| Группа | Количество клеток | % клеток с мя мелкими | % клеток с мя крупными | % клеток с признаками апоптоза | % клеток с признаками некроза |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Контроль per os | 5200 | $0,14 \pm 0,03$ | $0,12 \pm 0,05$ | $0,40 \pm 0,09$ | $0,79 \pm 0,12$ |
| Контроль per inh. | 4820 | $0,12 \pm 0,05$ | $0,15 \pm 0,05$ | $0,44 \pm 0,09$ | $0,77 \pm 0,13$ |
| МС 0,1 мг/кг per os | 5500 | $0,31 \pm 0,06^*$ | $0,16 \pm 0,05$ | $0,42 \pm 0,09$ | $0,67 \pm 0,11$ |
| МС 0,01 мг/кг per os | 4080 | $0,15 \pm 0,06$ | $0,20 \pm 0,07$ | $0,59 \pm 0,12$ | $0,83 \pm 0,14$ |
| МС 3,12 мг/м ³ per inh. | 3730 | $0,16 \pm 0,07$ | $0,24 \pm 0,08$ | $0,64 \pm 0,14$ | $0,83 \pm 0,15$ |
| МС 0,32 мг/м ³ per inh. | 3765 | $0,13 \pm 0,06$ | $0,21 \pm 0,08$ | $0,56 \pm 0,12$ | $0,82 \pm 0,15$ |

*различия с контролем per os $p < 0,05$

Таблица 2

Цитогенетические и цитотоксические показатели лейкоцитов периферической крови крыс при различных путях поступления митомицина С на 29 сутки эксперимента

| Группа | Количество клеток | % клеток с мя мелкими | % клеток с мя крупными | % клеток с признаками апоптоза | % клеток с признаками некроза |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Контроль per os | 4770 | $0,17 \pm 0,06$ | $0,23 \pm 0,07$ | $0,46 \pm 0,10$ | $0,78 \pm 0,13$ |
| Контроль per inh. | 4200 | $0,14 \pm 0,06$ | $0,19 \pm 0,07$ | $0,38 \pm 0,10$ | $0,64 \pm 0,12$ |
| МС 0,1 мг/кг per os | 4600 | $0,70 \pm 0,12^*$ | $0,20 \pm 0,07$ | $0,46 \pm 0,10$ | $0,70 \pm 0,12$ |
| МС 0,01 мг/кг per os | 3900 | $0,23 \pm 0,08$ | $0,21 \pm 0,07$ | $0,62 \pm 0,13$ | $0,87 \pm 0,15$ |
| МС 3,12 мг/м ³ per inh. | 3650 | $0,63 \pm 0,13^{**}$ | $0,19 \pm 0,07$ | $0,66 \pm 0,02$ | $0,85 \pm 0,15$ |
| МС 0,32 мг/м ³ per inh. | 3750 | $0,21 \pm 0,08$ | $0,19 \pm 0,07$ | $0,59 \pm 0,12$ | $0,83 \pm 0,15$ |

* различия с контролем per os $p < 0,05$

** различия с контролем per inh. $p < 0,05$

Микроскопический анализ мазков периферической крови не выявил достоверного увеличения апоптоза и некроза лейкоцитов. Анализ числа лейкоцитов с микроядрами, а также их распределение по размеру показал сохранение тенденции, полученной на 13 сутки эксперимента у животных, получавших митомицин С в максимальной дозе при пероральном пути поступления, и на 29 сутки у животных, получавших митомицин С в максимальной дозе при ингаляционном пути поступления, по сравнению с контрольными группами при соответствующем пути поступления в виде накопления числа клеток с мелкими микроядрами.

Результаты изучения хромосомных aberrаций на препаратах костного мозга представлены в таблице 3. Как видно из таблицы 3, митомицин С индуцировал статистически значимое увеличение числа клеток с хромосомными aberrациями. Случаи полиплоидии и эндоредупликации не зарегистрированы.

При изучении клинико-физиологических показателей в ходе проведения токсикологического эксперимента и макроскопического исследования внутренних органов экспериментальных животных и по данным вскрытия существенных различий между оцениваемыми показателями у животных экспериментальных и контрольных групп не выявлена.

Таблица 3

Хромосомные aberrации в клетках костного мозга крыс

| Серия | Нормальные метафазы | Метафазы с 1-2 aberrациями | Метафазы с множественными aberrациями | Метафазы с пульверизацией | Количество метафаз на 1000 клеток | Митотический индекс, % |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Контроль (растворитель) | | | | | | |
| A | 100 | 0 | 0 | 0 | 61 | 100 |
| B | 100 | 0 | 0 | 0 | 63 | |
| A+B | 200 | 0 | 0 | 0 | 124 | |
| Митомицин С, 0,1 мкг/мл | | | | | | |
| A | 71 | 31 | 0 | 0 | 24 | 31,56 |
| B | 66 | 35 | 0 | 2 | 18 | |
| A+B | 137 | 66* | 0 | 2* | 42* | |

* различия статистически значимы относительно отрицательного контроля (растворителя), $p < 0,05$

Был проведен анализ коэффициентов относительной массы некоторых органов животных, который показал достоверное снижение только массы селезенки ($p < 0,03$; $p < 0,05$) во всех экспериментальных группах, однако данные различия находятся в пределах нормы реакции (таблица 4).

Таблица 4

Изучение относительных коэффициентов массы внутренних органов животных в эксперименте

| Исследуемые органы животных | Группы сравнения | | | | | |
|-----------------------------|------------------|-------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Контроль per os | Контроль per inh. | МС 0,1 мг/кг per os | МС 0,01 мг/кг per os | МС 3,12 мг/м ³ per inh. | МС 0,32 мг/м ³ per inh. |
| Печень | 35,49±1,26 | 37,33±1,66 | 35,13±0,99 | 36,56±1,02 | 35,77±1,23 | 34,21±0,69 |
| Почки | 7,68±0,20 | 7,86±0,38 | 7,88±0,18 | 8,06±0,23 | 8,03±0,11 | 7,43±0,21 |
| Селезенка | 6,35±0,46 | 6,56±0,40 | 4,47±0,31 | 4,52±0,32 | 4,27±0,26 | 4,99±0,61 |
| Сердце | 4,07±0,19 | 4,27±0,34 | 4,53±0,32 | 4,43±0,08 | 4,07±0,30 | 4,24±0,12 |

В результате проведенных комплексных исследований (батарея тестов) по определению мутагенности и токсичности митомицина С при пероральном и ингаляционном путях поступления мутагена установлено, что увеличение числа лейкоцитов с мелкими микроядрами в периферической крови на фоне отсутствия токсического действия вещества является маркером цитогенетического (кластогенного) эффекта митомицина С и может использоваться для контроля мутагенного и потенциально канцерогенного действия химических веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Использование методов выявления генотоксичности потенциальных мутагенов для обоснования коэффициента запаса при гигиеническом нормировании химических веществ в воздухе рабочей зоны / В. Ю. Зиновкина [и др.] // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 95-летию республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» (Минск, 24–25 ноября 2022 г.) / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Науч.-практ. центр гигиены ; редкол.: С. И. Сычик [и др.] ; под общ. ред. А. А. Тарасенко. – Минск : Изд. центр БГУ, 2022. – С. 480–481.
2. Анализ показателей цитогенетического и токсического действия классических мутагенов для контроля мутагенного и потенциально канцерогенного действия химических веществ для обоснования коэффициента запаса при гигиеническом нормировании в воздухе рабочей зоны / В. Ю. Зиновкина [и др.] // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 95-летию республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» (Минск, 24–25 ноября 2022 г.) / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Науч.-практ. центр гигиены ; редкол.: С. И. Сычик [и др.] ; под общ. ред. А. А. Тарасенко. – Минск : Изд. центр БГУ, 2022. – С. 481–483.
3. Mills, J. N. Interpreting blood smears (or What blood smears are trying to tell you!) / J. N. Mills // Aust. Vet. J. – 1998. – Vol. 76, iss. 9. – P. 596–560.
4. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures / M. Fenech [et al.] // Mutation Research. – 2003. – Vol. 534, iss. 1-2. – P. 65–75.
5. Калаев, В. Н. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма / В. Н. Калаев, С. С. Карпова. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 2004. – 80 с.