

На правах рукописи



Ацаева Марет Махмудовна

**ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА МОДЕЛИ
СИНАПТОМЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СПЕРМАТОЦИТАХ МЫШИ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Коломиец Оксана Леонидовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Курило Любовь Федоровна, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской Академии медицинских наук, заведующая лабораторией генетики нарушений репродукции

доктор биологических наук, профессор
Сычева Людмила Петровна, Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая лабораторией генетического мониторинга

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «24» декабря 2013г. В 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, дом 3. Факс: (499)132-89-62, тел.: (499)135-14-61, e-mail: aspirantura@vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «22» ноября 2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение генотоксического действия лекарственных препаратов на половые клетки человека является одной из актуальных проблем современной генетики. Актуальность этой темы обусловлена риском формирования наследственной патологии, новообразований, мужского и женского бесплодия, невынашивания беременности у потомков. Внимание к этой проблеме заметно обострилось в связи с данными о постепенном снижении фертильности мужчин в разных регионах мира. В течение последних 50 лет прошлого века (период жизни двух генераций человека) произошло резкое снижение количества нормальных сперматозоидов (в среднем в два раза) и повышение доли терато- и некрозооспермии в эякулятах мужчин в разных регионах мира (Colborn & Smolen, 1998). Причины этого драматического явления не установлены до настоящего времени. Предполагалось, что основной причиной снижения фертильности мужчин может служить широкое распространение органохлоринов в быту (Colborn & Smolen, 1998). Однако позже было высказано предположение о возможной роли широкого внедрения антибиотиков в медицинскую практику (Wong et al., 2003).

Известно, что формирующиеся половые клетки высокочувствительны к действию факторов окружающей среды. Ранее установлено, что лекарственные препараты, в первую очередь противоопухолевые, вызывают разрывы мейотических хромосом животных и нарушение процесса десинапсиса хромосом (Сухачева и др., 2001; 2003), могут вызывать стойкое и даже необратимое нарушение фертильности мужчин (Фосса, 1989; Marchetti et al., 2006). Противомикробные препараты также обладают высокой метаболической активностью. Однако сведения об их генотоксичности для половых клеток довольно противоречивы (Кушнирук, 1974; Коломиец и др., 2001; Guay et al., 1991; Maura & Pino, 1991; Millsop et al., 2013). Это обусловлено разнообразием химической структуры препаратов разных фармакологических групп, различием механизмов их биологического действия, а также использованием разных экспериментальных моделей и методов анализа нарушений сперматогенеза.

Одним из наиболее информативных методов идентификации нарушений структуры и поведения хромосом в профазе I мейоза является анализ синаптонемных комплексов (СК) в распластанных ядрах сперматоцитов I порядка (Коломиец и др., 2001, 2013; Counce & Meyer, 1973; Moses, 1977). СК

– специфическая трехполосная структура, формирующаяся между двумя гомологичными хромосомами у представителей всех групп эукариот. СК участвует в процессах мейотической конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом. Метод анализа СК позволяет идентифицировать характер нарушений синапсиса хромосом, все типы хромосомных aberrаций. Применение метода иммуноцитохимического анализа белков позволяет выявлять не только нарушения в структуре СК, но и участки инактивации хроматина, нарушения рекомбинации, синапсиса и, соответственно, риска формирования анеуплоидных половых клеток (Vallente et al., 2006; Ko & Martin, 2009).

Цели исследования: сравнительная оценка повреждающего действия антимикробных лекарственных препаратов на хромосомы сперматоцитов I порядка мыши; анализ механизмов селекции клеток с нарушениями структуры СК; анализ потенциальных рисков, которые разные типы хромосомных нарушений несут потомству.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное иммуноцитохимическое и электронно-микроскопическое исследование распластанных ядер сперматоцитов I порядка мыши на разных сроках после окончания введения им противомикробных препаратов: фурацилина, цифрана и секстофага. В качестве групп сравнения использовать самцов после введения воды и самцов после введения им противоопухолевого цитостатика циклофосфана;

2. Охарактеризовать разные типы нарушений структуры СК в ядрах сперматоцитов подопытных и контрольных животных; оценить их роль в селекции сперматоцитов;

4. Проанализировать потенциальные трансгенерационные риски разных типов нарушений структуры СК;

3. Получить потомство от интактных самок, скрещенных с самцами, которым вводили цифран, циклофосфан, секстофаг и фурацилин; исследовать структуру СК в ядрах сперматоцитов потомков.

Научная новизна работы. Впервые на основе комплексного электронно-микроскопического и иммуноцитохимического анализа СК проведена оценка повреждающего действия противомикробных лекарственных препаратов на сперматоциты I порядка мыши. Установлено 6 типов основных нарушений в структуре и поведении СК. Впервые выявлено, что тотальная селекция сперматоцитов I порядка после введения высокотоксичных и высокогенотоксичных препаратов (фурацилина и цифрана) осуществляется с

помощью механизма «мейотической катастрофы». Установлено, что сперматоциты I порядка с нарушениями синапсиса хромосом, как правило, но не всегда, подвергаются селекции с помощью механизма пахитенного ареста. Преодолевшие пахитенный «контрольно-пропускной пункт» (КПП) мейоза сперматоциты несут потенциальный риск формирования анеуплоидных сперматозоидов. Хроматин фрагментов хромосом не подвергается транскрипционному сайленсингу, фрагменты хромосом не ассоциируют с половым бивалентом. Такие нарушения в ядрах незрелых половых клеток потенциально несут риск делеций, формирования сложных перестроек хромосом или кольцевых хромосом в потомстве.

Впервые в ядрах сперматоцитов самцов, получавших секстофаг, выявлены кольцевые структуры, «отпочковывающиеся» от боковых элементов СК. Кроме того в ядрах сперматоцитов этой группы животных выявлены фрагменты СК и единичные кольцевые СК.

Цифран вызывает нарушения в структуре и поведении СК, фрагментацию хромосом, нарушение синапсиса хромосом. Впервые проведен анализ СК у потомков самцов, которым в течение 10 дней вводили перечисленные выше антибактериальные препараты. У потомков самцов, получавших цифран, в 5,9% ядер сперматоцитов выявлены кольцевые хромосомы, что свидетельствует об увеличении ломкости теломерных сайтов хромосом у этих животных.

Практическая значимость работы. Сравнительный электронно-микроскопический и иммуноцитохимический анализ СК в распластанных ядрах сперматоцитов мыши показал высокую эффективность количественной и качественной оценки генотоксического действия лекарственных препаратов на незрелые половые клетки мыши. Разработанные подходы к анализу хромосомных нарушений на основе СК могут быть использованы для оценки потенциальной генотоксичности как лекарственных препаратов, так и других ксенобиотиков.

Получены убедительные доказательства необходимости предохранения от зачатия в течение нескольких месяцев после приема курса антибиотиков.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На основе анализа СК в ядрах сперматоцитов мышей после введения лекарственных препаратов выявлено нарушение архитектоники ядер и сходный спектр хромосомных нарушений: а) формирование единичных фрагментов синаптонемных комплексов (СК) или осевых элементов; б) ассоциацию хромосом XY с аутосомным СК; в) нарушение формирования

полового тельца; г) формирование униввалентов аутосом; д) формирование униввалентов половых хромосом; е) формирование кольцевых хромосом.

2. Лекарственные препараты циклофосфан и фурацилин вызывают тотальный некроз ядер сперматоцитов на стадии лептотены-зиготены, сопровождающийся множественной фрагментацией хромосом. Такой механизм селекции клеток (мейотическая катастрофа) оценивается как селективный, защитный механизм, предотвращающий формирование сперматозоидов с множественными хромосомными нарушениями

3. Наибольший генотоксический риск для потомства могут нести ксенобиотики, вызывающие формирование фрагментов СК и кольцевых СК, так как признаков пахитенного ареста в ядрах с такими нарушениями не выявлено.

4. У самцов из потомства F1, полученного от скрещивания двух интактных самок с самцами, которым вводили цифран, выявлено достоверное увеличение сперматоцитов (5,9%) с кольцевыми СК. Это может свидетельствовать об увеличении ломкости теломерных сайтов хромосом у потомков. В потомстве от самцов, получавших фурацилин и секстофаг, нарушения в структуре ядер сперматоцитов не выявлены. Самцы, получавшие циклофосфан, оказались бесплодными.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2011» (Москва, 15-16 декабря 2011 г.); Международной молодежной конференции «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы», посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (Москва, 17-18 ноября 2011 г.); 10-ом Российском научном форуме в рамках 10-ой Международной выставки «Мужское здоровье и долголетие» (Москва, 15-17 февраля 2012 г.); Международной конференции "Хромосома 2012" (Новосибирск, 2-7 сентября 2012 г.); VIII Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов», посвященной 150-летию от дня рождения В.И. Вернадского и 95-летию со времени основания НАН Украины (Алушта, 23-27 сентября 2013 г.); 11-ой Международной медицинской выставке «Мужское здоровье и долголетие» (Москва, 19 – 20 февраля 2013 г.).

Декларация личного участия автора. Автор самостоятельно получил тотальные препараты СК изучаемых животных, проводил их окрашивание и дальнейший анализ полученных изображений. Суммарное личное участие автора составило 85%.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 10 работ, из них в журналах, рекомендованных ВАК – 3 статьи, в сборнике – 1 статья; 6 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 108 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, заключение, выводы, список цитируемой литературы и список сокращений. Указатель литературы содержит 163 источника, в том числе 141 на иностранном языке. Текст работы иллюстрирован 6 таблицами и 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты проводили на половозрелых самцах мыши F1(СВА/лас x C57BL6) в возрасте 3 месяцев, с массой тела равной 28-30 г., приобретенных в питомнике «Столбовая». Далее животных содержали в виварии ИОГен РАН на обычном рационе.

В первой серии экспериментов проведено электронно-микроскопическое и иммуноцитохимическое исследование СК у трех групп самцов мыши, которым в лечебной дозе вводили противомикробные лекарственные препараты трех разных фармакологических групп: фурацилин – антисептик из группы нитрофурановых, цифран – антибиотик из группы фторхинолонов и секстофаг – поливалентный пибактериофаг. В качестве групп сравнения были использованы самцы мыши, которым вводили противоопухолевый препарат циклофосфан и мыши, которым вводили стерильную воду для инъекций.

Все препараты вводили внутривенно в объеме 1 мл, один раз в день, в течение 10 дней. Разовую дозу рассчитывали по формуле (Померанцев и др., 1992): $D = (16Mm \times Dч) / Mч$, где D - доза препарата для мыши, Mm – масса тела мыши, Dч – лечебная доза препарата для человека, Mч – масса человека. Животные были разделены на 5 групп, по два животных в каждой. От каждого самца иммуноцитохимически исследовано от 100 до 200 клеток.

Во второй серии экспериментов исследовали СК у самцов из потомства F1, полученного от скрещивания интактных самок и самцов, которым вводили один из препаратов, перечисленных в таблице 1. По два самца из каждой подопытной группы были подсажены к интактным самкам. Самцы из потомства отцов, получавших вышеуказанные препараты, были забиты по достижению ими возраста 3 мес.

Получение суспензии сперматоцитов проводили по методу Counce и Meyer (1973).

Получение тотальных препаратов распластанных синаптонемных комплексов (СК) проводили по методу Navarro et al. (1981) с собственными модификациями (Kolomiets et al., 2010). Спредирование ядер сперматоцитов проводили путем нанесения капли суспензии клеток семенника на каплю 0,2 М сахарозы, препараты фиксировали охлажденным 4% параформальдегидом на 0,1М сахарозе (рН 8,4).

Контрастирование препаратов СК для последующего электронно-микроскопического исследования проводили 50% или 70% водным раствором AgNO₃ (по Fletcher, 1979).

Электронно-микроскопический анализ препаратов СК проводили на микроскопе JEM 100B (фирмы Jeol, Япония) при увеличениях в 2 500 -15 000 раз.

Иммуноцитохимическое исследование. Для иммунофлуоресцентного анализа препаратов СК использовали метод, предложенный Moens с соавторами (1987). Первичные и вторичные антитела для предотвращения неспецифического связывания антител разводили в водно-солевом буфере, содержащем 3% бычьего альбумина, 0,05% тритона X-100. В качестве консерванта добавляли NaN₃. СК и осевые элементы хромосом иммуноокрашивали с помощью первичных кроличьих антител против белка SCP3 (Abcam, Cambridge, UK), гистона γ H2AX (Abcam, Cambridge, UK) и белков кинетохора (ACA) (Antibody Incorporated, California, USA) (все в разведении 1:100). В качестве вторичных использовали козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA); козы антитела против IgG человека, конъюгированные с Alexa Fluor 546, (Invitrogen, USA) и козы антитела против IgG мыши, конъюгированные с Fitc (Jackson, USA). Все в разведении 1:500. Препараты отмывали в PBS и заключали в среду Vectashield с красителем DAPI.

Флуоресцентная микроскопия. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1. Использовали следующие фильтры: для препаратов, окрашенных DAPI - (Zeiss Filter set 1); Alexa Fluor 546 - (Zeiss Filter set 43); окрашенных FITC и Alexa Fluor 488 - (Zeiss Filter set 9). Сохраняли изображение, полученное при помощи камеры AxioCam HRm в программе Axiovision rel. 4.6. Изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS3 Extended (Adobe Systems, San Jose, CA, США).

Статистическая обработка данных проводилась в программах Microsoft Excel и WINPEPI. Проверка однородности выборок проводилось по методу хи-квадрат, на основе которого объединялись результаты, полученные при исследовании животных, которым вводили один и тот же препарат и забивали на одном и том же сроке. При помощи точного теста Фишера проводили оценку достоверности (существенности) или случайности различий между результатами исследования в контроле и после воздействия лекарственных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ СК у контрольных животных

При иммунофлуоресцентном анализе распластанных ядер сперматоцитов I порядка, полученных от 6 животных контрольной группы, которым вводили воду для инъекций, выявлены клетки на всех стадиях профазы I мейоза от лептотены до стадии поздней диплотены.

На стадии пахитены в ядрах сперматоцитов выявлялись 19 аутосомных СК и типичный половой бивалент с частичным синапсисом между X и Y хромосомами. На ранних стадиях профазы I мейоза гистон γ H2AX выявлялся в хроматине тех участков хромосом, которые еще не вступили в синапсис. Начиная со стадии пахитены, сигнал локализовался только в хроматине XY бивалента. В большинстве ядер нарушения в структуре СК не выявлены. Однако в 6-7% ядер были обнаружены единичные фрагменты СК (Рисунок 4). Общее количество ядер с нарушениями составило от 13% до 17%, что соответствует данным других исследователей (Сухачева, 2001; и др).

Анализ СК самцов мыши после окончания введения им циклофосфана

На 1-е сутки после окончания введения циклофосфана (ЦФ) в препаратах распластанных сперматоцитов, окрашенных красителем DAPI, обнаружены ядра сперматозоидов и сперматид, множество дегенерирующих ядер сперматоцитов. При иммуноокрашивании ядер антителами к основному белку латеральных элементов СК – SCP3 выявлено множество тонких фрагментов осевых элементов хромосом, что свидетельствует о дегенерации сперматоцитов на стадии лептотены (Рисунок 2 а). Множественная фрагментация хромосом в митозе - «митотическая катастрофа», ведущая к гибели клеток на стадии метафазы, описана, в частности в опухолевых клетках, подверженных действию противоопухолевых препаратов-цитостатиков (Roninson et al., 2001). Митотическая катастрофа рассматривается как механизм, снижающий риск малигнизации нормальных соматических клеток или дальнейшей малигнизации опухолевых клеток под

действием противоопухолевых препаратов. События, описанные нами в сперматоцитах мыши на первые сутки после введения циклофосфана, также приводят к массовой гибели сперматоцитов. По аналогии с митотической катастрофой, мы назвали этот механизм селекции сперматоцитов I порядка «мейотической катастрофой». Не исключено, что мейотическая катастрофа может быть следствием энергетической катастрофы, как это описано в случае митотической катастрофы (Roninson et al., 2001; Онищенко, 2007; и др.). Селекция сперматоцитов I порядка, предшественники которых в течение 10 дней подвергались действию высокотоксичного и высокогенотоксичного циклофосфана, рассматривается нами в качестве механизма, защищающего клетки сперматогенного ряда от малигнизации, и предотвращающего передачу хромосомных нарушений потомству.

На 10-е сутки после окончания введения ЦФ были обнаружены ядра на всех стадиях профазы I мейоза. Однако в 71% ядер выявлены нарушения структуры СК. В 56,8% клеток выявлены фрагменты СК. В единичных ядрах были выявлены признаки пахитенного ареста. В таких ядрах отмечено нарушение формирования полового тельца, ассоциация полового (XY) бивалента с аутосомами. Кроме того, выявлены локальные нарушения синапсиса в отдельных аутосомных СК-бивалентах. В единичных ядрах обнаружены унивалентные половых хромосом и аутосом. Следует подчеркнуть, фокусы гистона γ H2AX не всегда выявлялись в участках нарушения синапсиса аутосом. Ниже мы вернемся к этому наблюдению.

На 36-е сутки после окончания введения ЦФ доля клеток с нарушениями в структуре СК снизилась до 61%. Фрагменты СК обнаруживались в 30% ядер. Однако увеличилось количество клеток с нарушением синапсиса хромосом и признаками пахитенного ареста.

Анализ СК самцов мыши после окончания введения фурацилина

На 1-е сутки после окончания введения фурацилина также, как и после введения цифрана, выявлены признаки мейотической катастрофы, причем в этом случае встречались ядра не только с фрагментами осевых элементов хромосом, но и с фрагментами СК, то есть в этом случае сперматоциты дегенерировали как на стадии лептотены, так и на стадии зиготены.

На 10-е сутки после окончания введения фурацилина в 53,4% ядер выявлены нарушения структуры и поведения СК. У животных, забитых на этом сроке, фрагменты СК обнаружены в 36% ядер. Фрагментация затрагивала от 1 до 5 СК-бивалентов. Также обнаруживались ядра с признаками пахитенного ареста: ассоциацией аутосом с половым бивалентом

в 12% и нарушением формирования полового тельца в 8% ядер. Следует подчеркнуть, что нарушения синапсиса гомологов не всегда удается четко увидеть на препаратах, иммуноокрашенных антителами к основному белку латеральных элементов SCP3. В качестве дополнительного метода выявления сайтов нарушения синапсиса гомологов, в настоящем исследовании использовали иммуноокрашивание препаратов антителами к гистону γ H2AX, участвующему в репарации запрограммированных двунитевых разрывов ДНК (DSB), индуцированных Spo11. Целесообразность использования антител к γ H2AX обусловлена тем, что он выявляется в зонах асинапсиса гомологов от стадии лептотены вплоть до завершения репарации DSB и начала активации транскрипции на стадии средней пахитены, а в случае нарушения синапсиса хромосом и на более поздних стадиях профазы мейоза. В 7,7% исследованных ядер сперматоцитов выявлены кольцевые СК (Рисунок 2, 3). Формирование кольцевых СК, по-видимому, является следствием потери прителомерных фрагментов уже завершивших синапсис гомологов. Формирование кольцевых хромосом приводит к потере связи хромосом с ядерной оболочкой, нарушению архитектоники ядра. Известно, что неправильное расхождение кольцевых хромосом на стадии анафазы I мейоза может приводить к формированию анеуплоидных сперматозоидов. Описаны случаи выявления кольцевых хромосом в кариотипах пациентов с нарушением фертильности и рождения детей с нарушением развития от отцов-носителей кольцевых хромосом (Zuccarello et al., 2010; Basinkova et al., 2012; и др.).

На 36-е сутки после введения фурацилина мышам, доля поврежденных сперматоцитов все еще оставалась высокой и составляла 41,3%. Однако увеличилась доля ядер с признаками пахитенного ареста. Ассоциация XY хромосом с аутосомными СК составляла 17,4%, а доля ядер с нарушением формирования полового тельца – 3,6% (рисунок 3). Гистон γ H2AX на стадии пахитены всегда обнаруживался в связи с хроматином половых хромосом и распространялся на хроматин ассоциированных с ними аутосом.

В целом увеличение клеток с признаками пахитенного ареста свидетельствует о том, что на более отдаленных от прекращения инъекций фурацилина сроках, в сперматоцитах постепенно восстанавливаются механизмы избирательной селекции поврежденных клеток.

Следует напомнить, что на 36-е сутки, стадии пахитены достигают сперматоциты, которые были подвержены действию фурацилина и других лекарственных препаратов на стадии стволовых клеток сперматогенеза.

Поэтому приведенные данные свидетельствуют о риске сохранения клеток с хромосомными нарушениями в пуле стволовых клеток, в течение длительного времени.

Количество ядер с фрагментами СК снизилось до 17%, а количество клеток с кольцевыми СК увеличилось до 10,5%.

Следует подчеркнуть, что фрагменты СК не ассоциировались с половым бивалентом, а в хроматине фрагментов СК не выявлялся гистон γ H2AX. Иными словами, такие клетки не подвергались селекции.

Анализ СК самцов мыши после окончания введения цифрана

На 1-е сутки после введения цифрана общее количество клеток с нарушениями в структуре СК составляло 76,2%; на 10-е сутки, оно уменьшилось до 29,0%, однако на 36-е сутки выросло и составило 38,0% (Рисунок 4). На 1-е сутки фрагментация СК (ФСК) отмечена в 44,7% исследованных ядер, на 10-е сутки – в 20,3%, однако на 36-е сутки она встречалась в 27,6% клеток. Формирование кольцевых хромосом выявлено в 2,3% клеток на 10 сутки после окончания введения цифрана.

Множественное нарушение синапсиса хромосом обнаружено на 1-ые сутки в 14,9% ядер; на 10-е сутки – в 5,5% ядер на 36-е сутки после окончания введения цифрана в 2,3%.

Напомним, что сперматогониогенез мыши включает семь типов сперматогониев (A_{single} , A_{pair} , A_{aligned} , A1, A2, A3 и A4). A_{single} являются единственными самообновляющимися сперматогониями в яичках мыши, при неравном делении которых, одна из двух дочерних клеток возвращается в пул A_{single} клеток, а вторая A_{pair} переходит к равным делениям. A_{pair} и A_{aligned} сперматогонии – формируют колонии. Продолжительность движения клеток от сперматогониев A_{single} , через восемь промежуточных делений клеток-предшественников, вступления в профазу мейоза и достижения ими стадии пахитены составляет 8-10 дней, продолжительность пахитены - 8 дней (Adler, 1996).

Таким образом, на 36 сутки пахитены достигают клетки, которые подвергались воздействию препаратов на стадии сперматогониев, в том числе A_{single} и ее потомки. Это свидетельствует о риске сохранения клона стволовых клеток, несущих хромосомные нарушения длительное время.

Анализ СК в разные сроки после окончания введения секстофага

На 1-е сутки после окончания введения секстофага общее количество ядер с нарушениями в структуре и поведении СК было значительно меньшим, чем после введения фурацилина и цифрана и составило 39,9%, на 10-е сутки оно

снизились до 24,5%, на 36 сутки до 12,3%. Неожиданным оказалось обнаружение ФСК в 30,2% клеток. На 36-е сутки количество ядер с такими нарушениями было сопоставимо с нормой (Рисунок 4). В 5% клеток на 10-е и в 3,2% клеток на 36-е сутки после введения бактериофага выявлены неизвестные ранее кольцевые структуры, не кольцевые хромосомы, а мелкие структуры, которые «отпочковывались» от боковых элементов СК. Они иммуноокрашивались антителами к белку СК - SCP3. Получены последовательные картины формирования таких структур (Рисунок 1). Кольцевые структуры были обнаружены на всех подстадиях пахитены и на стадии диплотены. Диаметр фрагментов составлял в среднем не больше 1-го микрона.

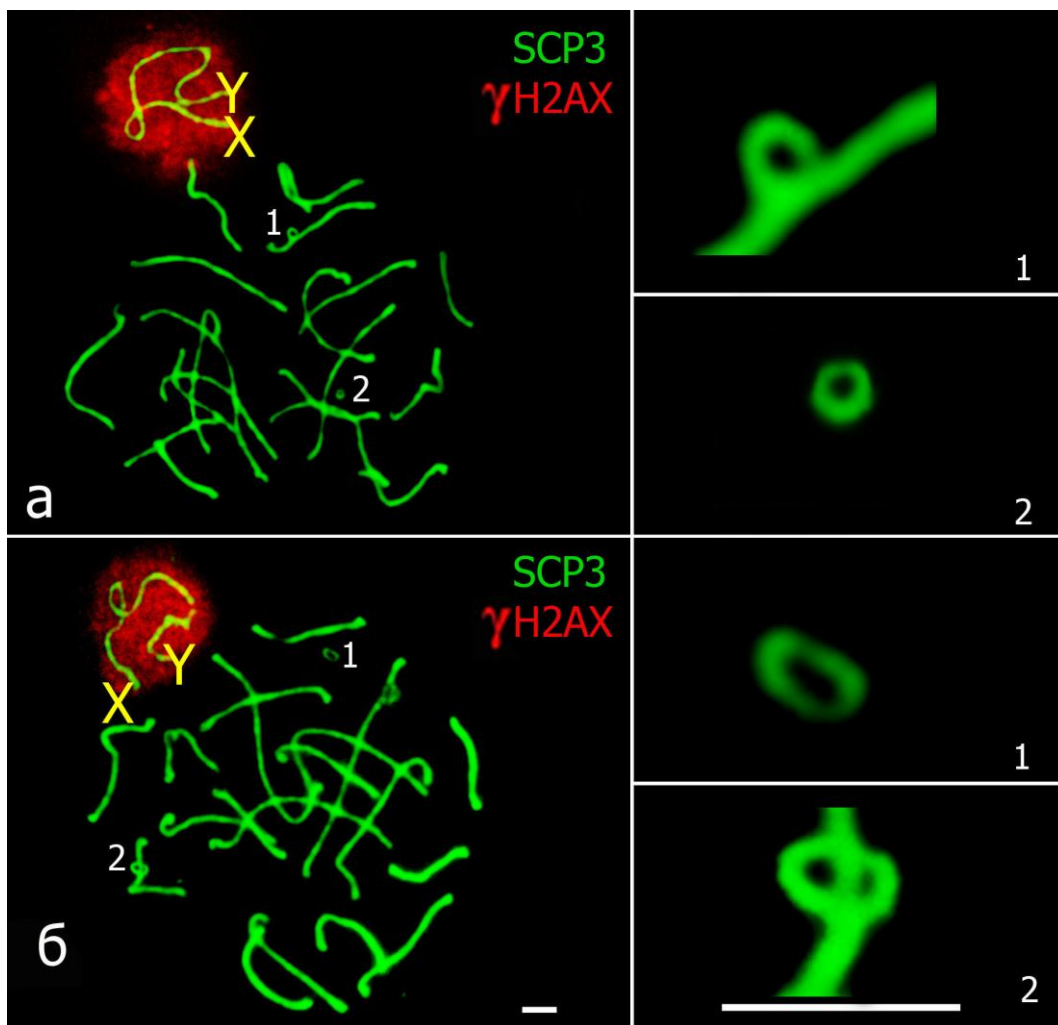


Рисунок 1. Формирование кольцевых структур в ядрах сперматоцитов мышей, исследованных на разных сроках после введения секстофага. Иммуноокрашивание антителами к основному белку СК – SCP3 (зеленый) и гистону γ H2AX (красный); а-б. 10 сутки после введения секстофага. Формирования кольцевых структур. В правой колонке увеличенные фрагменты фотографий с кольцевыми структурами. Ваг 2 мкм.

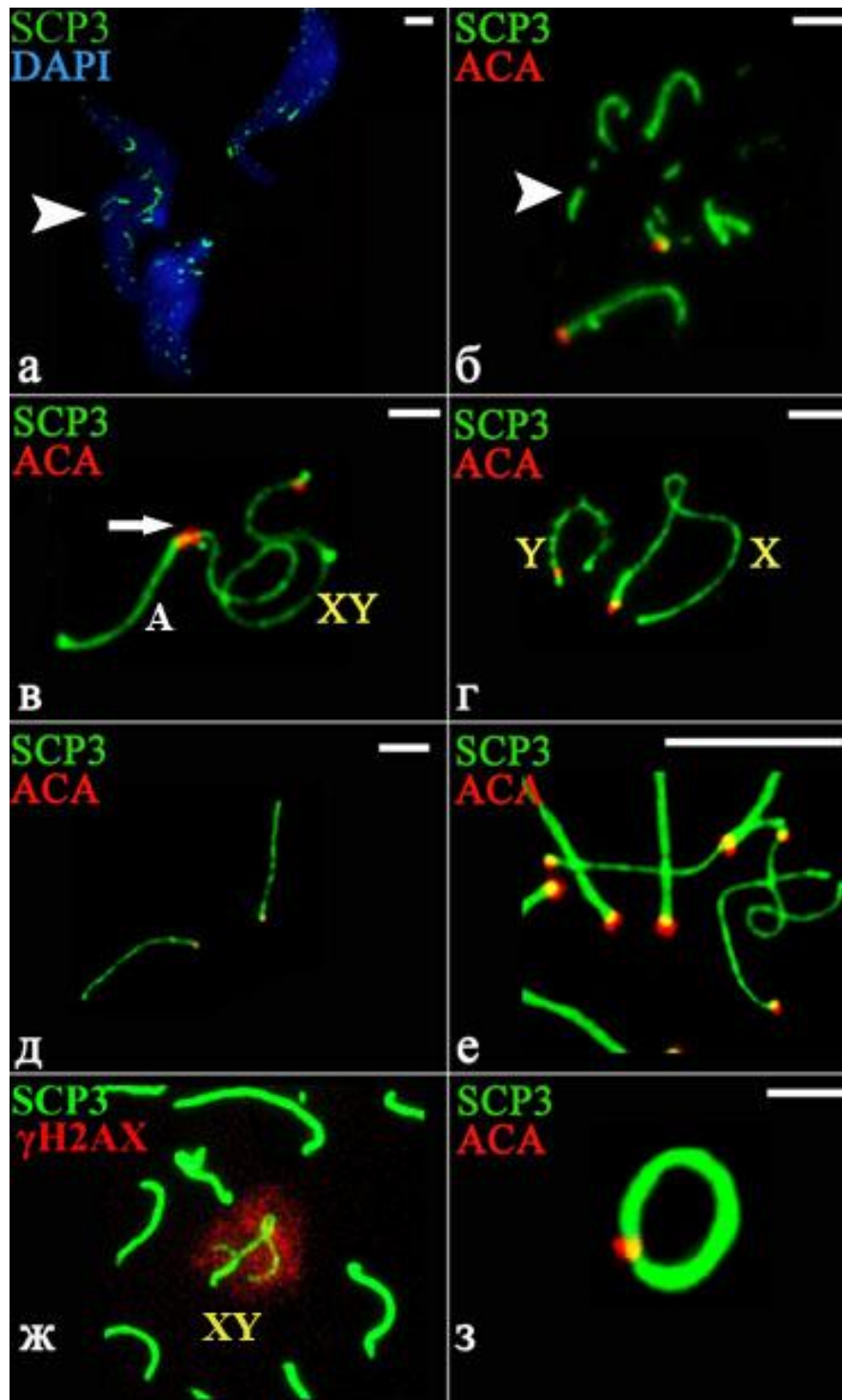


Рисунок 2. Основные типы нарушений, выявленные в структуре ядер сперматоцитов I порядка мыши. Иммуноокрашивание антителами к белку СК SCP3 (зеленый), к гистону γ H2AX (красный) (ж) и антителами к белкам кинетохора ACA (красный) (а-е, з). Хроматин окрашен красителем DAPI (синий).

а. «Мейотическая катастрофа» - тотальная фрагментация СК в ядрах сперматоцитов; б. фрагменты СК (головка стрелки); в. Ассоциация аутосомы с половым бивалентом (стрелка); г. униваленты X и Y хромосом; д. Униваленты аутосом; е. униваленты X и Y хромосом; ж. нарушение формирования полового тельца; з. кольцевой СК-бивалент. Bar 2 мкм.

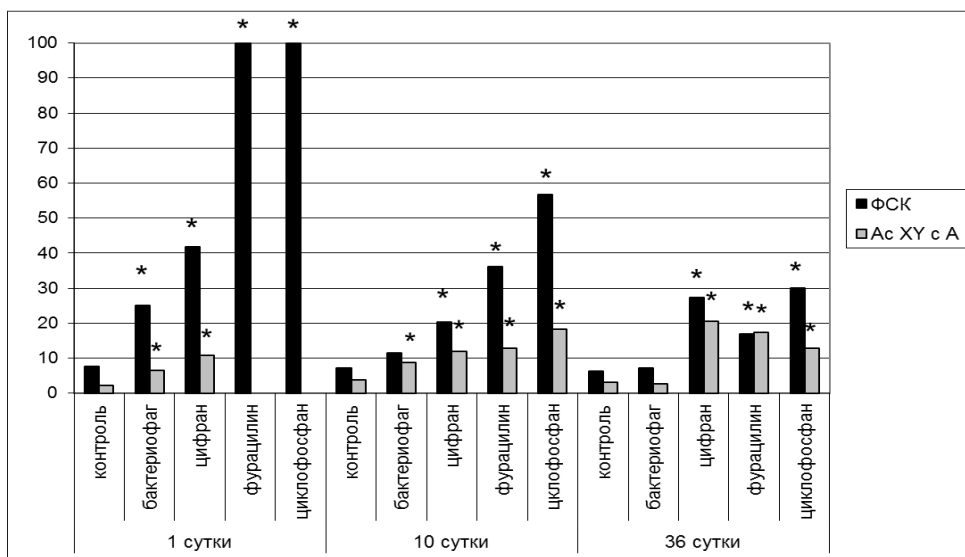


Рисунок 3. Динамика распределения ядер с фрагментами СК (ФСК) и ядер, в которых выявлена ассоциация полового бивалента с аутосомным бивалентом (Ac XY с А).

* Достоверно при $p < 0,05$.

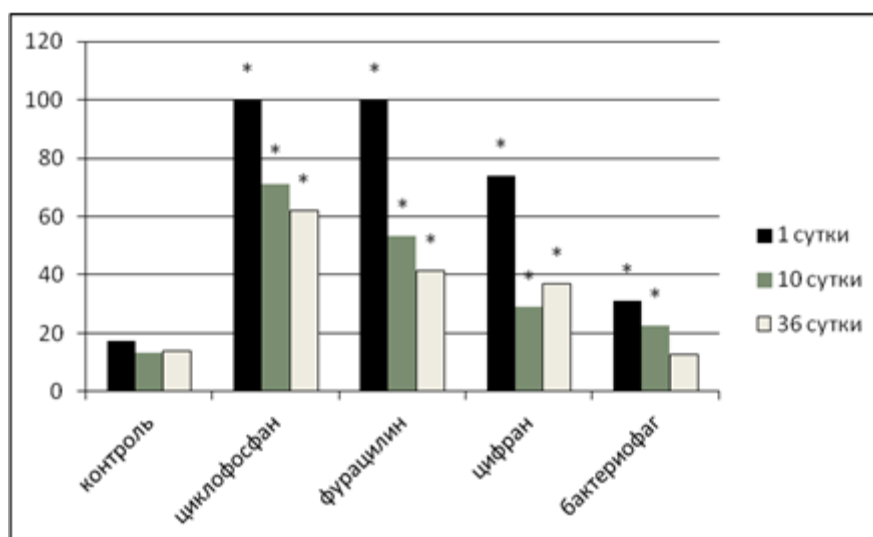


Рисунок 4. Динамика распределения ядер с нарушениями в структуре и поведении СК у контрольных самцов мыши и самцов на 1, 10 и 36-е сутки после окончания введения лекарственных препаратов. * Достоверно при $p < 0.05$.

Анализ СК в ядрах самцов – потомков F1, полученных от скрещивания интактных самок с самцами, получавшими лекарственные препараты в период жизни, предшествующий зачатию

Беременность самок наступала не сразу после ссаживания их с самцами, получавшими лекарственные препараты: фурацилин – 1-я самка на 10-е

сутки забеременела 2-я самка на 12-е сутки; цифран: 1-я самка – 8-е сутки; 2-я самка 13-е сутки; бактериофаг: 1-я самка – 4-е сутки, 2-я самка – 3-е сутки.

Анализ СК в сперматоцитах потомков контрольных самцов

При иммунофлуоресцентном анализе распластанных ядер сперматоцитов I порядка 6 контрольных животных, полученных от двух отцов, которым вводили воду для инъекций, выявлены клетки на всех стадиях профазы I мейоза от лептотены до стадии поздней диплотены. В большинстве ядер нарушения в структуре СК не выявлены. Однако, в единичных ядрах (10,4%) выявлены нарушения в структуре и поведении СК. Данные представлены на Рисунок 3. В потомстве отцов, получавших бактериофаг и фурацилин результаты практически идентичны (Рисунок 6).

Анализ СК в сперматоцитах потомства самцов, получавших инъекции цифрана

Иммуноцитохимически были исследованы СК сперматоцитов I порядка 3 животных из потомства 2 самцов, которым вводили цифран. В 16% изученных ядер были выявлены повреждения структуры и поведения СК, что не достоверно отличалось от контроля. Однако в 5,9% исследованных ядер выявлены кольцевые СК (Рисунок 5 а, б, д). Ядра с фрагментацией СК были обнаружены в 4,2% исследованных клеток. Ассоциация XY бивалента с аутосомным СК бивалентом и асинопсис половых хромосом были выявлены в 3,8% и 2% соответственно. В 40% исследованных клеток аутосомные СК биваленты заворачивались в виде петли (Рисунок 5 в, г). С меньшей частотой встречались ядра с изгибом X хромосомы (31%). Причина такой лабильности структуры СК и ОЭ не понятна, важно, что у контрольных самцов такие отклонения в морфологии СК не выявлены.

Анализ СК в потомстве животных, которым вводили циклофосфан

В течение 30 дней у интактных самок, ссаженных с самцами, получавшими цифран, беременность не наступила. Еще на 60 дней к этим самцам подсадили вторую группу самок, однако беременность не наступила и у этих самок. При вскрытии самцов, получавших цифран, и забитых через 3 месяца после окончания введения циклофосфана, обнаружено гипогонадизм и признаки жировой дистрофии яичка. Из ткани семенников этих самцов не удалось получить ни одного препарата СК.

В структуре СК потомков самцов, которым вводили бактериофаг, фурацилин и воду, не выявлено отличий ни в количестве, ни в спектре обнаруженных нарушений.

У самцов из потомства животных, получавших антибиотик цифран, общее количество поврежденных ядер сперматоцитов не отличалось достоверно от их количества у самцов, получавших воду. Однако достоверно увеличилось количество ядер с кольцевыми СК. Это позволяет предполагать увеличение ломкости хромосом у потомков, следствием которой являются делеции теломерных локусов хромосом, что в свою очередь приводит к формированию кольцевых бивалентов.

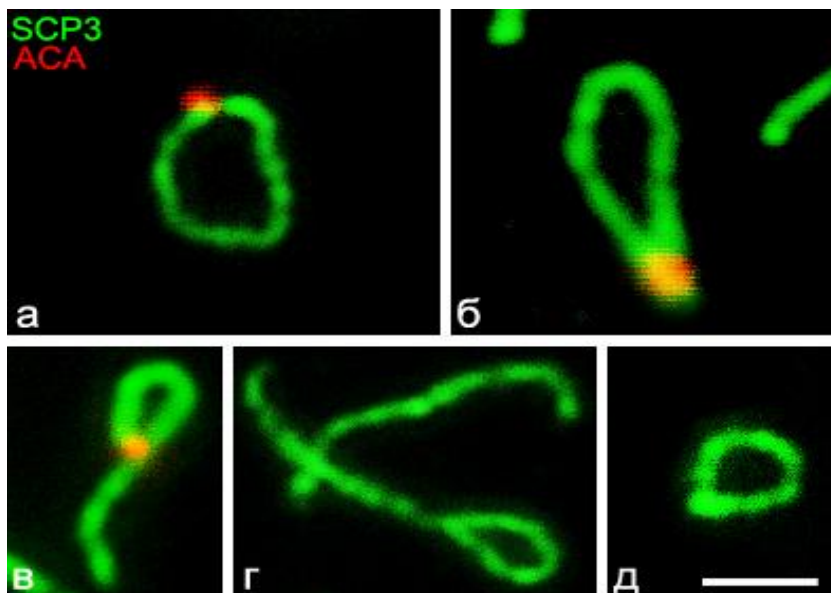


Рисунок 5. Нарушения и изменение морфологии в структуре СК потомства, полученного от отцов, которым вводили цифран. СК иммуноокрашены с помощью антител к белку SCP3 (зеленый), центромеры выявлены с помощью поликлональных антител к белкам кинетохоры – АСА (красный). а, б, д. Кольцевые СК биваленты. в, г. СК аутосомы заворачивается, образуя петлю. Вар 2 мкм.

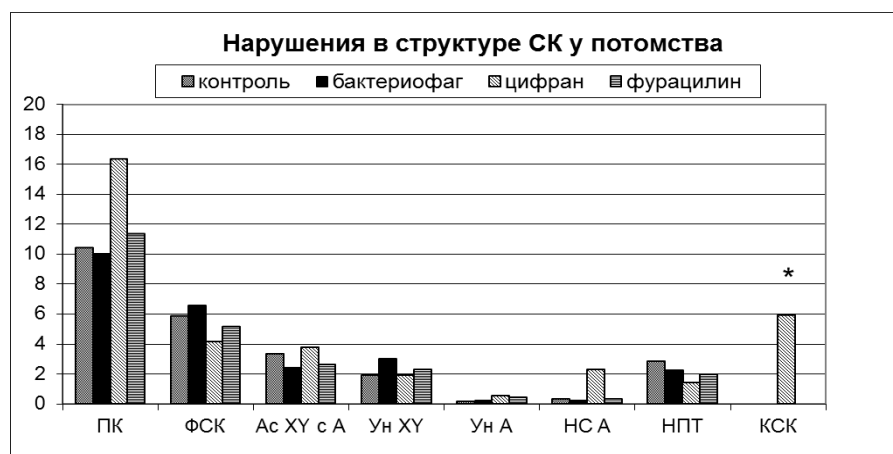


Рисунок 6. Распределение количества (%) нарушений структуры и поведения СК семи различных типов в сперматоцитах у мышей потомства, полученного от отцов, которым вводили бактериофаг, цифран, фурацилин и в контроле. ФСК – фрагментация СК; Ас ХУ с А – ассоциация ХУ с аутосомным СК; Ун ХУ – униваленты ХУ; Ун А – униваленты аутосом; НС А – нарушения синapsиса аутосом; НПТ нарушение формирование полового тельца; КСК – кольцевой СК бивалент. * Достоверно при $P < 0,05$.

Следует подчеркнуть, что секстофаг по сравнению с цифраном вызывал гораздо меньше нарушений в структуре хромосом сперматоцитов мыши, что дает основание для предположения о меньшем риске его применения в качестве антибактериального средства для лечения лиц репродуктивного возраста.

Учитывая то обстоятельство, что сперматогенез человека длится около 70 дней, супружеские пары, готовящиеся к зачатию, должны быть предупреждены о рисках, которые несет прием антибактериальных препаратов в этот период. Полученные результаты подтверждают представление о необходимости прекращения приема антибактериальных препаратов в течение 3 месяцев до планируемого зачатия.

ВЫВОДЫ

1. Введение мышам фурацилина и циклофосфана в лечебной дозе (в течение 10 дней) вызвало множественную фрагментацию хромосом в ядрах сперматоцитов I порядка и их дегенерацию. По аналогии с митотической катастрофой это явление рассматривается нами как мейотическая катастрофа. Массовая элиминация поврежденных сперматоцитов обеспечивает снижение риска малигнизации клеток семенника и трансгенерационной передачи множественных хромосомных нарушений потомкам.

2. Все использованные в работе лекарственные препараты вызывали нарушение архитектоники ядер сперматоцитов I порядка и сходный спектр хромосомных нарушений: а) формирование единичных фрагментов синаптонемных комплексов (СК) или осевых элементов; б) ассоциацию хромосом XY с аутосомным СК; в) нарушение формирования полового тельца; г) формирование унивентов аутосом; д) формирование унивентов половых хромосом; е) формирование кольцевых хромосом.

3. Установлена динамика распределения количества разных типов нарушений в ядрах сперматоцитов с 1-ых по 36-ые сутки после окончания введения лекарственных препаратов. На 1-ые сутки преобладают клетки с нарушениями архитектоники ядер и разрывами в структуре мейотических бивалентов (фрагменты СК). Количество ядер с фрагментами СК постепенно снижается, при этом увеличивается количество клеток, в ядрах которых обнаружены признаки пахитенного ареста – специфического механизма селекции сперматоцитов I порядка.

4. Впервые установлено повреждающее действие бактериофага на мейотические хромосомы мыши. Бактериофаг вызывает значительно

меньшее количество нарушений в ядрах сперматоцитов I порядка мыши по сравнению с фурацилином, цифраном и циклофосфаном. Однако после введения бактериофага впервые обнаружены отпочковывающиеся от СК кольцевые структуры (диаметром до 1 мкм), которые окрашивались антителами к основному белку латеральных элементов СК – SCP3.

5. Генотоксический риск для потомства могут нести ксенобиотики, вызывающие появление ядер с фрагментами СК и кольцевыми СК-бивалентами, так как признаки пахитенного ареста в ядрах с такими нарушениями не выявлены.

6. У самцов F1, полученных от скрещивания интактных самок с самцами, которым вводили антибиотик цифран, в 5,9% ядер выявлены кольцевые хромосомы, что свидетельствует об увеличении ломкости теломерных сайтов хромосом у этих животных. В потомстве от самцов, получавших фурацилин и секстофаг, нарушения в структуре ядер сперматоцитов не выявлены. Самцы, получавшие циклофосфан, не дали потомства.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1 Matveevsky, S.N. Synaptonemal complex analysis of interracial hybrids between the Moscow and Neroosa chromosomal races of the common shrew *Sorex araneus* showing regular formation of a complex meiotic configuration (ring-of-four) [Текст] \ S.N. Matveevsky, S.V. Pavlova, **М.М. Ацаева**, O.L. Kolomiets \ Comparative Cytogenetics – 2012. – V. 6(3) – P. 301–314.

2 Коломиец, О.Л. Нарушения структуры синаптонемных комплексов и особенности селекции сперматоцитов I порядка у мыши в ответ на введение лекарственных препаратов [Текст] \ О.Л., Коломиец, **М.М. Ацаева**, С.Я. Дадашев, С.К. Абилов, С.В. Спангенберг, С.Н. Матвеевский \ Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 11. – С. 1261–1289.

3 **Ацаева, М.М.** Разрывы хромосом в сперматоцитах I порядка мыши, вызванные фурацилином [Текст] \ М.М. Ацаева, П.М. Джамбетова, О.Л. Коломиец, С.К. Абилов \ Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. Биология. Медицина. – 2013. – № 2 – Вып. 52. – С.34-37.

Статьи в сборниках:

4 **Ацаева, М.М.** Флуоресцентный анализ нарушений в структуре синаптонемных комплексов, вызванных ксенобиотиками в сперматоцитах мыши [Текст] \ М.М. Ацаева, О.Л. Коломиец \ Сборник научных трудов "Факторы экспериментальной эволюции организмов". Логос. К. – 2013. – Т. 13. – С. 284-286.

Тезисы конференций:

5 **Ацаева, М.М.** Повреждающее действие антибиотиков и бактериофага на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши [Текст] \ **М.М. Ацаева** \ \ Международная молодежная конференция «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы» посвященная памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 14-16 ноября. «Цифровичок». М. – 2011. – С. 194.

6 **Ацаева, М.М.** Исследование влияния антибактериальных препаратов на структуру синаптонемных комплексов хромосом в профазе I мейоза самцов мыши [Текст] \ М.М. Ацаева \ \ В сб.: Материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2011». Секция «Цитология». М. – 2011. – С. 285.

7 Коломиец, О.Л. Иммунофлуоресцентный анализ сперматоцитов пациентов с нарушением фертильности [Текст] \ О.Л. Коломиец, **М.М. Ацаева**, А.Г. Корноухова, В.Е. Спангенберг \ \ 10-ый Российский научный форум на 10-ой Международной выставке «Мужское здоровье и долголетие». М. 2012 15-17 февраля. ВК «Римизэкспо», М. – 2012. – С. 149.

8 **Ацаева, М.М.** Особенности селекции сперматоцитов I порядка мыши в ответ на введение антимикробных препаратов [Текст] \ М.М. Ацаева, С.Я. Дадашев, А.Г. Корноухова, О.Л. Коломиец \ \ Материалы международной конференции "Хромосома 2012", Новосибирск, 2-7 сентября. Редакционно-издательский центр НГУ – 2012. – С. 36.

9 Павлова, С.В. Способствуют ли хромосомные гибридные зоны видообразованию у обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*: о чем свидетельствуют данные изучения мейоза? [Текст] \ С.В. Павлова, С.Н. Матвеевский, **М.М. Ацаева**, О.Л. Коломиец, Н.Ш. Булатова \ \ Материалы междунар. конф. "Хромосома 2012". Новосибирск. – 2012. – С. 157-158.

10 Коломиец, О.Л. Механизмы селекции сперматоцитов в профазе I мейоза и их роль в формировании мужского бесплодия [Текст] \ О.Л. Коломиец, **М.М. Ацаева**, А.Г. Корноухова, С.Н. Матвеевский, В.Е. Спангенберг \ \ 11-й Международной медицинской выставке «Мужское здоровье и долголетие». Москва. 19-20 февраля. – 2013 – С. 120.

Благодарность

Выражаю глубокую благодарность научному руководителю работы, профессору О.Л. Коломиец за постоянное внимание, помощь в процессе выполнения работы и освоении теоретических основ современной цитогенетики. Также хочу выразить благодарность всем сотрудникам лаборатории цитогенетики ИОГен РАН: профессору Ю.Ф. Богданову, к.б.н. С.Я. Дадашеву., к.б.н. Т.М. Гришаевой, д.б.н. В.Л. Чубыкину, к.б.н. С.Н. Матвеевскому, В.Е. Спангенбергу, к.б.н. И.С. Мажейке, Т.В. Сизовой за помощь в освоении методов и обсуждении полученных результатов.

Выражаю особую признательность профессору С. К. Абилеву, который инициировал и поддержал мою стажировку в ИОГен.

Выношу признательность декану биолого-химического факультета к.б.н. Р.Х. Гайрабекову и сотрудникам лаборатории клеточной биологии морфологии и микробиологии ЧГУ: П.М. к.б.н. Джамбетовой, З.И. Бисултановой., к.б.н. А.М-Х. Солтаевой. Отдельная благодарность моей семье и друзьям за поддержку и понимание на всех этапах выполнения работы.