

Р. П. МАРТЫНОВА

НОВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МУТАГЕННОМ ДЕЙСТВИИ КАНЦЕРОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 29 IV 1948)

В литературе до последнего времени не было представлено положительных данных по вопросу о мутагенном действии канцерогенных веществ. Между тем получение подобных данных значительно подкрепило бы позиции мутационной теории происхождения новообразований*, являющейся в настоящее время одной из наиболее серьезно обоснованных теорий бластомогенеза.

Лишь в 1939 и 1940 гг. появились отдельные работы по изучению действия канцерогенных веществ на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster*, причем единственным обнадеживающим в этом смысле исследованием явилась работа В. В. Сахарова (1). Другие исследователи (2, 3) получили в то время отрицательные результаты.

Противоречивость литературных данных, а главное, исключительная важность вопроса и побудили нас произвести ряд опытов, результаты которых были в свое время опубликованы (4, 5). Вначале мы повторили, насколько было возможно, методику опытов В. В. Сахарова, вскармливая дрозофилы на корме, в котором содержался метилхолантрен в концентрации 0,004%. Получив отрицательные результаты, мы во второй серии опытов увеличили концентрацию метилхолантрена в корме в 5 раз и с целью удлинения цикла развития дрозофилы понизили температуру содержания их с 25 до 14—18°С. Однако и в этом опыте нам не удалось обнаружить влияния метилхолантрена на мутационный процесс.

В третьей серии опытов 0,5—1,25% масляный раствор метилхолантрена инъецировался** непосредственно в полость тела личинки, откуда он мог, предположительно, более свободно проникнуть в ткани и органы личинки и, в частности, в зародышевые клетки. Инъекции проводились личинкам в 5 следующих друг за другом поколений, причем опытные личинки и мухи каждого из этих поколений развивались на корме, содержащем метилхолантрен в концентрации 0,02%. Инъекции подвергались как взрослые, так и однодневные личинки. Однако, независимо от того, вводился ли метилхолантрен в меньшей концентрации или большей (0,5 или 1,25%), взрослым личинкам или более молодым, однократно или в ряде последующих 5 поколений,— частота возникновения летальных мутаций оставалась стабильной, и применением всех указанных методик нам, следовательно, не удалось обнаружить влияния метилхолантрена на мутационный процесс у дрозофилы.

* Мутационную теорию происхождения новообразований мы трактуем расширительно, имея в виду не только генные мутации или хромосомные aberrации, но и другие возможные изменения наследственного характера, например, изменения определенных микроструктур протоплазмы.

** Инъекции были произведены Н. Н. Медведевым по принятой в опытах с дрозофилой методике (6, 7).

Однако в самое последнее время найден (8, 9) такой метод воздействия на дрозофилу, с помощью которого частота летальных мутаций повышается под влиянием целого ряда канцерогенных веществ.

Таким образом, мутагенное действие канцерогенных веществ у дрозофилы, впервые экспериментально установленное Сахаровым, теперь окончательно доказано Демерецом.

Что касается млекопитающих, то в литературе имеется лишь одно указание Стронга (10) на возможность вызывать мутации у мышей длительным воздействием на их предков метилхолантrenom. Стронгу удалось в одной сублинии мышей получить зародышевую мутацию, обуславливающую возникновение рака желудка у этих животных, и ряд других мутаций. В частности, Стронг получил от 2 коричневых мышей черного мутанта, т. е. доминантную мутацию гена *b*. Однако к данным Стронга некоторые исследователи относятся скептически.

Еще в 1939—1941 гг. мы провели предварительные опыты на мышах с целью выяснения возможности получения соматической мутации по окраске шерсти при воздействии 3,4-бензпиреном.

Путем скрещивания гомозиготных по черной окраске и по фактору общей пигментации мышей (типа ВВСС) с альбиносами, не содержащими фактора черной окраски (т. е. типа *b*ссс), мы получили гетерозиготных мышей по двум генетическим факторам ВвСс, причем окраска шерсти у них была черная. Всего было получено 36 таких черных „гетерозиготных“ мышей, у которых мы в 2½—3-месячном возрасте искусственно вызвали облысение значительного участка спинки однократным смазыванием смесью скипидара и дегтя. Для опыта послужили 26, а для контроля 10 таких мышей. После полного облысения участка спинки подопытные мыши были подвергнуты смазыванию 0,3% раствором 3,4-бензпирена в бензоле через каждые 3 дня в течение 6—9 недель, причем каждой мыши производилось не больше 12 смазываний. Контрольных мышей мы в те же сроки смазывали бензолом. Три подопытных мыши погибли до появления у них шерсти, у остальных 23 и у 10 контрольных шерстка восстановилась черного цвета. Другая серия подобных же опытов была в связи с войной прервана и ясных результатов не дала.

В дальнейшем, в связи с получением чистых линий мышей, мы возобновили работу по выявлению мутагенного действия blastomогенных веществ и поставили опыт с той же целью получения соматической мутации. Методика опыта была несколько изменена по сравнению с предыдущим: мыши линии „С₅₇ черные“, имеющие по крайней мере два хорошо изученных доминантных гена в гомозиготном состоянии (ВВСС), скрещивались с белыми мышами линии „А“, рецессивными в отношении этих генов (*b*ссс). Детеныши от этого скрещивания были, следовательно, гетерозиготными по указанным двум генам (ВвСс).

Для опыта были взяты 18 таких мышат; 10 служили в качестве контроля. Шерсть у всех этих мышей — черной окраски. 18 подопытным мышам в возрасте 2—2½ мес. было произведено подкожное введение по 0,15 см³ 0,5% раствора метилхолантрена в подсолнечном масле. Одновременно 10 таким же контрольным мышам производилось подкожное введение 0,15 см³ подсолнечного масла. Спустя месяц после инъекции всем мышам (и опытным и контрольным) произведена эпиляция спинки указанным выше способом. Через некоторое время выросла шерстка прежнего цвета, т. е. черная. После этого эпиляция производилась ежемесячно в течение 4 мес., причем каждый раз восстанавливалась шерстка черного цвета. Через 4—5 мес. у подопытных мышей стали появляться злокачественные опухоли, в связи с чем данный опыт был закончен.

В дальнейшем мы перешли к опытам по выявлению зародышевых

мутаций. Были применены различные модификации методик, но принцип оставался все время единым и заключался в том, чтобы получить у гетерозиготных по определенным генам мышей видимую рецессивную мутацию, касающуюся окраски шерсти. Для этого канцерогенное вещество вводилось молодым мышам линии „С₅₇ черные“, имеющим указанные выше доминантные гены в гомозиготном состоянии. Мы рассчитывали, что если метилхолантрен или бензпирен вызовет у той или иной мыши линии „С₅₇ черные“ мутацию любого из указанных генов (ВВ или СС), то при скрещивании такой мыши с альбиносом из линии „А“ (bbcc) это наследственное изменение должно, естественно, обнаружиться в виде соответствующего изменения окраски шерсти у мышей первого поколения, причем эти мыши будут иметь уже не черную шерстку, а либо коричневую, либо белую в зависимости от того произошла ли мутация гена В или гена С.

В первой серии опытов по выявлению таких зародышевых мутаций мы вводили под кожу 40 девственных самок линии „С₅₇ черные“ в возрасте 2—2½ мес. по 0,15 см³ раствора 3,4-бензпирена в подсолнечном масле. Выжило 36 самок, которые спустя месяц после инъекции скрещивались с обычными самцами линии „А“. В течение 5 с лишним месяцев от них было получено всего 863 детеныша, причем все потомство оказалось черным. В контроле было 12 таких же самок, которым вводилось подкожно по 0,15 см³ подсолнечного масла. Контрольные мыши принесли за тот же период всего 315 черных детенышей.

Во второй серии опытов, пытаясь воздействовать на мышей в физиологически более чувствительный период, мы вводили по 0,15 см³ 0,5% масляного раствора метилхолантрена беременным (от самца линии „А“) самкам той же линии „С₅₇ черные“ в возрасте около 3 мес. Таких самок было 25; за период около 5 мес. они дали всего 493 детеныша; все детеныши оказались черными. Если не считать первого помета, то детенышей было 351 (поскольку при учете зародышевых мутаций в данном случае первый помет не может идти в счет). В контроле было 13 таких же самок, как в опыте. Им вводилось по 0,15 см³ масла. Контрольные мыши дали всего 264 черных детеныша; если же не считать первого помета, то детенышей в контроле было 191.

В третьей серии опытов мы вводили метилхолантрен в той же дозе под кожу более молодых девственных самок, в возрасте 5—6 недель. Всего было инъцировано 53 таких самки; спустя месяц они скрещивались с самцами линии „А“. К этому времени выжило 46 подопытных самок, которые принесли всего 878 детенышей. Все детеныши были черными. Контроля в этом опыте не было.

Методику четвертой серии опытов мы значительно видоизменили. Воздействию подвергались не самки, а самцы линии „С₅₇ черные“, причем в очень раннем возрасте, не позднее 3-недельного. Инъекцию мы производили двухмоментно, в два срока. Первая инъекция производилась в указанном возрасте, а вторая спустя 3 недели после первой (подкожно по 0,05 см³ 0,5% масляного раствора метилхолантрена). Через некоторое время после второй инъекции ставилось скрещивание инъцированных самцов с девственными самками линии „А“. В четвертой серии опытов введению метилхолантрена подвергалось 80 самцов. Контролем послужили 16 таких же самцов, которым было введено в тех же условиях чистое растительное масло. К моменту скрещивания с самками „А“ в опыте выжило лишь 35 самцов (высокая смертность обусловлена, повидимому, введением метилхолантрена в очень раннем возрасте). В контроле выжило 13 самцов. В опыте из 35 самцов 10 оказались стерильными. От остальных 25 самцов получено 576 детенышей, среди которых оказалось 573 чер-

ных и трое белых мышат. В контроле 1 из 13 выживших самцов оказался стерильным, а от остальных 12 самцов получено потомство из 146 черных детенышей.

Все 3 белых мышонка в опыте произошли от одного самца (№ 11), но от 2 разных самок линии „А“, причем до рождения помета, в котором появился первый белый мышенок (от самки „А“ № 124), от самца № 11 уже было получено 54 детеныша и все были черными. Помет самки № 124, в котором оказалось 5 черных мышат и 1 белый, был уже третьим пометом этой самки от того же самца № 11, причем в первых двух она принесла 13 мышат — все черного цвета. Через 2 недели после рождения первого белого мышонка у другой самки „А“ (№ 58) от того же самца № 11 родились 3 черных и 2 белых детеныша. Другие самки линии „А“, а также коричневые самки (см. ниже), оплодотворенные тем же самцом № 11, давали в это время и в дальнейшем продолжали давать пометы, состоящие из одних лишь черных детенышей. Надо сказать, что появление белых мутантов в потомстве от самца № 11 совпало по времени с появлением у него злокачественной опухоли, вызванной метилхолантроном (микроскопическая картина: веретенчатая саркома с некоторым полиморфизмом и резко выраженным инфильтративным ростом)*.

С целью проверки генотипа самца № 11 мы скрестили его с коричневыми самками (bbCc) линии „С₅₇“, выведенной и описанной Н. Н. Медведевым⁽¹¹⁾. Все коричневые самки линии „С₅₇“ так же, как и остальные белые самки линии „А“, родили черных детенышей. Всего от самца № 11 получено потомство из 143 мышат, среди которых оказалось 140 черных и 3 белых. Если же считать всех инъцированных мышей, то от 198 мышей или, вернее, от 142 выживших после инъекции мышей получено потомство из 2668 детенышей, из которых 2665 оказались черными и 3 белыми. В контроле от 38 выживших после инъекции мышей получено потомство из 652 мышат, все черной окраски.

Резюмируя полученные нами данные, вряд ли можно сомневаться в том, что воздействием канцерогенных веществ нам удалось вызвать у самца линии „С₅₇ черные“ рецессивную мутацию генетического фактора окраски С. Эта мутация произошла повидимому, на ранней стадии сперматогенеза, поскольку получен пучок мутаций, вызвавших в известном промежутке времени несколько одинаковых наследственных изменений.

Одна из 3 белых мышей-мутантов погибла в 10-дневном возрасте, две остальные живы, обе самки, им уже около 2 мес. В настоящее время их генотип подвергается анализу.

Таким образом, как показали результаты наших длительных опытов, мутагенное действие канцерогенных веществ можно считать доказанным и у млекопитающих.

Лаборатория онкологии
Институт нормальной и паталогической морфологии
Академии Медицинских Наук СССР

Поступило
28 IV 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Сахаров, Журн. общ. биол., 3, 1, № 3 (1940). ² C. Auerbach, Proc. Roy. Soc. Edinb., 40, No. 13 (1940). ³ M. Demerec, B. P. Kaufmann, E. Sutton and O. Hinton, Carn. Inst. Wash. Year Book, 30 (1939—1940). ⁴ Р. П. Мартынова и Б. А. Кирсанов, ДАН, 55, № 7 (1947). ⁵ Б. А. Кирсанов и Р. П. Мартынова, ДАН, 55, № 8 (1947). ⁶ Н. Н. Медведев, Drosophila Inform. Serv., No. 3 (1937). ⁷ Н. Н. Медведев, Тр. Ин-та генетики АН СССР, № 11 (1937). ⁸ M. Demerec, Nature, 159, No. 4044 (1947). ⁹ M. Demerec, Drosophila Inform. Serv., No. 21 (1947). ¹⁰ L. Strong, Genetics, 32, No. 1 (1947). ¹¹ Н. Н. Медведев, Булл. эксп. биол. и мед., 24, № 1 (1947).

* Микроскопическое исследование произведено проф. Л. М. Шабаром.