

## ИНДУКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ФАРНЕЗЕНОВ И 2,5-ДИМЕТИЛПИРАЗИНА

© Е.В. Даев, В.А. Мамонтова, Т.С. Глинин

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Для цитирования: Даев Е.В., Мамонтова В.А., Глинин Т.С. Индукция повреждений ДНК в клетках костного мозга мышей при действии фарнезенов и 2,5-диметилпиразина // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 3. — С. 47–54. doi: 10.17816/ecogen16347-54.

Поступила в редакцию: 27.06.2018

Принята к печати: 05.09.2018

✿ В экспериментах на самцах домовых мыши показано, что феромоны 2,5-диметилпиразин и смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -фарнезенов индуцируют повреждения генетического материала в клетках костного мозга реципиентов. Данные, полученные методом кометного электрофореза, подтверждены цитогенетическим анализом делящихся клеток на стадии ана-телофазы. Одновременное воздействие хемосигналами не приводит к усилению эффекта.

✿ **Ключевые слова:** феромоны; фарнезены; 2,5-диметилпиразин; костный мозг; мышь; щелочной кометный электрофорез; хромосомные аберрации.

## DNA DAMAGE INDUCTION IN BONE MARROW CELLS OF MICE AFTER FARNESENES AND 2,5-DIMETHYLPYRAZINE SNIFFING

© E.V. Daev, V.A. Mamontova, T.S. Glinin

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Daev EV, Mamontova VA, Glinin TS. DNA damage induction in bone marrow cells of mice after farnesenes and 2,5-dimethylpyrazine sniffing. *Ecological genetics*. 2018;16(3):47-54. doi: 10.17816/ecogen16347-54.

Received: 27.06.2018

Accepted: 05.09.2018

✿ **Background.** Pheromones are an important regulatory link of synecological contacts in numerous animal species. Chemosignaling participates in establishing of population social structure, it regulates different types of behavior, changes hormonal state and maturation rate, etc. It also can affect the genetic material expression and integrity. **Material and methods.** Groups of adult males of CBA/Lac/Sto/Rap strain were exposed to volatile chemosignals (mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -farnesenes or 2,5-dimethylpyrazine) for 2 or 24 hours. Bone marrow cells were prepared for single cell gel electrophoresis (comet assay test). Content of DNA in comet cells were analyzed. In case of 24 hours exposure bone marrow cells were fixed also for ana-telophase analysis. **Results.** It is shown that exposures with farnesenes or 2,5-DMP both damage genetic material of bone marrow cells. It also followed by induction of mitotic aberration frequency. Simultaneous exposure with all chemosignals does not increase damaging effect. **Conclusion.** Chemosignals which serve as stress-pheromones in mice decrease also the integrity of genetic material in bone marrow cells of recipients. It could be a mechanism of pheromonal impact on density and space-genetic structure of mouse populations.

✿ **Keywords:** pheromones; farnesenes; 2,5-dimethylpyrazine; bone marrow; mice; alkaline comet assay; chromosome aberrations.

### ВВЕДЕНИЕ

Обоняние для домовых мыши является одним из самых развитых каналов получения информации об окружающей среде. Мышь способна не только распознавать запахи пищи, хищников и других экологических факторов, но и синтезировать специфические молекулы, сигнализирующие мышам-реципиентам о поле, возрасте и физиологическом состоянии особи-донора. Выделяемые мышами внутривидовые хемосигналы, способные индуцировать различные поведенческие и физиологические ответные реакции, получили название феромонов.

Известен ряд полоспецифических феромонов домовых мыши, выделяемых только самками или только самцами. Среди хемосигналов, выделяемых только самцами, одними из самых изученных являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -фарнезены (далее — фарнезены), смесь которых вызывает ряд специфических реакций как у самок, так и у самцов. К числу феромонов, выделяемых исключительно самками домовых мыши, относится 2,5-диметилпиразин [1].

Фарнезены (ФЗ) и 2,5-диметилпиразин (ДМП) достаточно широко распространены в природе. У домовых мыши эти вещества продуцируются полоспецифично, их

синтез и экскреция зависят от физиологического и социального статуса особей.

Так, ФЗ у домовых мышей продуцируются препуциальными железами самцов. Они являются аттрактантами для самок, у которых способны индуцировать эструс [2]. При этом у самцов ФЗ связаны с доминированием, а субординантные самцы их избегают [3, 4]. Показано также, что ФЗ индуцируют агрессию, а их продукцию в препуциальных железах регулируют андрогены и  $\alpha$ -меланоцит-стимулирующий гормон ( $\alpha$ -МСГ) в основном через рецепторы MC5R на мембранах клеток [5].

ДМП продуцируется самками и связан со стрессовыми условиями их содержания в однополых группах высокой плотности [6]. Его синтез находится под контролем надпочечников, экскреция во внешнюю среду снижается в эструсе и не выявлена у беременных и кормящих самок [3, 6]. Он вызывает аверсивную реакцию у самцов, замедляет скорость их полового созревания, снижает вес семенников, индуцирует нарушения в мейотически и митотически делящихся клетках, а также повышает частоту аномалий головок спермиев [7, 8].

Есть основания полагать, что социально значимые летучие хемосигналы ДМП и ФЗ выступают стрессорами для самцов мышей и, действуя через центральную нервную систему реципиентов, могут оказывать существенное влияние на клетки-мишени различных органов, одним из которых является костный мозг. При этом стрессорное воздействие феромонов может отражаться на геномном уровне, дестабилизируя его работу вплоть до структурной дезинтеграции.

*Цель исследования* заключалась в попытке выявить возможные эффекты действия ДМП и ФЗ на уровне целостности генома клеток костного мозга у самцов мышей.

Эксперименты проводили в соответствии со всеми необходимыми требованиями и рекомендациями этического комитета СПбГУ по работе с лабораторными животными (заключение № 131-03-1 от 01.06.2017).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для работы служили половозрелые самцы мышей линии СВА в возрасте 3–5 месяцев, из которых формировали группы по 6 животных. Животных содержали в стандартных полипропиленовых клетках при неинвертированном световом режиме, еда и питье *ad libitum*. После как минимум недельной адаптации животные поступали в эксперимент.

Было проведено два эксперимента по изучению дестабилизирующего действия нескольких ольфакторных воздействий на геном клеток костного мозга самцов мышей, отличающихся длительностью воздействия ольфакторными хемосигналами.

Процедуру воздействия длительностью 2 или 24 часа сводили к размещению на решетках клеток перфо-

рированных капсул с тестируемым веществом, нанесенным на фильтровальную бумагу. Использовали дистиллированную воду («Контроль»), 0,01 % раствор 2,5-ДМП (Aldrich, 98 %) или 0,01 % раствор смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -фарнезенов (Sigma-Aldrich, W383902). Объем размещаемых растворов в каждом случае составлял 1,5 мл. При совместном действии (ДМП + ФЗ) на решетку клетки помещали две капсулы с соответствующими растворами.

Через 2 или 24 часа у животных производили забор клеток костного мозга, которые подвергали соответствующим обработкам для последующего кометного электрофореза.

Из бедренных костей животных фосфатно-солевым буфером (PBS, pH = 7,4) вымывали клетки и готовили суспензию в конечной концентрации  $2-3 \cdot 10^5$  кл/мл. Из суспензии готовили препараты для щелочного кометного электрофореза по стандартной процедуре, лизируя клетки (в растворе L1), а затем помещая в электрофоретический буферный раствор (A1) [9]. Электрофорез проводили в камере COMPAC-50 ( $t = 20$  мин,  $U = 1$  В/см, EPS-600). После электрофореза стекла помещали в кювету и заливали 70 % этанолом для фиксации, которую осуществляли в течение 15 мин. Микропрепараты высушивали при комнатной температуре (1–2 часа).

Микропрепараты окрашивали раствором SYBR Green I (Sigma) в разведении 1 : 1000 в затемненной комнате в течение 20 мин, затем промывали в дистиллированной воде и с помощью камеры QIClick (QImaging, Canada) фотографировали на эпифлуоресцентном микроскопе (Axio Scope. A1, Zeiss). Использовали соответствующие (для SYBR Green I) фильтры: длина волны возбуждающего света — 516–560 нм, отсекающий фильтр — 590 нм и стандартизированные условия для захвата изображений с помощью лицензированной программы QCapture Pro7.

Изображения анализировали при помощи программы CometScore v.1.5. На основе предварительной оценки в качестве показателя поврежденности ДНК был выбран параметр процентного содержания ДНК в хвосте кометы. Анализировали по два препарата на животное и не менее 200 клеток на препарат (то есть не менее 400 клеток на животное).

В эксперименте с двухчасовым воздействием двум дополнительным животным за 6 часов до забора материала внутрибрюшинно вводили раствор акриламида (доза 100 мг/кг) [10]. Полученные от них данные использовали для оценки работоспособности метода и как «позитивный контроль».

В эксперименте с 24-часовым воздействием часть клеток костного мозга мышей фиксировали (3 части этанола : 1 часть ледяной уксусной кислоты). В дальнейшем из этого материала готовили давленные препараты, окрашенные ацеорсеином (2 %), для цитогенетического анализа ана-телофазным методом. Анализировали

частоту митотических нарушений (не менее 200 делящихся клеток на животное), в том числе структурные хромосомные aberrации и нарушения расхождения хромосом. Учитывали одиночные и двойные мосты, фрагменты, отставшие хромосомы и множественные перестройки по описанной ранее методике [11].

Материал всех экспериментов предварительно шифровали.

Статистический анализ начинали с оценки гомогенности материала, сравнивая параметры полученных распределений в случае теста ДНК-комет [12]. Ранее нами были подробно рассмотрены преимущества анализа типа распределения данных теста ДНК-комет, дополняющих результаты точечных оценок (таких как среднее и медиана), не дающих полного представления о характере различий, возникающих между животными контрольных и экспериментальных групп [12].

Гомогенность результатов ана-телофазного анализа проверяли с помощью метода многопольного Chi-square. Затем данные объединяли в пределах каждого варианта

и соответствующими методами проводили межгрупповые сравнения. При анализе содержания ДНК в хвостах комет для соответствующих параметров распределений вычислялся 99 % CI. Сравнения между вариантами проводили методом F (extra sum-of-squares F test), а данные ана-телофазного метода — с помощью таблиц сопряженности  $\chi^2$ . Использовали пакет программ GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Эффект двухчасового воздействия ольфакторными хемосигналами

Анализ типа распределения частоты клеток с разной степенью поврежденности ДНК в костном мозге самцов мышей линии СВА показал, что для каждого животного в пределах контрольной и экспериментальных групп наилучшим является экспоненциальное распределение (рис. 1). Построение модельных кривых распределения для каждого варианта воздействия хорошо соответствовало реальным распределениям данных ( $R^2 \geq 0,98$ ).

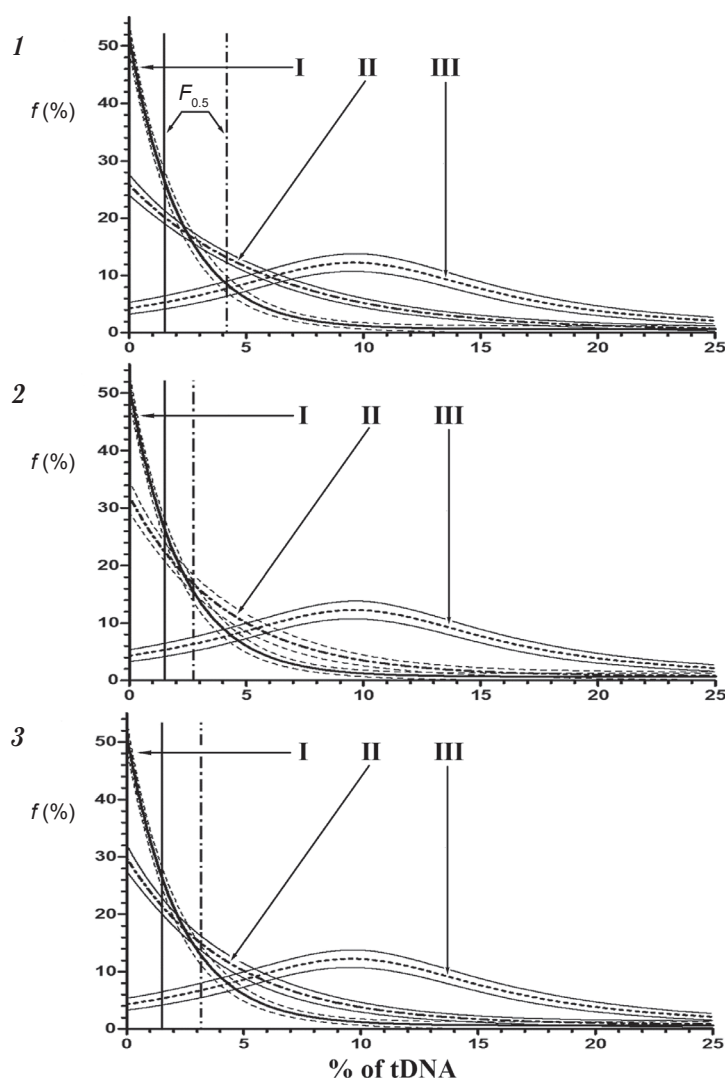


Рис. 1. Распределение частоты встречаемости клеток костного мозга с разным содержанием ДНК в хвостах комет после двухчасового действия различных хемосигналов на самцов мышей линии СВА ( $f \pm 99\%$  CI).  $f(\%)$  — частота встречаемости клеток; % of tDNA — содержание ДНК в хвосте кометы; I — контроль; II — соответствующее воздействие (1 — фарнезены; 2 — 2,5-диметилпиразин; 3 — совместное действие фарнезенов и 2,5-диметилпиразина); III — действие акриламида. Вертикальными линиями отмечены величины  $F_{0.5}$  для сравниваемых вариантов (см. табл. 1)

Fig. 1. Frequency distribution of bone marrow cells with different DNA content in comet tails after 2 hrs exposures of CBA mouse males with different chemosignals or acrylamide injection ( $f \pm 99\%$  CI). I — Control; II — exposure to corresponding chemosignal (1 — Farnesenes; 2 — DMP; 3 — both farnesenes and DMP); III — acrylamide injection. Vertical lines are  $F_{0.5}$  points (see table 1)

Таблица 1

Параметры экспоненциального распределения клеток костного мозга по показателю содержания ДНК в хвостах комет в группах самцов мышей линии СВА после различных двухчасовых воздействий

Table 1

Parameters of damaged bone marrow cells exponential distribution accordingly DNA content in comet tails after different exposures of CBA mouse males for two hrs

Вариант / Variant	Параметры / Parameters			
	$Y_0$	$K$	$P$	$F_{0,5}$
Контроль / Control*	48,95 <sup>51,4</sup> <sub>53,93</sub>	0,399 <sup>0,45</sup> <sub>0,499</sub>	0,04 <sup>0,7</sup> <sub>1,25</sub>	1,39 <sup>1,5</sup> <sub>1,74</sub>
ФЗ / FS	24,00 <sup>25,8</sup> <sub>27,61</sub>	0,142 <sup>0,17</sup> <sub>0,188</sub>	0 <sup>0,4</sup> <sub>0,93</sub>	3,68 <sup>4,2</sup> <sub>4,87</sub>
ДМП / DMP	29,32 <sup>32,1</sup> <sub>34,88</sub>	0,201 <sup>0,24</sup> <sub>0,286</sub>	0,02 <sup>0,7</sup> <sub>1,48</sub>	2,42 <sup>2,8</sup> <sub>3,45</sub>
ФЗ + ДМП / FS + DMP	27,57 <sup>29,9</sup> <sub>32,19</sub>	0,191 <sup>0,23</sup> <sub>0,261</sub>	0,16 <sup>0,8</sup> <sub>1,38</sub>	2,65 <sup>3,1</sup> <sub>3,63</sub>

*Примечание.* Для каждого параметра приведены доверительные интервалы (99 % CI). \* параметры  $Y_0$ ,  $K$  и  $F_{0,5}$  контрольной группы достоверно отличаются от соответствующих показателей в группах после ольфакторных воздействий ( $p < 0,0001$ ).  $F_{0,5}$  — обозначение параметра half-life, указывающего на % ДНК в хвостах комет, при котором частота встречаемости клеток падает в два раза; ФЗ — фарнезены; ДМП — 2,5-диметилпиразин; ФЗ + ДМП — совместное действие фарнезенов и 2,5-диметилпиразина.

*Note.* For each parameter 99% CI has been shown. \*  $Y_0$ ,  $K$  and  $F_{0,5}$  are significantly differed from corresponding values of all exposed groups.  $F_{0,5}$  parameter (half-life) pointed to tail DNA level where frequency of damaged bone marrow cells lowered in two times; FS — farnesenes; DMP — 2,5-dimethylpyrazine; FS + DMP — simultaneous action of farnesenes and 2,5-dimethylpyrazine

Внутригрупповых различий выявлено не было, что позволило охарактеризовать каждую группу единым уравнением:  $Y = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau}$  (табл. 1). Биологический смысл основных параметров этого распределения легко интерпретировать:  $Y_0$  (пересечение кривой с осью  $Y$ ) — частота встречаемости в анализируемой выборке неповрежденных клеток;  $K$  (крутизна склона кривой) отображает скорость исчезновения клеток по мере возрастания степени поврежденности их ДНК в анализируемой выборке. Показатель «плато» (Plateau) можно рассматривать как некую константную для каждого варианта воздействия частоту встречаемости клеток с любой степенью поврежденности ДНК.

Кроме того, интерес представляет параметр half-life, обозначенный здесь как  $F_{0,5}$  (падение частоты встречаемости вдвое), который указывает степень поврежденности ДНК клеток при падении их частоты встречаемости в 2 раза. Этот параметр можно интерпретировать как медиану, делящую выборку на две равные части: менее и более поврежденных клеток (с содержанием ДНК соответственно в интервале от 0 до Me и от Me до 100 %).

Сравнение данных показало, что все используемые ольфакторные воздействия повреждают ДНК в клетках костного мозга самцов-реципиентов, что оценивали, сравнивая распределение процентного содержания ДНК в хвостах комет в каждом варианте с параметрами контрольного распределения (см. рис. 1). Основные показатели экспоненциальных распределений ( $Y_0$  и  $K$ ) во всех группах после воздействий достоверно ниже, чем в контроле ( $F$  не менее 206(1,44) для  $Y_0$  и не ме-

нее 56,7(1,44) для  $K$ ,  $p < 0,0001$ ). При этом не выявлено отличий между эффектами различных ольфакторных воздействий (табл. 1).

По показателю  $P$  (плато) никаких межгрупповых различий обнаружено не было ( $p = 0,54$ ).

Двух животных (группа «Акриламид») использовали как дополнительный контроль для проверки работоспособности методики кометного электрофореза. Полученные данные соответствовали другому типу распределения, что наглядно отражает более сильный генотоксический эффект внутрибрюшинного введения акриламида (см. рис. 1). Результаты действия мутагена наилучшим способом описывает Лоренцево распределение с параметрами  $A = 12,2$ ;  $C = 9,6$ ;  $W = 7,1$  ( $R^2 = 0,952$ ).

Сравнение показателей  $F_{0,5}$  half-life (сходного с медианой при традиционном анализе) продемонстрировало, что если в «Контроле» степень фрагментации ДНК у половины клеток не превышает 1,5 % (значение этого показателя с 99 % CI равнялось <sub>1,39</sub><sup>1,5</sup><sub>1,74</sub>), то для самого слабо отличающегося от «Контроля» варианта (ДМП) оно составило <sub>2,42</sub><sup>2,8</sup><sub>3,45</sub>.

Детальный анализ кривых показал, что в «Контроле» частота клеток с % ДНК в хвостах комет падает в два раза (то есть на 25,7 %) в точке, где степень поврежденности составляет всего 1,5 % ( $F_{0,5} = 1,5$  %). Для варианта «ДМП» в этой же точке она снижена всего примерно на 10 %. Аналогичное падение для оставшихся вариантов («ФЗ + ДМП» и «ФЗ») составляет соответственно около 9 и 5 %. Таким образом, частота клеток с нарушениями генетического материала после двухчасовых ольфакторных воздействий с увеличением

степени поврежденности ДНК падает заметно медленнее, чем в контроле.

По параметрам  $Y_0$ ,  $K$  и  $F_{0,5}$  выявлены также различия между генотоксическими эффектами ФЗ и ДМП ( $F(1,46)$  для  $Y_0$  составляет 27,5 ( $p < 0,0001$ ; для  $K$  — 18,33)): фарнезены вызывают более сильное повреждающее действие (см. рис. 1, табл. 1).

Не обнаружено какого-либо аддитивного или синергичного эффекта одновременного действия ФЗ и ДМП (см. табл. 1). Кривая распределения частот по основным параметрам  $Y_0$  и  $K$  не отличается от таковой для варианта ДМП. Тем не менее совместное действие хемосигналов слабее, чем только ФЗ:  $Y_0$  и  $K$  достоверно выше, а  $F_{0,5}$  меньше, чем после действия ФЗ (см. табл. 1).

Эффект 24-часового воздействия ольфакторными хемосигналами

Анализ типа распределения частоты клеток с разной степенью поврежденности ДНК в костном мозге сам-

цов мышей линии СВА после ольфакторных 24-часовых воздействий показал, что, как и в случае двухчасовых воздействий, для каждого животного в пределах контрольной и экспериментальных групп наилучшим является экспоненциальное распределение ( $R^2$  в каждом случае был не ниже 0,96). Внутригрупповых различий выявлено не было, что позволило охарактеризовать каждую группу своим единым уравнением (рис. 2, табл. 2).

Сравнение данных, полученных после 24-часовых воздействий, с контрольными продемонстрировало, что степень фрагментации ДНК в клетках костного мозга возрастает после всех ольфакторных воздействий (см. рис. 2, табл. 2).

Основные параметры экспоненциальных распределений ( $Y_0$  и  $K$ ) после действия хемосигналов достоверно ниже соответствующих показателей в контрольной группе ( $F(1,48)$  не меньше 111,0 для  $Y_0$  и не меньше чем 17,2 для  $K$ ,  $p \leq 0,0001$ )), что отражает большую

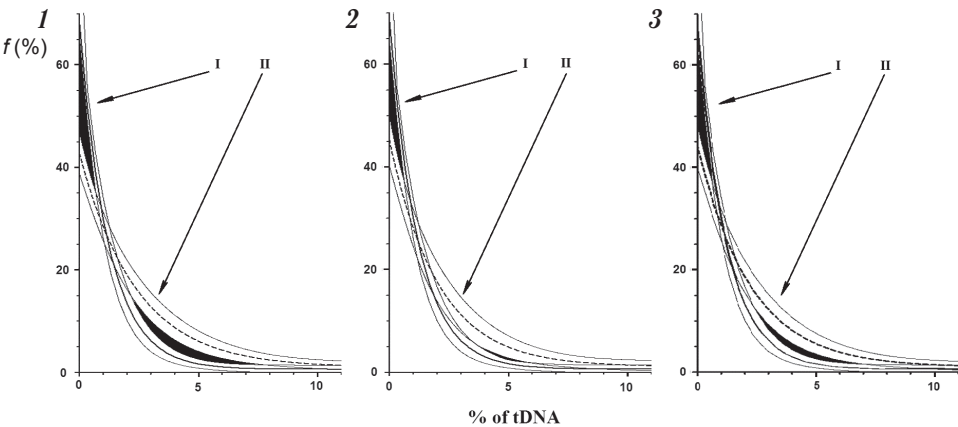


Рис. 2. Распределение частоты встречаемости клеток костного мозга с разным содержанием ДНК в хвостах комет после 24-часового действия различных хемосигналов на самцов мышей линии СВА ( $f \pm 99\%$  CI). I — контроль, II — соответствующее воздействие: 1 — фарнезены; 2 — 2,5-диметилпиразин; 3 — совместное действие фарнезенов и 2,5-диметилпиразина. Черным выделены области «неперекрывания» доверительного интервала (99 % CI). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Fig. 2. Frequency distribution of bone marrow cells with different DNA content in comet tails after 24 hrs exposures of CBA mouse males with different chemosignals ( $f \pm 99\%$  CI). I — Control; II — exposure to corresponding chemosignal (1 — Farnesenes; 2 — DMP; 3 — both farnesenes and DMP). Black zones show where confidence intervals are not overlapping. The rest symbols are the same as in Fig. 1

Таблица 2  
Параметры экспоненциального распределения клеток костного мозга по показателю содержания ДНК в хвостах комет в группах самцов мышей линии СВА после различных 24-часовых воздействий

Table 2  
Parameters of damaged bone marrow cells exponential distribution accordingly DNA content in comet tails after different exposures of CBA mouse males for 24 hrs

Вариант / Variant	Параметры / Parameters			
	$Y_0$	$K$	$P$	$F_{0,5}$
Контроль / Control*	65,0 <sup>68,5</sup> <sub>72,0</sub>	0,70 <sup>0,83</sup> <sub>0,97</sub>	0 <sup>0,26</sup> <sub>1,364</sub>	0,72 <sup>0,83</sup> <sub>0,99</sub>
ФЗ / FS	38,7 <sup>42,8</sup> <sub>46,9</sub>	0,33 <sup>0,42</sup> <sub>0,51</sub>	0,093 <sup>0,32</sup> <sub>1,856</sub>	1,37 <sup>1,65</sup> <sub>2,09</sub>
ДМП / DMP	40,4 <sup>45,3</sup> <sub>48,8</sub>	0,36 <sup>0,49</sup> <sub>0,61</sub>	0,025 <sup>0,38</sup> <sub>2,129</sub>	1,28 <sup>1,42</sup> <sub>1,90</sub>
ФЗ + ДМП / FS + DMP	40,2 <sup>44,5</sup> <sub>48,8</sub>	0,35 <sup>0,45</sup> <sub>0,55</sub>	0,042 <sup>0,32</sup> <sub>1,847</sub>	1,27 <sup>1,54</sup> <sub>1,98</sub>

Примечание. Обозначения те же, что и для табл. 1.  
Note. Symbols are the same as for table 1



по сравнению с контролем частоту клеток с высоким содержанием ДНК в хвостах комет. По показателю  $P$  (плато) различий не выявлено ( $p = 0,30$ ). Также не обнаружено различий по основным показателям между группами после различных ольфакторных воздействий (см. табл. 2). Сравнение показателя  $F_{0,5}$  half-life, показало, что у половины клеток животных контрольного варианта содержание ДНК в хвостах комет не превышает 0,83 %. Таким образом, падение частоты клеток в точке 0,83 % составило 34,25 % ( $68,5/2$ ) для контрольного варианта и всего около 12–15 % (то есть примерно на  $1/3$ ) для каждого из вариантов ольфакторных воздействий.

Для наименее отличающегося от контроля варианта (ДМП)  $F_{0,5}$  было почти в два раза больше и составило 1,42 % (см. табл. 2). Еще медленнее снижалась частота поврежденных клеток после воздействий ФЗ и ФЗ + ДМП (см. рис. 2, табл. 2). Ни аддитивного, ни синергического эффекта совместного действия ФЗ и ДМП выявлено не было.

В целом можно заключить, что повреждающее ДНК действие летучих хемосигналов после двухчасового воздействия выражено сильнее, чем после 24-часового. Именно после двухчасового воздействия выявлены различия между действием ФЗ и ДМП.

Анализ частоты цитогенетических нарушений, выявляемых в митотически делящихся клетках костного мозга самцов мышей линии СВА после соответствующих 24-часовых воздействий, показал, что используемые хемосигналы (и их сочетание) индуцируют повреждения на хромосомном уровне (табл. 3).

Воздействие 2,5-ДМП повышает общую частоту митотических нарушений в 1,6 раза ( $p = 0,019$ ), а фарнезены — в 1,8 раза ( $p = 0,004$ ). Сочетанное воздействие 2,5-ДМП и фарнезенов также увеличивает частоту

митотических нарушений почти в 2 раза ( $p = 0,00008$ ) по сравнению с контролем, но различий по эффективности применяемых воздействий не установлено (см. табл. 3).

Таким образом, как 2,5-ДМП, так и фарнезены увеличивают частоту митотических нарушений в клетках костного мозга самцов мышей. При сочетанном воздействии этих хемосигналов усиления эффекта не наблюдали (см. табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Фарнезены (класс сесквитерпенов) и 2,5-диметилпиразин (гетероциклическое соединение) относятся к летучим веществам с широким спектром биологических эффектов. Так, являясь мажорными компонентами в составе эссенций масел некоторых растений, ФЗ могут играть важную роль в ингибировании пролиферации клеток и роста опухолей [13, 14]. Показано влияние таких масел на различные параметры поведения мышей [15]. Клетки могут синтезировать фарнезены эндогенно путем дефосфорилирования фарнезилпирофосфата [16].

У муравьев ФЗ и пиразины могут выступать в роли указателей пути [17], а у афид служить сигналом тревоги [18]. ДМП у муравьев, в зависимости от конкретной ситуации, может быть как аттрактантом, так и репеллентом [19]. Пиразины и, в частности, ДМП могут образовываться при термической обработке пищевых продуктов [19, 20]. Увеличивая содержание пиразинов в процессе приготовления пищи, человек улучшает ее аромат за счет пиразинов, обладающих «ореховым» и другими запахами. При этом аттрактивность пищевых продуктов зависит от баланса и концентраций пахучих веществ, включая пиразины. Переизбыток последних может вызвать неприятные ощущения.

Таблица 3

**Общая частота (%) клеток с нарушениями митоза в клетках костного мозга самцов домовых мышей линии СВА после 24-часового воздействия различными ольфакторными хемосигналами**

Table 3

**Total frequency (%) of CDF mouse males bone marrow cells with mitotic disturbances after 24 hrs exposure to different olfactory chemosignals**

Вариант / Variant	Число проанализированных клеток / Number of analyzed cells		Общая частота клеток с МН / Total frequency of MD
	Всего / Total	с МН / with MD	
Контроль / Control	1237	37	2,99
ДМП / DMP	1263	63	4,99*
ФЗ / FS	1269	69	5,44**
ФЗ + ДМП / FS + DMP	1276	76	5,96***

Примечание: МН — митотические нарушения; \*, \*\*, \*\*\* отличие от контроля (критерий многопольного  $\chi^2$ ;  $p$  соответственно  $<0,05$ ,  $<0,01$  и  $<0,001$ ).  
 Note. MD — mitotic disturbances; \*, \*\*, \*\*\* difference from control values (contingency  $\chi^2$ -test,  $p$ , correspondingly,  $<0.05$ ;  $<0.01$  and  $<0.001$ )

Многочисленные биологические эффекты этих веществ на модельных животных объектах в настоящее время служат предметом для интенсивного изучения. Тем не менее подобных исследований, проведенных на человеке, явно недостаточно.

Показано, что у животных синтез и экскреция дозорами многих феромонов, как и действие последних на реципиентов, видоспецифично и зависит от пола, возраста и физиологического состояния организма [21, 22].

Полученные в данной работе результаты подтвердили наше предположение о генотоксическом действии ФЗ и ДМП на организм самцов-реципиентов домовых мышей. В литературе для применяемых хемосигналов описаны физиологические и поведенческие эффекты, характерные для действия стресс-факторов. Так, известно, что ФЗ и ДМП вызывают аверсию у самцов мышей [7, 23]; ФЗ индуцируют агрессию у доминантных самцов [5], а продукция 2,5-ДМП находится под гормональным контролем надпочечников [25].

По нашему мнению, описанный в данной работе дестабилизирующий эффект на геном клеток костного мозга можно рассматривать как одну из характеристик организменного стресса, индуцированного изменениями в центральной нервной системе самцов-реципиентов под действием социально значимых хемосигналов.

Использованные в работе феромоны имеют разное биологическое значение. ФЗ являются факторами установления межсамцовой иерархии и секретируются доминантными самцами, отпугивая субординантных [4]. ДМП сигнализирует о переуплотненном состоянии популяции, вызывая реакцию избегания и замедления репродуктивного развития у мышей обоих полов [6, 25]. При этом, несмотря на различную биологическую роль этих феромонов, и тот и другой, по-видимому, активирует стресс-пути, а стресс, в свою очередь, индуцирует генотоксическое действие в соматических клетках.

Представляется вероятным, что как агрессивное поведение самцов, зависимое от ФЗ, так и последующий цитогенетический ответ на уровне генетического материала клеток костного мозга являются разными формами комплексного ответа реципиентного организма на появление феромонов в окружающей среде. Можно также предположить, что феромоны вызывают повреждения в соответствующих рецепторных клетках. Защитным поведенческим ответом многоклеточного организма на такое повреждающее клетки действие выступает индуцированная агрессия.

Повреждающее «цитогенетическое» действие ФЗ и ДМП на генетический аппарат интерфазных (тест ДНК-комет) и митотически делящихся клеток (ана-телофазный тест) костного мозга самцов-реципиентов у мышей осуществляется при участии органов обоняния и связанных с ними центрально-мозговых структур [8]. Снижение работоспособности жизненно

важных органов (например, костного мозга) с поврежденными клетками может предопределять как возникающие длительные изменения агрессивности при межсамцовых контактах, так и ранг животных в группах. В природных условиях подобный механизм может влиять на приспособленность особей, а также на плотность и пространственно-генетическую структуру популяций домовых мышей [27].

Интерес вызывает также отсутствие синергизма при сочетанном действии стрессоров. По-видимому, в данном случае конвергентные пути действия используемых стрессоров в центральной нервной системе могут ограничивать ее возможности реагирования, что и определяет конечную силу эффекта в клетках периферийных органов, который менее выражен, чем «прямое» действие мутагена акриламида.

Работа осуществлена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00678. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(7):551-562. doi: 10.1038/nrn1140.
2. Asaba A, Hattori T, Mogi K, Kikusui T. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front Neurosci.* 2014;8:231. doi: 10.3389/fnins.2014.00231.
3. Harvey S, Jemiolo B, Novotny M. Pattern of volatile compounds in dominant and subordinate male mouse urine. *J Chem Ecol.* 1989;15(7):2061-2072. doi: 10.1007/BF01207438.
4. Novotny M, Harvey S, Jemiolo B. Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia.* 1990;46(1):109-113. doi: 10.1007/bf01955433.
5. Morgan C. Melanocortin-5 Receptor Deficiency Reduces a Pheromonal Signal for Aggression in Male Mice. *Chem Senses.* 2004;29(2):111-115. doi: 10.1093/chemse/bjh011.
6. Jemiolo B, Andreolini F, Xie T-M, et al. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol Behav.* 1989;46(2):293-298. doi: 10.1016/0031-9384(89)90270-9.
7. Даев Е.В., Суринов Б.П., Дукельская А.В. Влияние стресса на хемосигнализацию у лабораторных мышей линии СВА и С57Bl/6 // Экологическая генетика. — 2007. — Т. 5. — № 2. — С. 37–43. [Daev EV, Surinov BP, Dukelskaya AV. Chemosignaling in CBA and C57Bl/6 mouse strains is modified by stress. *Ecological Genetics.* 2007;5(2):37-43. (In Russ.)]. doi: 10.17816/ecogen5237-43.
8. Даев Е.В. Генетические эффекты ольфакторного стресса: исследования на домовых

- мыши. — Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing, 2011. [Daev EV. Geneticheskie efekty ol'faktornogo stressa: issledovaniya na domovoy myshi. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2011. (In Russ.)]
9. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода «комета тест» в радиобиологических исследованиях // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2010. — Т. 50. — № 3. — С. 329–339. [Sirota NP, Kuznetsova EA. The Comet Assay Application in Radiobiological Investigations. *Radiation biology, radioecology*. 2010;50(3):329-339. (In Russ.)]
  10. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, et al. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol*. 2000;30(6):629-799. doi: 10.1080/10408440008951123.
  11. Daev EV, Kazarova VE, Vyborova AM, Dukel'skaya AV. Effects of "Pheromone-Like" pyrazine-containing compounds on stability of genetic apparatus in bone marrow cells of the male house mouse *Mus musculus* L. *J Evol Biochem Physiol*. 2009;45(5):589-595. doi: 10.1134/s0022093009050053.
  12. Daev EV, Petrova MV, Onopa LS, et al. DNA damage in bone marrow cells of mouse males in vivo after exposure to the pheromone: Comet assay. *Russian Journal of Genetics*. 2017;53(10):1105-1112. doi: 10.1134/s1022795417100027.
  13. Costa EV, Menezes LR, Rocha SL, et al. Antitumor Properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med*. 2015;81(7):563-567. doi: 10.1055/s-0035-1545842.
  14. Phutdhawong W, Donchai A, Korth J, et al. The components and anticancer activity of the volatile oil from *Streblus asper*. *Flavour Fragr J*. 2004;19(5):445-447. doi: 10.1002/ffj.1342.
  15. Can OD, Demir Ozkay U, Kıyan HT, Demirci B. Psychopharmacological profile of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):306-310. doi: 10.1016/j.phymed.2011.10.001.
  16. Çelik K, Toğar B, Türkez H, Taşpınar N. *In vitro* cytotoxic, genotoxic, and oxidative effects of acyclic sesquiterpene farnesene. *Turk J Biol*. 2014;38:253-259. doi: 10.3906/biy-1309-55.
  17. Suckling DM, Stringer LD, Bunn B, et al. Trail pheromone disruption of red imported fire ant. *J Chem Ecol*. 2010;36(7):744-750. doi: 10.1007/s10886-010-9810-6.
  18. Verheggen FJ, Diez L, Sablon L, et al. Aphid alarm pheromone as a cue for ants to locate aphid partners. *PLoS One*. 2012;7(8): e41841. doi: 10.1371/journal.pone.0041841.
  19. Sasaki T, Holldobler B, Millar JG, Pratt SC. A context-dependent alarm signal in the ant *Temnothorax rugatulus*. *J Exp Biol*. 2014;217(Pt 18):3229-3236. doi: 10.1242/jeb.106849.
  20. Park D, Maga JA. Identification of key volatiles responsible for odour quality differences in popped popcorn of selected hybrids. *Food Chem*. 2006;99(3):538-545. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.08.019.
  21. Paraskevopoulou A, Chrysanthou A, Koutidou M. Characterisation of volatile compounds of lupin protein isolate-enriched wheat flour bread. *Food Res Int*. 2012;48(2):568-77. doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.028.
  22. Brown RE, Macdonald DW. Social odours in mammals. Oxford: Oxford University Press; 1985.
  23. J Vandenbergh, editor. Pheromones and Reproduction in Mammals. 1st ed. London: Elsevier; 1983.
  24. Jemiolo B, Xie T-M, Novotny M. Urine marking in male mice: Responses to natural and synthetic chemosignals. *Physiol Behav*. 1992;52(3):521-526. doi: 10.1016/0031-9384(92)90341-x.
  25. Novotny M, Jemiolo B, Harvey S, et al. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science*. 1986;231(4739):722-725. doi: 10.1126/science.3945805.
  26. Jemiolo B, Novotny M. Inhibition of sexual maturation in juvenile female and male mice by a chemosignal of female origin. *Physiol Behav*. 1994;55(3):519-522. doi: 10.1016/0031-9384(94)90110-4.
  27. Tzapigina R, Aref'ev A, Sverdlova O, Daev E. Pheromonal regulation hypothesis of the space-genetic structure of the house mouse (*Mus musculus* L.) populations. In: Proceedings of the World Congress of Landscape Ecology, IALE; 1991; Ottawa, Canada. Ottawa: Carleton University; 1991. p. 84.

## ✳ Информация об авторах

**Евгений Владиславович Даев** — д-р биол. наук, профессор, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. E-mail: mouse\_gene@mail.ru.

**Виктория Андреевна Мамонтова** — студент, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. E-mail: vicktory.shubina@gmail.com.

**Тимофей Сергеевич Глинин** — аспирант, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. E-mail: t.glinin@gmail.com.

## ✳ Information about the authors

**Eugene V. Daev** — PhD, ScD, Professor, Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mouse\_gene@mail.ru.

**Victoria A. Mamontova** — Undergraduate, Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: vicktory.shubina@gmail.com.

**Timofey S. Glinin** — Postgraduate, Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: t.glinin@gmail.com.