

Р. М. АРУТЮНЯН, Г. Г. ЗАЛИНЯН, Э. Г. МУГНЕЦЯН,  
Л. А. ГУКАСЯН

## ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ СТАБИЛИЗАТОРОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ЛАТЕКСОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

**Введение.** Для генетико-гигиенической оценки химических соединений весьма актуальным и необходимым этапом является исследование их мутагенного действия. При этом результаты изучения мутагенной опасности веществ будут наиболее полными, если использовать ряд тестов, помогающих выявить цитогенетическую активность исследуемых соединений на различных уровнях. Для определения способности соединений к индукции генных мутаций желательно также использовать микробные тесты с метаболической активацией веществ *in vitro* и *in vivo* [1]. На современном этапе для исследования мутагенных свойств химических веществ применима комплексная схема тестирования, основанная на работе Бочкова и соавт. [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение на различных тест-системах цитогенетического действия двух синтезированных химических соединений, предлагаемых в качестве стабилизаторов полимеризации наиритовых латексов — моноэтаноламина (МЭА) и триэтаноламина (ТЭА), а также неозона-Д, широко используемого стабилизатора полимеризации. Проведен учет хромосомных aberrаций (ХА) и сестринских хроматидных обменов (СХО) в культуре лимфоцитов человека, обработанной исследуемыми соединениями, изучена частота генных мутаций в тест-системе Эймса, а также исследовано мутагенное действие этих веществ на семенах *Crepis capillaris*.

**Материал и методика.** Генные мутации, индуцированные исследуемыми веществами, выявляли по гистидину у различных штаммов *Salmonella typhimurium* тест-системы Эймса [3].

При изучении цитогенетического действия исследуемых соединений в культуре лимфоцитов периферической крови человека их вводили на 52-м часу культивирования в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-2}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Культивирование лимфоцитов проводилось по общепринятой методике в течение 72 ч [4]. При этом учитывали ХА в клетках I и II митозов и СХО. Для этого препараты окрашивали по методике Чеботарева и соавт. [5].

Сухие семена *Crepis capillaris* обрабатывали в течение 1 и 4 ч шестью концентрациями исследуемых соединений. В качестве контроля исследовали также действие диметилсульфоксида, в котором растворяли неозон-Д. После обработки исследуемыми соединениями семена промывали проточной водой и проращивали. Проростки в стадии G<sub>1</sub> клеточного цикла фиксировали смесью уксусной кислоты и этилового спирта. В каждом варианте на временных давленных препаратах анализировали 500 метафаз.

Разницу между опытными и контрольными данными по всем трем системам тестирования оценивали с помощью общепринятых статистических методов.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Мутагенное действие исследуемых соединений изучали на представителях штаммов с заменной пар оснований (1535) и со сдвигом рамки считывания (1534). В табл. 1 представлены результаты по индукции генных мутаций и инактивирующего действия двух концентраций стабилизаторов наиритовых латексов — разведений 1:1 и 1:100 в диметилсульфоксиде. Данные концентрации были выбраны, исходя из выживаемости бактериальных культур, при их обработке различными концентрациями испытуемых соединений. Неозон-Д в исходной концентрации вызывал гибель свыше 95 % бактериальных культур всех штаммов, тем самым исключая возможность идентификации индукции генных мутаций. Разведение неозона-Д в диметилсульфоксиде 1:1 у штамма со сдвигом рамки счи-

Таблица 1

**Индукция генных мутаций в тест-системе Эймса моноэтаноламином, триэтаноламином и неозон-Д (среднее из 6 опытов)**

Вещество	Штаммы ТА 1531				ТА 1535			
	Титр, кл/мл	Выживаемость, %	Число ревертантов		Титр, кл/мл	Выживаемость, %	Число ревертантов	
			в опыте	на $1 \cdot 10^8$ кл/мл			в опыте	на $1 \cdot 10^8$ кл/мл
Контроль	$1,5 \cdot 10^9$	100,0	14	9,3	$1,6 \cdot 10^9$	100,0	20	12,5
Позитивный контроль	$8,5 \cdot 10^8$	59,0	80	9,3	$1,2 \cdot 10^9$	75,0	300	250,0
МЭА (1/1)	$8,8 \cdot 10^8$	66,0	0	—	$1,0 \cdot 10^9$	89,0	18	18,0
МЭА (1/100)	$1,3 \cdot 10^9$	98,0	12	8,9	$1,5 \cdot 10^9$	95,9	15	10,0
ТЭА (1/1)	$6,6 \cdot 10^8$	41,0	6	10,0	$5,8 \cdot 10^8$	30,8	10	17,0
ТЭА (1/100)	$8,1 \cdot 10^8$	59,0	6	7,5	$1,3 \cdot 10^9$	81,0	14	18,0
Неозон-Д (1/1)	$5,6 \cdot 10^8$	38,0	6	12,0	$1,3 \cdot 10^9$	95,9	216	144,0
Неозон-Д (1/100)	$5,3 \cdot 10^8$	41,0	9	14,0	$1,5 \cdot 10^9$	95,9	18	12,0
Диметилсульфоксид	$1,4 \cdot 10^9$	93,3	13	9,2	$1,6 \cdot 10^9$	100,0	24	14,5

тивание оказывает сильное инактивирующее действие на 38 %. Довольно высокое инактивирующее действие на данный штамм оказывают эти же концентрации МЭА и ТЭА, не повышая при этом спонтанного уровня генных мутаций. Разведение 1:100 снимает инактивирующее действие всех стабилизаторов, не повышая уровня генных мутаций. Штамм ТА 1535 оказался более устойчив к инактивирующему действию всех испытанных соединений. МЭА и ТЭА на нем не выявили ни в одном случае мутагенной активности. Неозон-Д на этом штамме в разведении 1:1 повысил индукцию генных мутаций на порядок при 95 %-ной выживаемости клеток, что позволяет отнести данное соединение к мутагенам с первичным молекулярным механизмом действия — заменой пар оснований. Разведение 1:100 снижает индукцию генных мутаций до уровня спонтанного фона.

Предварительные результаты по *in vitro*, *in vivo* метаболической активации с использованием крыс и линейных мышей СВА в качестве промежуточного хозяина свидетельствует о том, что МЭА и ТЭА метаболически не активировались, однако и неозон-Д полностью не потерял способности индуцировать генные мутации (спонтанный фон повысился более чем в 2,5 раза) у штаммов *Salmonella typhimurium* с заменой пар оснований.

Результаты цитогенетического анализа в культуре лимфоцитов периферической крови человека сведены в табл. 2. Проведено дифференциальное выявление эффекта исследуемых соединений в клетках, прошедших I и II митозы. При совместном учете хромосомных aberrаций в клетках I и II митозов ( $M_1 + M_2$ ) было показано, что число хромосомных aberrаций в клетках возросло с увеличением концентрации исследуемого соединения как для одного вещества, так и для другого. При этом для обоих соединений, начиная с концентрации  $10^{-4}$  М, отмечается достоверное различие полученных результатов от контрольных вариантов. Для оценки цитогенетического эффекта исследуемых соединений в конкретных клеточных делениях был использован метод дифференциального окрашивания сестринских хроматид. При сравнении с контрольными вариантами частота aberrантных метафаз в вариантах, обработанных исследуемыми веществами, выявлено, что в клетках, прошедших одно клеточное деление ( $M_1$ ), наблюдается их повышение, как и при совместном учете aberrаций в клетках  $M_1 + M_2$  ( $P < 0,01$ ). В клетках же  $M_2$  не наблюдается достоверного отличия полученных данных от контрольных вариантов.

При анализе спектра ХА, образуемых МЭА и ТЭА, выявлено, что с повышением концентрации исследуемых соединений происходит возрастание числа хроматидных разрывов. При концентрации МЭА и ТЭА

в  $10^{-3}$  М наблюдались единичные обмены с образованием дицентрических хромосом.

Изучение частоты СХО в культурах клеток, обработанных изучаемыми веществами (табл. 3), выявило, что наблюдается тенденция к повышению частоты СХО по сравнению с контролем.

Исследованный параллельно с МЭА и ТЭА неозон-Д ввиду выраженного цитотоксического эффекта в культуре лимфоцитов человека не был оценен на индукцию им хромосомных повреждений.

Таблица 2  
Спектр цитогенетических повреждений, индуцированных моноэтанололамином и триэтанололамином в клетках, прошедших различные деления (показатели на 100 клеток)

Концентрация вещества, М	$M_1 + M_2$				$M_1$				$M_2$			
	Аберрантные метафазы	Общее число разрывов	Число		Аберрантные метафазы	Общее число разрывов	Число		Аберрантные метафазы	Общее число разрывов	Число	
			одиночных разрывов	парных разрывов			одиночных разрывов	парных разрывов			одиночных разрывов	парных разрывов
Моноэтанололамин												
$10^{-3}$	8,0	9,0	6,50	2,50	8,90	10,27	7,53	2,74	4,69	4,69	4,69	0
$8 \cdot 10^{-4}$	5,56	5,56	4,45	1,11	7,25	7,25	5,8	1,45	0	0	0	0
$6 \cdot 10^{-4}$	5,29	5,88	3,53	2,35	6,45	7,26	3,23	4,03	2,17	2,17	0	2,17
$4 \cdot 10^{-4}$	4,0	4,0	2,40	1,60	5,10	5,10	3,06	2,04	3,70	3,70	3,70	0
$2 \cdot 10^{-4}$	4,40	4,40	2,0	2,40	5,17	5,17	2,87	2,29	2,63	2,63	0	2,63
$10^{-4}$	4,0	4,0	3,43	0,57	5,11	5,11	3,25	1,86	1,96	1,96	1,96	0
$10^{-5}$	2,31	2,31	1,54	0,77	1,98	1,98	1,98	0	3,45	3,45	0	3,45
Триэтанололамин												
$10^{-2}$	8,46	8,46	4,99	3,47	7,28	7,28	4,16	3,12	9,26	9,26	4,63	4,63
$8 \cdot 10^{-3}$	5,0	5,0	2,50	2,50	6,45	6,45	3,23	3,22	0	0	0	0
$6 \cdot 10^{-3}$	5,38	5,38	3,07	2,31	5,77	5,77	3,85	1,92	3,85	3,85	0	3,85
$2 \cdot 10^{-3}$	5,0	5,0	2,0	3,0	6,67	6,67	3,67	3,0	0	0	0	0
$10^{-3}$	4,69	4,69	3,65	1,04	5,92	5,92	4,63	1,29	3,92	3,92	2,94	0,98
$8 \cdot 10^{-4}$	4,32	4,32	3,24	1,08	5,07	5,07	3,80	1,27	2,13	2,13	2,13	0
$10^{-4}$	3,60	4,0	3,20	0,8	5,92	6,58	5,26	1,32	0	0	0	0
$10^{-5}$	2,0	2,0	1,0	1,0	1,69	1,69	0	1,69	2,44	2,44	2,44	0
Контроль	0,5	0,5	0,5	0	0,57	0,57	0,57	0	0	0	0	0

Таблица 3  
Зависимость частоты сестринских хроматидных обменов (СХО) от действия различных концентраций моноэтанололамина и триэтанололамина в культуре лимфоцитов человека

Концентрация вещества, М	Клетки с СХО	Число СХО	СХО на клетку	Концентрация вещества, М	Клетки с СХО	Число СХО	СХО на клетку
Моноэтанололамин				Триэтанололамин			
$10^{-3}$	54	199	3,68	$10^{-2}$	56	288	5,14
$8 \cdot 10^{-4}$	21	54	2,57	$8 \cdot 10^{-3}$	27	130	4,81
$6 \cdot 10^{-4}$	46	185	4,02	$6 \cdot 10^{-3}$	26	96	3,69
$4 \cdot 10^{-4}$	27	95	3,52	$4 \cdot 10^{-3}$	31	132	4,26
$2 \cdot 10^{-4}$	76	325	4,28	$2 \cdot 10^{-3}$	24	118	4,92
$10^{-4}$	102	389	3,81	$10^{-3}$	97	344	3,55
$10^{-5}$	30	107	3,57	$8 \cdot 10^{-4}$	47	160	3,40
				$10^{-4}$	98	298	3,04
				$10^{-5}$	41	148	3,61
				Контроль	28	97	3,46

С целью оценки сравнительного эффекта обоих соединений был проведен регрессионный анализ. При этом сравнивали угловые коэффициенты линий регрессии частоты цитогенетических повреждений от концентрации как МЭА, так и ТЭА. Было выявлено, что хотя моноэтаноламин (коламин) является биологически активным соединением [6], он проявляет несколько большую эффективность по сравнению с ТЭА ( $m=5278,535$ ;  $m=4446,847$ ).

На следующем этапе исследований мутагенности соединений изучали цитогенетические повреждения в семенах *Crepis capillaris*, обработанных исследуемыми соединениями. Данные цитогенетического анализа приведены в табл. 4. В вариантах, обработанных в течение 1 ч 0,001 %-ной концентрацией получены близкие к контролю результаты ( $1,0 \pm 0,44$ ). Более длительная обработка семян по сравнению с часовой приводит во всех вариантах к возрастанию частоты перестроек. Результаты исследований свидетельствуют, что МЭА и ТЭА оказывают сходный цитогенетический эффект на семена *Crepis capillaris*. Так, при одночасовой обработке семян 5 %-ным раствором МЭА частота метафаз с абберациями составляла  $3,4 \pm 0,81$  %, а для вариантов с ТЭА —  $5,2 \pm 1,0$  %.

Неозон-Д оказывает на меристематические клетки *Crepis capillaris* более выраженный цитогенетический эффект. Так, при одночасовой экспозиции процент абберантных клеток составляет от  $4,8 \pm 0,95$  до  $6,6 \pm 1,11$  %, а при более длительной обработке увеличивается от  $5,8 \pm 1,04$  до  $7,8 \pm 1,19$  %. При этом не исключается, что выраженный цитогенетический эффект неозона-Д обусловлен кумулятивным действием с диметилсульфоксидом, который при различных экспозициях повышает спонтанный уровень абберантных клеток (от  $1,4 \pm 0,5$  до  $1,6 \pm 0,5$  % по сравнению с контролем  $0,8 \pm 0,39$  %).

Анализ спектра перестроек хромосом при обработке семян МЭА и ТЭА выявил, что подавляющее большинство аббераций — концевые делеции, симметричные и асимметричные транслокации, изредка кольца.

Таблица 4

Анализ частоты перестроек хромосом у *Crepis capillaris* под действием моноэтаноламина, триэтаноламина и неозона-Д

Вещество и концентрация, М	Экспозиция, ч					
	1			4		
	Перестройки, %	Хромосомные, %	Хроматидные, %	Перестройки, %	Хромосомные, %	Хроматидные, %
Вода (контроль I)	0,8	0,8	0	0,8	0,8	0
МЭА						
0,001	0,8	0,4	0,4	2,0	2,0	0
0,01	1,2	1,0	0,2	2,6	2,6	0
0,1	2,0	1,4	0,6	2,8	2,8	0
1	1,6	1,4	0,2	3,2	3,2	0
2	2,4	2,4	0	3,0	3,0	0
5	3,4	3,4	0	0	0	0
ТЭА						
0,001	1,0	1,0	0	2,6	2,6	0
0,01	1,4	1,4	0	2,6	2,6	0
0,1	1,2	1,2	0	3,2	3,2	0
1	1,8	1,8	0	3,0	3,0	0
2	2,8	2,8	0	3,2	3,0	0,2
5	5,2	5,0	0,2	5,4	5,2	0,2
Диметилсульфоксид (контроль II)	1,4	1,2	0,2	1,6	1,4	0,2
Неозон-Д						
0,001	4,8	4,8	0	5,8	5,8	0
0,01	4,8	4,8	0	4,2	4,2	0
0,1	5,4	5,4	0	6,0	5,8	0,2
1	5,2	5,2	0	6,4	5,8	0,6
2	5,0	5,0	0	7,8	7,8	0
5	6,6	6,6	0	7,8	7,8	0

Неозон-Д индуцирует значительно больше перестроек хромосом, чаще чем при действии МЭА и ТЭА образуя кольцевые делеции. В отличие от МЭА и ТЭА, неозон-Д индуцировал также периферические инверсии и вызывал сильную фрагментацию хромосом.

Таким образом, выявленный нами мутагенный и цитотоксический эффект неозона-Д на трех различных тест-системах подтвердил полученные микроядерным тестом и на лабораторных мышах результаты его мутагенности при применении в резинотехническом производстве [7].

**Выводы.** Проведенное тестирование исследуемых соединений — моноэтаноламина, триэтаноламина и неозона-Д в трех различных тест-системах выявило слабый мутагенный эффект МЭА и ТЭА и несколько больший мутагенный и определенный цитотоксический эффект неозона-Д.

На основании проведенного комплексного исследования можно рекомендовать как менее генотоксичные соединения — МЭА и ТЭА в качестве стабилизаторов для замены применяемого в производстве латексов неозона-Д.

**SUMMARY.** The cytogenetic activity of latex polymerization stabilizers (monoethanolamine, triethanolamine and neozon-D) is investigated in three different test systems. It is shown that monoethanolamine and triethanolamine are weak inducers of chromosome breaks in the culture of human lymphocytes and in the *Crepis capillaris* seeds and induce low levels of gene mutations in the Ames systems. The third stabilizer — neozon-D manifests higher mutagenic activity and definite cytotoxic effect. Monoethanolamine and triethanolamine as to their weak mutagenic effect are recommended as preferable stabilizers to be used in the latex industry.

1. Пилинская М. А., Куринный А. И. Временные методические рекомендации при оценке потенциальной мутагенной опасности пестицидов. — М., 1980. — 11 с.
2. Система оценки химических веществ на мутагенность для человека: Общие принципы, практические рекомендации и дальнейшие разработки / Н. П. Бочков, Р. Я. Шрам, Н. П. Кулешов, В. С. Журков // Генетика. — 1975. — 11, № 10. — С. 156—169.
3. Ames B. N., Lee F. D., Durston W. E. Improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1973. — 70, P. 782.
4. Hungerford D. A. Leucocytes cultured from small incision of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with FCS. Stain Technol. — 1965. — 30. — P. 333—338.
5. Чеботарев А. Н., Селезнева Т. Г., Платонова В. И. Модифицированный метод дифференциальной окраски сестринских хроматид. Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1977. — 85, № 2. — С. 242—243.
6. Григорян С. К., Бейлерян Н. М. О причине положительного действия моноэтаноламина и его комплексов с  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  на живой организм // Уч. зап. Ереван. гос. ун-та. — 1980. — № 3. — С. 142.
7. Луткова О. В. Вопросы скрининга и профилактики цитогенетических нарушений у работников резинотехнического производства // Актуальные вопросы профилактики наследственных болезней (Вильнюс, 16—17 апр. 1986 г.): Тез. докл. — Вильнюс, 1986. — С. 72—73.

Ереван. гос. ун-т

Поступила 02.06.86

УДК 575.24

Л. Н. ЖИЛЕНКО