

Р. М. АРУТЮНЯН, Г. И. КОНОБЕЕВА, Г. Г. ЗАЛНЯН

### КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

Для оценки мутагенной активности регуляторов роста растений, наряду с рутинными методами изучения их митозных инверсий в клетках костного мозга и в лимфоцитах у лабораторных животных у экспериментальных животных в практику исследований по цитогенетике вошло также изучение эффектов регуляторов роста в культуре периферической крови человека. При этом данные, полученные в культуре, хорошо согласуются с результатами других тест-систем и зачастую дополняют их, являясь одной из удобных отправных точек для дальнейшей экстраполяции генетического риска для человека [1].

Целью настоящего исследования явилось получение данных о мутагенной активности регуляторов роста растений — ГМК-натрия (натриевая соль гидразидмалеиновой кислоты), ДЯК, или дидра (диметилгидразид янтарной кислоты), камвозана (2-хлорэтилфосфоновая кислота), гидрела (2-хлорэтилфосфонокислый гидразид) и дитидрела (2-хлорэтилфосфонокислый диметилгидразид) у родоных клетках крыс-самцов (учет доминантных летальных мутаций), в костном мозге (учет аберраций хромосом), а также в культуре лимфоцитов человека.

**Материалы и методы.** Изучение мутагенной активности регуляторов роста растений осуществляли в соматических и половых клетках белых беспородных крыс. В половых клетках крыс-самцов исследование проводили с помощью метода доминантных летальных мутаций при многократном воздействии в течение всего цикла сперматогенеза на уровне пороговых и возмороговых доз [2]. Опытных самцов (по 15 в группе) после окончания введения препаратов спаривали с интактными самками в расчете 1 самец на 3 самки в течение недели. Беременных самок вскрывали на 18-й день беременности и учитывали следующие показатели: количество желтых тел, мест имплантаций, резервных и живых эмбрионов. Частоту возникновения летальных мутаций определяли по величине смертности до и после имплантации.

Препараты костного мозга крыс готовили по общепринятому методу [3]. Вещества вводили однократно, интратекально в дозах, соответствующих 1/2—1/5 от ЛД<sub>50</sub>, установленных в серии однократных экспериментов. Аберрации хромосом учитывали на стадии метафазы. От каждого животного подсчитывали по 100 метафазных пластинок. Контролем служили клетки, полученные от интактных животных. Всего использовали 56 животных.

При изучении цитогенетического действия исследуемых соединений в культуре лимфоцитов человека их вводили на 48-м часу культивирования в пяти различных кон-

центрациях от  $10^{-4}$  М до  $10^{-6}$  М. Культивирование крови продолжалось 72 ч и проводилось подмикроскопом [4]. При этом на каждую концентрацию анализировали не менее 200 клеток по принятой методике учета аберраций [5].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Изучение цитогенетической активности регуляторов роста растений показало различие в характере их действия. Гидрел, дигидрел и кампозан, синтезированные на основе 2-хлорэтилфосфоновой кислоты, не обладали цитогенетической активностью в костном мозге крыс, подвергавшихся однократному воздействию на уровне  $1/5$  и  $1/50$  от ЛД<sub>50</sub>.

Другая группа регуляторов — гидразинсодержащие вещества — алар (ДЯК) и ГМК проявили себя по-иному (табл. 1). Так, алар во всех исследуемых дозах, кроме 20 мг/кг, вызывал в костном мозге крыс статистически достоверное увеличение частоты хромосомных аберраций по сравнению с контролем. ГМК-натрия относился к двум различным партиям: ГМК-I из НИС Московской сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева, ГМК-II с Волжского завода органического синтеза им. 60-летия СССР). При этом обе партии различались своей способностью индуцировать хромосомные аберрации в костном мозге крыс. Первая партия ГМК во всех исследуемых дозах показала четкое увеличение хромосомных аберраций по сравнению с контролем. Вторая же партия препарата не вызывала цитогенетического эффекта в костном мозге крыс, подвергшихся воздействию ГМК в дозе 200 мг/кг. По-видимому, такое различие в цитогенетическом действии препарата можно объяснить за счет того, что первая его партия — ГМК-I содержала примеси гидразида малеиновой кислоты, что и послужило причиной его большей активности. Данные о мутагенном эффекте гидразида малеиновой кислоты изучены рядом авторов на различных тест-системах [6-9].

Таблица 1

Частота аберраций хромосом в клетках костного мозга крыс при действии гидразинсодержащих регуляторов роста растений

Вещество и доза, мг/кг	Клетки в анализе	Метафаз с аберрациями, %	Всего аберраций	Частота аберраций на метафазу		Аберраций на 100 клеток	
				исследуемую	аберрационную	одиночные фрагменты	парные фрагменты
Алар							
2000	6	5,80±0,92	35	0,083	1,0	5,83	—
200	6	2,65±0,92	16	0,026	1,0	2,50	0,10
20	6	1,33±0,42	8	0,013	1,0	1,33	—
ГМК-I							
3000	8	4,87±0,75	39	0,048	1,0	4,00	0,87
500	6	3,50±0,75	21	0,035	1,0	3,50	—
2,5	6	2,66±0,68	17	0,028	1,0	2,66	0,17
0,75	6	3,00±0,75	18	0,030	1,16	2,83	0,17
ГМК-II							
500	6	1,33±0,42	5	0,008	1,0	0,83	—
Контроль	6	1,00±0,10	6	0,010	1,0	1,00	—

Изучение мутагенной активности регуляторов роста растений в поликультурах клеток крыс-самцов показало, что гидрел, дигидрел, кампозан и алар не вызывали увеличения частоты доминантных детальных мутаций (табл. 2). Только ГМК-I в дозе 15 мг/кг индуцировал доминантные детальные мутации.

Гидрел, дигидрел, кампозан не вызывали достоверного увеличения частоты хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов человека во всех изучаемых концентрациях (табл. 3).

ГМК (I и II) и ДЯК (алар) вызывали статистически достоверное повышение уровня хромосомных аберраций (табл. 4). При этом только исследование наименьшей концентрации алара в  $10^{-6}$  М не вызывало

Таблица 2

Частота доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов крыс после воздействия регуляторов роста растений

Вещество и доза, мг/кг	Количество		На 1 беременную самку			Постимплантационная смертность, %
	самцов	беременных самок	имплантаций	живых эмбрионов	мертвых эмбрионов	
Гидрел						
2,2	15	43	9,58	9,28	0,30	3,15±0,81
0,22	15	42	10,69	10,34	0,35	3,34±0,83
Дигидрел						
3,5	15	42	10,35	10,04	0,31	2,98±0,81
0,35	15	42	10,47	10,14	0,33	3,18±0,83
Кампозан						
3,39	15	41	11,58	11,29	0,29	2,52±0,72
0,33	15	42	11,58	11,30	0,28	2,46±0,70
Контроль	15	42	9,97	9,73	0,24	2,29±0,74
Алар (ДЯК)						
20	15	41	10,43	10,02	0,41	3,97±0,95
2,0	15	43	9,65	9,35	0,30	3,05±0,81
Контроль	15	42	9,97	9,73	0,24	2,33±0,74
ГМК						
5,0	15	43	11,11	10,21	0,90	8,15±1,25
1,5	15	42	10,52	10,16	0,36	3,39±0,86
0,15	15	43	10,86	10,52	0,34	2,81±0,74
Контроль	15	44	10,65	10,45	0,20	1,92±0,63

Таблица 3

Зависимость уровня хромосомных aberrаций от концентраций гидрела, дигидрела, кампозана в культуре лимфоцитов человека

Концентрация веществ, M	Количество просмотренных клеток	Показатели на 100 клеток				$\chi^2$	P
		Аберрантных метафаз	Общее число разрывов	Число одиночных разрывов	Число парных разрывов		
Гидрел							
10 <sup>-4</sup>	200	3,00	3,00	3,00	0	3,69	>0,05
3,3·10 <sup>-5</sup>	200	2,00	2,00	2,00	0	1,13	>0,05
10 <sup>-5</sup>	200	1,50	1,50	1,50	0	—	—
3,3·10 <sup>-6</sup>	200	1,50	1,50	1,50	0	—	—
10 <sup>-6</sup>	200	1,00	1,00	1,00	0	—	—
Дигидрел							
10 <sup>-4</sup>	200	3,00	3,00	3,00	0	3,69	>0,05
3,3·10 <sup>-5</sup>	200	2,00	2,00	2,00	0	1,13	>0,05
10 <sup>-5</sup>	200	1,50	1,50	1,50	0	—	—
3,3·10 <sup>-6</sup>	200	1,50	1,50	1,50	0	—	—
10 <sup>-6</sup>	200	1,00	1,00	1,00	0	—	—
Кампозан							
10 <sup>-4</sup>	200	2,00	2,00	2,00	0	1,13	>0,05
3,3·10 <sup>-5</sup>	200	2,00	2,00	2,00	0	1,13	>0,05
10 <sup>-5</sup>	200	2,00	2,00	2,00	0	1,13	>0,05
3,3·10 <sup>-6</sup>	200	1,50	1,50	1,50	0	—	—
10 <sup>-6</sup>	200	1,00	1,00	1,00	0	—	—
Контроль	500	1,00	1,00	1,00	0	—	—

достоверного отличия экспериментальных данных от контроля ( $P > 0,05$ ). Эти соединения индуцировали в среднем 20% парных фрагментов от общего числа разрывов. Зависимость аберрантных метафаз и общего числа разрывов от концентрации алара и ГМК (I и II) удовлетворительно описывалась уравнением линейной регрессии. При этом наиболее эффективным препаратом в индукции хромосомных aberrаций является ГМК-I, затем ДЯК (алар) и ГМК-II.

Зависимость уровня хромосомных aberrаций от концентраций ГМК и ДЯК в культуре лимфоцитов человека

Концентрация вещества, М	Количество просмотренных клеток	Показатели на 100 клеток				$\chi^2$	Р
		Аберрантные метафазы	Общее число разрывов	Число одиночных разрывов	Число парных разрывов		
ДЯК (алар)							
$10^{-4}$	250	6,80	7,20	6,80	0,40	19,69	<0,001
$3,3 \cdot 10^{-5}$	200	5,00	5,00	4,50	0,50	10,90	<0,001
$10^{-5}$	200	5,00	5,00	4,50	0,50	10,90	<0,001
$3,3 \cdot 10^{-6}$	200	4,00	4,00	3,50	0,50	6,80	<0,001
$10^{-6}$	200	2,50	2,50	2,50	0	2,28	<0,05
ГМК-I							
$10^{-4}$	300	9,00	10,66	9,00	1,66	32,92	<0,001
$3,3 \cdot 10^{-5}$	500	7,80	7,80	7,60	0,20	26,46	<0,001
$10^{-5}$	400	5,25	5,75	5,75	0	14,31	<0,001
$3,3 \cdot 10^{-6}$	300	5,66	5,66	5,66	0	15,27	<0,001
$10^{-6}$	400	4,75	4,75	4,75	0	12,04	<0,001
ГМК-II							
$10^{-4}$	400	3,50	3,50	3,50	0	6,72	<0,05
$3,3 \cdot 10^{-5}$	400	3,25	3,25	2,25	1,0	5,74	<0,05
$10^{-5}$	400	2,75	2,75	2,75	0	4,80	<0,05
$3,3 \cdot 10^{-6}$	300	3,00	3,00	2,75	0,25	3,62	<0,05
$10^{-6}$	400	2,75	2,75	2,50	0,25	3,90	<0,05
Контроль	500	1,00	1,00	1,00	0	—	—

Таким образом, на основе исследования ряда регуляторов роста растений в соматических и половых клетках крыс и в культуре лимфоцитов человека не выявлено цитогенетической активности гидрела, дигидрела и кампозана, синтезированных на основе 2-хлорэтилфосфоновой кислоты, ни в одной из используемых тест-систем. ГМК (I и II) и алар проявили цитогенетическую активность в культуре лимфоцитов человека, а также в костном мозге крыс. Единственный из исследуемых регуляторов — ГМК-I вызывал также и увеличение частоты доминантных летальных мутаций у самцов крыс.

**Выводы.** Тестирование ряда регуляторов роста растений — гидрела, дигидрела кампозана, алара (ДЯК) и ГМК-патрия (I и II) выявило мутагенный эффект ГМК-I во всех исследуемых тест-системах. Гидразинсодержащие регуляторы роста растений — алар и ГМК (I и II) показали цитогенетическую активность в костном мозге крыс и культуре лимфоцитов человека. Производные же 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (гидрел, дигидрел, кампозан) не обладают мутагенной активностью.

**SUMMARY.** The cytogenetic activity of plant's growth regulators is investigated in three different test-systems. It is shown that three substances (hydrel, dihydrel, camposan) induce no chromosome breaks. MAH-I (maleic acid hydrazide monosodium salt) increases the mutagenic activity in all three investigated test-systems (in somatic and generative cells of rats and in the culture of human lymphocytes). The recrystallized MAH (II) and alar demonstrate an increase in the level of chromosome aberrations in the culture of human lymphocytes and in the bone marrow of rats.

1. 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.
2. Малащенко А. М., Егоров Н. К. Доминантные летали у инбредных мышей под действием этиленмина // Там же.— 1975.— 11, № 3.— С. 59—67.
3. Ford O., Wollam D. A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong A. line // Exp. Cell Res.— 1963.— 32, N 2.— P. 320—325.

- 4 *Hungerford D. A.* Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with KCl // *Stain Technol.*—1965.—49 N 6.—P. 333—338.
- 5 *Метод учета хромосомных aberrаций как биологический индикатор влияния факторов внешней среды на человека.*—М., 1974.—31 с.
- 6 *MacDonald D.* Salmonella microsome test on 42 coded chemicals // *Eval. Short Term Test. Carcinog. Rep. Int. Collaborat. Programm.*—New York, 1981.—P. 285—297.
- 7 *Ioshizake N., Makiko N., Leonuchi I.* Chromosomal aberrations induced by maleic hydrazide and related compounds in Chinese hamster cells in vitro // *Mutat. Res.*—1971.—67, N 3.—P. 249—257.
- 8 *Paschin I. V.* Mutagenicity of maleic acid hydrazide for TK locus of mouse lymphoma cell // *Ibid.*—1981.—91, N 4/5.—P. 359—362.
- 9 *Частота сестринских хроматидных обменов (СХО) в лимфоцитах человека при воздействии «in vitro» низких концентраций карбофурала, холинновой соли малеинового гидразида, профама и хлорирофома* / Л. Георгина, Н. Морару, Т. Дранелеску, Р. Тапавил // XIV Ежегод. конф. Европейского общества по мутагенам внешней среды. Тез. докл.—М., 1984.—С. 185.