

УДК 631.82

## ВИКОРИСТАННЯ КОРОТКОСТРОКОВИХ ТЕСТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПЕСТИЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ

*Сенченко Т.В., Болтіна І.В., Костик О.Л., Ткачук О.М., Лельошкін І.В., Кравчук О.П.*

*Інститут екогієни і токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України*

**Ключові слова:** пестицид, мутагенна активність, Тест Еймса, метод Еванса

### Вступ

Прогнозування генетичних наслідків забруднення навколишнього середовища та визначення шляхів захисту спадкового матеріалу людини від негативного впливу господарчої діяльності стає надзвичайно актуальним. Одним з провідних аспектів дослідження “віддалених наслідків” несприятливої дії пестицидів є оцінка їх можливого вкладу в індукований мутаційний процес у людини, наслідком якого може бути зріст частоти патології з генетичною компонентою. Тому важливим напрямком у вивченні біологічного ефекту пестицидів є генетико-гігієнічні дослідження, основною метою яких є наукове прогнозування та попередження мутагенної небезпеки пестицидів для здоров'я теперішнього та майбутніх поколінь [1, 8]. Оцінити потенційну мутагенну небезпечність пестицидів неможливо без попередньої оцінки їх токсичної дії на тест-об'єкти.

**Метою роботи** є розробка підходів до тестування пестицидів в експериментальних умовах. Для цього проаналізували данні дослідів по вивченню мутагенної активності пестицидних препаратів на трьох основних тестах: на індукцію генних мутацій у *S. typhimurium*/тест Еймса; на індукцію аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку мишей *in vivo*; на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* без та з метаболічною активацією).

### Матеріали і методи

Тест Еймса, суть якого полягає в реєстрації здатності досліджуваної ре-

човини та її метаболітів індукувати генні мутації від ауксотрофності до прототрофності по гістидину у індикаторних штамів *S. typhimurium*, які несуть his-мутації і не здатні синтезувати гістидин, проводили методом стандартного чашкового тесту, запропонованого D.M. Maron і B.N. Ames [10]. Мутагенний ефект в даному тесті визначали ступінню кратності перевищення кількості колоній-ревертантів в кожній концентрації над кількістю колоній у контролі (спонтанний рівень реверсій) та, згідно рекомендаціям Л.М. Фонштейну [4] оцінювали як слабкий, середній і сильний.

Культивування лімфоцитів *in vitro* та приготування препаратів хромосом виконували за стандартним напівмікрометодом [9] з модифікаціями, що прийняті в лабораторії мутагенезу. Експеримент по вивченню пестицидних препаратів проводили в двох варіантах – без та з метаболічною активацією. При постановці експерименту з метаболічною активацією разом з препаратом додавали мікросомальну активуючу суміш (S-9 mix), яку готували за методичними рекомендаціями D.M. Maron і B.N. Ames [10]. Відбір метафазних платівок для цитогенетичного аналізу, класифікація та метод обліку аберацій хромосом – загальноприйняті. Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до критеріїв Ст'юденту.

Дослідження метафазних хромосом клітин кісткового мозку проводили на білих нелінійних мишах, самцях за методом H.J. Evans [7]. Під час прове-

дення експерименту тварини утримувались у віварії в стандартних пластикових клітках, при температурі навколишнього середовища 20-22°C, вологості повітря 50-60%, стандартному світловому режимі “день-ніч”. Відбір піддослідних тварин проводили методом “випадкових чисел” [2]. Досліджувану речовину вводили внутрішньошлунково одноразово за допомогою зонду. Тварин забивали через 24 години після введення досліджуваної речовини. За дві години до забою тваринам внутрішньочеревно вводили розчин колхіцину для припинення поділу клітин на стадії метафази мітозу. Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до критеріїв Ст’юденту.

### Результати та обговорення

За весь час роботи лабораторії мутагенезу було досліджено більше 100 пестицидних препаратів.

В тесті Еймса та в тесті на індукцію аберацій в кістковому мозку мишей мутагенні ефекти були виявлені у чотирьох препаратів.

Тест на індукцію аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові *in vitro* виявився найбільш чутливим по кількості пестицидних препаратів, які проявили мутагенні властивості. Збільшення частоти аберацій хромосом було виявлено у 19 препаратів

Крім частоти аберацій хромосом на метафазних препаратах підраховували частоту анеуплоїдних клітин – явище, при якому клітини організму містять некрратне гаплоїдному (ординарному) число хромосом. Підвищення частоти анеуплоїдних клітин може свідчити про можливий канцерогенний ризик при дії пестицидного препарату на культуру лімфоцитів периферичної крові людини [3, 6, 11]. За час досліджень підвищення частоти анеуплоїдних клітин було виявлено у 10 пестицидів.

Ще одним цитогенетичним показником, на який варто звернути увагу, є мультиаберантні клітини, наявність яких

свідчить про зміни в системі репарації [5]. Мультиаберантні клітини виявлені майже у всіх препаратів в найвищих концентраціях, що свідчить про їх потенційну небезпеку.

Слід зауважити, що протягом останнього року став актуальним ще один показник – токсичність пестицидних препаратів при дослідженні їх мутагенних властивостей.

При постановці експерименту в тесті Еймса спершу визначали бактеріотоксичність (критерієм бактеріотоксичності вважали відсутність колоній в двох повторах), «відштовхуючись» від розчинності препарату. При співставленні концентрацій пестицидних препаратів (мається на увазі однієї і тієї ж діючої речовини при дослідженні різних пестицидних препаратів) був зафіксований бактеріотоксичний ефект (зниження діючих концентрацій в дослідженні на мутагенез). В тесті Еймса токсичний ефект був виявлений у 13 діючих речовин різних пестицидних препаратів.

Подібну картину спостерігали і в тесті на індукцію аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку мишей *in vivo*. Першою концентрацією вважається 1/2 – 1/4 ЛД<sub>50</sub>. При дослідженні однакових діючих речовин пестицидних препаратів були виявлені різні токсичні властивості (загибель тварин в першій концентрації).

В тесті на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* без та з метаболічною активацією були виявлені цитотоксичні властивості у 16 пестицидних препаратів. Показником цитотоксичності вважали зниження мітотичного індексу в культурі лімфоцитів, що відповідає зниженню мітотичної активності лімфоцитів.

Можливо, це пов’язано з тим, що останнім часом з’явилися копії оригінальних препаратів, які називають генериками. Речовина, що діє, в препара-

тах, як правило, одна і та ж, але при синтезі генериків неминуче з'являються домішки, які змінюють рівень токсичності.

Таким чином, дослідження токсичних властивостей пестицидних препаратів-генериків, мають бути невід'ємною частиною досліджень мутагенної активності цих речовин, тому що, токсичний ефект (*toxic – ядовитий, потенційно летальний*) свідчить про можливий потенційний летальний вплив.

#### Висновки

1. Дослідження токсичних властивостей пестицидних препаратів-генериків, мають бути невід'ємною частиною досліджень мутагенної активності цих речовин, які слід проводити тільки в комплексі із застосуванням не менше трьох тестів, що відображено на схемі щодо вивчення їх мутагенної активності.
2. Зниження рівня токсичності концентрацій при дослідженні мутагенної активності пестицидних препаратів-генериків, може бути підставою для перегляду деяких нормативів при застосуванні окремих препаратів.
3. Цитогенетичні показники – кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин необхідно більш широко використовувати в експериментальних дослідженнях.

#### Література

1. Куринный А.И. Оценка пестицидов как мутагенного фактора окружающей среды: автореф. дис на соискание науч. степени доктора биол. наук: спец. 030015 "Генетика" / А.И. Куринный. – Москва., 1986. – 39 с.
2. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк – К.Вища освіта, 1983 – 383 с.
3. Назаренко С.А., Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках челове-

ка при воздействии вредных внешне-средовых факторов / С.А. Назаренко, В.А Тимошевский. //Генетика. – 2005. – т. 41. - №3. – С. 391-395.

4. Фонштейн Л.М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. (Методические указания). / Л.М. Фонштейн, С.К. Абилов, Е.В. Бобринев. – Москва: Производственно-издательский комбинат ВИНТИ 1985. - 34 с.
5. Худoley В.В., Мизгирев И.В. Пути развития и перспективы экологической онкологии / В.В. Худoley. //Вопросы онкологии. – 1997. - т. 43. - № 1. - С. 116 -119.
6. Duesberg P., Rasnick D. Aneyploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / P. Duesberg, D.Rasnick. //Cell Motility and Cytoskeleton. – 2000. – V. 47. – P. 81-107.
7. Evans H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. / H.J. Evans //Chemical mutagens: principles and methods for their detection. – 1976. - V. 4. – P. 1–29.
8. Flemiry L. Mortality in a cohort of licenced pesticide applicators in Florida / L.Flemiry, J.Bean, M.Rudolph. // Occup. and environ. Med. – 1999. – 56. - № 1. – P. 14 -21.
9. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotic KCl. / D.A. Hungerford //Stain Techn. – 1965. – V. 40. – P. 333–338.
10. Maron D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. / D.M.Maron, B.N.Ames. //Mutation Research. – 1983. – V. 113. – P. 173–215
11. Sen S. Aneyploidy and cancer / S. Sen //Curr. Opinion Oncology. – 2000. – V. 12. – P. 82–88.

**Резюме**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРАТКОСРОЧНЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПЕСТИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

*Сенченко Т.В., Болтина И.В., Костик О.Л., Ткачук О.М., Лепешкин И.В., Кравчук О.П.*

Показано, что исследование токсичных свойств пестицидных препаратов-генериков, должны быть неотъемлемой частью исследований мутагенной активности этих веществ, которые следует проводить только в комплексе с применением не менее трех тестов.

Ключевые слова: *пестицид, мутагенная активность, Тест Эймса, метод Эванса*

**Summary**

**USING OF SHORT-TERM TESTS FOR PESTICIDAL PREPARATIONS MUTAGEN ACTIVITY RESEARCHES**

*Senchenko T.V., Boltina I.V., Kostik O.L., Tkachuk O.M., Lepyoshkin I.V., Kravchuk O.P.*

It is shown that research of toxic properties of pesticidal preparations-generikov should be an integral part of researches of mutagen activity of these substances. The complex of not less than three tests should be contained at these researches.

**Keywords:** *pesticide, mutagene activity, Ames test, Evans method*

*Впервые поступила в редакцию 16.06.2010 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 616-036.22:613

**ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ**

*Застенская И.А., Кочубинский В.В.*

*Республиканский научно-практический центр гигиены  
Министерство здравоохранения Республики Беларусь*

**Ключевые слова:** *нормирование химических веществ, стойкие органические загрязнители, хлорсодержащие пестициды, полихлорированные бифенилы*

**Введение**

Проблемы нормирования химических веществ становятся все более актуальными в результате расширения перечня и объемов их производства, высокой стоимости классических экспериментов по установлению безопасных для здоровья человека концентраций в объектах окружающей среды, расширением спектра исследований, необходимых для получения полной токсикологической характеристики того или иного химического вещества. Кроме того, условия воздействия химических веществ в

реальной жизни в значительной степени отличаются от экспериментальных условий: их количество, дозы, пути поступления варьируют и количество возможных вариаций значительно. Особую категорию представляют химические вещества, которые обладают способностью к биоаккумуляции, что определяет особенности их токсикодинамики и токсикокинетики [1, 2].

Вопросы совершенствования системы гигиенического нормирования постоянно присутствуют в повестке обсуждений оценки риска, социально-гигиени-