

КЛАСТОГЕННІ ЕФЕКТИ ПРОЛОНГОВАНОЇ ДІЇ ТІОФОСФАМІДУ

В.М. Шкарупа, І.Р. Баріляк, Л.В. Неумержицька
Науковий центр радіаційної медицини АМН України (Київ)

Вступ

Тіофосфамід є трифункціональним алкілюючим мутагеном [1,2], показана також і його прооксидантна активність [3]. Мутагенність тіофосфаміду була встановлена в дослідях з *S. typhimurium*, *S. cariliaris*, *A. sera*, *D. melanogaster*; показана індукція мутагеном ХА в клітинах ссавців *in vitro* та *in vivo*, СХО і ХА в клітинах людини *in vitro* [1,2,4-7]. В більшості робіт досліджували ефекти короточасної дії мутагену на різних стадіях клітинного циклу. Проте, дослідження дозових залежностей пролонгованого впливу мутагенів має істотне значення, оскільки за природніх умов спостерігається саме довготривала дія генотоксикантів навколишнього середовища на організми.

Метою роботи було дослідити цитогенетичні ефекти пролонгованої дії тіофосфаміду в діапазоні концентрацій, які індують від найменшої до максимальної частоти аберантних клітин в *Allium*-тесті.

Матеріали і методи дослідження

В якості модельної системи використовували кореневу меристему проростків насіння *Allium sera* L. (вік насіння на момент експерименту складав 9 місяців) Досліджували дію 12 концентрацій препарату ("Лэнс", РФ): 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 мг/л. В якості контролю - дистильована вода. Після 72 годинної експозиції з мутагеном та фіксації матеріалу готували тимчасові препарати пофарбовані ацетоорсеїном за загальноприйнятими методиками [8]. Проводили мікроскопічне вивчення меристематичної зони корінців. Перебудови хромосом досліджували в ана-телофазі першого поділу меристематичних клітин. Визначали частоту аберантних ана-

телофаз (ЧАА): $ЧАА = \frac{па \cdot 100 \%}{п}$, де *па* - кількість аберантних ана-телофаз, *п* - загальна кількість проаналізованих ана-телофаз. Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками [9].

Отримані результати та їх обговорення

Найвища діюча концентрація (40 мг/л) в 4000 разів перевищувала найменшу (0,01 мг/л). Результати досліджень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив тіофосфаміду на рівень аберантних клітин кореневої меристеми *Allium sera* L.

Концентрація тіофосфаміду, мг/л	Досліджених ана-телофаз, п	Аберантних ана-телофаз, п	ЧАА ± Sp, %	р
0	1149	17	1,48±0,36	-
0,01	1689	51	3,02±0,42	< 0,05
0,02	1651	69	4,18±0,49	< 0,05
0,1	1140	87	7,63±0,79	< 0,01
0,2	1677	167	9,96±0,73	< 0,01
0,5	1663	237	14,25±0,86	< 0,01
1,0	1748	374	21,40±0,98	< 0,001
2,0	1248	319	25,56±1,24	< 0,001
5,0	1213	599	49,38±1,44	< 0,001
10	604	507	83,94±1,49	< 0,001
20	450	396	88,00±1,53	< 0,001
30	178	157	88,20±2,42	< 0,001
40	144	124	86,11±2,88	< 0,001

В досліджуваному діапазоні не виявлено концентрації мутагену, класоногенний ефект якої вірогідно не відрізнявся б від спонтанного. Вже найменша з досліджених концентрацій (0,01 мг/л) індукувала в 2,04 разів більшу ЧАА ніж в контролі (р < 0,05). При збільшенні концентрації тіофосфаміду в 2 рази (0,02 мг/л) ЧАА збільшується в 1,38 разів (3,02±0,42% і 4,18±0,49% аберантних клітин відповідно). При наступному збільшенні концентрації в 5 разів (0,1 мг/л) ЧАА збільшується лише в 1,83 рази. Подальше зростання концентрації мутагену в 2, 5, 10, 20, 50 та 100 разів призводило до збільшення ЧАА

відповідно в 1,31, 1,87, 2,8, 3,35, 6,47 і 11,01 рази. Це свідчить про нелінійний характер дозової залежності та зменшення кластогенної ефективності тіофосфаміду із збільшенням концентрації. При дії мутагену в концентраціях вищих за 10 мг/л спостерігається вихід кривої дозової залежності на "плато", відмінності по ЧАА в діапазоні концентрацій 20 - 40 мг/л не є вірогідними ($p > 0,1$).

При дослідженні дозових залежностей цитогенетичної дії тіофосфаміду *in vitro* в лімфоцитах людини, не було виявлено виходу кривої на "плато", що може бути обумовлено використанням концентрацій мутагену, які не призводять до значної затримки мітозу [1,5]. Найбільший мутагенний ефект спостерігали при концентрації мутагену 50 мг/л (експозиція 1 год. на стадії G_0) - 68% аберантних метафаз (при дії 20 мг/л - 26,4%). В наших же експериментах (див. табл. 1) кількість проаналізованих ана-телофаз значно зменшувалась при концентраціях мутагену більших 5 мг/л. В дослідях на *S. capilaris* дозова залежність мала вид огинаючої кривої (хоча мітотична активність не зменшувалась більш ніж на 25,1%). Слід зазначити, що частота аберацій при цьому не перевищувала 6%, при 3 год. експозиції з мутагеном (7,5 мМ) в пресинтетичному періоді [7].

Таким чином, не зважаючи на можливу різну чутливість цих об'єктів, мутагенна ефективність тіофосфаміду за умов пролонгованої експозиції є значно вищою ніж при більших концентраціях але короткочасній дії. Останнє вказує на необхідність врахування особливостей пролонгованої дії потенційних мутагенів при оцінці їх генотоксичності.

Висновки

1. Визначена крива доза-кластогенний ефект пролонгованої дії тіофосфаміду в діапазоні концентрацій 0,01 мг/л - 40 мг/л в *Allium*-тесті.

2. Максимальний мутагенний ефект ($88,2 \pm 2,4\%$ аберантних клітин) виявлено при концентрації 30 мг/л.

3. Дозова залежність має нелінійний характер з виходом на "плато" при концентраціях мутагену більших 10 мг/л.

4. Мутагенна активність тіофосфаміду за умов пролонгованої

ної експозиції є значно вищою, ніж при більших концентраціях, але короткочасної дії.

Література

1. Бочков Н.П. *Наследственность человека и мутагены внешней среды* / Н.П. Бочков, А.Н. Чеботарев. - М.: Медицина, 1989. - 270 с.

2. *Hprt mutant frequency and molecular analysis of Hprt mutations in Fischer 344 rats treated with thiotepa* / T. Chen, A. Aidoo, R.A. Mittelstadt, D.A. Casciano, R.H. Heflich // *Carcinogenesis*. - 1999. - Vol. 20, № 2. - P. 269-277.

3. Середенин С.Б. *Разработка фармакологических средств защиты генетических структур на основе изучения клеточных механизмов индукции мутаций* / С.Б. Середенин, А.Д. Дурнев // *Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта* / С.Б. Середенин, А.Д. Дурнев. - М., 1990. - С. 273-296.

4. *IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 50. Pharmaceutical drugs*. - Lyon: IAFROC, 1990. - 415 p.

5. Чеботарёв А.Н. *Математическое моделирование зависимости цитогенетического эффекта от концентрации мутагена* / А.Н. Чеботарёв, К.Н. Яковенко // *Генетика*. - 1974. - Т. 10, № 8. - С. 150-157.

6. Щеглова Е.Г. *Корреляция уровня сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций, индуцированных химическими мутагенами in vivo* / Е.Г. Щеглова, А.Н. Чеботарев // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 1983. - № 12. - С. 67-68.

7. Семенов В.В. *Мутагенная активность противоопухолевых препаратов в условиях естественной и искусственной модификации* / В.В. Семенов // *Генетика*. - 1990. - Т. 26, № 11. - С. 2020-2027.

8. Паушева З. П. *Практикум по цитологии растений* / З. П. Паушева. - М.: Агропромиздат, 1988. - 271 с.

9. Лакин Г.Ф. *Биометрия* / Лакин Г.Ф. - М.: Высшая школа, 1980. - 293 с.

Резюме

Шкарупа В.М., Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В. Кластогенні ефекти пролонгованої дії тіофосфаміду.

Досліджені цитогенетичні ефекти пролонгованої дії тіофосфаміду в клітинах *Allium cepa* L. Встановлена крива доза-кластогенний ефект при концентраціях тіофосфаміду: 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 мг/л. Максимальний мутагенний ефект ($88,20 \pm 2,42\%$ аберантних клітин) виявлений при концентрації 30 мг/л. Дозова залежність має нелінійний характер з виходом на "плато" при концентраціях мутагену більших 10 мг/л.

Ключові слова: мутагенез, тіофосфамід, *Allium cepa* L.

Резюме

Шкарупа В.Н., Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В. Кластогенні ефекти пролонгированного действия тиофосфамида.

Исследованы цитогенетические эффекты пролонгированного действия тиофосфамида в клетках *Allium cepa* L. Установлена кривая доза-кластогенный эффект при концентрациях тиофосфамида: 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 мг/л. Максимальный мутагенный эффект ($88,20 \pm 2,42\%$ аберантных клеток) выявлен при концентрации 30 мг/л. Дозовая зависимость имеет нелинейный характер с выходом на "плато" при концентрациях мутагена больших 10 мг/л.

Ключевые слова: мутагенез, тиофосфамид, *Allium cepa* L.

Summary

Shkarupa V.M., Barylak I.R., Neumerzhickaya L.V. Clastogenic effects of prolonged action of thiophosphamide.

The cytogenetics effects of prolonged action of thiophosphamide in cells *Allium cepa* L. was investigated. The curve dose-clastogenic effect is established at concentration thiophosphamide: 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40 mg/l. The maximal effect ($88,20 \pm 2,42\%$ aberrant cells) is revealed at concentration of 30 mg/l. Dependence dose-effect has non-linearly with an output on "plateau" at concentration of mutagen the big 10 mg/l.

Key words: mutagenesis, thiophosphamide, *Allium cepa* L.

Рецензент: д.біол.н., с.н.с. Ж.М.Мінченко

ЕКОЛОГІЧНА І КЛІНІЧНА ІМУНОЛОГІЯ ТА ІМУНОРЕАБІЛІТАЦІЯ