

В. Г. Матвеева, Ю. Я. Керкис, Б. Я. Эжитат

К ВОПРОСУ СТАНДАРТИЗАЦИИ ТЕСТИРОВАНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Научно-исследовательский санитарный институт, Новосибирск

В последние годы возрастает интерес к генетическим последствиям воздействия промышленных ядов и лекарственных препаратов на организм человека. Накоплена значительная информация, позволяющая уже сейчас прогнозировать потенциальную опасность такого воздействия. Однако в многочисленных исследованиях, проводимых в этом направлении в различных лабораториях мира, отсутствует единство в выборе методов оценки мутагенности, используются нестандартные тест-системы и критерии учета повреждений наследственных структур. Все это затрудняет обсуждение и обобщение научных результатов.

26/II 1971 г. комитет Американского общества по исследованию мутагенов внешней среды совместно с рядом европейских ученых выработал предварительную схему тестирования мутагенности химических соединений. Рекомендации комитета касаются 4 аспектов: исследований *in vivo* и *in vitro* критериев учета и описания результатов, рекомендаций по дальнейшему развитию проблемы.

Комитет считает, что задача исследований на млекопитающих *in vivo* должна состоять в установлении факта и характера цитогенетических повреждений. Эти эксперименты позволяют выявить мутагенную активность как самих соединений, так и продуктов их метаболизма в организме млекопитающих. Опыты целесообразнее проводить на крысах (основном объекте в токсикологии), но в отдельных сериях вполне адекватным объектом могут быть и мыши. Цитогенетический анализ следует осуществлять в клетках костного мозга метафазным методом, дающим полную картину повреждения хромосом. Хотя анафазный метод выгоднее и проще, но в настоящее время отсутствует корректная методика приготовления таких препаратов в опытах *in vivo*.

Нам представляется вполне возможным использование простого метода учета хромосомных нарушений в клетках костного мозга на стадиях поздней анафазы и ранней телофазы на временных давленых препаратах костного мозга, учитывая 200—300 клеток на каждое животное.

Комитет рекомендует отдать предпочтение нелинейным животным во избежание сугубо специфической реакции инбредных линий. Исследуемое соединение должно испытываться как в остром, так и в подостром экспериментах с использованием 3 доз: сублетальной, терапевтической, промежуточной между ними. Все опыты должны сопровождаться позитивным и негативным контролем. Позитивным контролем может служить любой известный супермутаген (этиленимин, метилметансульфонат, цитоксан и т. д.). Сроки фиксации материала предлагаются следующие: в остром опыте — через 6, 12, 24 ч после однократного введения; в подостром — через 6 ч после 5-дневного ежесуточного введения. На каждую точку экспозиции следует брать по 5 животных и анализировать по 50 метафаз на каждое из них.

В нашем представлении эта схема удобна для тестирования мутагенности лекарственных препаратов, но не удовлетворяет требованиям при исследовании мутагенности промышленных ядов. В этом случае, по нашему

мнению, целесообразнее мутагенные исследования ввести в основные этапы токсикологического эксперимента с обязательным проведением хронических опытов. Выбор доз и концентраций в каждом случае должен определяться токсикодинамическими свойствами исследуемого соединения, а также условиями его гигиенического нормирования во внешней среде (открытые водоемы, атмосфера или воздух рабочих помещений).

На необходимость изучения мутагенных свойств основных компонентов загрязнений внешней среды многократно указывали отечественные генетики, гигиенисты и токсикологи. Острую дискуссию вызывают такие вопросы, как выбор объекта исследований, корреляция мутагенного эффекта в соматических и генеративных клетках, выбор доз и концентраций, а также методов учета генетических повреждений. Учитывая литературные данные и исходя из собственных результатов, полученных при изучении мутагенной активности хлороорганических соединений (В. Г. Матвеева и соавт., 1971, 1973; Г. К. Исакова и соавт., 1969, 1971), мы предлагаем следующую схему для предварительного тестирования промышленных ядов в опытах *in vivo*.

I. Условия эксперимента

Время экспозиции

1. Острый опыт — однократное введение доз, составляющих $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ от ЛД₅₀ 6, 12, 24, 48, 72 ч
2. Подострый опыт с оценкой кумулятивных свойств веществ — ежедневное введение в течение 20 сут $\frac{1}{50}$ от ЛД₅₀ или ЛС₅₀ 5, 10, 15, 20 сут периода воздействия и в эти же сроки периода восстановления
3. Хронический опыт — дозы и длительность введения определяются токсикодинамическими свойствами вещества 1 раз в месяц в течение всего периода обработки

II. Исследования *in vitro*. Система *in vitro* рассматривается комитетом как вспомогательная, рекомендуется использовать культуры диплоидных клеток человека с частотой спонтанных повреждений хромосом не более 2%; анализ можно проводить в анафазах. Система позволяет: строго регламентировать концентрации химических соединений и время экспозиции; использовать высокие дозы для более вероятного выявления мутагенного эффекта; отличать истинные мутации от псевдохиазм, возникающих в ранние часы после воздействия; установить характер корреляции мутагенных эффектов в системе *in vivo* и *in vitro*.

Комитет предлагает испытывать каждое соединение на уровне 3 концентраций: максимально переносимой клетками, в 10 раз ниже и на уровне терапевтической или физиологической для человека. Три срока фиксации должны быть выбраны так, чтобы можно было учесть субхроматидные повреждения (например, в культуре фибробластов человека — через 2—3 ч), а также все остальные типы нарушений хромосом. Фиксация через 48 ч позволяет обнаружить аберрации при наличии эффекта задержки митотического цикла. На точку должно быть проанализировано 200 анафаз. Позитивный и негативный контроль столь же обязательны, как и в системе *in vivo*.

Мы полагаем, что при использовании этой системы для изучения мутагенных свойств промышленных соединений выбор доз должен осуществляться с учетом общетоксических свойств исследуемых соединений.

III. Критерии учета и описание результатов. Комитет предлагает в системе *in vivo* учитывать в метафазах костного мозга число хромосом, ахроматиновые пробелы, хроматидные и хромосомные делеции и обмены, а также отдельно все «прочие» нарушения (расхождение центромер, пульверизация хромосом).

При анафазном методе в системе *in vitro*, по рекомендации комитета, подлежат учету все виды мостов, ацентрические фрагменты и мультиполярные митозы. Мы считаем возможным применить все указанные критерии при анализе повреждений хромосом в клетках костного мозга в опытах *in vivo*. При этом следует учитывать и слипания хромосом, вынося их в отдельную графу учета.

Вопросы стандартной терминологии и результаты подробно изложены в работах Н. П. Бочкова и соавт., Evans, Riger и соавт.

IV. Рекомендации по дальнейшему развитию проблемы. Комитет считает предложенную схему предварительной и придает большое значение дальнейшему развитию проблемы мутагенного тестирования химических соединений. Особое внимание должно быть уделено следующим спорным вопросам: а) выяснение соотношения хромосомных перестроек и точковых мутаций, индуцированных одним и тем же соединением; б) выяснение специфичности реакции наследственных структур различных тканей организма, особенно соматической и генеративной; в) изучение реакции на химический мутаген тканей развивающегося эмбриона, ибо не исключена возможность избирательного накопления веществ отдельными тканями эмбриона; г) оценка различных типов повреждений хромосом в спермато- и овогенезе млекопитающих; д) введение в практику тестирования метода учета доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов и самок млекопитающих.

Работа по созданию стандартной схемы тестирования мутагенной активности химических соединений была продолжена на симпозиуме Европейского общества изучения мутагенов внешней среды в Праге, состоявшемся 29/X—2/XI 1973 г. Симпозиум еще раз подчеркнул необходимость проверки химических веществ на мутагенную активность.

Рекомендованная симпозиумом обязательная программа по изучению мутагенов внешней среды содержит 3 пункта: 1) проверка мутагенности химических соединений с использованием системы опосредованного хозяина; 2) исследование хромосомных aberrаций в костном мозге мышей; 3) оценка частоты доминантных леталей в половых клетках мышей.

Изложенные выше программы двух симпозиумов свидетельствуют об интенсивном развитии проблемы тестирования мутагенности химических соединений. Два пункта программы Пражского симпозиума возводят в ранг обязательности те тесты, которые Американский комитет рекомендовал лишь в качестве перспективных. Обязательное использование системы опосредованного хозяина является новым тестом, дающим важную информацию о мутагенных превращениях химического соединения в организме лабораторных животных. Среди многочисленных вариаций этого метода наиболее употребительным считается использование штамма G46 *Salmonella thurphum* и некоторые линии *Neurospora grassa*. Эксперимент содержит две ступени: исследуемое вещество испытывается по критерию биохимических мутаций *in vitro*; параллельно интактная культура микроорганизмов вводится мышам, которые подвергаются воздействию испытуемого соединения — этап *in vivo*.

Через определенное время культура микроорганизмов извлекается из серозной жидкости мышцы и анализируется на наличие индуцированных мутаций (Legator).

Выполнение другой рекомендации Пражской программы вряд ли требует дополнительных пояснений. Учет частоты доминантных леталей в половых клетках мышей (пункт 3) проводится обычно по методу Бейтмана (Bateman) или по упрощенному методу для экспериментов на большом количестве мышей (Erstein и Shafner).

Недавно прошедший в Москве I советско-американский симпозиум «Генетические влияния загрязнений окружающей среды на человека» подчеркнул особую актуальность обсуждаемой проблемы и в своем решении отметил следующие первоочередные задачи:

1. В кратчайший срок разработать высокочувствительный, дешевый, простой в обращении, обладающий высокой пропускной способностью тест для целей предварительного скрининга потенциальных мутагенов внешней среды.

2. Для дальнейшего изучения мутагенных свойств испытуемых веществ создать ряд тест-систем разных уровней организации (микроорганизмы, растения, животные и человек).

3. Для правомерной экстраполяции данных на человека следует использовать культуры человеческих тканей с учетом генетических и цитогенетических повреждений.

4. Необходимо выбрать типы мутаций и методы их учета для мониторинга и определения генетического груза в человеческом генофонде.

5. Необходима полная международная стандартизация всех употребляемых методов.

6. Особое внимание нужно уделить таким неизученным вопросам, как комбинированное действие, влияние малых доз при хроническом поступлении, проблема антимутагенной защиты, продленный мутагенез и многим другим.

7. Необходимо интенсифицировать исследования по теории мутагенеза.

Таким образом, вопрос о единой международной стандартной схеме тестирования мутагенности химических соединений остается в настоящее время открытым.

ЛИТЕРАТУРА. Бочков Н. П., Демин Ю. С., Лучник Н. В. Генетика, 1972, в. 5, с. 133. — Исакова Г. К., Экштат Б. Я., Керкис Ю. Я. Гиг и сан., 1971, № 11, с. 9. — Матвеева В. Г., Керкис Ю. Я., Экштат Б. Я. Там же, 1973, № 1, с. 94. — Рапопорт И. А. В кн.: Проблемы медицинской генетики. М., 1970, с. 249. — Саноцкий И. В., Авхименко М. М., Фоменко В. Н. В кн.: Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М., 1970, с. 245. — Матвеева В. Г., Экштат Б. Я., Керкис Ю. Я. Гиг. и сан., 1971, № 12, с. 26. — Bateman A. I., Heredity, 1958, v. 12, p. 467. — Epstein S., Shaiper H., Nature, 1968, v. 219, p. 385. — Evans H. J., Int. Rev. Cytol., 1962, v. 13, p. 221. — Legator M. S. В кн.: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. New York, 1970, p. 260. — Rieger R., Michaelis A., Green M., A glossary of genetics and Cytogenetics. Berlin, 1968, p. 72. — Mammalian Chromosomes Newsletter, 1971, v. 12, p. 98.

Поступила 29/IV 1974 г.