

Цитология и генетика. – 2002. – Т.36, №1. – С.14–25.

УДК 575.224.4 / 575.224.6

**КЛАСТОГЕННОСТЬ ЭТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТА
И ДИМЕТИЛТЕРЕФТАЛАТА В МИКРОЯДЕРНОМ ТЕСТЕ
И ПУТИ ЕЕ МОДИФИКАЦИИ**

Гончарова Р.И.¹, Даливеля О.В.¹, Кужир Т.Д.¹, Дубурс Г.Я.², Улдрикис Я.Р.²

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь, E-mail: Antimut@biobel.bas-net.by

²Латвийский институт органического синтеза,

Айзкрауклес, 21, Рига LV-1006 Латвия E-mail: Duburs@osi.lanet.lv

В трансплацентарном микроядерном тесте на мышах показано, что этилметансульфонат (ЭМС) индуцирует микроядра и нарушает кроветворение не только у беременных самок, но и у плодов. Диметилтерефталат (ДМтФ) в изученной концентрации оказался неэффективным у беременных самок, повышая, однако, уровень этих событий у плодов. Следовательно, и алкилирующий агент, и представитель фталатов проникают через плацентарный барьер и представляют опасность для эмбриона.

Антимутаген дигидропиридинового ряда (ДГП) снижал частоту ЭМС-индуцированных микроядер в соматических клетках беременных самок, но оказался неэффективным у плодов и не влиял на действие ДМтФ. Выявлена характерная зависимость эффективности его защитного действия от физиологического состояния организма, которая указывает на то, что антимутаген подавляет кластогенез путем индукции или стимуляции антимутагенами эндогенных компонентов, ответственных за антиоксидантную защиту и/или обезвреживание электрофильных молекул.

Закономерности и механизмы химического мутагенеза по-прежнему привлекают пристальное внимание. Это во многом связано с интенсивной химизацией биосферы и ее генетическими последствиями. К числу широко распространенных загрязнителей среды относятся фталаты [1]. Биологическая активность соединений этой группы достаточно подробно изучена. Обнаружена их эмбриотоксичность и тератогенность [2, 3], тканеспецифическое действие и канцерогенность, обусловленная по всей вероятности действием продуктов их метаболизма в организме [4–6]. Однако анализ генетической активности фталатов дал неоднозначные результаты [3, 7–11]. В опытах на дрозофиле и мышах было показано, что один из широко распространенных представителей этого класса, диметилтерефталат, проявляет специфичность действия по отношению к мутациям разного типа [12–16]. Кроме того, на примере этих соединений можно проследить за развитием кризиса в генетической токсикологии, когда данные о канцерогенности некоторых ксенобиотиков вступали в противоречие с отсутствием мутагенного эффекта в тесте Эймса и других тест-системах. Это привело к пересмотру существующих критериев опасности поллютантов и выделению в отдельный класс так называемых негенотоксичных канцерогенов [17–22].

Среди многочисленных тест-систем, применяемых для идентификации мутагенов среды, микроядерный (МЯ) тест *in vitro* и *in vivo* имеет определенные

преимущества [17, 23–25]. Оценка генетического риска не только для взрослого организма, но и плода стала возможной после разработки трансплацентарного МЯ теста [24, 26–28]. Целью данной работы было исследование кластогенности диметилтерефталата, являющегося одним из основных компонентов лавсанового производства, по сравнению с действием алкилирующего агента этилметансульфоната в МЯ (в том числе трансплацентарном) тесте *in vivo* на мышах F_1 *СВА×С57В1/6_j*. Выявлены закономерности, подтверждающие существенные различия в механизмах действия этих мутагенов, а также проанализирована возможность модификации их эффектов с помощью антимутагенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного мутагена использован монофункциональный алкилирующий агент этилметансульфонат производства Sigma (CAS No.62-50-0). Проверялась также кластогенная активность диметилового эфира терефталевой кислоты (диметилтерефталата, CAS No. 12-06-16). Коммерческий препарат получен на Могилевском производственном объединении «Химволокно».

В качестве модификатора химически индуцированного кластогенеза использовали препарат дигидропиридинового ряда – 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбо-нил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридин (ДГП), синтезированный в Латвийском институте органического синтеза. Препарат представляет собой желтоватый порошок, хорошо растворимый в воде, свето- и температуроустойчивый, характеризуется высокой антиоксидантной активностью [29, 30].

Объектом исследования были гибридные мыши F_1 *СВА×С57В1/6_j* (самцы и самки). Животные получены из питомника Белые столбы (Москва), использованы в возрасте 6–10 недель, вес 20–25 г. Обработка мышей химическими препаратами проводилась с помощью внутрибрюшинных инъекций. Навески ДГП и ЭМС растворяли в дистиллированной воде, а ДМтФ – в диметилсульфоксиде (ДМСО), конечную концентрацию рассчитывали на вес одного животного и вводили внутрибрюшинно по 0,2 мл. В качестве контрольной инъекции животным вводили 0,2 мл дистиллированной воды. Забой животных и приготовление препаратов для цитогенетического анализа осуществлялся в соответствии с модифицированной методикой W. Schmid [31] каждые 6 ч в течение 2 сут после инъекции мутагена.

Взрослых животных забивали смещением шейных позвонков, выделяли бедренные кости, вымывали костный мозг и готовили препараты, которые высушивали при комнатной температуре, фиксировали в метиловом спирте, а затем окрашивали 5% раствором красителя Gimsa. От каждого животного анализировали не менее 1000 полихроматофильных эритроцитов на наличие микроядер, соотношение полихроматофильных (ПХЭ) и нормохроматофильных (НХЭ) эритроцитов оценивали для каждого животного на выборке 500 клеток (по 100 клеток на разных участках слайда).

Поскольку печень плода является органом эритропоэза с 12 по 16 день, то для сравнительного изучения влияния химических агентов на материнский

организм и плод, беременных самок обрабатывали ими через 2 недели после оплодотворения. Одновременно готовили препараты костного мозга, извлеченного из бедренной кости беременной самки, и печени плодов. Материал фиксировали через 6, 12, 18, 24, 36, и 48 ч после инъекции мутагена. Приготовление препаратов проводили в соответствии с описанными методиками [24, 26–28, 32, 33].

Эффективность действия мутагенов определяли, пользуясь поправкой Abbott [34], а эффективность действия антимуагена оценивали по редуционному фактору (РФ), который вычислялся по формуле:

$$\text{РФ} = \frac{M - (AM + M)}{M} \times 100 \%,$$

где М – частота мутаций, индуцированных мутагеном; АМ+М – частота мутаций, наблюдаемых в варианте комбинированного воздействия антимуагена и мутагена. Этот показатель отражает долю мутаций, редуцируемых антимуагеном. Сравнение результатов в разных вариантах проводили с помощью критерия χ^2 , t-критерия Student и теста Cochran [35, 36], пользуясь компьютерными программами, разработанными к.б.н. Б.Ю. Аношенко.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Сравнение закономерностей кластогенеза, вызванного этилметансульфонатом и диметилтерефталатом, в трансплацентарном тесте у мышей

Ранее нами изучена кластогенность ЭМС и ДМтФ в МЯ тесте у самцов F₁ СВА×С57В1/6j [13, 37]. В данной работе проанализирована способность этих ксенобиотиков повреждать структуру хромосом у беременных самок и плодов. Следует еще раз подчеркнуть, что обработка самок производилась на 15-й день беременности, когда печень плода выполняет функции кроветворного органа.

Как видно из Табл. 1, частота МЯ ПХЭ в костном мозге материнского организма достоверно отличалась от спонтанного уровня через 24 и 36 ч после внутрибрюшинного введения ЭМС беременным самкам. Пик образования МЯ наблюдался через 36 ч после инъекции мутагена, что полностью соответствовало закономерностям ЭМС-кластогенеза у самцов (Рис. 1). При этом частота МЯ ПХЭ примерно в 7 раз превышала контрольные значения и в пять раз – первоначальный уровень МЯ, отмеченный через 6 ч после мутагенного воздействия. Динамику образования МЯ в печени плодов анализировали в течение 24 ч после инъекции мутагена беременным самкам. Достоверное увеличение частоты микроядерных клеток наблюдалось уже на 18 ч, а через 24 ч она почти в 5 раз превышала как контрольный, так и начальный уровень в опытном варианте.

Соотношение незрелых (ПХЭ) и зрелых (НХЭ) эритроцитов под влиянием ЭМС достоверно отличалось от контроля, начиная с 18 ч фиксации для взрослого организма и с 12 ч (т.е. с 6-часовым опережением) для плода. Сдвиг этого показателя в любую сторону от 1 означает нарушения клеточного деления и функции кроветворения. В данном случае происходит снижение частоты

незрелых эритроцитов в пуле всех анализируемых клеток, что может свидетельствовать о токсическом эффекте мутагена в исследованной дозе. Представленные результаты показывают, что ЭМС проявляет кластогенность и нарушает кроветворные функции не только у беременных самок, но и у плодов. При этом вредные эффекты мутагена проявляются на 6 ч раньше у плода, чем в материнском организме.

Таблица 1

Кластогенный эффект ЭМС в трансплацентарном тесте
у мышей *СВАхС57В1/6_j*

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		животных	ПХЭ	клеток с МЯ		
Частота МЯ ПХЭ в костном мозге беременных самок						
<i>Контроль</i>	36	4	4000	12	0.3	56.98±2.74
ЭМС 300 мг/кг	6	3	3000	12	0.4	49.75±2.61
	12	4	4000	5	0.125	50.13±3.71
	18	6	6000	30	0.5	43.67±4.62*
	24	6	6000	58	0.97*	42.48±3.10*
	36	6	6000	124	2.07*	30.46±1.56*
	48	6	6000	26	0.43	30.45±4.24*
Частота МЯ ПХЭ в печени плодов						
<i>Контроль</i>	36	5	5000	14	0.28	56.03±1.66
ЭМС 300 мг/кг	6	4	4000	15	0.38	57.13±2.35
	12	6	6000	28	0.47	43.38±2.64*
	18	9	9000	51	0.57*	49.22±2.07*
	24	6	6000	91	1.52**	35.26±3.52*

* P<0.05; ** P<0.01

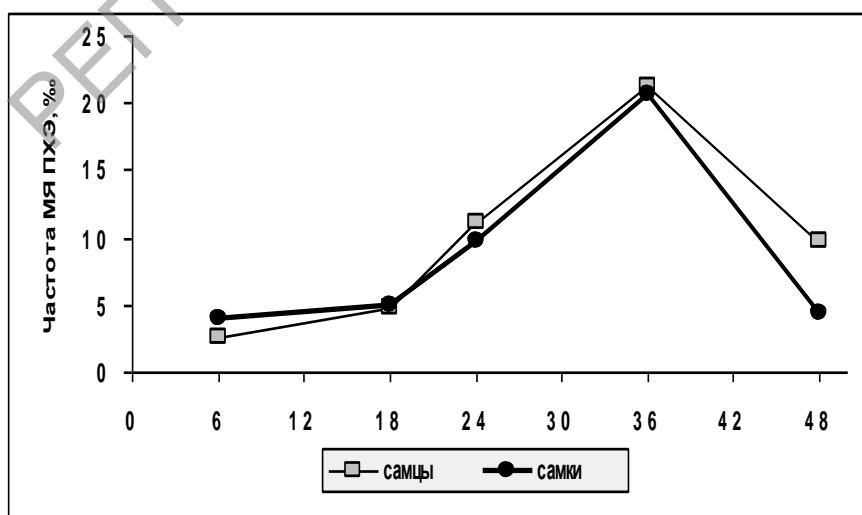


Рис. 1. Динамика образования микроядер в клетках костного мозга самцов и самок *СВАхС57В1/6_j* под влиянием ЭМС (доза 300 мг/кг). По оси абсцисс – время фиксации, ч

В отличие от ЭМС, ДМтФ в исследованной концентрации (1/40 LD₅₀) не индуцировал МЯ в клетках костного мозга беременных самок, но повышал их частоту в печени плода через 48 ч после воздействия на материнский организм (Табл. 2). Частота МЯ ПХЭ примерно в 2 раза превышала спонтанный уровень и в 1,5 раза – начальный уровень в опытном варианте. ДМтФ не влиял на соотношение ПХЭ/НХЭ в костном мозге самок и печени плодов, то есть не нарушал их кроветворные функции. Тем не менее, оказавшись фактически безвредным для материнского организма, фталат вызывал кластогенный эффект у плодов.

Таблица 2

Кластогенный эффект ДМтФ в трансплацентарном тесте у мышей СВАхС57Вl/6j

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		животных	ПХЭ	клеток с МЯ		
Частота МЯ ПХЭ в костном мозге беременных самок						
<i>Контроль</i>	18	6	12000	11	0.092	59.99±1.89
ДМтФ 1/40 LD ₅₀	12	4	4000	1	0.025	60.72±5.38
	18	8	8000	7	0.088	54.85±2.17
	24	8	8000	10	0.125	58.38±3.62
	48	8	8000	5	0.063	55.42±1.31
Частота МЯ ПХЭ в печени плодов						
<i>Контроль</i>	18	12	12000	13	0.108	52.13±1.97
ДМтФ 1/40 LD ₅₀	12	8	8000	14	0.175	65.91±2.59
	18	6	6000	10	0.165	54.85±2.17
	24	14	14000	20	0.143	58.02±1.65
	48	12	12000	29	0.242*	59.53±1.76

*P<0.05

Таким образом, с использованием трансплацентарного МЯ теста установлены кластогенные эффекты изученных ксенобиотиков у взрослых особей и плодов. Алкилирующий агент индуцировал цитогенетические нарушения с одинаковой частотой как у самцов, так и у беременных самок, т.е. эффективность его действия не зависела от пола особей и их физиологического состояния. В отличие от этого изученная доза ДМтФ, оказалась неэффективной для беременных самок, но в то же время вдвое повышала частоту МЯ ПХЭ у плодов. На основании этих данных можно с уверенностью прогнозировать, что контакт с химическими загрязнителями окружающей среды во время беременности опасен для матери, но еще в большей степени для плода.

2. Влияние производного 1,4-дигидропиридина на химически индуцированный кластогенез в трансплацентарном МЯ тесте у мышей

Препарат ДГП вводился беременным самкам за 12 ч до инъекции мутагена. При исследовании его влияния (доза 1/10 LD₅₀) на ЭМС-кластогенез обнаружено существенное снижение частоты МЯ ПХЭ в костном мозге беременных самок почти на всех точках фиксации (Табл. 3, Рис. 2 б). В среднем обнаружена 50% редукция частоты ЭМС-индуцированных повреждений хромосом, что значительно превышает эффективность этой же дозы препарата при воздействии на самцов (Рис. 2. а). Максимальный антикластогенный эффект препарата у беременных самок (РФ) соответствовал пику образования микроядер и достигал 70%. Одновременно с костным мозгом самок анализировались клетки печени плодов, и в этом случае препарат оказался неэффективным (Табл. 4). Он также не оказывал существенного влияния на соотношение ПХЭ/НХЭ по сравнению с действием одного мутагена. Отсутствие защитного эффекта ДГП у плодов может быть вызвано двумя причинами: несовершенством их защитных систем и/или расходом препарата в организме матери, т.к. физико-химические свойства позволяют предполагать его способность проникать через гематоплацентарный барьер.

Таблица 3

Влияние антимуагена ДГП (1/10 LD₅₀)
на кластогенность этилметансульфоната в костном мозге
беременных самок лабораторных мышей

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		животных	ПХЭ	клеток с МЯ		
Контроль	36	4	4000	12	0.3	56.98±2.74
ЭМС 300 мг/кг	6	3	3000	12	0.4	49.75±2.61
	12	4	4000	5	0.125	50.13±3.71
	18	6	6000	30	0.5	43.67±4.62
	24	6	6000	58	0.97	42.48±3.10
	36	6	6000	124	2.07	30.46±1.56
	48	6	6000	26	0.43	30.45±4.24
ДГП; ЭМС	6	3	3000	10	0.33	56.11±3.10
	12	5	5000	18	0.36*	32.47±3.89
	18	5	5000	15	0.3	40.51±4.01
	24	4	4000	12	0.3**	40.12±2.23
	36	3	3000	27	0.9**	22.49±1.45
	48	2	2000	11	0.55	20.87±4.89
Cochran-тест (z)					4.37**	

*P<0.05; ** P<0.01

При исследовании влияния ДГП (дозы 1/50 – 1/10 LD₅₀) на частоту МЯ ПХЭ, индуцированных диметилтерефталатом, не выявлено каких-либо существенных отклонений от уровня микроядерных клеток в опытном варианте ни у взрослых особей (табл. 5), ни у эмбрионов (табл. 6).

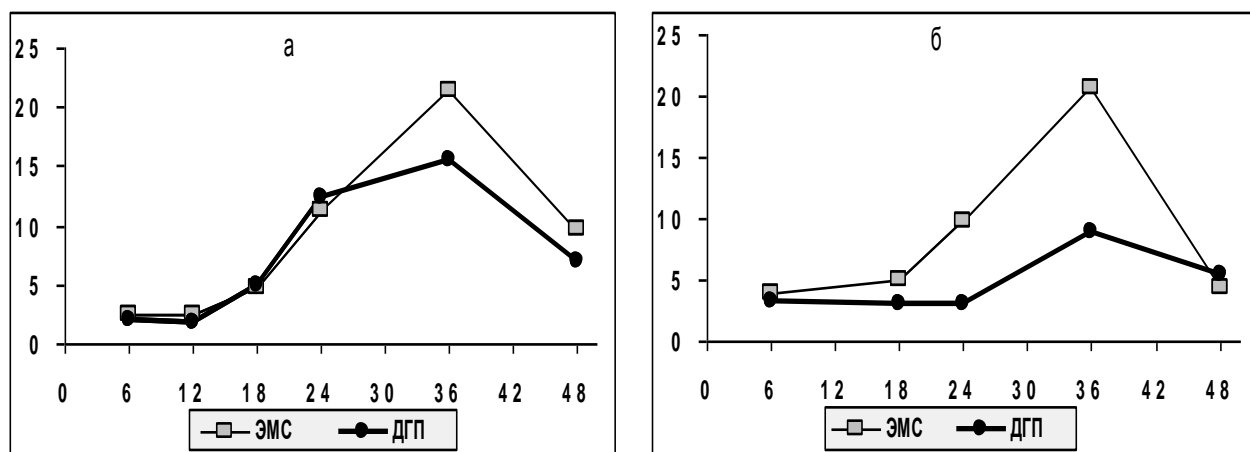


Рис. 2. Ингибирующий эффект ДГП ($0,1 LD_{50} = 340$ мг/кг) на ЭМС-кластогенез в клетках костного мозга самцов (а) и самок (б) лабораторных мышей
По оси ординат – частота МЯ ПХЭ (%),
по оси абсцисс – время фиксации, ч

Таблица 4

Влияние антимутагена ДГП ($1/10 LD_{50}$) на кластогенность
этилметансульфоната в печени плодов

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		эмбрионов	ПХЭ	клеток с МЯ		
Контроль	36	5	5000	14	0.28	56.03±1.66
ЭМС 300 мг/кг	6	4	4000	15	0.38	57.13±2.35
	12	6	6000	28	0.47	43.38±2.64
	18	9	9000	51	0.57*	49.22±2.07
	24	6	6000	91	1.52**	35.26±3.52
ДГП; ЭМС	6	4	4000	13	0.35	65.92±3.32
	12	5	5000	28	0.56	61.06±1.22
	18	6	6000	43	0.72	52.72±1.76
	24	5	5000	83	1.66	33.84±1.73
Сочран-тест (z)					1.00	

*P<0.05; ** P<0.01

Таким образом, изученный препарат дигидропиридинового ряда подавлял ЭМС-кластогенез в соматических клетках беременных самок, но не влиял на частоту ЭМС-индуцированных МЯ ПХЭ в печени плода, также как и не изменял эти показатели у взрослых особей и эмбрионов при действии другого ксенобиотика – ДМтФ. Эффективность антикластогенного действия зависела от пола и физиологического состояния животных.

Таблица 5

Влияние антимуtagена ДГП на действие ДМтФ
в костном мозге беременных самок лабораторных мышей

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		животных	ПХЭ	клеток с МЯ		
<i>Контроль</i>	18	6	12000	11	0.092	59.99±1.89
ДМтФ 1/40 LD ₅₀	12	4	4000	1	0.025	60.72±5.38
	18	8	8000	7	0.088	54.85±2.17
	24	8	8000	10	0.125	58.38±3.62
	48	8	8000	5	0.063	55.42±1.31
ДГП1/10 LD ₅₀ ; ДМтФ	18	4	4000	6	0.150	58.67±6.59
	24	6	6000	8	0.133	65.93±3.8
	48	6	6000	5	0.083	60.35±1.57
ДГП1/50 LD ₅₀ ; ДМтФ	12	8	8000	11	0.138	60.22±4.05
	18	4	4000	4	0.100	67.38±4.14
	24	8	8000	13	0.163	63.63±6.66
	48	8	8000	12	0.150	50.44±1.78

Таблица 6

Влияние антимуtagена ДГП на действие ДМтФ в печени плодов

Вариант обработки	Время фиксации, ч	Количество			Частота МЯ ПХЭ, %	ПХЭ / НХЭ
		эмбрионов	ПХЭ	клеток с МЯ		
<i>Контроль</i>	18	12	12000	13	0.108	52.13±1.97
ДМтФ 1/40 LD ₅₀	12	8	8000	14	0.175	65.91±2.59
	18	6	6000	10	0.167	54.85±2.17
	24	14	14000	20	0.143	58.02±1.65
	48	12	12000	29	0.242*	59.53±1.76
ДГП1/10 LD ₅₀ ; ДМтФ	18	8	8000	14	0.175	55.33±1.22
	24	12	12000	17	0.142	52.30±2.91
	48	14	14000	37	0.264	58.09±4.12
ДГП1/50 LD ₅₀ ; ДМтФ	12	8	8000	11	0.138	69.64±2.68
	18	4	4000	8	0.200	62.03±1.77
	24	12	12000	16	0.133	58.44±2.39
	48	6	6000	17	0.283	57.87±0.85

*P<0.05

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами достаточно детально исследована генетическая активность ДМтФ в опытах на дрозофиле и показано, что этот ксенобиотик эффективно индуцирует разрывы хромосом, приводящие к потерям половых хромосом, а также летальности на эмбриональной и постэмбриональной стадиях развития дрозофилы [38, 39]. В то же время, в остром эксперименте препарат не повышал спонтанную частоту рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций, а при хроническом воздействии на популяции не изменял динамику накопления в аутосомах мутаций, влияющих на жизнеспособность особей [14–16]. Отсюда следовало, что фталаты, не являясь типичными мутагенами, тем не менее, способны повреждать структуру хромосом, а вещества с такими свойствами представляют отдельный класс мутагенов внешней среды [12].

Тогда же было высказано предположение, что канцерогенность фталатов обусловлена механизмами, не связанными с их взаимодействием с ДНК [40]. О неспособности формировать аддукты ДНК свидетельствовал анализ их химической структуры [18]. Оказалось, что эти соединения вызывают пролиферацию пероксисом, что приводит к драматическому ускорению β -окисления жирных кислот и продукции перекиси водорода и свободных радикалов кислорода [41, 42]. На основании этих и других данных индукторы (или пролифераторы) пероксисом были выделены в особый класс негенотоксичных канцерогенов [20, 43].

Механизмы кластогенного и канцерогенного действия фталатов скорее всего основаны на “вторичной” генотоксичности, предполагающей, что на ДНК действуют не сами вещества или их метаболиты, а реактивные радикалы кислорода, возникающие в результате интенсивного окисления липидов. В соответствии с другой точкой зрения образующиеся радикалы кислорода могут повреждать мембраны с последующим выходом в цитозоль пероксидаз [41] или эндонуклеаз [10]. Освобождение эндонуклеаз делает более понятным преимущественное повреждение структуры хромосом. В связи с этим интересна гипотеза I. Emerit (1994), согласно которой супероксидные радикалы продуцируют долгоживущие эндогенные продукты, способные “рвать” хромосомы (кластогенные факторы) [44]. Кластогенные факторы формируются благодаря действию супероксидных радикалов и в то же время сами стимулируют их образование. Это приводит к продолжительному (как бы самовоспроизводимому) процессу кластогенеза, который исчерпывает возможности репарации ДНК и вызывает опухолевый рост. Возможно, это же в какой-то мере объясняет тот факт, что класс негенотоксичных канцерогенов объединяет вещества, проявляющие преимущественно кластогенную активность [12, 37].

Анализ представленных результатов свидетельствует о существенных различиях в механизмах кластогенеза, индуцированного *in vivo* ЭМС и ДМтФ, и подтверждает опосредованный характер действия последнего. Тем не менее оба мутагена способны повреждать хромосомы плодов. Это означает, что, либо они сами (ЭМС), либо их метаболиты (ДМтФ), либо сопутствующие продукты (такие, как реактивные радикалы кислорода) проникают через плацентарный барьер. По

всей вероятности организм и клетки плода обладают повышенной чувствительностью к токсическому и мутагенному действию загрязнителей среды. Во-первых, вредные эффекты ЭМС у них проявляются раньше, чем в материнском организме, а на 24 ч после мутагенной обработки эффективность мутагена (т.е. частота индуцированных МЯ за вычетом спонтанного уровня событий) у плодов в 2 раза выше, чем у самок (12,3‰ по сравнению с 6,7‰). Во-вторых, кластогенный эффект ДМтФ проявляется только у плодов. Более высокая чувствительность печени плодов к действию кластогенов по сравнению с костным мозгом взрослых особей установлена и другими авторами [45, 46], которые среди причин этого явления называют различия в способности к репарации ДНК органов-мишеней, фармакокинетику тестируемых веществ и пути их распределения в организме.

Хотелось бы обратить внимание еще на один интересный факт. Использованная в наших экспериментах доза ДМтФ составляет 97.5 мг/кг веса животных, что соответствует примерно 0.5 мМ. Эта доза, наряду с другими концентрациями ДМтФ (0.2 – 1 ммоль/кг), исследована ранее на самцах [13]. Было показано, что она индуцирует от 4.0 до 7.33‰ МЯ ПХЭ с пиком их образования на 24 ч после внутрибрюшинной инъекции. В данной работе ДМтФ в дозе 1/40 LD₅₀ оказался генетически неактивным у беременных самок, но удваивал спонтанный уровень МЯ в клетках печени плодов. Возможно, это несоответствие объясняется физиологическим состоянием животных, а именно, стимуляцией во время беременности всех защитных сил организма, включая системы антиоксидантной защиты [47]. Поэтому материнский организм, в отличие от плода, способен справиться с окислительным стрессом и его последствиями. Полученные данные не противоречат тому, что кластогенность фталатов обусловлена продукцией реактивных радикалов кислорода, генотоксичность которых в свою очередь определяется антиоксидантным статусом клеток и организма.

Ранее показано, что изученное производное 1,4-ДГП является генетически нейтральным в микроядерном тесте как у самцов, так и самок мышей и их плодов [37]. В рамках данной работы обнаружено, что антикластогенный потенциал этого соединения проявляется в зависимости от физиологического состояния животных. Известно, что соединения дигидропиридинового ряда, в частности дилудин, близкий аналог изученного препарата, является синергистом α-токоферола, а также повышает содержание в тканях млекопитающих глутатиона, витаминов С и А [48]. Известно также, что глутатион и глутатион-S-трансфераза способствуют конъюгации и выведению ЭМС из организма [49]. Представленные результаты позволяют предположить, что действие изученного антимуагена у млекопитающих зависит от антиоксидантного статуса организма, а также функционирования антимуагенных систем, включающих глутатион и комплекс глутатион-S-трансфераз [50, 51]. Вероятно, компоненты, выполняющие роль эндогенных антимуагенов и одновременно являющиеся мишенями для действия экзогенных антимуагенов, отсутствуют или вырабатываются в недостаточном количестве у эмбрионов 14 – 16-дневного возраста, что и приводит к исчезновению антикластогенного эффекта. Эти данные

подтверждают высказанное ранее предположение, что антимуtagens в целостном организме преимущественно действуют опосредованным путем [37, 52, 53].

Новые исследования производных 1,4-дигидропиридина в различных тест-системах указывают на множественность механизмов их действия у животных [37, 54–60]. Возможно, это явление обусловлено их триггерными свойствами, то есть способностью запускать и/или контролировать биохимические процессы, приводящие в конечном итоге к защитным и лечебным эффектам.

Список литературы

1. Giam C.S., E. Atlas Jr., Powers M.A. et al. Phthalic acid esters // The Handbook of Environmental Chemistry. – Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984. – Vol.3, Part C. – P. 67–143.
2. Shiota K., Nishimura H. Teratogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol.45. – P. 65–70.
3. Tomita I., Nakamura Y., Aoki N. et al. Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol.45. – P. 119–125.
4. Kluwe W.M. Carcinogenic potential of phthalic acid esters and related compounds: structure-activity relationship // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol.65. – P. 271–278.
5. Kluwe W.M., McConnel E.E., Huff J.E. et al. Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds by the National Toxicology Program and the National Cancer Institute // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol.45. – P. 129–133.
6. Douglas G.R., Hugenholtz A.P., Blakey D.H. Genetic toxicology of phthalate esters. Mutagenic and other genotoxic effects // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol.65. – P. 255–262.
7. Zeiger E., Haworth S., Speck W. et al. Phthalate ester testing in the National Toxicology Program's Environmental Mutagenesis Test Development Program // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol.45. – P. 99–101.
8. Kozumbo W.J., Kroll R., Rubin R.J. Assessment of the mutagenicity of phthalate esters // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol.45. – P. 103–110.
9. Phillips B.J., James T.E.B., Gangolli S.D. Genotoxicity studies of di(2-ethylhexyl)phthalate and its metabolites in CHO cells // Mutat. Res. – 1982. – Vol. 102. – P. 297–304.
10. Phillips B.J., Anderson D., Gangolli S.D. Studies on the genetic effects of phthalic acid esters on cells in culture // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol.65. – P. 263–266.
11. Катосова Л.Д., Павленко Г.И. Цитогенетическое обследование рабочих химических производств // Тез. докл. XIV Ежегод. конф. Европ. об-ва по мутагенам окружающей среды. – М., 1984. – С. 232.
12. Изучить влияние вредных выбросов МПО "Химволокно" на наследственные структуры животных: Отчет о НИР (заключит.) / Институт генетики и цитологии АН БССР; Рук. темы Р.И Гончарова. – № ГР 0181.6011729. – Минск, 1985. – 93 с.
13. Goncharova R.I., Zabrejko S.P., Kozachenko V.I. et al. Mutagenic effects of dimethyl terephthalate on mouse somatic cells *in vivo* // Mutat. Res. – 1988. – Vol.204, №2. – P. 703–709.
14. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Левина А.Б. Мутационный груз и приспособленность популяций *Drosophila melanogaster* после продолжительной обработки промышленным загрязнителем диметилтерефталатом (ДМТФ) // VI Всесоюз. совещ. по проблемам биологии и генетики дрозофилы: Тез. докл. совещ., Одесса, 7 – 12 сент. 1989 г./ Одесса, 1989. – С.26.
15. Гончарова Р.И., Левина А.Б., Кужир Т.Д. Влияние хронической обработки популяций дрозофилы диметилэфиром терефталевой кислоты (ДМТФ) на мутационный процесс и приспособленность особей к индуцирующему фактору // Эколого-генетические последствия воздействия на окружающую среду антропогенных факторов: Тез. докл. II Всесоюз. координ. совещ., Сыктывкар, 21 – 23 марта 1989 г. / Сыктывкар, 1989 – С.51–52.

16. Гончарова Р.И., Левина А.Б., Кужир Т.Д. Отдаленные эффекты хронического воздействия на популяции дрозофилы малых доз диметилтерефталата // Объем и методы генотоксической оценки и побочных эффектов биологически активных веществ: Тез. докл. Всесоюз. симпоз., Ленинград, 22 – 26 мая 1989 г. / Ленинград, 1989. – С.31–32.
17. Ashby J. The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens // *Mutagenesis*. – 1986. – Vol.1, №1. – P. 3–16.
18. Ashby J., Tennant R.W. Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP // *Mutat. Res.* – 1988. – Vol. 204. – P. 17–115.
19. Shelby M.D. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications // *Mutat. Res.* – 1988. – Vol.204, №1. – P. 3–15.
20. Buttenworth B.E. Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential // *Mutat. Res.* – 1990. – Vol.239, №2. – P. 117–132.
21. Тарасов В.А. Принципы качественной и количественной оценки генетической опасности химических веществ // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека: Материалы межд. симпоз. / М., 1994. – ч.1. – С.3–66.
22. Худoley В.В. Методы регистрации и процедура тестирования загрязнителей среды на канцерогенность в хронических экспериментах на лабораторных животных: протокол, возможности, ограничения, перспективы // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека: Материалы межд. симпоз. / М., 1994. – ч.1. – С.67–86.
23. Bruce W.R., Heddle J.A. The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella* and sperm abnormality assays // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1979. – Vol. 21, №3. – P.319–334.
24. Cole R.J., N.A. Taylor, J. Cole, C.F. Arlett. Short-term test for transplacentally active carcinogens. 1. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts // *Mutat. Res.* – 1981.– Vol. 80. – P. 141–157.
25. Ильинских Н.Н., Медведев М.А., Бессуднова С.С., Ильинских И.Н. Мутагенез при различных функциональных состояниях организма. – Томск: Изд-во ТГУ, 1990. – 226 с.
26. Cole R.J., N.A. Taylor, J. Cole, C.F. Arlett. Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test // *Nature (London)*. – 1979. – Vol. 277. – P. 317–318.
27. Cole R.J., Cole J., Henderson L. et al. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts // *Mutat. Res.* – 1983. – Vol.113, №1. – P. 61–75.
28. Stoyel C.J., A.M. Clark. The transplacental micronucleus test // *Mutat. Res.* – 1980. – Vol. 74. – P. 393–398.
29. Дубур Г.Я. 1,4-дигидропиридины, их реакционная способность и биологические свойства: Автореф. дис... др-а хим. наук: 02.00.10. – Рига, 1979. – 52 с.
30. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Дубур Г.Я. и др. Сравнительное изучение антимуtagenного действия соединений дигидропиридинового ряда в связи с их антиоксидантной активностью // *ДАН СССР*. – 1980. – Т.255, №6. – С.1483–1486.
31. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis // *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*; by ed. A. Hollaender / N.Y.: Plenum Press, 1976. – Vol.4. – P. 31–53.
32. Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox. Program // *Mutat. Res.* – 1983. – Vol.123. – P. 61–118.
33. Казаченко В.И., Пашин Ю.В. Трансплацентарная индукция микроядер в эритроблестах печени эмбрионов мыши. – М: Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, 1985 – 15 с.
34. Mendelson D. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of *Drosophila melanogaster*. I // *Mutat. Res.* – 1974. – Vol.22, №2. – P. 145–156.
35. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
36. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.

37. *Кужир Т.Д.* Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 267 с.
38. *Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Левина А.Б., Забрейко С.П.* Мутагенная активность диметилтерефталата // Доклады АН БССР. – 1984. – Т.28, №11. – С.1041–1044.
39. *Левина А.Б., Кужир Т.Д.* Специфичность проявления мутагенного действия диметилтерефталата в опытах на дрозофиле // Заседание секции генетических аспектов проблемы "Человек и биосфера" при ГКНТ СССР: Тез. докл. / Киев, 1988. – С.69.
40. *Lutz W.K.* Investigation of the potential for binding of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to rat liver DNA *in vivo* // Environ. Health Perspect. 1986. – Vol. 65.– P. 267–269.
41. *Reddy J.K., Reddy M.K., Usman M.I., et al.* Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di-(2-ethylhexyl)phthalate and di-(2-ethylhexyl)adipate with a hypolipidemic drug // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol.65. – P. 317–327.
42. *Warren J.R., Lalwani N.D., Reddy J.K.* Phthalate esters as peroxisome proliferator carcinogens // Environ. Health Perspect. – 1982. – Vol. 45. – P.35–40.
43. *Conway J.G., Cattley R., Popp J.A., Bottenworth B.E.* Possible mechanisms in hepatocarcinogenesis by the peroxisome proliferator di-(2-ethylhexyl)phthalate // Drug. Metabol. Rev. 1990. – Vol. 21. – P. 65–102.
44. *Emerit I.* Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis // Free Radic. Biol. Med. – 1994. – Vol.16, №1. – P. 99–109.
45. *Yamamoto K.I., Kikuchi Y.* Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei // Mutat. Res. – 1981. – Vol.90. – P. 163–173.
46. *Yamamoto K.I., Kikuchi Y.* Induction of micronuclei in mouse fetal liver after exposure in utero to *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine // Mutat. Res. – 1984. – Vol.128, №2. – P. 173–179.
47. *Anderson D.* Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage // Mutat. Res. – 1996. – Vol.350, №1. – P. 103–108.
48. *Вальдман А.Р., Дубур Г.Я., Спруж Я.Я.* Дилудин – новый антиоксидант – стабилизатор витаминов и стимулятор роста и продуктивности сельскохозяйственных животных // Известия АН Латв. ССР. – 1977. –№9. – С.43–61.
49. *Roberts J.J., Wazwick G.P.* Studies on the mode of action of tumor-growth-inhibiting alkylating agents. 1. The fate of ethyl methanesulfonate ("half-myleran") in the rat // Biochem. Pharmacol. – 1985. – Vol.1. – P. 60–67.
50. *Гончарова Р.И.* Антимутагенная система клеток // Взаимодействие между преобразованиями окружающей среды и адаптивной демографической и генетической структурой народонаселения: Тез. докл. межд. конф. по проекту №12 программы ЮНЕСКО "Человек и биосфера", Ташкент, 15–19 мая 1984 г./ М., 1984. – С.98–100.
51. *Гончарова Р.И.* Антимутагенез как генетический процесс // Вестник РАМН. – 1993. – №1. – С.26–33.
52. *Goncharova R.I., Kuzhir T.D.* A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster* // Mutat. Res. – 1989. – Vol.214, No 2. – P. 257–265.
53. *Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Даливеля О.В. и др.* Производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) – ингибиторы химического мутагенеза // Вестник РАМН. – 1995. –№1. – С.9–20.
54. *Кужир Т.Д., Гончарова Р.И.* Механизмы ингибирующего действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты при химическом мутагенезе // Вестник РАМН. – 1995. – №1. – С.20–29.
55. *Goncharova R.I., Kuzhir T.D.* Some effects of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives on repair pathways involved in chemical mutagenesis // Biochem. Society Transact.– 1997. – Vol.25.– 139S
56. *Klušā V., Duburs G.* Cognition enhancers (nootropic drugs) // Acta Medica Baltica. – 1996. – V. 3, No.2. – P. 104–114.

57. Misane I., Kluša V., Dambrova M., Germane S., Duburs G., Bisenieks E., Rimondini R., Ögren S.O. "Atypical" neuromodulatory profile of glutapyrone, a representative of a novel 'class' of amino acid-containing dipeptide-mimicking 1,4-dihydropyridine (DHP) compounds: *in vitro* and *in vivo* studies // European Neuropsychopharmacology. – 1998. – V.8. – P. 329–347.
58. Liutkevičius E., Ulinskaite A., Meškys R., Kraujelis K., Duburs G., Kluša V. Influence of different types of the 1,4-dihydropyridine derivatives on rat plasma corticosterone levels // Biomedical Letters. – 1999. – V.60. – P. 39–46.
59. Briede Ja., Daija D., Stivrina M., Duburs G. Effect of cerebrocrast on the lymphocyte blast transformation activity in normal and streptozotocin-induced diabetic rats // Cell Biochem. Funct. – 1999. – V. 17. – P.89–96.
60. Briede Ja., Daija D., Bisenieks E., Makarova N., Uldrikis Ja., Poikans Ja., Duburs G. Effects of some 1,4-dihydropyridine Ca antagonists on the blast transformation of rat spleen lymphocytes // Cell Biochem. Funct. – 1999. – V. 17. – P.97–105.

SUMMARY

Clastogenicity of ethyl methanesulfonate and dimethyl terephthalate in micronucleus test and the pathways of its modification

In the mouse transplacental test, EMS induced micronuclei and disturbed haemopoiesis in female bone marrow and foetal liver. Dimethyl terephthalate at the tested dose was ineffective in pregnant females increasing however the level of these events in foetuses. Hence, both the alkylating agent and the phthalate derivative penetrates placenta and are dangerous for embryos. The 1,4-dihydropyridine derivative (DHP) decreased the EMS-induced micronucleus frequency in pregnant female somatic cells but it was inefficient in fetuses and did not influence on the DMtP effects. The typical dependence of its protective action on the physiological organism status was revealed. This indicates that the antimutagen inhibits the clastogenesis by induction or stimulation of endogenous components responsible for antioxidant defenses and/or electrophile-detoxifying mechanisms.