

А.М. ВОЙТОВИЧ^{1,2}, Л.А. НАДЖАРЯН¹,
А.И. КОТЕЛЕНЕЦ¹, В.Ю. АФОНИН^{1,2},
А.Г. ДАВЫДОВСКИЙ^{1,3}, А.А. УШКОВ¹,
Н.В. ГАВРИЛЕНКО⁴

¹Республиканский научно-практический центр гигиены МЗ
Республики Беларусь

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

³Институт физиологии НАН Беларуси

⁴Белорусский государственный университет,
биологический факультет

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА



В тестах in vitro и in vivo изучено генотоксическое действие синтетического аналога фитогормона стероидной природы — эпибрассинолида. В тесте Эймса (S. typhimurium, TA100) и тесте на ДНК-повреждающую активность (ДНК фага λ) эпибрассинолид не проявил мутагенных свойств. В микроядерном тесте при внутрибрюшинном введении эпибрассинолида в дозе 500 мг/кг отмечено увеличение уровня полихроматофильных эритроцитов с микроядрами, что, вероятно, связано с нарушением проницаемости клеточных мембран.

© А.М. ВОЙТОВИЧ, Л.А. НАДЖАРЯН, А.И. КОТЕЛЕНЕЦ,
В.Ю. АФОНИН, А.Г. ДАВЫДОВСКИЙ, А.А. УШКОВ,
Н.В. ГАВРИЛЕНКО, 2004

Введение. Вещества, применяемые в качестве регуляторов роста растений и гербицидов, подлежат обязательному тестированию как потенциальные мутагены. К таким веществам относятся, в частности, брассиностероиды. Эти вещества являются растительными аналогами гормонов млекопитающих и экдизионов — гормонов, регулирующих линьку насекомых [1, 2].

Сведения о мутагенном действии фитогормонов достаточно ограничены и нет указаний на потенциальную опасность этих веществ [3]. В литературе практически отсутствуют сведения о воздействии синтетических аналогов брассиностероидов на животных и человека. Поэтому проведение подобных исследований с учетом требований, предъявляемых к пестицидам [4], представляется вполне актуальным и необходимым. Стероидные гормоны играют ключевую роль в функционировании биосистем. Метаболизм брассиностероидов происходит с участием ферментов, имеющих аналоги в организме животных и человека [1]. В связи с этим можно предположить, что в организме метаболизм этих веществ может проходить по тому же пути, что и половых гормонов. Поэтому представляет интерес оценка последствий их воздействия на тканевом и клеточном уровнях.

Необходимость в подобных исследованиях диктуется тем, что другие растительные гормоны, в частности, аналогичные эстрогенам животных и человека, способны оказывать значительное влияние на гормональный статус организма [5]. При изучении возможных побочных эффектов брассиностероидов в организме человека и животных необходимо учитывать особенности сигнальных систем, через которые реализуется их воздействие на клеточные структуры, их схожесть с растительными аналогами [1], метаболизм и участие в процессах онтогенеза [2].

Материалы и методы. 24-эпибрассинолид синтезирован и предоставлен лабораторией химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Потенциальная ДНК-повреждающая активность эпибрассинолида изучена на ДНК фага λ (Сиб. энзим). Контролем служили интактная ДНК и ДНК в присутствии системы метаболической активации и бензидаина, вещества с доказанной генотоксичностью [6]. Поврежденная продуктами окисления бензидаина ДНК утрачивает электрофоретическую подвижность и остается на старте.

Условия проведения реакции: объем реакционной смеси 25 мкл; 0,1 М цитратно-ацетатный буфер pH 5,5; [ПХ] = 10^{-8} М; $[H_2O_2]$ = 10^{-3} М; [ДНК фага λ] = 0,15 мкг; раствор возрастающей концентрации эпибрасинолида (ЭБ) в диметилформамиде (ДМФ). В контрольную пробу (№ 3) вносили вместо эпибрасинолида бензидин в повреждающей ДНК концентрации ($5 \cdot 10^{-6}$ М). Конечная концентрация ДМФ во всех пробах, включая контрольные, составляла 20 %. В ячейках иммунологического планшета смешивали буфер, ДНК в физиологическом растворе, раствор пероксидазы и расчетное количество эпибрасинолида. Реакцию начинали добавлением перекиси водорода. Смесь инкубировали в течение 1 ч, затем в ячейки приливали по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя бромфенолового синего (Serva), пробы вносили в гель (по 10 мкл на дорожку). Горизонтальный электрофорез проводили при силе тока 90 мА, напряжении 80 В в 0,8%-ном агарозном геле с использованием 0,1 М трис-фосфатного буфера и 0,008 М ЭДТА. Интеркалирующий реагент — бромистый этидий (Sigma). ДНК в геле просматривали на трансиллюминаторе и сканировали в ультрафиолетовом свете на приборе IMFGE MASTER VDS-CL.

Тест Эймса на индукцию обратных мутаций [7] проведен на бактериях *Salmonella typhimurium* штамма TA100 с использованием постмитохондриальной (1) и постядерной (2) фракций гомогената печени крыс. Эпибрасинолид растворяли в этаноле при помощи шуттера (2 ч) в диапазоне массово-объемных соотношений от 50 мкг/мл до 5 пкг/мл, далее эпибрасинолид пассивно экстрагировали в течение 24 ч при температуре 20 ± 5 °С. Уровень мутагенного эффекта определяли как кратность превышения числа ревертантов (среднее значение по трем чашкам) в данном опытном варианте над чистым контролем.

В микроядерном тесте *in vivo* [8] использованы взрослые мыши линии СВА, самцы массой $20,0 \pm 2,0$ г. 24-Эпибрасинолид растворяли в физиологическом растворе (20 мг/мл) с добавлением 0,05 мл Твин-40 (Sigma) на 3,0 мл раствора, вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл одному животному, что соответствует дозе 500 мг/кг, которая по ГОСТ 12.1.007-76

составляет 1/10 LD50 при введении *per os* для веществ IV класса опасности.

Забой животных производили через 24, 36 и 48 ч путем цервикальной транслокации шейных позвонков. Для приготовления мазков клетки костного мозга вымывали из бедренных костей мышей 50%-ной эмбриональной телячьей сывороткой на фосфатном буфере (pH 7,0–7,2). Сразу после высыхания препаратов костного мозга их фиксировали этиловым спиртом. Окраску препаратов проводили через 1 сут после приготовления мазков красителем Гимза (Merck). Считали по 1000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами на одно животное, в тех же полях считали число эритроидных клеток с признаками апоптоза. Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением параметрических методов вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты эксперимента по изучению воздействия эпибрасинолида и продуктов его пероксидазного окисления на ДНК представлены на рис. 1. Хорошо видно, что электрофоретическая подвижность ДНК фага λ в присутствии системы метаболической активации не изменяется в зависимости от возрастающей концентрации эпибрасинолида, четко прослеживается ДНК-повреждающее действие бензидаина.

В тесте Эймса, как видно из табл. 1, эпибрасинолид не проявил мутагенную активность (0 баллов) в изученном диапазоне концентраций на индукцию обратных мутаций при использовании обеих систем метаболической активации.

При анализе мазков костного мозга мышей было установлено, что достоверное превышение уровня ПХЭ с микроядрами наблюдается уже через 24 ч, а максимальные значения наблюдаются через 36 и 48 ч после введения эпибрасинолида (табл. 2). Введение физраствора с добавлением Твин-40 привело через 24 ч к увеличению уровня аберрантных клеток в три раза. Чистый физраствор вызвал двукратное увеличение уровня таких клеток лишь через 48 ч после инъекции. Поэтому можно предположить, что в значительной степени воздействие изучаемой препаративной формы вещества вызвано чисто физиологической реакцией в результате раздражения брюшины при инъекции.

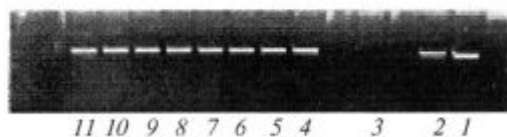


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность ДНК фага λ в присутствии системы метаболической активации в зависимости от возрастающей концентрации эпибрасинолида: 1 — (контроль 1) ДНК фага λ , 20 % ДМФ; 2 — (контроль 2) ДНК фага λ , 20 % ДМФ; [ПХ] = 10^{-8} М, [H₂O₂] = 10^{-3} М; 3 — (контроль 3) ДНК фага λ , 20 % ДМФ; [ПХ] = 10^{-8} М, [H₂O₂] = 10^{-3} М, [БД] = $5 \cdot 10^{-6}$ М; 4 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $3,9 \cdot 10^{-5}$ М; 5 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $7,8 \cdot 10^{-5}$ М; 6 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $1,56 \cdot 10^{-4}$ М; 7 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $3,1 \cdot 10^{-4}$ М; 8 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $6,25 \cdot 10^{-4}$ М; 9 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $1,25 \cdot 10^{-3}$ М; 10 — ДНК фага λ , 20 % ДМФ, ПХ = 10^{-8} М, H₂O₂ = 10^{-3} М, [ЭБ] = $1,25 \cdot 10^{-3}$ М; 11 — (контроль 4) ДНК фага λ , 20 % ДМФ, [ЭБ] = $5,0 \cdot 10^{-3}$ М

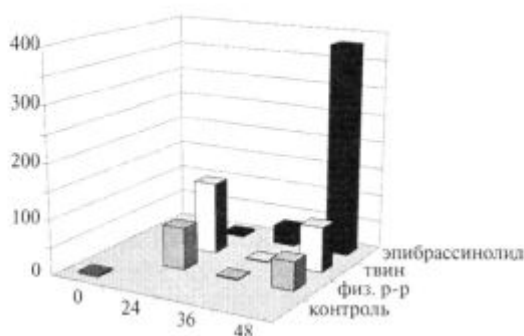


Рис. 2. Гибель эритроидных клеток костного мозга мышей в различные сроки воздействия: по вертикали — погибших клеток на 10 000 ПХЭ; по горизонтали — ч

Твин-40, который был применен для растворения эпибрасинолида, также мог оказать заметное действие. Детергенты этого типа способны изменять поверхностное натяжение клеточных мембран и нарушать их структуру [9]. Такие изменения могут послужить как побудительным мотивом к вступлению клетки в деление, так и причиной клеточной гибели. Видимо клеточная гибель была основной причиной увеличения числа клеток с микроядрами уже через 24 ч после введения твина. Исследуемое вещество вызывало максимальное увеличение числа этих клеток через 36 ч. Такое смещение во времени создает впечатление защитного

действия эпибрасинолида, однако следует учитывать, что фитогормоны могут способствовать изменению плотности и вязкости клеточной мембраны [3]. При этом вероятно замедление темпов энуклеации, сопровождающей созревание эритроцитов и удаление микроядер [4]. Последнее предположение подтверждается динамикой выхода эритроидных клеток на стадии энуклеации с признаками клеточной гибели по критерию пикноза ядра и карioreксиса (рис. 2). В целом эта динамика в большинстве серий полностью соответствует уровню клеток с микроядрами.

Следует учесть, что в ряде случаев ускорение темпов клеточной пролиферации способствует росту уровня цитогенетических повреждений даже в отсутствие мутагенного воздействия. Такая активация часто сопровождается апоптозом [10]. Известно, что введение в организм стероидных гормонов может увеличивать уровень клеток с цитогенетическими повреждениями [11], вероятно, за счет перераспределения клеточных субпопуляций в кроветворных тканях [12, 13]. Именно клеточная гибель является причиной, по которой наши данные отличаются от результатов эксперимента по оценке мутагенного эффекта эпибрасинолида

Таблица 1
Результаты исследования мутагенной активности в тесте Эймса

Пробы	Среднее количество ревертантов <i>S. typhimurium</i> , TA100		Активность, баллы
	фракция 1	фракция 2	
ЭБ в условиях метаболической активации	2	8	0
Контроль фракции	3	4	0
50 мкг/мл	0	0	0
5 мкг/мл	0	0	0
500 нг/мл	0	0	0
50 нг/мл	0	0	0
5 нг/мл	0	0	0
500 пкг/мл	0	0	0
50 пкг/мл	0	0	0
5 пкг/мл	0	0	0
Чистый контроль (дистиллированная вода)	0		0
Позитивный контроль (бромистый этидий)	970		2

Таблица 2

Микроядра в полихроматофильных эритроцитах костного мозга в разные сроки после введения эпибрасинолида (ЭБ)

Вариант исследования	Количество		Число клеток с микроядрами		Статистическая достоверность
	животных	исследованных клеток	всего	%	
Контроль	7	7000	19	0,27 ± 0,07	—
			24 ч		
Физраствор	5	5000	13	0,26 ± 0,12	—
Твин	6	6000	55	0,92 ± 0,15	*P < 0,01; **P < 0,01
Твин + ЭБ	5	5000	31	0,52 ± 0,08	*P < 0,01
			36 ч		
Физраствор	5	5000	14	0,28 ± 0,05	—
Твин	6	6000	41	0,68 ± 0,12	*P < 0,02; **P < 0,03
Твин + ЭБ	7	7000	114	1,63 ± 0,26	*P < 0,01; **P < 0,01; ***P < 0,01
			48 ч		
Физраствор	5	5000	28	0,56 ± 0,12	—
Твин	6	6000	46	0,77 ± 0,08	P < 0,01;
Твин + ЭБ	6	6000	86	1,43 ± 0,08	*P < 0,01; **P < 0,01; ***P < 0,01

*Достоверность различий с контролем. **Достоверность различий с физраствором. ***Достоверность различий с твином.

в составе препарата DI-31 [14], где вещество, растворенное на подсолнечном масле, дважды вводили мышам внутривентриально. В опытных сериях уровень аберрантных клеток был ниже положительного контроля. Однако высокая вариабельность в зависимости от концентрации позволяет предположить, что эффект тоже был обусловлен клеточной гибелью. Косвенно такое предположение подтверждается признаками интоксикации, которые были отмечены авторами у животных.

Стероидные соединения относятся к мембраноактивным веществам [15], именно на мембранах находятся рецепторы гормонов, тканевых и ростовых факторов. Специфическое воздействие детергентов на мембраны [16] может значительно модифицировать это воздействие. Поэтому вероятный эффект эпибрасинолида заключается в модификации клеточной пролиферации, дифференцировки, а также индукции апоптоза, так как система сфингомиелина-церамида является одним из пусковых механизмов этого процесса через каскад киназных реакций на лигандах рецепторов и в цитоплазме [17, 18].

Эффекты эпибрасинолида *in vivo* трудно отделить от физиологической реакции в связи с раздражением брюшины и присутствием детергента, что требует дальнейшего изучения его биологического действия с использованием других растворителей. Это заключение в целом согласуется с известным мнением, что цитогенетические эффекты экидиноподобных веществ обусловлены физиологическим воздействием [19].

По результатам исследований 24-эпибрасинолида в трех тест-системах он не оказывает прямого мутагенного действия. Можно предположить, что эпибрасинолид оказывает воздействие на клеточные мембраны, меняя их проницаемость и жесткость.

SUMMARY. Genotoxic effect of synthetic phytohormone analogue of steroid origin epibrassinolide was studied in *in vitro*- and *in vivo*-tests. Epibrassinolide did not display mutagenic properties in Ames' test (*S. typhimurium*, TA100) and DNA damaging activity test (DNA of phage λ). The rise in the level of polychromatophilous erythrocytes with micronuclei was observed in the micronuclear test at intraperitoneal epibrassinolide injection at the dose of 500 mg/kg that seems to be associated with disturbance of cell membrane permeability.

РЕЗЮМЕ. У тестах *in vitro* та *in vivo* вивчали генотоксичну дію синтетичного аналога фітогормона стероїдного походження — епібрасиноліда. В тесті Еймса (*S. typhimurium*, TA100) та у тесті на ДНК-ушкоджуючу властивість (ДНК фага λ) епібрасинолід не виявив мутагенних властивостей. У мікроядерному тесті при внутрішньочеревному введенні епібрасиноліда в дозі 500 мг/кг відзначали підвищення рівня поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами, що, можливо, пов'язано з порушенням проникливості клітинних мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clouse S.D. Brassinosteroids. Plant counterparts to animal steroid hormones? // *Vitam. Horm.* — 2002. — **65**. — P. 195–223.
2. Davison G.P., Restrepo R., Martinez G., Coll F., Leon O.S. Effects of a brassinosteroid analogue to mosquito larvae // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2003. — **56** (3). — P. 419–424.
3. Ratnayake W.M., L'Abbe M.R., Mueller R., Hayward S., Plouffe L., Hollywood R., Trick K. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats // *J. Nutr.* — 2000. — **130** (5). — P. 1166–1178.
4. *Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51.* — Женева: ВОЗ, 1989.
5. Li J., Biswas M.G., Chao A., Russell D.W., Chory J. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5α -reductases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1997. — **94** (8). — P. 3554–3559.
6. Абилов С.К., Порошенко Г.Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений // *Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Токсикология.* — М., 1986. — **14**.
7. EPA. Health effects test Guidelines OPPTS 870.5100. Bacterial reverse mutation test. — US. — EPA 712-C-98-247, 1998. — 11 p.
8. EPA. Health effects test Guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test. — US. — EPA 712-C-98-226, 1998. — 10 p.
9. Palasz A.T., Thundathil J., Verrall R.E., Mapletoft R.J. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture // *Anim. Reprod. Sci.* — 2000. — **58** (3/4). — P. 229–240.
10. Schwenke K., Peterson H.P., Wangenheim K.-H. et al. Radiation-enhanced differentiation of erythroid progenitor cells and its relation to reproductive cell death // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1996. — **69** (3). — P. 309–317.
11. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. — Томск, 1992.
12. Гильдиева Б.С., Хамидов Д.Х. Регуляция гемопоэза кортикостероидами у рыб // *Журн. эвол. биохимии и физиологии.* — 1973. — **9** (2). — С. 144–149.
13. De Souza Bueno A.M., de Branganca Pereira C.A., Rabello-Gay M.N. Environmental genotoxicity evaluation using cytogenetic end points in wild rodents // *Env. Health Persp.* — 2000. — **108** (12). — P. 1165–1169.
14. S. del C. Diaz Liera, G.F. Lope Evaluacion genotoxica del brasinoesteroide DI-31 (biobras-16) mediante el ensayo de micronucleo en medula osea de rato // *Rev. Cubana Invest. Biomed.* — 1999. — **18** (1). — P. 27–28.
15. Волюнец А.П., Шуканов В.П., Полянская С.Н. Стероидные гликозиды — новые фиторегуляторы гормонального типа. — Минск: ИООО «Право и экономика», 2003.
16. Казеннов А.М., Маслова М.И., Савина Г.В. Сравнительная характеристика свойств Na, K-АТФазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio* // *Журн. эвол. биохимии и физиологии.* — 1984. — **20** (2). — С. 167–174.
17. Agarwal M.K. Receptors for mammalian steroid hormones in microbes and plants // *FEBS Lett.* — 1993. — **322** (3). — P. 207–210.
18. Fu M., Wang C., Wang J., Zhang X., Sakamaki T., Yeung Y.G., Chang C., Hopp T., Fuqua S.A., Jaffray E., Hay R.T., Palvimo J.J., Janne O.A., Pestell R.G. Androgen receptor acetylation governs trans-activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting *in vitro* stimulation and trans-repression function // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — **22** (10). — P. 3373–3388.
19. Tomaschko K.-H. Nongenomic effects of ecdysteroids // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* — 1999. — **41** (1). — P. 89–98.

Поступила 07.06.04