

Л. М. Фонштейн, Ю. А. Ревазова, Г. Н. Золотарева

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений
(Купавна, Московская область)

Проблема исследования генетических последствий загрязнения среды обитания человека имеет множество аспектов. Одним из них является выбор методов и тест-систем для изучения мутагенной активности химических соединений, с которыми так или иначе контактирует человек в результате внедрения химии в различные сферы хозяйства и быта. Так, развитие фармакологии и фармакологической промышленности ведет к тому, что практически каждый человек становится объектом воздействия лекарственных препаратов. Арсенал лекарственных средств можно рассматривать поэтому как важный компонент среды обитания человека.

К настоящему времени с несомненностью доказана способность ряда лекарственных препаратов вызывать мутации /1-4/. Однако число лекарств, относительно которых имеется какая-либо информация по мутагенезу, составляет лишь небольшую часть фармакопеи. Согласно рекомендациям экспертов ВОЗ лекарственные средства, использующиеся в клинике, должны быть выборочно исследованы на мутагенную активность, исходя из их структурной аналогии с известными мутагенами, наличием известных токсических, канцерогенных, тератогенных и других эффектов, масштабов применения препаратов и т. д. Препараты же, внедряющиеся в клинику, рекомендовано подвергать тотальной проверке на мутагенность /5/. Примерно такая же ситуация наблюдается и в других группах соединений, использующихся в различных областях хозяйства.

Особые трудности представляет оценка способности препарата индуцировать точковые (генные) мутации, т. е. изменения на уровне отдельных нуклеотидов ДНК. При анализе таких мутаций приходится иметь дело с отдельными генетическими маркерами, поэтому их регистрация всегда является учетом редких мутационных событий в большой популяции.

При отсутствии селективных методов отбора мутантных особей,

а именно так и обстоит дело в случае попытки зарегистрировать генную мутацию на млекопитающих *in vivo* анализу необходимо подвергать большие популяции животных. Поэтому наиболее адекватный задаче метод специфических локусов /6-8/ может быть использован только в исключительных случаях и неприменим для оценки мутагенной активности широкого набора агентов.

Задача оценки мутагенной активности большого набора веществ делает необходимым использование для этой работы экспериментальных моделей, обладающих высокой пропускной способностью. Однако при введении в сферу эксперимента таких моделей неизбежно приходится сталкиваться с рядом трудностей. Основной из них является вопрос о соотношении данных, полученных с помощью модельных тест-систем, с результатами определения мутагенной активности этих агентов на высших организмах. Важно, однако, что это классическое для ряда оценок затруднение в интересующем нас случае имеет определенную особенность. Речь идет о том, что генетическая оценка отличается, например, от токсикологической в силу универсальности генетического материала у организмов с разной степенью сложности организации.

Предметом данной работы явился анализ результатов тестирования мутагенной активности на различных модельных системах и высших с целью получения информации о сравнительной ценности различных тест-систем для первичного этапа выявления мутагенов.

Обработке были подвергнуты данные, приведенные в обзоре Бартельмесса. Результаты определения мутагенной активности оценивались по шкале от 0 до 1. Случаи отсутствия мутагенной активности или антимутагенная активность принимались за 0, наличие мутагенной активности принималось за 1. Слабый мутагенный эффект, который отмечался в работе Бартельмесса знаком скобок, соответствовал индексу 0,5. Такой же индекс вводился в случаях прямо противоположных результатов определения мутагенной активности определенного вещества на данной модели. Иногда противоречивые результаты разных авторов соответствовали в отдельности индексам 0,5 и 0 или 0,5 и 1. В таких случаях общий индекс оценки мутагенной активности данного соединения на данной модели составлял соответственно 0,25 или 0,75.

За наличие мутагенного эффекта принимали случаи, которым в анализируемой работе соответствовал знак "+", а также случаи с нарушениями в распределении хромосом, со слипаниями хромосом и с индукцией мутаций в экстрахромосомальных элементах. Результаты определения мутагенной активности, отмеченные в работе Бартельмесса знаком "?", не учитывались. Сравнивались попарно различные тест-системы, анализировались результаты, полученные в условиях *in vitro* и *in vivo*. Отдельно анализировались случаи с явной мутагенной активностью (случаи с индексом 1) и все случаи с индексом больше 0. Анализ велся с двух позиций: исследовалось, с какой вероятностью препарат, показавший себя как мутаген на моделях, является мутагеном на высших, какова вероятность того, что препарат, показавший мутагенную активность на млекопитающих и человеке, может быть зарегистрирован как мутаген на экспериментальных моделях.

В табл. 1 первая цифра означает исходную величину, соответствующую числу случаев, в которых препараты обнаруживали мутагенную активность на модельных объектах (нуклеиновые кислоты, бактериофаги, бактерии, растения, насекомые), а вторая соответствует числу случаев, в которых эти же соединения показали активность на млекопитающих и человеке. Отметим, что для нуклеиновых кислот в основном имеются в виду работы по изучению инаktivации донорной ДНК в системах генетической трансформации, а данные по растениям различного типа объединены.

Аналогичным образом составлена табл. 2, в которой учитывались лишь случаи с индексом 1, а также табл. 3 и 4, в которых за исходную величину принималось число случаев обнаружения мутагенной активности на млекопитающих и человеке.

На основании табл. 1-4 составлены табл. 5 и 6, в которых приведены показатели, характеризующие уровень совпадения результатов определения мутагенной активности на модельных объектах и высших. Случаи определения мутагенной активности на млекопитающих и человеке при этом объединены.

Оценка проводилась с помощью непараметрического критерия знаков. Нуль-гипотеза при этом состояла в допущении отсутствия совпадения в результатах определения мутагенной активности на моделях и высших. При этом распределение числа случаев, в которых результаты определения мутагенной активности на какой-то паре объектов совпадали бы или не совпадали, подчинялось бы закону биномиального распределения с параметром 0,5. Сопоставление приведенных в табл. 1-4 данных с той или иной мерой достоверности ставило эту гипотезу под сомнение. Пользовались статистическими таблицами из работы В. В. Налимова /9/. При получении индекса, характеризующего активность того или иного соединения на данном объекте, не учитывалась количественная выраженность мутагенного эффекта. В случаях противоречивых результатов определения мутагенной активности данного соединения на том или ином объекте по данным различных работ не учитывался статистический вес "+" или "0" результата. В ряде случаев число препаратов, анализировавшихся попарно на различных тест-системах, очень невелико. Учитывая все это, следует тем не менее прийти к выводу о довольно высоком совпадении результатов определения мутагенной активности на ряде модельных объектов и высших организмах. Такое совпадение свидетельствует о принципиальной возможности использования модельных объектов для получения характеристики генетической активности химических соединений.

При анализе данных, представленных в таблицах, обращает на себя внимание, что наиболее низкий уровень совпадений между результатами определения мутагенной активности на модельных объектах и высших наблюдается в том случае, когда мутагенез на высших учитывался в условиях *in vivo*. Условия *in vivo* в целом ряде случаев ведут к изменению реакции клетки на действие препарата по сравнению с условиями *in vitro*. Так, в последние годы показано, что целый ряд соединений, не показавших мутагенной активности в обычной микробиологической проверке, вели себя как яв-

Таблица 1

Сопоставление результатов определения мутагенной активности химических соединений на модельных объектах, млекопитающих и человеке (исходное — модели)

Модель- ные объек- ты	Число случаев с выявленной мутагенной активностью (с индексом > 0)					
	Млекопитающие			Человек		
	опухолевые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>	нормаль- ные клетки <i>in vitro</i>	нормаль- ные клетки <i>in vivo</i>	опухоле- вые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>	нормаль- ные клетки <i>in vitro</i>	нормаль- ные клетки <i>in vivo</i>
Нуклеино- вые кис- лоты	7/7	10/9	8/8	3/3	22/19	7/7
Вирусы	3/3	5/5	5/5	1/1	7/7	2/2
Бактерии	6/6	9/9	11/11	5/5	16/16	6/5
Растения	18/17	36/35	29/29	12/12	55/49	16/14
Насекомые	10/9	11/11	17/17	3/3	19/19	8/7

Таблица 2

Сопоставление результатов определения мутагенной активности химических соединений на модельных объектах, млекопитающих и человеке (исходное — модели)

Модельные объекты	Число случаев с выявленной мутагенной активностью (с индексом = 1)					
	Млекопитающие			Человек		
	опухоле- вые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>	нормаль- ные клетки <i>in vitro</i>	нормаль- ные клетки <i>in vivo</i>	опухоле- вые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>	нормаль- ные клетки <i>in vitro</i>	нормаль- ные клетки <i>in vivo</i>
Нуклеино- вые кис- лоты	7/6	10/9	8/6	3/3	22/17	7/5
Вирусы	3/3	4/4	4/3	1/1	7/6	2/1
Бактерии	3/3	7/7	9/6	3/3	13/12	5/3
Растения	16/14	28/25	25/19	11/11	46/37	11/5
Насекомые	7/7	8/8	16/13	2/2	15/12	6/3

ные мутагены при использовании млекопитающего в качестве промежуточного хозяина. Результаты этих исследований показали, что под влиянием ферментных систем животного могут образовываться мета-

Таблица 3

Сопоставление результатов определения мутагенной активности химических соединений на модельных объектах, млекопитающих и человеке (исходное - высшие)

Модельные объекты	Число случаев с выявленной мутагенной активностью (с индексом > 0)					
	Млекопитающие			Человек		
	опухолевые клетки	нормальные клетки	нормальные клетки	опухолевые клетки	нормальные клетки	нормальные клетки
	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vitro$ $in vitro$ $in vitro$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vitro$ $in vitro$ $in vitro$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$
Нуклеиновые кислоты	7/7	9/9	8/8	3/3	19/19	7/7
Вирусы	5/3	7/5	6/5	2/1	11/7	2/2
Бактерии	6/6	9/9	11/11	5/5	16/16	5/5
Растения	18/17	38/35	32/29	12/12	53/49	18/14
Насекомые	11/9	15/11	19/17	3/3	24/19	8/7

Таблица 4

Сопоставление результатов определения мутагенной активности химических соединений на модельных объектах, млекопитающих и человеке (исходное - высшие)

Модельные объекты	Число случаев с выявленной мутагенной активностью (с индексом = 1)					
	Млекопитающие			Человек		
	опухолевые клетки	нормальные клетки	нормальные клетки	опухолевые клетки	нормальные клетки	нормальные клетки
	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vitro$ $in vitro$ $in vitro$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$	ки $in vitro$ $in vitro$ $in vitro$	ки $in vivo$ $in vivo$ $in vivo$
Нуклеиновые кислоты	6/6	9/9	6/6	3/3	17/17	5/5
Вирусы	4/3	7/4	4/3	2/1	10/6	1/1
Бактерии	5/3	9/7	7/6	5/3	14/12	4/3
Растения	16/14	36/25	25/19	12/11	47/37	11/5
Насекомые	10/7	15/8	15/13	3/2	20/12	5/3

болиты, обладающие выраженным мутагенным эффектом /10-12/. Идея индикации возможной мутагенной активности исходного соединения в результате его метаболизма в организме животного была исполь-

Таблица 5

Вероятности совпадения результатов определения мутагенной активности на модельных объектах и высших. Ситуация модели (исходное) — высшие

Модель- ные объекты	Уровни значимости совпадения результатов					
	Опухолевые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>		Нормальные клетки <i>in vitro</i>		Нормальные клетки <i>in vivo</i>	
	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1
Нуклеино- вые кис- лоты	0,01	0,05	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,25
Вирусы	0,25	0,25	$< 0,01$	0,05	0,05	$> 0,25$
Бактерии	0,01	0,05	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$> 0,25$
Растения	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,10
Насекомые	0,01	0,01	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,10

Таблица 6

Вероятности совпадения результатов определения мутагенной активности на модельных объектах и высших. Ситуация высшие (исходное) — модели

Модельные объекты	Уровни значимости совпадения результатов					
	Опухолевые клетки <i>in vitro</i> или <i>in vivo</i>		Нормальные клетки <i>in vitro</i>		Нормальные клетки <i>in vivo</i>	
	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1	случай с индексом > 0	случай с индексом = 1
Нуклеино- вые кис- лоты	0,01	0,01	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,01
Вирусы	$> 0,25$	$> 0,25$	0,25	$> 0,25$	0,10	$> 0,25$
Бактерии	0,01	$> 0,25$	$< 0,01$	0,01	$< 0,01$	0,10
Растения	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,10
Насекомые	0,05	$> 0,25$	$< 0,01$	$> 0,25$	$< 0,01$	$< 0,05$

зована также в применении к другим модельным системам, таким как дрозофила /13/ и культуры соматических клеток млекопитающих /14/. Использование такого подхода должно несомненно повысить уровень совпадений в результатах определения мутагенной активности исследуемых агентов на модельных объектах и высших.

Конечно, высокая цена возможной ошибки заставляет рассматривать оценку на модельных системах как предварительную, но важную

для выработки стратегии дальнейшего испытания препаратов. Такая оценка может быть достаточной при отборе препаратов, обладающих высокой мутагенной активностью, которые предназначаются для использования в селекции полезных форм растений и микроорганизмов. Другой подход необходим при испытании мутагенной активности лекарственных средств или другой категории препаратов, имеющих хозяйственное значение. В этом случае получение позитивного результата на модельных объектах может служить основанием для постановки вопроса о замене мутагенного препарата его немутагенным аналогом. С другой стороны, именно эти препараты целесообразно в первую очередь подвергнуть развернутому исследованию, учитывая важность накопления данных о мутагенной активности одних и тех же препаратов на различных объектах.

Конечно, широко распространенные лекарственные препараты, не показавшие активности на модельных объектах при первичной оценке, также должны быть подвергнуты развернутому исследованию. Такая развернутая оценка должна включать методы, позволяющие регистрировать различные категории мутаций /16-18/. Накопление экспериментальных данных в этом направлении и их анализ будут способствовать решению вопроса о сравнительной ценности различных модельных объектов и методов для первичного этапа выявления мутагенов, представляющих практическую опасность для человека.

L. M. Fonstein, Yu. A. Revazova, G. N. Zolotareva

THE COMPARISON OF THE MUTAGENIC ACTIVITY DETERMINATIONS OF CHEMICAL SUBSTANCES ON DIFFERENT OBJECTS

S u m m a r y

The literature data on testing of mutagenic activity of some chemical substances on model objects (nucleic acids, viruses, bacteria, plants, insects) as well as high organisms (mammals and man) in vitro and in vivo were analyzed. A high level of the coincidence of the data is concluded. The possibility of utilization of models on the first step assay of the mutagens for planning of the further study of mutagenic activity of compounds essential for economics is discussed

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Рапопорт И. А. Токсикогенетика. ВИНТИ. Итоги науки, фармакология и токсикология, 7, 1966.
2. Bartelmes A. Mutagenic substances in the human environment. In: Chemical mutagenesis in mammals and man. F. Vogel, L. Rohrborn (Eds), Springer-Verlag, Heidelberg, 69, 1970.
3. Рапопорт И. А., Филипова Л. М., Журков В. С. Исследование мутагенной активности фенотиразиновых и других лекарственных препаратов. Генетика, 7, 115, 1971.

4. Шапиро Ю. Л., Вайнтриб М. Л., Гринберг К. Н., Журков В. С. Тератогенный и мутагенный эффект некоторых противозепептических и психотропных препаратов /обзор литературы/. Журнал невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова, 72, 934, 1972.
5. ВОЗ. Оценка и тестирование лекарств на мутагенность. Принципы и проблемы. Научно-технический доклад, № 482, 1971.
6. Russell W.L. X-ray-induced mutations in mice. Cold Spr. Harb. Sympos. Quant. Biol., 16, 327, 1951.
7. Ehling U.H., Russell W.L. Induction of specific lones mutations by alkyl methanesulfonates in male mice. Genetics, 61, Suppl. 212, 14, 1969.
8. Ehling U.H. The multiple loci method, In: Chemical mutagenesis in mammals and man. F.Vogel, L.Röhrborn (Eds). Springer-Verlag, Heidelberg, 156, 1970.
9. Налимов В. В. Применение математической статистики при анализе вещества. Гос. изд-во физ-мат. лит., М., 1980.
10. Gabridge M.G., Legator M.S. A host-mediated assay for the detection of mutagenic compounds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 130, 831, 1969.
11. Legator M.S., Malling H.V. The host-mediated assay, a practical procedure for evaluating potencial mutagenic agents in mammals. In: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. A.Hollander (Ed.), Plenum Press, New-York, London, 2, 569, 1971.
12. Propping P., Buselmaier W., Röhrborn C. Kritische Betrachtung über die intra-animale kultur von Microorganismen, iene Methode zum Nachweis chemisch induzierte Mutationen. Arznei-Forsch., 23 746, 1973.
13. Browning L. Recessive-lethal frequency in dorsophila after injection with intraperitoneal fluid from mice previously injected with ethyl metanesulfonate. EMS Newsletter, 6, 8, 1972.
14. Capizzi R.L., Smith R., Fierld B., Papirmeister B. A host-mediated assay for chemical mutagens using the L5178 Y/asn murine leukemia. Mut. Res., 21, 6, 1973.
15. Flamm W.G. A tier system approach to mutagen testing. Mut. Res., 26, 4, 329, 1974.
16. Vogel F., Rohrborn L. (Eds). Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer-Verlag, Heidelberg, 1970.
17. Hollaender A. (Ed.). Chemical mutagens. Principles and Methods for their detection. Plenum Press, New-York, London, 1, 2, 1971.
18. De Serres F.S., Sheridan W. (Eds). The evaluation chemical mutagenicity data in relation to population risk. Environ. Health Rerspectives, 6, 1973.