

С. Т. МНАЦАКАНОВ, А. С. ПОГОСЯН

К ВОПРОСУ О МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗОЛА В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В ОПЫТАХ IN VITRO

Изучалась мутагенная активность бензола в клетках человека в опытах *in vitro* на культуре лимфоцитов. Бензол вводился в культуру в G_0 и G_1 — S -фазах клеточного цикла. Установлено, что он является слабым мутагеном. Введение его вызывает растяжение центромерных участков хромосом. Мутагенная активность бензола проявляется в появлении хромосомных aberrаций, в основном типа одиночных и парных фрагментов. Как в G_0 -фазе, так и в G_1 — S -фазе клеточного цикла она примерно одинакова.

В последние годы внимание многих исследователей привлекают вопросы генетической активности промышленных веществ. Если общебиологическое действие промышленных веществ, их токсикологическая характеристика изучена достаточно полно, то вопросы генетической активности их до последнего времени оставались малоизученными. Как справедливо указывает Бочков [2], токсикологический эффект не всегда коррелирует с генетической активностью, т. е. вещество может быть токсичным и малоактивным в генетическом отношении и наоборот.

К одному из таких веществ относится бензол—простейший ароматический углеводород, который является исходным продуктом синтеза всех ароматических углеводородов. Токсикология бензола изучена достаточно полно, но его генетическая активность (мутагенная активность)—исследована крайне недостаточно.

Уже в первых работах по изучению генетической активности бензола [9] указывалось, что он может вызвать различного рода хромосомные мутации. Ряд авторов [5, 6, 9], изучавших влияние этого вещества на работах, подвергавшихся воздействию его, нашли, что оно увеличивает частоту хромосомных aberrаций у людей, хотя и незначительно. Однако отсутствие работ по изучению характера действия на хромосомы человека в различные периоды клеточного цикла и специфичности действия побудило нас провести исследования по выявлению мутагенного действия бензола на хромосомный аппарат в опытах *in vitro*.

Материал и методика. Исследовалась кровь четырех доноров в возрасте от 26 до 40 лет. У двух доноров кровь бралась дважды. Культивирование крови проводилось микрометодом по общепринятой методике [8]. Культуральная смесь состояла из 0,5 мл крови, 4,0 мл среды 199, 1,0 мл сыворотки крупного рогатого скота и 0,1 мл фитогемоглютина (ФГА) (Wellcome).

Фиксация производилась на 56 часу (первый митоз) смесью метанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1, окраска препарата—азур II с эозином.

Мутагенная активность бензола изучалась при его введении на 28 часу культивирования (фаза G_1-S) и до введения ФГА (фаза G_0) без последующей отмывки вещества.

Изучалось действие следующих концентраций бензола—1, 10, 25, 50, 100, 250 мкг/мл. Каждый опыт имел контроль. Опыты по изучению влияния бензола, проводились в трехкратной повторности.

В препаратах каждой концентрации анализировалось по 100 метафазных пластинок. При этом учитывались одиночные, парные фрагменты, кольцевые хромосомы и т. д. Пробелы к aberrациям не относили, они не учитывались. В анализ брались метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом и с числом их не менее 44 и не более 47.

Учет хромосомных aberrаций проводился по классификации, предложенной Бочковым с соавторами [1].

Результаты и обсуждение. Всего было исследовано 4200 метафазных пластинок, из которых в 249 были выявлены хромосомные aberrации. На стадии G_1-S в 117 метафазных пластинках с aberrациями было установлено наличие 119 aberrантных хромосом, тогда как в G_0 -фазе в 132 метафазных пластинках с aberrациями соответственно 133 aberrантные хромосомы.

Суммарные результаты наблюдений в G_1-S и G_0 -фазах приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Количество aberrаций, вызываемых бензолом при введении его на различных стадиях клеточного цикла

Концентрация бензола, мкг/мл	Количество метафаз	Процент метафаз с aberrациями	Количество aberrаций на 100 клеток	Количество aberrаций на 1 aberrантную клетку
Стадия G_0				
Контроль	300	2,0	2,0	1,00
1	300	5,0	5,0	1,00
10	300	4,3	4,3	1,00
25	300	5,3	5,3	1,00
50	300	6,6	7,0	1,05
100	300	8,3	8,3	1,00
250	300	12,0	12,0	1,00
Стадия G_1-S				
Контроль	300	2,0	2,0	1,00
1	300	3,3	3,3	1,00
10	300	3,3	3,3	1,00
25	300	5,6	5,6	1,00
50	300	5,3	5,6	1,06
100	300	7,6	7,6	1,00
250	300	12,3	12,6	1,03

Как видно из приведенных данных, как на стадии G_1-S , так и на стадии G_0 бензол вызывает незначительный выход aberrаций. При низких концентрациях его уровень хромосомных aberrаций лишь незначительно превышал контроль. Так, в концентрациях 1, 10, 25, 50 мкг/мл на стадии G_0 и 25, 50 мкг/мл на стадии G_1-S процент aberrантных

метафаз лишь вдвое превышал уровень aberrаций в контроле (данные статистически достоверны, $P < 0,001$). И лишь в концентрации 250 мкг/мл процент aberrаций превысил контроль в 6 раз. Это говорит о том, что бензол является слабым мутагеном и в концентрациях, которые часто встречаются в окружающей среде, вызывает хромосомные мутации, превышающие уровень контроля, т. е. спонтанные мутации незначительны. Поскольку частота возникновения aberrаций была незначительной в G_1 —S фазе, мы сочли возможным провести изучение мутагенной активности бензола на G_0 -стадии клеточного цикла.

Как видно из приведенных данных, уровень aberrаций как в G_2 -фазе, так и в G_1 —S-фазе в основном совпадал.

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание тот факт, что бензол вызывал в основном по одной aberrации хромосом в клетке. Так, из табл. 1 видно, что лишь в двух случаях при введении его в стадии G_1 —S (в концентрациях 50 мкг/мл и 250 мкг/мл) и в 1 случае при введении на стадии G_0 (в концентрации 50 мкг/мл) наблюдались метафазные пластинки, в которых отмечались поломки двух хромосом.

Наши исследования показали, что бензол вызывает в основном одиночные и парные фрагменты (табл. 2).

Таблица 2

Типы aberrаций при воздействии бензолом

Типы aberrаций	Количество aberrаций					
	стадии клеточного цикла					
	G_1 —S-стадия			G_0 -стадия		
	всего	на 100 клеток	% к общему числу (119) aberrантных клеток	всего	на 100 клеток	% к общему числу (133) aberrантных клеток
Одиночные фрагменты	88	4,2	73,9	112	5,3	84,21
Парные фрагменты	26	1,2	21,8	20	0,9	15,79
Центромерные разрывы	4	0,19	3,5	—	—	—
Кольцевые хромосомы	1	0,05	0,8	—	—	—

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, наиболее часто выявлялись одиночные фрагменты, как на G_1 —S-стадии, так и на G_0 -стадии. Парные фрагменты встречались значительно реже (21,8% в G_1 —S-фазе и 15,79% в G_0 -фазе). Другие aberrации выявлялись лишь в единичных случаях—центромерные разрывы в 4 случаях в G_1 —S-фазе и лишь один раз при анализе была выявлена кольцевая хромосома. Прочие типы aberrаций нами не были обнаружены. Очень часто морфологически хромосомы имели исчерченность, зернистость.

При анализе метафазных пластинок обратило на себя внимание наличие многочисленных центромерных растяжений. Всего нами было выявлено 775 метафазных пластинок, в которых у 2195 хромосом наблюда-

лось растяжение центромерных участков. На стадии G_1 —S число подобных пластинок составляло 374, в которых у 1082 хромосом отмечались центромерные растяжения, тогда как в G_0 -фазе число метафаз с центромерными растяжениями было 401, в которых у 1113 хромосом были выявлены центромерные растяжения. Хотя центромерные растяжения и не относятся к хромосомным aberrациям, мы считаем нужным привести эти данные (табл. 3).

Таблица 3
Количество центромерных растяжений хромосом при воздействии бензолом

Концентрация бензола, мкг/мл	Количество метафаз	Процент метафаз с центромерными растяжениями	Количество центромерных растяжений на 100 клеток	Количество центромерных растяжений на 1 клетку
Стадия G_1 —S				
Контроль	300	0	0	0
1	300	5,3	6,0	1,12
10	300	9,0	14,6	1,80
25	300	15,0	27,0	1,80
50	300	29,0	108,3	3,73
100	300	33,3	106,6	3,20
250	300	36,3	98,0	2,69
Стадия G_0				
Контроль	300	3,0	6,3	2,11
1	300	18,6	45,3	2,44
10	300	22,6	60,6	2,67
25	300	16,3	30,3	3,08
50	300	22,6	59,3	2,61
100	300	23,3	70,0	3,00
250	300	27,0	78,6	2,91

Из табл. 3 видно, что в G_1 —S-фазе число хромосом с центромерным растяжением постепенно нарастает и достигает 36,3%, тогда как в G_0 -фазе повышение числа хромосом с растяжением центромерных участков до 18,6% наблюдается уже при концентрации 1 мкг/мл; этот уровень держится примерно до концентрации 100 мкг/мл и в концентрации 250 мкг/мл достигает 27,0% (данные статистически достоверны, $P < 0,001$).

Необходимо отметить, что число хромосом с центромерным растяжением в одной метафазной пластинке колебалось в пределах 2—8 (иногда до 12), причем у всех групп хромосом степень растяжения центромерных участков была примерно равной. Нам не удалось выявить преимущественного поражения той или иной группы хромосом.

Также был выведен митотический индекс во всех опытах как в G_0 -фазе, так и в G_1 —S-фазе введения бензола. Оказалось, что он снижался по мере увеличения концентраций бензола.

В настоящее время в литературе имеется ряд сообщений, в которых обсуждается вопрос мутагенной активности бензола. Как уже указывалось, эти исследования были в основном проведены на рабочих, занятых на производстве, связанном с бензолом.

Так, в работах Тауг и Браун [10], Гартвих с соавторами [6], Хаберланд и Менте [5], Форни с соавторами [4], Гартвих и Шваниц [7] показано, что бензол вызывает хромосомные aberrации, хотя процент их незначителен (от 1,4 [10] до 10,4% [7]). Наши данные также показали, что бензол не является сильным мутагеном и способен вызвать лишь незначительное статистически достоверное увеличение выхода мутаций. Ясно, что увеличение хромосомных aberrаций до 12,3% при концентрации 250 мкг/мл не может служить доказательством высокой мутагенной активности бензола, так как концентрация 250 мкг/мл граничит с токсической концентрацией (500 мкг/мл). Наши данные свидетельствуют о том, что бензол в низких концентрациях способен вызвать небольшое увеличение выхода хромосомных поломок.

Что касается типов aberrаций, то наши результаты во многом совпадают с данными других авторов. Было установлено [4—6], что бензол вызывает появление исключительно простых aberrаций (фрагменты). К такому же выводу приходит и Доброхотов [3], который в опытах на мышах наблюдал появление преимущественно фрагментированных хромосом и лишь изредка появление других типов aberrаций.

Наши результаты совпадают с литературными данными и в отношении морфологических изменений хромосом. Как уже указывалось выше, бензол вызывал появление у хромосом зернистости и исчерченности. Изучение же хромосом рабочих, подвергнувшихся длительной экспозиции бензолом [6], также показало появление зернистости и неравномерной спирализации хромосом.

Таким образом, данные, полученные нами в опытах *in vitro*, и результаты, полученные при обследовании рабочих, непосредственно занятых на производстве с экспозицией бензола, в основном совпадают.

На наш взгляд, интерес представляет выявление растяжения центромерных участков хромосом. Как при введении бензола на стадии G_1-S , так и при введении его стадии G_0 наблюдались растяжения центромерных участков хромосом, причем в проценте, значительно превышающем уровень хромосомных aberrаций. О таких растяжениях центромерных участков хромосом имеются указания в уже упомянутой работе Хаберланта и Менте [5]. Хотя центромерные растяжения не относятся к хромосомным aberrациям, результаты наших исследований показывают, что они весьма специфичны для бензола. По-видимому, являясь слабым мутагеном, он способен вызывать морфологические изменения хромосом и тем самым оказывать влияние на наследственный аппарат человека. Во всяком случае этот вопрос является дискуссионным и нуждается в дальнейшем изучении.

Таким образом, проведенные исследования показали, что мутагенная активность бензола при его введении как на G_0 -фазе, так и на G_1 — S -фазе клеточного цикла примерно одинакова.

Институт общей гигиены
и профессиональных заболеваний,
группа генетических исследований

Поступило 4.VII 1973 г.

Ս. Տ. ՄԱՅԱԿԱՆՈՎ, Ա. Ս. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

ՄԱՐԴՈՒ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ ԲԵՆԶՈՒ ՄՈՒՏԱԿԵՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ IN VITRO ՓՈՐՁԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է բենզոլի մուտագեն ափսոսանքները մարդու պերիֆերիկ արյան լիմֆոցիտների բջջային կուլտուրայի վրա: Բենզոլի մուտագեն ափսոսանքների ռոշման համար վերցվել են հետևյալ խտությունները՝ 1, 10, 25, 50, 100, 250 մկգ/մլ: Բենզոլը ներմուծվել է բջջային ցիկլի G_0 և G_1 — S ֆազաներում: Պարզվել է, որ այն որպես մուտագեն թույլ է և առաջացնում է աննշան քանակով բրոմոսոմային աբերացիաներ:

Բենզոլի ներգործության ժամանակ հատուկ ուշադրության է արժանի բրոմոսոմաների ցենտրոմերային շրջանների ձգվածությունների առկայության փաստը, որը մի քանի անգամ գերազանցել է բրոմոսոմային աբերացիաների մակարդակը: Փորձերը ցույց են տվել, որ ձգվածությունները խիստ յուրահատուկ են բենզոլի ազդեցությանը:

Հետազոտության արդյունքներով հաստատվել է, որ բենզոլը մոտավորապես նույնանման է ազդում բջջային ցիկլի ինչպես G_0 , այնպես էլ G_1 — S ֆազաներում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бочков Н. П., Демин Ю. С., Лучник Н. В. Генетика, 8, 5, 1972.
2. Бочков Н. П. В кн. Вопросы гигиенического нормирования при изучении отдаленных последствий воздействия промышленных веществ. 16, М., 1972.
3. Доброхотов В. Б. Гигиена и санитария, 10, 1972.
4. Forni A. M. D., Pacifico E. ScD. Limonta A. MD. Arch. environm. Hlth, 22, 3, 373—378, 1971.
5. Haberland W., Mente B. Zbl. Arbeitsmed., 21, 11, 388—341, 1971.
6. Hartwich G., Schwantiz G., Becker J. Dtsch. med. Wsch., 94, 23, 1228—1229, 1969.
7. Hartwich G., Schwantiz G. Dtsch. med. Wsch., 97, 2, 45—49, 1972.
8. Hungerford D. A. Stain Technology, 40, 6, 333—338, 1965.
9. Pollini G., Colombi R. Med. Lavoro, 55, 11, 641—654, 1964.
10. Tough I. M., Brown W. M. C. Lancet, 7387, 1, 684, 1965.