

УДК 575.224.22:616-003.96:667.281

© 1999 г. Д. Н. ДЕВЕЙКИС, З. Т. НИКОЛЬЧЕНКО, В. Г. ШАХБАЗОВ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА АНИОННЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ
В ТЕСТ-СИСТЕМЕ «DROSOPHILA»****Введение**

В принятой номенклатуре анионные азокрасители – новый технологический класс водорастворимых азокрасителей, которые применяются для окраски кож. Это малоизученный класс азосоединений и сведения об отдаленных эффектах действия подобных веществ на живые организмы малочисленны. В литературе описаны свойства пищевых красителей, подобных по структуре анионным, которые обладали канцерогенными тератогенными и гонадотоксическими свойствами в экспериментах на млекопитающих и проявляли свойства мутагенов различной силы при испытании на микроорганизмах (Штенберг, Гавриленко, 1972; Fi-Hud, 1990, Joachim, 1989). Отдельные представители анионных азокрасителей индуцировали повышение частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов млекопитающих (Анионный азокраситель ..., 1996; Азокраситель ..., 1998), однако в тесте Эймса эти же красители мутагенной активностью не обладали (Нікуліна, 1997). Отрицательный результат, полученный при испытании химических соединений в тесте Эймса, предполагает дальнейшую проверку их мутагенных свойств на других объектах. Сведения о генетической активности анионных азокрасителей на других тест-объектах в литературе отсутствуют.

Целью настоящей работы явилось выявление мутагенных свойств у ряда анионных азокрасителей с различным количеством азогрупп в молекуле на модельном объекте *Drosophila melanogaster* L.

Материалы и методы

Для исследования были выбраны 3 красителя: моноазокраситель Пунцовый 4РТ (П4РТ), диазокраситель Твердый Синий (ТС) и триазокраситель с разобщенными азогруппами Чёрный Н (ЧН). Эксперименты проведены на *D. melanogaster* линий Canton-S (дикий тип), mei 9^{L1} и mei 9^a – мейотические мутанты с нарушенной системой эксцизионной репарации, а также на мутабельной линии w mus(1)104^{D1}, генотип которой характеризуется нарушенной системой пострепликативной репарации. Мухи подвергались стандартной обработке азокрасителями (экспозиция 72 часа при добавлении в питательную среду) на стадии имаго. Мутагенная активность АК исследована в тесте рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛ), а также методом учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ). Эти два метода охватывают практически весь спектр возможных генетических повреждений – генные мутации и микробрерации (Руководство ..., 1989), хромосомные и геномные нарушения и такие, природа которых неизвестна (Середенин, Дурнев, 1992), и позволяют полностью охарактеризовать частоту мутационного процесса у дрозофилы. В качестве косвенных показателей состояния генотипа изучено влияние азокрасителей на адаптивные возможности *D. melanogaster*, показателями которых служили средняя продолжительность жизни имаго и уровень плодовитости самок (Солбриг, Солбриг, 1982).

Учет частоты РСПЛ проведен по общепринятой методике с помощью тестерной линии Меллер-5 (sc^{S1} V InS w^a sc^B). В качестве негативного контроля были использованы мухи, обработанные 5% раствором глюкозы. Позитивным контролем служили дрозофилы, получавшие эталонный мутаген – 0,25% раствор нитрозометилмочевины (НММ). Учет частоты ДЛМ проводился посредством подсчета числа неразвившихся зигот у опытных вариантов по сравнению с контролем (Медведев, 1966; Тихомирова, 1990). Параллельно по количеству отложенных яиц оценивался уровень плодовитости самок.

Для исследования мутагенной активности азокрасителей были проведены предварительные эксперименты по установлению их острой токсичности (экспозиция 72 часа при добавлении в питательную среду). Результаты исследований были обработаны статистически с помощью критерия Стьюдента-Фишера с использованием соответствующего программного обеспечения.

Результаты и обсуждение

Исследование острой токсичности азокрасителей показало, что все они не токсичны для дрозофил, и их СЛ₅₀ установить не удалось. В качестве рабочей была принята максимально достижимая концентрация – 500 мг/мл.

При исследованиях, проведенных на мухах линии Canton-S, установлено, что все изученные красители на уровне максимальных концентраций в разной степени повышали частоту РСПЛ у *D. melanogaster* (рис. 1).

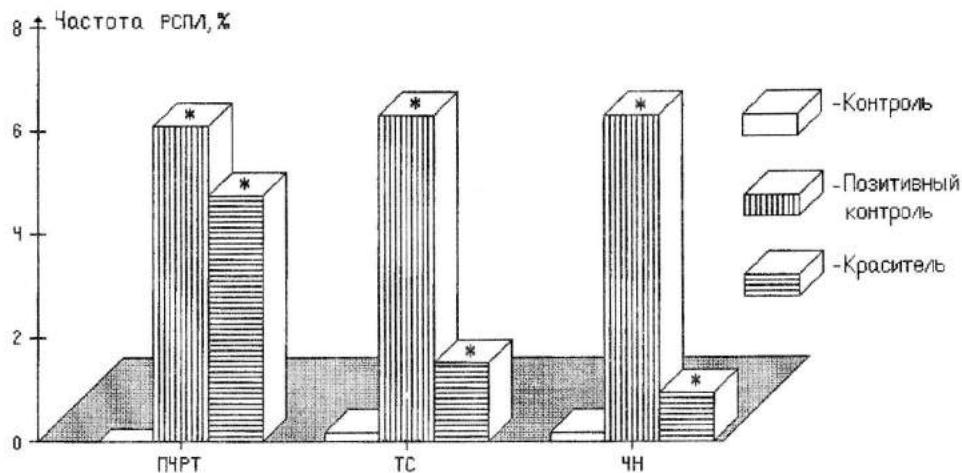


Рис. 1. Частота РСПЛ у *D. melanogaster* (линия Canton-S) при воздействии анионных азокрасителей.

При добавлении в питательную среду П4РТ частота РСПЛ у дрозофил повышалась до 4,8% при отсутствии таковых в контроле и приближалась к величине эталонного супермутагена – НММ. Мутагенный эффект красителя оценивался в 3 балла (Бочков, Чеботарев, 1989), что позволило отнести его к сильным мутагенам. ТС в тесте РСПЛ проявил себя как мутаген средней силы, частота РСПЛ в этом случае повысилась в 10 раз и составила 1,5% (2 балла). ЧН проявил слабо выраженные мутагенные свойства (1 балл), повышая выход РСПЛ по сравнению с негативным контролем в 6,7 раза.

Зависимость частоты РСПЛ от дозы агента была исследована на примере азокрасителя с наиболее выраженными мутагенными свойствами – Пунцового 4РТ. Уменьшение его концентрации до 100 мг/мл привело к снижению частоты РСПЛ до 3,8%, степень мутагенного эффекта при этом осталась прежней (3 балла). При дальнейшем снижении концентрации П4РТ до 25 мг/мл частота РСПЛ по сравнению с максимальной концентрацией уменьшилась в 4,4 раза (2 балла), и краситель проявлял свойства мутагена средней силы (табл. 1).

Таблица 1

Частота возникновения РСПЛ у *D. melanogaster* линии Canton-S при воздействии различных концентраций П4РТ

Вариант	Количество развившихся культур	Частота РСПЛ, %	Степень мутагенного эффекта, баллы
Контроль негативный	1798	0	0
Контроль позитивный	1984	6,1±1,70*	3
П4РТ 500 мг/мл	2070	4,8±1,50*	3
100 мг/мл	1849	3,8±1,40*	3
Контроль негативный	1790	0,15±0,15	0
Контроль позитивный	200	6,06±1,70*	3
П4РТ 25 мг/мл	2720	1,1±0,40*	2

Примечание. * – разница с негативным контролем достоверна

Как видно из приведенных данных, действие моноазокрасителя в тесте РСПЛ на уровне испытанных концентраций подчиняется четко выраженной дозо-эффектной зависимости.

Поскольку с увеличением количества азогрупп генетическая активность анионных азокрасителей снижается, у красителей с двумя и тремя азогруппами в молекуле подобные эффекты зарегистрировать не удалось.

В тесте ДЛМ при тестировании на линии Canton-S все исследуемые красители проявили слабую мутагенную активность: выход частоты ДЛМ при их воздействии не увеличивался более чем в 2 раза (рис. 2).

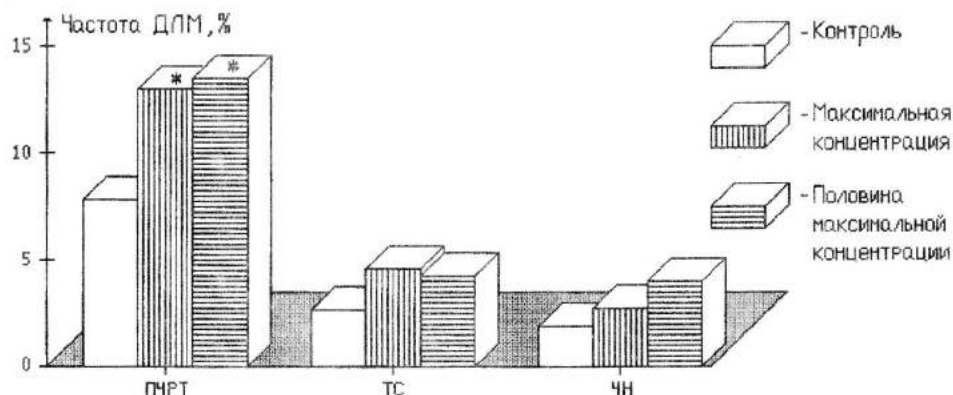


Рис. 2. Частота ДЛМ при воздействии анионных азокрасителей на имаго линии Canton-S.

Параллельно на 4 линиях *D. melanogaster* был проведен учет частоты ДЛМ при воздействии П4РТ, что позволило выявить возможный характер и особенности мутагенной активности азокрасителей (табл. 2).

Таблица 2

Выход ДЛМ у различных линий *D. melanogaster* в норме и при воздействии различных концентраций П4РТ

Концентрация, мг/мл	Canton-S	mei 9 ^{L1}	mei 9 ^a	w mus(1)104 ^{D1}
Контроль	7,9±0,66	3,9±0,4	3,7±0,9	6,1±1,6
500,0	13,0±0,81*	10,1±0,9*	15,6±1,6*	26,3±2,8*
250,0	13,5±0,66*	5,7±0,4*	13,1±1,6*	26,9±3,5*
100,0	9,1±0,58	7,5±0,5*	6,2±1,3	15,9±2,4
50,0	9,0±0,59	6,1±0,4*	5,2±1,2	13,0±1,6
25,0	12,4±1,0*	6,7±0,8*	—	—
10,0	10,7±1,0**	5,8±0,8**	—	—
5,0	11,0±1,0*	4,7±0,7	—	—
2,5	10,3±1,0**	5,0±0,8	—	—
1,0	9,7±1,0	4,3±0,7	—	—

Примечание. * — разница с контролем достоверна;

** — разница с контролем проявляется в виде тенденции.

При введении в корм различных концентраций Пунцового 4РТ частота ДЛМ у линии Canton-S в целом зависела от концентрации красителя. При этом, мутагенная активность П4РТ в наименьшей степени проявилась у *D. melanogaster* дикого типа (Canton-S). Мухи линий с нарушенной эксцизионной репарацией (mei 9^{L1} и mei 9^a) оказались более чувствительными к воздействию красителя, тогда как на линии w mus(1)104^{D1} — с нарушенной пострепликативной репарацией — проявление генетической активности азокрасителей было максимальным. Это дало основание предположить, что только небольшая часть генетических нарушений, вызываемых П4РТ, устраняется в ходе эксцизионной репарации, не успев реплицироваться; основная же их часть может восстанавливаться в процессе пострепликативной репарации.

Изменение плодовитости и продолжительности жизни *D. melanogaster* при воздействии азокрасителей отражает различную степень их адаптивных возможностей, обусловленных генотипом. При воздействии химических соединений, обладающих генетической активностью, уровень плодовитости и продолжительность жизни особей в популяции могут сильно измениться, в результате чего изменится численность популяции, а следовательно и ее шансы на выживание.

После обработки имаго моноазокрасителем П4РТ на уровне максимальной концентрации отмечалось увеличение плодовитости самок на 47% (табл. 3). С уменьшением концентрации красителя плодовитость самок несколько снижалась, однако оставалась выше, по сравнению с контролем на 28%. Диазокраситель ТС на уровне испытанных концентраций не оказывал влияния на плодовитость *D. melanogaster*, а при воздействии триазокрасителя ЧН уровень плодовитости самок *D. melanogaster* находился в прямой зависимости от его концентрации. Значительное снижение плодовитости самок при воздействии ЧН свидетельствует о том, что он может повлиять неблагоприятным образом на приспособленность генотипа дрозофил и тем самым снизить шансы популяции на выживание. Чрезмерную стимуляцию плодовитости самок при воздействии П4РТ можно рассматривать как парадоксальную реакцию, подобную той, которая наблюдается при воздействии радиации.

Таблица 3

Плодовитость самок (по числу отложенных яиц) и продолжительность жизни имаго линии Canton-S при воздействии различных азокрасителей

Краситель	Вариант, концентрация, мг/мл	Уровень плодовитости	Продолжительность жизни, сут	
			Самцы	Самки
П4РТ	Контроль	28,8±1,82	15,9±0,27	13,2±0,09
	500	41,4±4,41*	—	—
	250	37,0±2,78	5,7±0,80*	5,8±0,77*
ТС	Контроль	20,2±1,23	14,5±0,10	13,2±0,09
	500	17,0±2,05	18,2±0,17*	14,6±0,16
	250	17,6±1,55	—	—
ЧН	Контроль	25,4±1,30	14,5±0,10	13,2±0,09
	500	13,5±1,0*	15,6±0,18	16,5±0,17*
	250	18,0±1,28	—	—

Примечание. * – разница с контролем достоверна.

Продолжительность жизни самцов и самок *D. melanogaster* оценивали с момента вылета насекомых до их гибели. Результаты проведенных исследований (табл. 3) свидетельствуют о том, что все изученные азокрасители на уровне испытанных максимальных концентраций поразному влияют на продолжительность жизни самцов и самок имаго *D. melanogaster*. Наибольшей активностью среди изученных красителей обладал моноазокраситель П4РТ, при воздействии которого в максимальной концентрации продолжительность жизни имаго настолько снизилась, что полноценный анализ провести не удалось; 100% гибель имаго наблюдалась в течение первых 5 суток. При снижении концентрации красителя вдвое продолжительность жизни имаго незначительно повысилась и составила 5,7 суток (ниже в 2,8 раза по сравнению с контролем). При воздействии диазокрасителя ТС несколько увеличивалась продолжительность жизни у самцов, а при воздействии триазокрасителя ЧН – у самок. Обращает на себя внимание четко выраженная зависимость «структура–активность» при воздействии исследуемых красителей: с увеличением количества азогрупп снижается уровень плодовитости самок *D. melanogaster*.

Выводы

1. Все изученные марки анионных азокрасителей обладают мутагенной активностью, степень выраженности которой определяется структурой самого красителя: с увеличением количества азогрупп в молекуле их мутагенная активность снижается.

2. Отсутствие различий в активности анионных азокрасителей при учете частоты ДЛМ и положительные результаты в тесте РСПЛ свидетельствуют о том, что их повреждающий эффект проявляется преимущественно в виде генных мутаций и микроаббераций, которые могут устраняться в процессе пострепликативной репарации. В то же время, накапливаясь в генофонде популяции, они способны оказать неблагоприятное влияние на её генетическую устойчивость.

Сравнивая полученные данные с результатами испытаний в тесте Эймса можно заключить, что тест-система «*Drosophila*» позволила выявить большее количество генетически активных азокрасителей, чем тест-система «сальмонелла», что свидетельствует о большей чувствительности системы к воздействию красителей, а следовательно, и о большей её информативности. Исследования на *D. melanogaster* позволяют выявить не только более

широкий спектр мутаций, чем исследования на микроорганизмах, но также зарегистрировать неустойчивые состояния генотипа, которые, возникая в результате воздействия красителей, снижают адаптивные возможности популяции. Исходя из вышеизложенного можно заключить, что при скрининговых испытаниях на мутагенный эффект азокрасителей исследования на *D. melanogaster* могут считаться приоритетными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Азокраситель для кожи Прямой Черный 2С / Н. М. Василенко, Д. Н. Девейкис, И. В. Завгородний и др. // Токсикологический вестник. – 1998. – № 3. – С. 42–44.
- Анионный азокраситель для кожи Черный Н / Н. М. Василенко, Г. Л. Никулина, Д. Н. Девейкис, Л. Н. Яшина // Токсикологический вестник. – 1996. – № 4. – С. 32–33.
- Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М.: Медицина, 1989. – 229 с.
- Медведев Н. Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1966. – 238 с.
- Никуліна Г. Л. Особливості токсикодинаміки аніонних азобарвників та обґрунтування принципів їх гігієнічного нормування: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 1997. – 24 с.
- Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенич. критерии состояния окруж. среды / ВОЗ. – Женева, 1989. – 212 с.
- Середенин С. Б., Дурнев А. Д. Фармакологическая защита генома. – М.: ВИНТИ, 1992. – 62 с.
- Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. – М.: Мир, 1982. – 488 с.
- Тихомирова М. М. Генетический анализ. – Л.: ЛГУ, 1990. – 280 с.
- Штенберг А. И., Гавриленко С. В. Гонадотоксическое и эмбриотоксическое действие пищевого красителя Амаранта // Вопр. питания. – 1972. – № 2. – С. 28–33.
- Fi-Hyd and unvermed. Cymotoxiti and mutageniciti of food dyes // Toxicology. – 1990. – Vol. 189, № 4. – P. 391.
- Joachym F., Burell A., Andersen Y. Mutagenisiti of azo dyes in the Salmonella/microsome assay using in vitro activation // Mutat. Res. – 1989. – Vol. 156, № 3. – P. 131–138.

*Государственное предприятие Харьковский НИИ гигиены труда и профзаболеваний
Харьковский национальный университет.*

D. N. DEVEYKIS, Z. T. NIKOLCHENKO, V. G. SHAHBAZOV

RESEARCH INTO MUTAGENIC ACTIVITY OF A NUMBER OF ANION AZO DYES IN THE DROSOPHILA TEST SYSTEM

*State Enterprise of Kharkov Research Institute of Hygiene and Professional Diseases
Kharkov National University*

SUMMARY

For the first time the mutagenic activity of a new class of azo dyes – anion azo dyes – has been investigated in the «Drosophila» test system. The received data testify to the fact that for anion azo dyes the induction gene mutation is most typical. The increase in frequency of dominant lethal mutation was registered on a line with a reparation broken after replication. It has been established that with the increase in number of azogroups in the molecule the mutagenic activity of azo dyes is reduced. Comparing the results received earlier in the similar test by Ames we can make a conclusion about the priority of research on *Drosophila melanogaster*.