

Цитотоксическое действие биорага и аммиачной селитры на лабораторных мышей

Р. А. Гахокидзе, А. Г. Пирцхелани, Н. А. Пирцхелани,
Н. Богверадзе, Г. Д. Капанадзе

*Тбилисский Государственный Университет, Тбилиси, Грузия
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*Контактная информация: Республика Грузия 38079 г. Тбилиси, Н. Абашидзе, 31,
Тбилисский медицинский университет, тел.: (10-495-32) 42-42-11*

На лабораторных мышах изучено мутагенное и цитотоксическое действие биоактивных веществ – биорага и аммиачной селитры. Пероральное введение животным аммиачной селитры (доза $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, ЛД₅₀) вызывает достоверное повышение ($p < 0,001$) количества структурных aberrаций хромосом, геномных мутаций патологических митозов и нарушение интерфазных ядер. Биораг характеризуется выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Цитогенетический анализ клеток мышей, получающих кукурузу, выращенную на почве обработанной биорагом и аммиачной селитрой, показали, что цитогенетические нарушения не отличаются от контроля.

Ключевые слова: биораг, аммиачная селитра, митоз, хромосомы, мыши.

Деятельность человечества вызвала изменение природных ландшафтов: загрязнение рек, морей, океанов, атмосферы и почвы [2]. Быстрое развитие химической промышленности способствовало образованию огромного количества химических соединений, которые ранее в природе не встречались. Большинство этих веществ вызывают повреждение генетического аппарата живых организмов и в особенности человека, с чем впоследствии связано образование не только наследственных болезней, врожденных аномалий и злокачественных образований, но и болезней сердечно-сосудистой, нервной, пищеварительной систем и др. [1].

Исходя из вышесказанного, представляется необходимым проведение ряда мероприятий, направленных против негативного воздействия повреждающих агентов с целью защиты генетического аппарата и здоровья человека. Среди них можно выделить следующие.

1. Выявление и изъятие из использования вредных веществ или их замену неопасными аналогами.
2. Определение безопасных доз химических препаратов.
3. Выявление и использование эффективных антимутагенов, которые максимально уменьшают повреждение генетического аппарата [3].

Целью настоящего исследования являлось изучение хромосомных аномалий и патологических митозов при воздействии аммиачной селитры отдельно и на фоне биоактивных веществ – биорага.

Материалы и методы

Работа выполнена на взрослых нелинейных белых мышах. Из химических соединений было использовано азотное удобрение – аммиачная селитра. В качестве антимутагена было использовано биоактивное соединение – биораг. Исследования были проведены на 40 белых мышах весом 20–25 г в 5 сериях.

I серия – цитогенетическое изучение действия аммиачной селитры при однократном пероральном введении животным в дозе 175 мг/кг ($1/2$ ЛД₅₀) и 70 мг/кг ($1/5$ ЛД₅₀).

II серия – цитогенетическое исследование клеток костного мозга мышей при предварительном введении биорага (в течение пяти дней) с последующим однократным (на 6-й день) введением аммиачной селитры в дозе 175 мг/кг.

III серия – цитогенетическое исследование клеток костного мозга мышей при предварительном введении биорага (в течение пяти дней) с последующим однократным (на 6-й день) введением аммиачной селитры в дозе 70 мг/кг.

IV серия – цитогенетическое исследование животных, вскормленных кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой.

V серия – контроль.

Хромосомные препараты из костного мозга животных готовились по методу Форда и Воллама [8]. Изучение нарушенных интерфазных ядер проводилось по модифицированному методу А. Пирцхелани [5]. Токсичность вещества определялась по методу И. Саноцкого [6].

Все цифровые данные обработаны методом вариационной статистики Фишера, t-критерий определяли по таблице Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что аммиачная селитра характеризуется

Таблица 1

Результаты цитогенетического исследования клеток мышей при отдельном и комбинированном воздействии аммиачной селитры и биорага

Показатель	Аммиачная селитра		Аммиачная селитра + биораг	
Количество животных	5		4	
Доза, мл/кг	175 ($1/2$ ЛД ₅₀)	70 ($1/5$ ЛД ₅₀)	175+30	70+30
Количество исследованных метафаз	419	400	450	450
Структурные нарушения хромосом и геномные мутации, %±ст. ош	8,8±1,5	5,73±1,07	3,0±0,3	1,0±0,2
Патологические митозы, %±ст. ош	21,4±2,0	15,3±1,7	8,6±1,8	6,0±1,1
Число нарушений интерфазных ядер, %±ст. ош	4,5±0,18	2,6±0,29	1,5±0,2	1,1±0,3
P	<0,001		–	

выраженным мутагенным действием. В частности, число аномальных метафаз и патологических митозов при примененной дозе препарата $1/2$ от LD_{50} увеличивается до 30,2% (в контроле 3,5%). Наиболее часто наблюдаются патологические митозы, из которых характерными являются полые метафазы, К-метафазы и слипание хромосом. Из структурных нарушений хромосом наблюдаются одиночные и парные фрагменты и лизис хромосом, а из геномных мутаций характерными являются триплоидные клетки (табл. 1).

Анализ полученного нами материала также показал, что аммиачная селитра вызывает нарастание нарушения интерфазных ядер, при которых плотноконденсированный хроматин располагается в виде кольца по периферии клетки, а середина остается пустой [5].

При воздействии на животных более малыми концентрациями аммиачной селитры ($1/5$ LD_{50}) был выражен «доза-эффект». При использовании аммиачной селитры $1/5$ от LD_{50} , цитогенетический эффект по сравнению с более высокой концентрацией ($1/2$ от LD_{50}) частично уменьшается и составляет 5,73% для структурных нарушений хромосом и геномных мутаций и 15,3% – для патологических митозов.

Известно, что генетический аппарат клетки, который подвергается тяжелым нарушениям (фрагментация, лизис хромосом, К-метафаза, полая метафаза, полая интерфаза), в дальнейшем элиминируется [4], то есть имеет место цитотоксическое действие, что является показателем как мутагенного, так и общетоксического действия.

Как показали результаты исследования, введение биорага до внесения минеральных удобрений в 3 раза снижает цитогенетический эффект, вызванный аммиачной селитрой, так как число аномальных метафаз и патологических митозов при изолированном воздействии аммиачной селитры повышается до 30,12%, а в случае предварительного введения в организм биорага эти показатели снижались до 11,6% ($p < 0,001$). Данные, полученные нами, совпадают с данными других авторов, которые изучили антимутагенное действие разных витаминов и других биоактивных веществ [7, 9, 10, 11].

В последней серии исследования провели цитогенетический анализ клеток мышей, которых кормили кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой. Установлено, что в этом случае цитогенетические нарушения не отличаются от контроля (табл. 2).

Таблица 2

Цитогенетический анализ клеток мышей, вскормленных кукурузой (20 день), выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой

Показатель	Аммиачная селитра + биораг	Контроль
Количество животных	7	5
Количество исследованных метафаз	475	500
Структурные нарушения хромосом и геномные мутации, %±ст. ош	0,84	0,8±0,39
Патологические митозы, %±ст. ош	1,05	2,7±0,6
Число нарушений интерфазных ядер, %± ст. ош	0,58±0,1	0,5±0,1

Выводы

1. Аммиачная селитра характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Пероральное введение животным аммиачной селитры (доза $1/2, 1/5$ ЛД₅₀) вызывает достоверное повышение ($p < 0,001$) количества структурных нарушений хромосом (одиночные и парные фрагменты, лизис хромосом) и геномных мутаций (анеуплоидия, триплоидия), патологических митозов (полая метафаза, К-метафаза, слипание хромосом) и нарушение интерфазных ядер (полное ядро).

Список литературы

1. Александров У. К. Антимутагенез. М.: Наука, 1984.
2. Дубинин Н. П. Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978.
3. Лесявичус Р. К. Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды. Новосибирск, 1977.
4. Михайлова Г. Р., Горбунова Л. П. Цитологическое и кариологическое изучение культур клеток человека // Цитол. и генетика 1980. Т.10, №6. С. 582–584.
5. Пирцхелани А. Г., Мамаладзе Н. В. Нарушение инетрфазных ядер и хромосом как показатель общетоксического и мутагенного действия факторов среды на орагнизма. Методические рекомендации. Тбилиси, 1991.
6. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н. Значение прикладной генетики для токсикологической оценки новых веществ. / В. Кн. Токсикология. 2003. С. 17–23.

2. Биораг обладает выраженным анти-мутагенным и антицитотоксическим действием и в среднем в три раза уменьшает количество цитогенетических нарушений, вызываемых аммиачной селитрой.

3. Анализ клеток мышей, вскормленных кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой, показал, что в этом случае цитогенетические нарушения не отличаются от контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного научного гранта № GNSF/STO 6/8-065 (Грузия).

7. Durnev A .D., Sidneva E. S., Zhanataev A. K. et al. The protective action of vitamins in induced mutagenesis // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2007. Vol.7. P. 6–13.
8. Ford E., Wollam D. A. Study of the mitotic chromosomes of mise of the strong line // Esp. Call Res. 1963. Vol.32. P. 320–326.
9. Kada T. Mechanismes and Genetic Implications of Environmental Antimutagens // Environmental Mutagens and carcinogens. 1992. P. 355–359.
10. Nikitina V. A., Vrzhesinskaya O. A., Beketova N. A. et al. Effect of regular intake of vitamin-mineral complex on spontaneous and on induced clustogenesis in humans // Bull. Exp. Biol. Med. 2000. Vol.130, №9. P. 867–870.
11. Sidneva E.S., Katosova L. D., Platonova V.I.etal. Effects of vitamins supply on spontaneous and chemically induced mutagenesis in human cells // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. Vol.139, №2. P. 230–234.

Investigation of cytotoxic action of ammonium nitrate and biorag on laboratory mice

R. Gakhokidze, A. Pirtskhelani, N. Pirtskhelani, N. Bogveradze, G. Kapanadze

The present study investigates antimutagenic and anticytotoxic effects of biorag in laboratory mice. Mutation in mice was induced by ammonium nitrate, wich is characterizes by the mutagenic and cytotoxic effect. The ten-day administration of ammonium nitrate ($1/2, 1/5$ LD₅₀ dose) per or to animals induces strong increase ($p < 0,001$) of frequency of chromosomal aberrations (deletions, multiple fragments, lyses) genomic mutations (triploidy, tetraploidy), pathological mitosis (hollow metaphase, K-mitosis, chromosomal

Цитотоксическое действие биорага и аммиачной селитры на лабораторных мышей

adhesion) and destruction of interphase nucleuses (hollow nucleus). Experiments showed that biorag exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic actions. Biorag decreased the incidence of the mutagenic and cytotoxic effects of the ammonium nitrate about 3 times. Analysis of the cells of mice, eating corn grown on ground fertilized with ammonium nitrate and biorag showed that in this case cytogenetic disorders are the same as in control group.

Key words: biorag, ammonium nitrate, mitosis, chromosome, mice.