



© Е. А. Саратовских <sup>1</sup>,  
В. М. Глазер <sup>2</sup>,  
Н. Ю. Костромина <sup>2</sup>,  
С. В. Котелевцев <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка;  
<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

✿ С помощью теста Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100 изучена мутагенная активность семи пестицидов: шести гербицидов (раундап, зенкор, базагран, кузагард, лонтрел, сетоксидим) и фунгицида тачигарен, а также комплексов гербицида лонтрел ( $ML_2$ ) с восемью металлами (Cu, Co, Zn, Ni, Fe, Mn, Mo, Mg). Установлено, что мутагенные индексы изученных пестицидов коррелируют с величинами констант комплексообразования ( $K_{к/обр}$ ) этих веществ с ДНК. Комплексы лонтрела со всеми металлами проявили мутагенную активность. Генотоксичность  $NiL_2$ ,  $FeL_2$ ,  $ZnL_2$  близка к генотоксичности исходного лонтрела, у комплексов с другими металлами — в 1,5–2 раза ниже.

✿ **Ключевые слова:** пестициды, комплексы пестицидов с металлами, генотоксичность, тест Эймса

### ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ПЕСТИЦИДОВ В ТЕСТЕ ЭЙМСА И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ КОМПЛЕКСОВ С ДНК

#### ВВЕДЕНИЕ

На Конференции ООН по окружающей среде и развитию в 1992 году пестициды и тяжелые металлы были отнесены к преобладающим в природе загрязняющим веществам (**ЗВ**) [4,7]. Поэтому исследования их токсичности и отдаленных последствий действия крайне важны. Имеется достаточное количество фактов, подтверждающих реальность генетической опасности накопления пестицидов в почве, воде и атмосфере [23, 26, 28]. В ряде работ показана генотоксичность пестицидов в отношении человека [5, 8, 22, 31]. Так у растений, обработанных базаграном обнаруживается большое количество хромосомных нарушений, проявляющихся на разных стадиях мейотического деления [32]. Другой гербицид — раундап, индуцирует образование анафазных мостов и большое число митотических дефектов в клетках корневой меристемы *Vicia faba* [30], а также реверсии к прототрофности у *Salmonella typhimurium*, обнаруживаемые в тесте Эймса [27]. Зенкор в концентрациях 0,01 и 0,05 % вызывает хромосомные нарушения у *Crepis capillaris*. Спектр хромосомных aberrаций представлен хроматидными и изохроматидными делециями и микрофрагментами [2].

Актуальность исследования мутагенных свойств пестицидов обусловлена тем, что большинство мутагенных соединений проявляют канцерогенный эффект и представляют опасность для здоровья человека [3, 20]. Однако из-за огромного разнообразия используемых в сельском хозяйстве пестицидов имеющихся в литературе сведений о генотоксичности химических средств защиты растений недостаточно. С другой стороны, ранее нами было показано, что в растворах пестициды легко образуют комплексные соединения с металлами [33, 40]. Таким образом, в водных объектах окружающей среды, содержащих пестициды и металлы, возникают новые ЗВ — комплексы пестицидов с металлами, характеризующиеся как высокой устойчивостью [36, 38, 39], так и более высокой токсичностью по отношению к растениям [16], почвенным организмам [14] и гидробионтам [15], в сравнении с исходными пестицидами.

Одна из характерных черт мутагенных и канцерогенных веществ — способность проявлять биологическую активность даже при очень низких концентрациях. Это затрудняет их аналитическое определение в биологических тканях. При этом с помощью химических методов и анализа структуры вещества можно только прогнозировать какие вещества проявят канцерогенное и мутагенное действие [1]. По этой причине для анализа канцерогенности и мутагенности различных соединений все шире применяются биологические тесты. В последнее время появилось значительное количество работ, в которых результаты изучения токсичности и генотоксичности пестицидов используются и для анализа последствий их воздействия на окружающую среду [12, 23]. Для анализа генотоксичнос-

ти ЗВ разработано более 100 тест-систем, выявляющих различные нарушения генетического материала. Для выявления способности химических соединений индуцировать генные мутации обычно используют тест-систему Эймса *Salmonella*/микросомы. Основными достоинствами этого метода являются простота и быстрота выполнения, высокая чувствительность, возможность дифференцировать оба типа генных мутаций (замена оснований и сдвиг рамки считывания генетического кода) благодаря использованию различных индикаторных штаммов *S. typhimurium*, высокая (порядка 90 %) корреляция между мутагенной и канцерогенной активностями ЗВ. Бактерии как тест-объекты имеют существенный недостаток, заключающийся в отсутствии у них характерной для многоклеточных организмов системы монооксигеназного окисления, которое протекает в эндоплазматическом ретикулуме. Эти мембранные структуры выделяются из гомогенатов клеток в виде микросом (фракция S9), поэтому процесс получил название микросомного окисления. Вышеназванный недостаток удалось превратить в преимущество путем введения в тест-систему компонента, содержащего микросомы из печени крыс и кофакторы микросомного окисления, что обеспечивает метаболическую активацию ЗВ *in vitro*. Пробы без метаболической активации позволяют выявить прямую мутагенную активность, пробы с активацией — промутагенную активность. Указанные достоинства обеспечили тесту Эймса применение в качестве основного метода первичного скрининга химических веществ на генотоксичность.

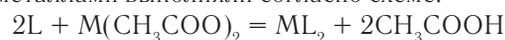
Для исследования физико-химических свойств нуклеиновых кислот используют спектрофлуоресцентный метод анализа [13]. Энергия собственной флуоресценции оснований ДНК чрезвычайно слаба. Так квантовый выход флуоресценции ДНК в растворе при нейтральном pH и 25 °C ( $\lambda_{\text{возб}} = 250 \text{ нм}$ ) составляет порядка  $2 \times 10^{-5}$  [21]. Для решения этой задачи используют ДНК, модифицированную дибромэтилацетатом, то есть вводят этено-группы (-C=C-) в состав аденинового и цитозинового остатков ( $\epsilon$ -А и  $\epsilon$ -Ц). Введение в гетероцикл оснований этено-групп повышает величину энергии флуоресценции на несколько порядков [11]. При этом конформационных изменений гетероциклов не наблюдается. Этенпроизводные моно-, ди- и полинуклеотидов оказались удобной моделью для изучения мишеней связывания пестицидов в реакциях *in vitro*. В наших предыдущих работах изучено действие пестицидов (зенкор, лонтрел, кузагард, раундап, сетоксидим, тачигарен, тилт, базагран) и комплексов гербицида лонтрел с металлами (медь, кобальт, никель, марганец, цинк, магний, молибден, железо) [37], а также хлорсодержащих фенолов [17] на этено-адениновые основания ДНК и РНК. Установлено, что пестициды и их комплексы с различными

металлами вступают в химическое взаимодействие с адениновыми гетероциклами ДНК и РНК. При этом происходит образование устойчивых комплексов ЗВ с нуклеиновой кислотой. Представляет интерес выявить связь генотоксичности ЗВ с их способностью к образованию комплексов с адениновыми остатками, входящими в состав ДНК. Такие данные могут быть полезны в изучении отдаленных последствий применения различных ЗВ техногенного происхождения, а также для первичного скрининга их действия на генетический аппарат.

Задачей настоящей работы являлась оценка генотоксичности семи пестицидов (раундапа, зенкора, базагран, тачигарена, кузагарда, лонтрела, сетоксидима), относящихся к разным классам химических соединений, и восьми комплексов гербицида лонтрел с металлами: Cu, Co, Zn, Ni, Fe, Mo, Mn, Mg с помощью теста Эймса. Другой задачей работы был анализ полученных результатов с целью оценки корреляции генотоксичности указанных соединений с величинами констант их комплексообразования ( $K_{\text{к/обр}}$ ) с остатками ДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Названия и химические формулы использованных пестицидов и комплексов металлов приведены в таблице 1. Выделение действующих веществ из коммерческих препаратов и их очистку проводили по методу, разработанному ранее [34]. Действующим веществом гербицида лонтрел является 3,6-дихлорпиколиновая кислота (3,6-ДХПК = L). Синтез комплексов лонтрела с металлами выполняли согласно схеме:



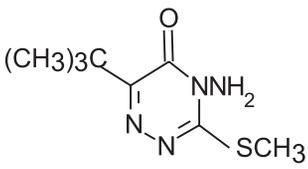
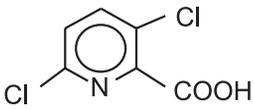
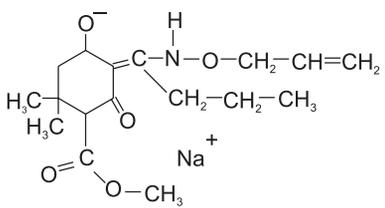
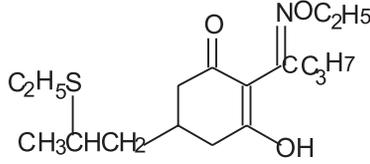
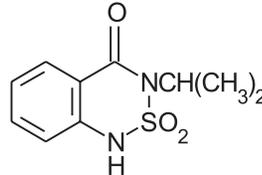
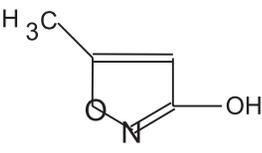
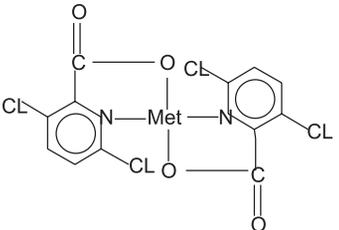
Методика синтеза описана в работах [33, 40].

Модификацию ДНК для получения этенпроизводных аденина и цитозина, осуществляли дибромэтилацетатом согласно Личиной М. В. [9, 10] на основе коммерческих препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из селезенки крупного рогатого скота. Степень модификации аденина и цитозина в составе  $\epsilon$ -РНК и  $\epsilon$ -ДНК составляла порядка 90 и 100 %, соответственно, для каждого из них. Спектры флуоресценции  $\epsilon$ -РНК и  $\epsilon$ -ДНК в присутствии испытуемых веществ регистрировали на спектрофлуориметре (Aminco-Bowman, США). Обработку результатов тушения флуоресценции и расчет констант комплексообразования ( $K_{\text{к/обр}}$ ) пестицидов с  $\epsilon$ -ДНК и  $\epsilon$ -РНК производили на основании математической модели процесса комплексообразования, предложенной Саратовских Е. А. и соавт. [34, 37]. Брутто-константа  $K_{\text{к/обр}}$  для ДНК и РНК должна быть намного выше, так как расчет произведен на один остаток аденина.

Мутагенность исследуемых соединений определяли с помощью модифицированного полуколичественного теста Эймса *Salmonella*/микросомы с системой метаболической активации на основе микросомной фрак-

Таблица 1

## Названия используемых в работе веществ

Коммерческое название	Номенклатурное название	Формула
Зенкор Sencor, Metribuzin	4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазинон-5	
Лонтрел Lontrel, Clopyralid	3,6-дихлорпикалиновая кислота	
Кузагард Alloxydim sodium	аллоксидим натрия	
Раундап Glyphosate, Roundup, Rodeo	N-фосфометилглицин	$(\text{OH})_2\text{POCH}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$
Сетоксидим Sethoxydim	2-[1-(этоксимино)бутил]-5-[2-(этилтио)пропил]-3-гидрокси-2-циклогексен-1-один	
Базаран Bentazon	3-изопропилбензо-2,1,3-тиадазинон-4-диоксид-2,2	
Тачигарен Нутехазол	3-гидрокси-5-метил-изоксазол	
Металлокомплексы гербицида лонтрел	бис-(3,6-дихлорпиколинато) «металл» (II)	

ции S9 из печени крыс, индуцированных «Саволом-54» (смесь полихлорированных бифенилов). В качестве индикаторных использовали штаммы *S. typhimurium* TA98 и TA100. Штамм TA98 регистрирует мутации типа сдвига рамки считывания, TA100 — типа замены оснований [19, 24, 25, 29]. О мутагенности судили по частоте реверсий к прототрофности по гистидину (His<sup>+</sup>), выявляемых на чашках с минимальной средой. В пробах без метаболической активации (МА-) оценивали прямой мутагенный эффект исследуемого вещества, в пробах с метаболической активацией (МА+) выявляли мутагенность продуктов метаболизма ЗВ (промутагенный эффект). Исследуемые соединения растворяли в ДМСО. В каждую пробу вносили по 2 мкмоль испытуемого вещества, растворенного в 100 мкл ДМСО. В качестве положительных контролей использовали прямые мутагены 2-нитрофлуорен (10 мкг на пробу) для TA98 и NaN (10 мкг на пробу) — для TA100. Промутаген 2-аминоантрацен (0,5 мкг на пробу) служил контролем активности системы метаболической активации на обоих штаммах. Общий контроль (0,1 мл ДМСО) испытывали на обоих штаммах в пяти повторностях, остальные пробы ставили в трех повторностях. Результаты выражали в виде мутагенного индекса (МИ): отношение числа колоний ревертантов His<sup>+</sup> в опыте (среднее количество колоний на чашку в присутствии испытуемого вещества) к контролю (среднее количество колоний на чашках с ДМСО). За наличие мутагенного эффекта принимали МИ, равный 2,0 и более для штамма TA98 и 1,8 и более для штамма TA100. Величины МИ от 2 (1,8) до 10 расценивали как слабый, от 10 до 100 — как средний мутагенный эффект [6]. Достоверность результатов рассчитывали с помощью критерия Стьюдента по программе «Статистика», при этом достоверность превышения отклонений над контролем в 1,8 раза, как правило, соответствовала вероятности  $p < 0,001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения генотоксичности пестицидов приведены в таблице 2. На штамме TA100 кузагард проявил слабую прямую мутагенную активность. Остальные пестициды имеют более низкие МИ, равные 1,1–1,5, что расценивается как отсутствие прямой мутагенной активности. МИ метаболитов исследуемых соединений (МА+) не превышают 1,6. В целом можно заключить, что все изученные пестициды, кроме кузагарда, не оказывают мутагенного действия в отношении мутаций типа замены оснований (штамм TA100).

Все пестициды на штамме TA98 проявили либо прямую, либо промутагенную активность. Что касается прямой активности, то самым мутагенным из пестицидов оказался зенкор. Он показал средний прямой мутагенный эффект (МА-) со значением МИ = 25,2. Лонтрел, кузагард и базагран также обнаружили слабые прямые мутагенные эффекты, с величинами МИ, равными или незначительно превышающими 2,0. Раундап, сетоксидим и тачигарен не проявили прямой мутагенной активности. По величине МИ, определенного в опыте по выявлению прямой мутагенной активности, рассмотренные пестициды можно расположить в следующий ряд: зенкор > базагран ~ лонтрел ~ кузагард > раундап > тачигарен > сетоксидим (последние три не проявили мутагенной активности).

Как видно из таблицы 2, пестициды активно метаболизируются монооксигеназной системой печени крыс. Так в результате метаболической активации мутагенный эффект, проявляемый зенкором в прямом опыте, значительно снизился. Это говорит о том, что метаболиты зенкора являются менее генотоксичными соединениями, чем исходный пестицид. Напротив, метаболиты лонтрела и кузагарда проявили мутагенные активности, заметные по сравнению с их прямыми активностями.

Таблица 2

## Величины мутагенного индекса (МИ) пестицидов и их констант комплексообразования с нуклеотидами

	штамм TA98		штамм TA100		$K_{\kappa/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-АТФ [34]	$K_{\kappa/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-НАДН [37]	$K_{\kappa/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ 1 ε-ДНК [37]	$K_{\kappa/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-РНК [37]	$K_i 10^{-4}, M^{-1}$ по НАДН, тип инг. [35]	$K_i 10^{-4}, M^{-1}$ по НТ, тип инг. [35]
	МА+	МА-	МА+	МА-						
контроль	1	1	1	1						
1. зенкор	3,2	25,2	1,1	1,3	$26,5 \pm 3,3$	$22 \pm 2$	$7,0 \pm 0,7$	$10,8 \pm 1,3$	0,25 – к	8,94 – б
2. лонтрел	5,5	2,0	0,4	1,1	$15,9 \pm 2,0$	$11,7 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	1,0 – к	7,42 – б
3. кузагард	5,3	2,0	1,6	1,8	$9,7 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,47 \pm 0,05$	14,0 – к	158,9 – к
4. раундап	5,3	1,8	1,7	1,1	$8,2 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,4$	$0,54 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,05$	22,0 – н	42,9 – б
5. сетоксидим	3,0	0,9	0,7	0,9	$5,0 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$0,36 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,1$	397,5 – н	8,04 – к
6. базагран	2,3	2,2	1,5	1,5	$4,7 \pm 0,4$	–	–	–	12,8 – б	8,4 – б
7. тачигарен	2,0	1,5	1,4	1,5	$1,1 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,4$	$0,12 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,07$	21,0 – к	4,55 – к

Примечание. Тип ингибирования (инг.) фермента: к — конкурентный; н — неконкурентный; б — бесконкурентный. НТ — неотетразолий хлористый.

В результате метаболической активации их МИ возрастает в 2,6–2,8 раза. Мутагенная активность метаболитов базагран практически не отличалась от таковой в пробах МА-. Генотоксичность раундапа, сетоксидима и тачигарена выявилась только после метаболической активации, то есть эти соединения оказались промутагенами. При этом МИ сетоксидима возрастает более чем в 3 раза. Таким образом, все рассмотренные пестициды вызывают у штамма TA98 мутации типа сдвига рамки считывания. В целом величина МИ для штамма TA98 изменяется в ряду: зенкор > лонтрел > кузагард > раундап > сетоксидим > базагран > тачигарен.

Данные по определению генотоксичности комплексов гербицида лонтрел с металлами представлены в таблице 3. Комплексы не проявили мутагенной активности на штамме TA 100. Только для комплекса  $MgL_2$  показан слабый промутагенный эффект.

На штамме TA98 все изученные комплексы металлов с лонтрелом (табл. 3) проявили прямую или промутагенную активность. Максимальная прямая мутагенная активность выявлена у  $MoL_2$  (МИ = 5,2), что характеризуется как слабый мутагенный эффект. За  $MoL_2$  по степени убывания МИ следуют комплексы  $NiL_2 > MgL_2 > FeL_2 > (L) > MnL_2$ , все они проявили слабую прямую мутагенную активность. Комплексы  $CoL_2$ ,  $ZnL_2$  и  $CuL_2$  (МИ = 1,8; 1,7 и 1,6, соответственно) следует охарактеризовать как не обнаружившие прямой мутагенной активности.

После метаболической активации все металлокомплексы гербицида лонтрел проявили генотоксичность с МИ менее 10, но значения мутагенных индексов претерпели различные изменения по сравнению с пробами без метаболической активации. Мутагенная активность метаболитов  $MoL_2$  и  $MgL_2$  снизилась, в то время как у

других комплексов ( $FeL_2$ ,  $NiL_2$  и  $MnL_2$ ), наоборот, возросла. Комплексы  $CoL_2$ ,  $ZnL_2$  и  $CuL_2$  обнаружили только промутагенный эффект. По промутагенной активности изученные металлокомплексы можно выстроить в следующий ряд:  $(L) > NiL_2 > ZnL_2 \sim FeL_2 > MoL_2 \sim CuL_2 \sim CoL_2 > MnL_2 \sim MgL_2$ .

Комплексы  $MnL_2$  и  $MgL_2$  с наиболее низкими МИ, также обладающие более низкими, чем лонтрел константами комплексообразования ( $K_{к/обр}$ ) с нуклеотидами, в частности с АТФ (табл. 2, 3), демонстрировали более низкую активность в отношении ингибирования прорастания злаковых и двудольных растений [16]. В меньшей степени чем исходный лонтрел эти комплексы снижали численность взрослых особей, количество яиц в кладках и скорость увеличения численности популяции у почвенных коллембол *Xenylla grisea* и *Folsomia candida* [14], а также рост клеток инфузории *Tetrahymena pyriformis* [15]. Комплексы с Cu, Co, Ni, Mo, Fe, наоборот, повышали указанные токсические эффекты исходного лонтрела.

Как показано нами ранее в работе [37], пестициды и комплексы лонтрела с металлами непосредственно взаимодействуют с ДНК и РНК, образуют с ними аддукты за счет взаимодействия с аденином. Строение комплекса ЗВ (на примере лонтрела) с нуклеотидами, по данным Саратовских Е. А. и соавт. [34], приведено на рисунке 1. Взаимодействия такого рода приводят к разнообразным повреждениям ДНК: одно- и двунитевые разрывы, модификация азотистых оснований, интеркаляция ЗВ между основаниями, утрата пуриновых оснований и т. д. Прочность комплексов характеризуется константой комплексообразования ( $K_{к/обр}$ ), вычисляемой в рамках созданной нами математической модели процесса [34, 37]. Поэтому установленные величины

Таблица 3

**Величины мутагенного индекса металлокомплексов гербицида лонтрел для *Salmonella typhimurium* и их констант комплексообразования с нуклеотидами**

	штамм TA98		штамм TA100		$K_{к/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-АТФ [35]	$K_{к/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-НАДН [38]	$K_{к/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ 1 ε-ДНК [38]	$K_{к/обр} 10^{-3}, M^{-1}$ ε-РНК [38]	$K_i 10^{-4}, M^{-1}$ по НАДН, тип инг. [36]	$K_i 10^{-4}, M^{-1}$ по НТ, тип инг. [36]
	мутагенный индекс									
	МА+	МА-	МА+	МА-						
контроль	1	1	1	1						
1. $MoL_2$	3,3	5,2	1,4	1,5	$3,6 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,5$	0,13 – к	0,41 – к
2. $FeL_2$	4,2	2,8	1,5	1,1	$8,8 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$	1,13 – к	11,67 – н
3. $CoL_2$	3,0	1,8	1,4	1,1	$600,0 \pm 200$	$3,1 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$	13,73 – н	13,05 – см
4. $NiL_2$	5,2	4,3	1,2	1,4	$21,6 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,2$	12,36 – н	11,76 – н
5. $CuL_2$	3,1	1,6	1,4	1,2	$851,4 \pm 82$	$4,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,3$	0,06 – к	4,01 – н
6. $MnL_2$	2,5	2,0	0,8	1,2	$2,2 \pm 0,1$	–	–	–	3,80 – к	22,28 – см
7. $ZnL_2$	4,3	1,7	1,5	1,23	$1,6 \pm 0,06$	–	–	–	10,19 – н	2,46 – см
8. $MgL_2$	2,3	3,8	1,8	1,3	$0,8 \pm 0,02$	–	–	–	12,67 – н	3,55 – к

Примечание. Тип ингибирования (инг.) фермента: к — конкурентный; н — неконкурентный; б — бесконкурентный; см — смешанный. НТ — неотетразолий хлористый.

МИ мы сравнили с величинами  $K_{к/обр}$  исследованных пестицидов, приведенными в таблице 2. В изменении величин МИ изученных веществ прослеживается корреляция с последовательностью уменьшения их констант комплексообразования с ДНК и РНК. На рисунке 2 (кривая 1) представлен график изменения МИ от  $K_{к/обр}$  с ДНК (РНК), демонстрирующий линейную зависимость. Поскольку изменение  $K_{к/обр}$  пестицидов с РНК происходит симбатно с изменением  $K_{к/обр}$  этих же соединений с ДНК, то и зависимость изменения МИ от  $K_{к/обр}$  с РНК будет иметь такой же вид.

Приведенные в таблице 3 значения  $K_{к/обр}$  металлокомплексов лонтрела с ДНК, изменяются в последовательности:  $MoL_2 > FeL_2 \sim CoL_2 \geq NiL_2 > CuL_2$ . Максимальное значение имеет комплекс  $MoL_2$ , а минимальное —  $CuL_2$ . У комплексов лонтрела с Fe, Co, Ni — величины  $K_{к/обр}$  с ДНК близки между собой, что естественно для соединений одного лиганда и переходных металлов одного периода. Такая же закономерность наблюдается в изменении МИ: у  $MoL_2$  (МА-) он максимален, а у  $CuL_2$  — минимален. Мутагенные эффекты, проявляемые метаболитами, сближаются (в пределах ошибки эксперимента).

Как уже было отмечено, у млекопитающих и других высших организмов конечный мутагенный и канцерогенный эффекты, проявляемые ЗВ, определяются совокупностью целого ряда факторов, прежде всего метаболической активностью монооксигеназ — ферментных систем, осуществляющих микросомное окисление [29]. Функционирование этой группы ферментов осуществляется в присутствии восстановленных динуклеотидов НАДФН или НАДН, участвующих в переносе электронов и протонов (водорода) к окисляющимся субстратам. В присутствии восстановленных динуклеотидов окисляется множество разнообразных субстратов, а высокая субстратная специфичность обусловлена множественностью изоформ монооксигеназ [18].

Полученные результаты мы сравнили с имеющимися у нас данными [35] по ингибированию НАДН-ОР, одного из ферментов монооксигеназной системы. В таблице 2 приведены значения констант ингибирования ( $K_i$ ) по донору НАДН и акцептору (неотетразолий хлористый) электронов. Поскольку коферментом в данной системе является НАДН, здесь же представлены данные по комплексообразованию с НАДН, по работе [37]. Видно, что наблюдается корреляция изменения величины МИ пестицидов и их  $K_{к/обр}$  с НАДН. На рисунке 2 (кривая 2) продемонстрирована полная идентичность этих изменений:  $K_{к/обр}$   $\epsilon$ -НАДН от  $K_{к/обр}$  с  $\epsilon$ -ДНК и МИ от величины  $K_{к/обр}$  пестицида с  $\epsilon$ -ДНК. Обе зависимости прямолинейные, имеющие одинаковый угол наклона. Кривая 3 характеризует изменение константы ингибирования ( $1/K_i$ ) НАДН-ОР по НАДН. Несмотря на то, что угол наклона в данном случае существенно меньше, чем на кривых 1 и 2, тенденция сохраняется: увеличение МИ происходит симбатно с нарастанием прочности комплекса фермент-ингибитор. В сравнении использованы только те вещества, которые конкурентно ингибируют НАДН-ОР.

$K_{к/обр}$  металлокомплексов гербицида лонтрел с  $\epsilon$ -НАДН весьма близки между собой и так же, как их  $K_i$  НАДН-ОР по НАДН не выявляют четких корреляционных зависимостей с величинами МИ. Это можно объяснить тем, что Mo, Fe, Co, Ni, Cu являются металлами с высокой координационной способностью, которую они могут проявить в условиях *in vivo*.

Поскольку, ингибирование ферментативной активности происходит за счет встраивания пестицида в место присоединения НАДН к ферменту, то есть такими ЗВ, которые являются донорами электронов, то можно предположить, что вещества, обладающие электронодонорными свойствами, будут обладать высокой мутагенной активностью. Вероятно, что чем выше электронодонорная способность ЗВ, тем выше его мутагенный

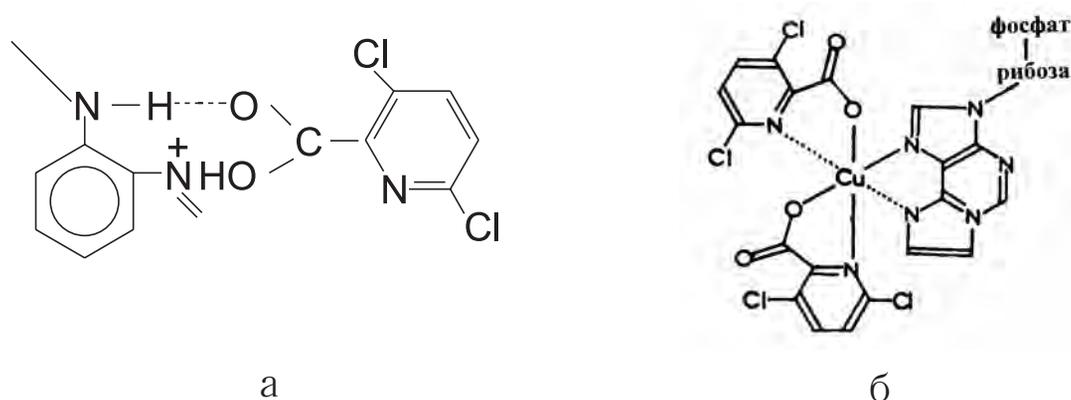
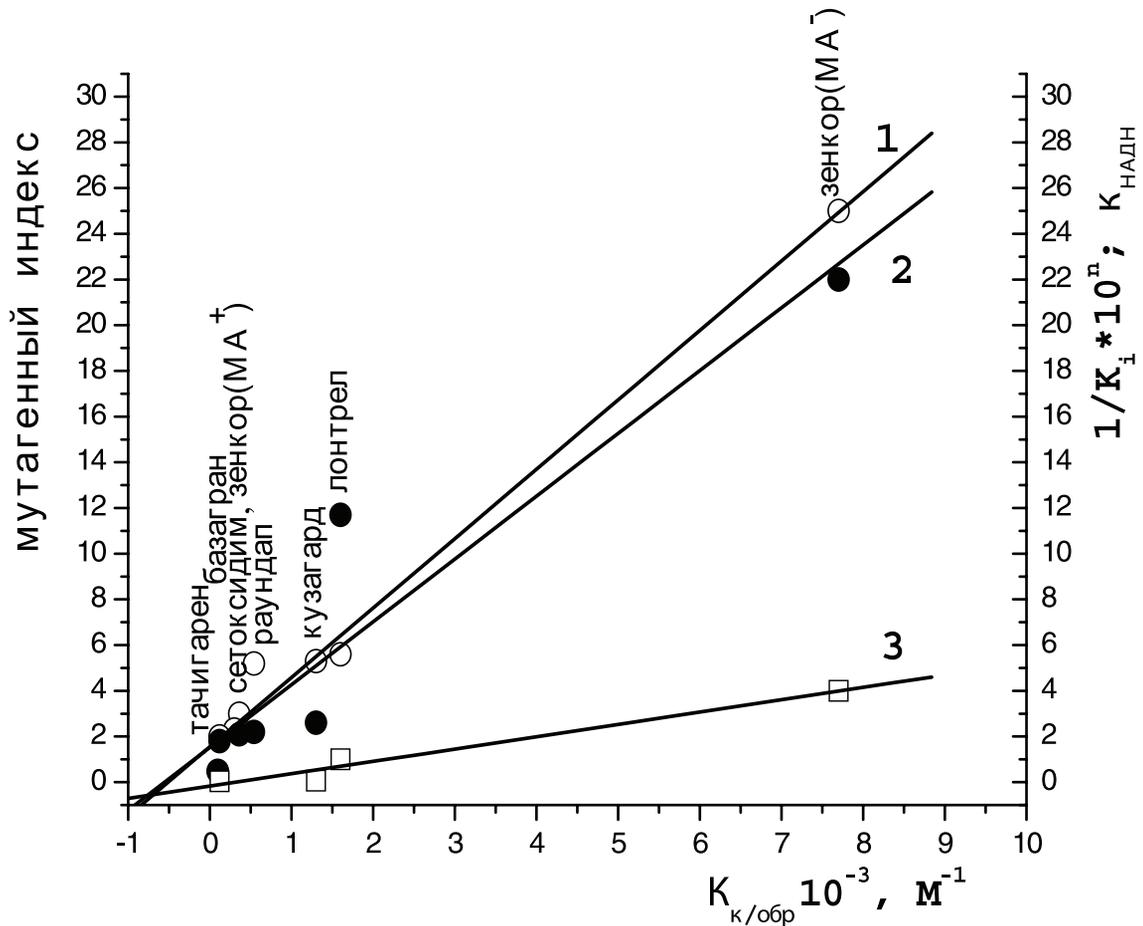


Рис. 1. Строение комплекса гербицида лонтрел (3,6-ДХПК = L) с нуклеотидами по данным работы [34]:

а. комплекс лонтрела с адениновым остатком;

б. тройной комплекс  $\epsilon$ -АТФ с металлокомплексами лонтрела: [ $\epsilon$ -АТФ- $Cu(L)_2$ ]



**Рис. 2.** Зависимость мутагенного индекса пестицидов от их констант комплексообразования с ДНК (1). Изменения констант комплексообразования пестицидов с НАДН (2) и констант ингибирования НАДН-ОР ( $K_i$ ) пестицидами (3) от констант комплексообразования этих пестицидов с ДНК.

Кривая 1 —  $\circ$ , экспериментальные точки: зенкор, лонтрел, кузагард, раундап, сетоксидим, базагран.

Кривая 2 —  $\bullet$ , по оси  $y = K_{к/обр} \times 10^{-1}, M^{-1}$  с НАДН, по работе [37].

Кривая 3 —  $\square$ , по оси  $y = 1/K_i \times 10^{-4}, M^{-1}$  по работе [35]

индекс. Выявленная корреляция МИ с комплексообразованием отражает химические свойства пестицидов и их металлокомплексов, их электронно-донорную природу, способность к образованию ковалентных (или координационных) связей, то есть возникновению стойких химических соединений (или комплексов) за счет собственных электронов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экологическая безопасность пестицидов, используемых в современном сельском хозяйстве должна быть главным приоритетом науки и практики. Тем не менее опасность для окружающей среды этих соединений общеизвестна. Однако мутагенным и канцерогенным свойствам этих соединений уделяется недостаточно внимания. В этой работе нам удалось показать, что ряд широко используемых пестицидов проявляют мутагенный

эффект в тесте Эймса. Кроме этого, комплексы этих соединений с металлами также могут проявлять мутагенный эффект. Подобные комплексы могут легко образовываться на территориях, подвергавшихся различного рода антропогенным воздействиям. В этой работе проведено исследование мутагенного действия пестицидов и их комплексов с металлами и проведен анализ корреляции взаимодействия этих соединений с ДНК *in vitro* с мутагенным действием этих соединений в тесте Эймса.

Дополнительно в данном исследовании проведен анализ корреляции взаимодействия пестицидов и их металлокомплексов с ДНК *in vitro* с мутагенным действием этих соединений в тесте Эймса. Установлено, что мутагенное действие исследованных пестицидов коррелирует с их способностью образовывать устойчивые комплексы с ДНК. Комплексы  $MoL_2$ ,  $NiL_2$ ,  $MgL_2$ ,  $FeL_2$  проявляют более высокую прямую мутагенную активность, чем исходный лонтрел.

Изучение мутагенных и канцерогенных свойств пестицидов и их возможных конъюгатов с другими неорганическими и органическими загрязнителями окружающей среды остается актуальной проблемой, так как широкое применение генетически опасных веществ представляет реальную угрозу не только для экосистем, но и непосредственно для человека.

## Литература

1. *Абилев С. К.* Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластогенных свойств химических соединений / *Абилев С. К., Порошенко Г. Г.* // Итоги науки и техники. Сер.: Токсикология. М.: ВИНТИ. — 1986. — Т. 14. — 171 с.
2. *Азатян Р. А.* Цитогенетический эффект гербицидов зенкора, базаграна и дифенамида / *Азатян Р. А., Авакян В. А., Мирзоян Г. И.* // Цитология и генетика. — 1984. — № 6. — С. 460–462.
3. *Бреслер С. Е.* Введение в молекулярную биологию: пер. с англ. / *Бреслер С. Е.*; пер. англ. Р. Татарская; ред. А. Н. Белозерский. — М.-Л.: Наука, 1996. — с. 513.
4. *Данилов-Данильян В. И.* Экологический вызов и устойчивое развитие / *Данилов-Данильян В. И., Лосев К. С.* // М.: Прогресс-Традиция, 2000. — 416 с.
5. *Дубинин Н. П.* Мутагены среды и наследственность человека // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. — М.: Наука, 1977. — С. 3–20.
6. *Дуган А. М.* Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса / *Дуган А. М., Журков В. С., Абилев С. К.* // Цитология и генетика. — 1990. — Т. 24, № 6, — С. 41–45.
7. *Коптюг В. А.* Конференция ООН по окружающей среде и развитию (Рио-де-Жанейро, июнь 1992 г.). Информ. обзор / *Коптюг В. А.* // Новосибирск. СО РАН, 1992. — 62 с.
8. *Куриный А. И.* К проблеме предупреждения генетических последствий применения пестицидов: реальность и необходимость / *Куриный А. И.* // Цитология и генетика. — 1983. — Вып. 17. — № 6. — С. 16–21.
9. *Личина М. В.* Модификация ДНК дибромэтилацетатом. I. Взаимодействие со свободными основаниями и с основаниями, доступными для реакции в составе молекулы ДНК / *Личина М. В., Шугалий А. В., Гвоздев Р. И., Тодоров И. Н.* // Биоорганич. химия. — 1979. — Т. 5, № 5. — С. 664–670.
10. *Личина М. В.* Модификация ДНК дибромэтилацетатом: о возможностях использования при анализе особенностей структуры / *Личина М. В., Шугалий А. В., Черный Д. И., Тодоров И. Н.* // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 243, № 2. — С. 516–519.
11. *Органическая химия нуклеиновых кислот / Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д.* [и др.]; Ред. Н. К. Кочетков и Э. И. Будовский. — М.: Химия, 1970. — 720 с.
12. *Попов А. В.* Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) / *Попов А. В., Коничев А. С., Цветков И. Л.* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 5. — С. 518–523.
13. *Практическая химия белка: пер. с англ. / Пер. с англ. Н. Алдановой; ред. А. Дарбре.* — М.: Мир, 1989. — 623 с.
14. *Саратовских Е. А.* Влияние гербицидов на популяцию почвообитающих коллембол / *Саратовских Е. А., Бокова А. И.* // Токсикологический вестник. — 2007. — № 5. — С. 17–23.
15. *Саратовских Е. А.* Корреляционная зависимость между токсическими свойствами загрязняющих веществ и их константами комплексообразования с АТФ. II. Комплексы металлов с гербицидом лонтрел / *Саратовских Е. А., Козлова Н. Б., Байкова И. С., Штамм Е. В.* // Хим. физика. — 2007. — В печати.
16. *Саратовских Е. А.* Влияние некоторых пестицидов на двудольные и злаковые культуры / *Саратовских Е. А., Папина Р. И., Карцев В. Г.* // Сельскохозяйственная биология. Сер.: Биология растений. — 1990. — № 5. — С. 152–159.
17. *Саратовских Е. А.* Влияние хлорсодержащих фенолов на стабильность ДНК / *Саратовских Е. А., Штамм Е. В.* // Хим. физика. — 2007. — Т. 26, № 7. — С. 77–83.
18. *Сорвачев К. Ф.* Биологическая химия / *Сорвачев К. Ф.* // М.: Просвещение, 1970. — с. 142.
19. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (Методическое указание) / *Фонштейн Л. М., Калинина Л. М., Полухина Г. Н.* [и др.] // М.: Изд. МГУ, 1977. — 36 с.
20. *Уотсон Дж.* Рекомбинантные ДНК: пер. с англ. / *Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.*; пер. англ. Е. Кунина; ред. А. А. Баев // М.: Мир, 1986. — 288 с. [Watson J. D., Tooze J., Kurtz D. T. Recombinant DNA. A short course. New York.: Scientific American books distributed by W. H. Freeman and Company, 1983.]
21. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот: пер. с англ. / Пер. англ. К. Е. Кругляковой; ред. Н. М. Эмануэль. — М.: Мир, 1976. — 314 с.
22. *Чепинога О. П.* Пестициды, исследование на наличие бластомогенных, мутагенных, эмбриотоксических, гонадотоксических свойств и полученные результаты / *Чепинога О. П.* // Гигиена применения, токсикология пестицидов и клиника отравлений. — Киев: ВНИИГИНТОКС, 1970. — С. 30–39.
23. A comparative study of bioassays based on enzyme biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

- exposed to heavy metals and organic pesticides / Guven K., Togrul S., Uyar F. [et al.] // Enzyme Microbiol. Technol. — 2003. — Vol. 32. — P. 658–664.
24. Ames B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria // in: Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection (A. Hollaender, Ed.) / N. Y., Plenum Press. — 1971. — Vol. 1. — P. 267–282.
  25. Ames B. N. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens / Ames B. N., Lee F. D., Durston W. E. // Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1973. — Vol. 70. — P. 782–786.
  26. Christoffers M. J. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat / Christoffers M. J., Berg M. L., Messersmith C G. // Genome. — 2002. — Vol. 45, N 6. — P. 1049–1056.
  27. Gopalan H. N. B. Mutagenicity testing of pesticides: III. *Drosophila*: recessive sexlinked lethals / Gopalan H. N. B., Niagi G. D. E. // Genetick. ticks (USA). — 1981. — Vol. 97, N 1. — P. 44–50.
  28. Grant W. F. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. "Genet. Toxicol.: Agr. Perspect. Proc. Symp., Davis, Calif., 1–5 Nov., 1981". New York & London, 1982. — P. 353–377.
  29. Kotelevtsev S. V. Biomonitoring of Genotoxicity in Coastal Water / Kotelevtsev S. V., Stepanova L. I., Glaser V. M., In book: Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Kramer, K. J. M. / Ed., CRC Press Inc., 1993. — P. 227–245.
  30. Niagi G. D. E. Mutagenicity testing of herbicides, fungicides and insecticide. I. Chromosome aberrations in *Vicia faba* / Niagi G. D. E., Gopalan H. N. B. // Cytologia. — 1981. — Vol. 46, N 1–2. — P. 169–172.
  31. Rakitsky V. N. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review / Rakitsky V. N., Koblyakov V. A., Turusov V. S. // Teratog. carcinog. Mutagen. — 2000. — Vol. 20, N 4. — P. 229–240.
  32. Reddy S. S. Cytogenetic effect of agricultural chemicals. II. Effects of herbicides «lasso and basagran» on chromosomal mechanism in relation to yield and field components in chili (*Capsicum annum L.*) / Reddy S. S., Rao G. M. // Cytologia. — 1982. — Vol. 47, N 2. — P. 257–267.
  33. Saratovskikh E. A. Synthesis of bidentate complexes of 3,6-dichloropicolinic acid / Saratovskikh E. A. // Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci. — 1989. — Vol. 38. — Part 2. — P. 2140–2141.
  34. Saratovskikh E. A. Complex-formation of some pesticides with adenosine triphosphoric acid / Saratovskikh E. A., Kondrateva T. A., Psikha B. L. [et al.] // Bull. Academy Scie. USSR Div. Chem. sci. — 1988. — Vol. 37. — Part 1. — P. 2252–2258.
  35. Saratovskikh E. A. Inhibition of the nicotinamide adenine dinucleotide-oxidoreductase reaction by herbicides and fungicides of various structures / Saratovskikh E. A., Korshunova L. A., Gvozdev R. I., Kulikov A. V. // Rus. Chem. Bull. — 2005. — Vol. 54, N 5. — P. 1322–1327.
  36. Saratovskikh E. A. Biochemical and Photochemical Degradation of the Herbicide Lontrel / Saratovskikh E. A., Kozlova N. B., Papin V. G., Shtamm E. V. // Appl. Biochem. Microbiol. — 2006. — Vol. 42, N 1. — P. 38–44.
  37. Saratovskikh E. A. Character of the reaction of dinucleotides and polynucleotides with some pesticides / Saratovskikh E. A., Lichina M. V., Psikha B. L., Gvosdev R. I. // Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci. — 1989. — Vol. 38. — Part 1. — P. 1822–1827.
  38. Saratovskikh E. A. EPR spectroscopic study of metallocomplexes of 3,6-dichloropicolinic acid / Saratovskikh E. A., Orlov V. S., Krinichnyi V. I. // Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci. — 1989. — Vol. 38. — Part 1. — P. 2274–2277.
  39. Saratovskikh E. A. Products of photolysis of 3,6-dichloropicolinic acid (the herbicide Lontrel) in aqueous solutions / Saratovskikh E. A., Poliakova O. V., Roschupkina O. S., Lebedev A. T. // Appl. Biochem. Microbiol. — 2007. — Vol. 43, N 2. — P. 227–231.
  40. Synthesis, structure, and spectral characteristics of copper-complexes with picolinic acid derivatives / Aliev Z. G., Atovmyan L. O., Saratovskikh E. A. [et al.] // Bull. academy sci. USSR. Div. chem. sci. — 1988. — Vol. 37. — Part 1. — P. 2246–2252.
- Genotoxicity of the pesticide in Ames test and the possibility to formate the complexes with DNA**
- Saratovskikh E. A., Glaser V. M., Kostromina N. Yu., Kotelevtsev S. V.*
- ✳ **SUMMARY:** The Ames test (strains *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100) was used to study mutagen activity of seven pesticides: six herbicides ( roundup, zenkor basagran, kusagar, lontrel, setoxidim), and fungicide tachigaren, also as herbicide complexes lontrel with eight metals (Cu, Co, Zn, Ni, Fe, Mn, Mo, Mg). It is positioned, that mutagen indexes of the investigated pesticides correlate with the value constant of formation the complexes these substances with DNA. Complexes lontrel (ML<sub>2</sub>) with all metals have displayed mutagen activity. Genotoxicity NiL<sub>2</sub>, FeL<sub>2</sub>, ZnL<sub>2</sub> it is close to genotoxicity initial lontrel, at complexes with other metals have genotoxicity in 1,5–2 times lower.
- ✳ **KEY WORDS:** pesticides, complexes of pesticides with metals, genotoxicity, Ames test