

<https://doi.org/10.3176/biol.1987.1.03>

УДК 597.553.2 : 639.3.043.2 : 543.73

Елена ШАРУПИЧ, Елизавета ХОВАНОВА, Борис СЕРГЕЕВ,  
Сергей БОГОВСКИЙ, Валентина ЯГУЖИНСКАЯ,  
Геннадий БЕЛИЦКИЙ

## ЗАГРЯЗНЕНИЕ КОРМА ФОРЕЛЕЙ КАНЦЕРОГЕННЫМИ АФЛАТОКСИНАМИ ВЫЯВЛЯЕТСЯ В КРАТКОСРОЧНОМ ТЕСТЕ НА ДРОЗОФИЛЕ

Чрезвычайно высокая чувствительность радужной форели *Salmo gairdneri* к афлатоксинам предъявляет соответственно высокие требования к качеству их кормов (Steffens, 1970). Использование в рыбоводческих хозяйствах кормов, пораженных плесневыми грибами типа *Aspergillus flavus* приводит к массовой заболеваемости форелей опухолями печени (Wales, 1970; Wunder, Otto, 1969), в том числе и в обследованных хозяйствах Эстонии (Боговский и др., 1984). В связи с этим разработка простых и точных методов определения микотоксинов в кормах форели представляет собой актуальную практическую задачу.

Афлатоксин В<sub>1</sub>, являющийся основной причиной возникновения гепатом у форелей, обладает сильным мутагенным действием на *Drosophila melanogaster*, вызывая у нее мутации как в половых, так и в соматических клетках (Белицкий и др., 1981; Graf, 1984; Lamb, Lilly, 1971; Vogel, 1976). Нами был разработан метод скрининга генотоксических канцерогенов на дрозофиле, который позволил выявить наличие афлатоксина В<sub>1</sub> в водных растворах в концентрации до  $3 \cdot 10^{-8}$  М или  $\sim 0,01$  мкг/мл (Белицкий и др., 1983).

В данном исследовании мы применили этот метод для выявления мутагенных свойств сложных смесей, каковыми являются экстракты гранулированных кормов форели и их составных частей.

### Материал и методика

Исследованию были подвергнуты два образца гранулированного корма, в которых химическим методом анализа (Методические..., 1984) было обнаружено наличие афлатоксина В<sub>1</sub>. Кроме того были исследованы образцы составных частей корма (кукурузная мука, арахисовое масло, куколка тутового шелкопряда), также зараженные афлатоксином. Контролем служили: образец гранулированного корма, свободный от афлатоксина, водный раствор афлатоксина В<sub>1</sub> (Serva) в 10%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО) и водный раствор *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидина (НМНГ), синтезированный в 10%-ном ДМСО в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  М В. П. Ягужинской (Всесоюзный онкологический центр АМН СССР). Экстракт гранулированных кормов и их составных частей получали с помощью аппарата Сокслета по описанной методике (Боговский и др., 1984).

Эксперименты были поставлены на личинках *D. melanogaster* гетерозиготных по локализованным в X-хромосоме рецессивным генам *yellow* (*y*) и *singed* (*sn*), обуславливающим в гомозиготном состоянии соответственно желтую окраску тела (*y*) и извитую форму щетинок (*sn*), которые у гетерозиготных особей имеют черную окраску и прямую

форму. Метод получения гетерозигот генотипа  $y^{++}/sn^3$  и исследования самок-мозаиков описан нами ранее (Шабад и др., 1976). Таким образом, показателем генотоксических свойств испытуемых соединений в наших экспериментах было наличие у самок гетерозиготных дрозофил желтых или/и извитых щетинок, свидетельствующих о том, что у них в личиночной стадии в клетках имагинальных дисков, формирующих покровы взрослой мушки, произошли мутационные процессы (соматический кроссинговер, точковые мутации, делеции), в результате которых проявилось действие избранных нами рецессивных генов.

Испытуемые экстракты разводили 10%-ным водным раствором ДМСО так, чтобы концентрация афлатоксина  $B_1$  в них составляла величину порядка  $3 \cdot 10^{-7}$  М (0,1 мкг/мл) и добавляли по 0,2 мл к личинкам трехдневного возраста, находящимся на стандартной питательной среде в пробирках диаметром 2 см. Частоту мозаичных пятен  $P$  рассчитывали на 100 особей — отдельно для  $y$ ,  $sn$  и их суммы (включая двойные пятна). Далее переходили к  $\phi$ -распределению Фишера  $\phi = 2 \arcsin \sqrt{P}$ ,  $P_\phi = 1/\sqrt{n}$ , где  $n$  — число просмотренных самок. При сравнении показателей мутирования с контрольным уровнем использовали  $t$ -критерий для числа степеней свободы равного  $\infty$ . Всего было просмотрено 41 429 самок.

### Результаты и обсуждение

Афлатоксин  $B_1$  является значительно более сильным мутагеном, чем НМНГ (таблица). Так, НМНГ в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  г/мл не увеличивает частоту мутирования, а афлатоксин  $B_1$  в той же концентрации повышает ее примерно вдвое ( $p < 0,01$ ). Это представляет интерес в связи с тем, что нитрозосоединения, способные вызывать опухоли печени у рыб (Худолей, 1975; 1983), также могут входить в состав загрязнителей недоброкачественных кормов.

Мутагенная активность экстрактов гранулированных кормов № 1 и 2, если судить по суммарным данным (мутации по обоим генам у рано и поздно вылетевших особей), была такой же, как и у контрольного раствора афлатоксина  $B_1$  — соответственно 2,45 и 2,77% мозаичных пятен против 2,23%. По отдельным генам результаты были менее однородны. В случае корма № 1 частота пятен  $y$  более чем в три раза превышала спонтанный фон (корм без афлатоксина) и различие с контрольным уровнем было значимым на 1%-м уровне, а в случае корма № 2 количество пятен  $y$  хотя и превышало фон в 2,5 раза, но значимость различий была меньше ( $p < 0,05$ ). Что касается мозаичных пятен  $sn$ , то частота их была ниже и высокую степень значимости различий они имели лишь в случае корма № 2.

Значительная мутагенная активность была обнаружена в экстракте кукурузной муки. При его добавлении в культуру дрозофил частота мутагенеза была такой же, как и от экстрактов кормов № 1 и 2. Меньший мутагенный эффект был получен при действии экстрактов из арахисового масла и муки из тутового шелкопряда, хотя все они содержали примерно такое же количество афлатоксина  $B_1$ , как и предыдущие три пробы. Если эти результаты не являются случайными, то их можно связать с различиями в составе этих экстрактов, которые могут содержать компоненты, препятствующие проявлению действия мутагена (Аликперов, 1984).

Существенно, что экстракт из гранулированного корма, который по данным химического исследования не был контаминирован афлатоксином, не проявлял мутагенных свойств. Это свидетельствует о том, что генотоксические свойства изученных нами образцов корма обуславлива-

Индукция соматического мутагена экстрактами кормов для форели у самок *D. melanogaster*  $y^{++}/sn^3$ .

Испытуемое вещество	Суммарный результат <sup>1)</sup>						Рано вылетевшие особи						Поздно вылетевшие особи								
	Просмот-Рено самок	число пятен			частота пятен, %			Просмот-Рено самок	число пятен			частота пятен, %			Просмот-Рено самок	число пятен			частота пятен, %		
		у	sn	Σ	P <sub>y</sub>	P <sub>sn</sub>	P <sub>Σ</sub>		у	sn	Σ	P <sub>y</sub>	P <sub>sn</sub>	P <sub>Σ</sub>		у	sn	Σ	P <sub>y</sub>	P <sub>sn</sub>	P <sub>Σ</sub>
Контроль	22979	95	175	263	0,41	0,76	1,14	13627	59	110	165	0,43	0,81	1,21	9352	36	65	98	0,38	0,70	1,05
Афлатоксин В <sub>1</sub> 1·10 <sup>-7</sup> г/мл	8372	107	99	187	1,28**	1,18**	2,23**	3690	39	37	74	1,06**	1,00	2,01**	4682	68	62	113	1,45**	1,32**	2,41**
НМНГ 1·10 <sup>-7</sup> г/мл	986	4	7	10	0,41	0,71	1,01	475	1	3	3	0,21	0,63	0,63	491	3	4	7	0,61	0,81	1,43
Корм № 1	897	13	12	22	1,44**	1,34	2,45**	644	7	6	11	1,09	0,93	1,71	253	6	6	11	2,37*	2,37*	4,35**
Корм № 2	1084	11	21	30	1,01*	1,94**	2,77**	791	8	17	24	1,01	2,15**	3,03**	293	3	4	6	1,02	1,37	2,05
Кукурузная мука	2886	48	34	78	1,66**	1,18*	2,70**	1546	16	13	29	1,03**	0,84	1,88**	1340	32	21	49	2,39**	1,57*	3,66**
Арахисовое масло	1394	12	5	17	0,86*	0,36*	1,22	774	2	2	4	0,26	0,26*	0,52*	620	10	3	13	1,61**	0,48	2,10*
Мука из того же шелкопряда	1084	12	12	22	1,11**	1,11	2,03*	412	6	5	9	1,21	1,46	2,18	672	7	6	13	1,04*	0,89	1,93
Корм без афлатоксина	1747	8	15	22	0,46	0,86	1,26	477	2	3	5	0,42	0,63	1,05	1270	6	12	17	0,47	0,94	1,34

Примечание: <sup>1)</sup> Рано + поздно вылетевшие особи. Значимость различий с соответствующим контролем: \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

ются наличием в них афлатоксина. Растительные продукты могут содержать и другие микотоксины, однако, мутагенная и канцерогенная активность большинства из них во много раз ниже, чем у афлатоксина В<sub>1</sub> (Белицкий и др., 1983; Могі и др., 1984).

Сравнение частот мозаицизма у рано и поздно вылетевших особей свидетельствует о том, что у личинок, которые к моменту добавления мутагена находились на более поздних стадиях развития, эффект выражен, как правило, слабее, чем у находившихся на ранних стадиях (таблица).

Таким образом, с помощью метода индукции соматического мозаицизма у дрозифилы за относительно короткие сроки (до 2 недель) можно выявить генотоксические свойства канцерогенов, присутствующих в кормах форелей (Белицкий и др., 1981; Fahmy, Fahmy, 1983). При этом, для получения результата примерно на 1000 особей достаточно экстракта из 50 г корма, содержащего 1 мкг/кг афлатоксина В<sub>1</sub>. Хотя химический метод анализа (Методические..., 1984) позволяет определять содержание афлатоксинов в кормах для рыб в тех же пределах, используемый в перспективе биологический метод даст возможность для исследования продуктов без предварительной экстракции из них афлатоксинов. Более существенно, он позволяет определять реальный суммарный генотоксический эффект, складывающийся из действия всех мутагенных примесей любой природы, а также агентов, усиливающих или ослабляющих это действие.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Аликперов У. К. Антимутагенез. Теоретические и практические аспекты. М., 1984.
- Белицкий Г. А., Хованова Е. М., Шарунич Б. Г. Предсказание канцерогенных свойств химических соединений по их мутагенной активности. — В кн.: Ускоренное определение канцерогенности химических соединений. М., 1981, 34—45.
- Белицкий Г. А., Хованова Е. М., Будунова И. В., Шарунич Е. Г. Индукция микотоксинами соматического мозаицизма у дрозифилы и репарации ДНК в культурах клеток млекопитающих. — Бюл. экспер. биол. и мед., 1983, № 7, 83—86.
- Боговский С. П., Роодвее Ю. Ю., Сергеев Б. Л. Острое токсическое и канцерогенное действие афлатоксинов на радужную форель. — В кн.: Экспериментальная и клиническая онкология. Вып. 6. Таллин, 1981, 112—115.
- Методические указания по определению афлатоксинов (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) в кормах для рыб. Таллин, 1984.
- Худолей В. В. Опыт изучения некоторых нитрозоаминов на низших позвоночных (рыб и амфибий). — В кн.: Канцерогенные нитрозосоединения. Действие, синтез, определение. Таллин, 1975, 109—111.
- Худолей В. В. Разработка и применение экспресс-систем биотестирования химических канцерогенных соединений на низших позвоночных и бактериях. Дис. докт. биол. н., Л., 1983.
- Шабад Л. М., Хованова Е. М., Логвиненко Е. Г., Белицкий Г. А. Соматический мутагенез у *D. melanogaster* как экспресс-метод тестирования канцерогенов (*N*-нитрозосоединения). ДАН СССР, 1976, 232, № 4, 997—1000.
- Fahmy, M. J., Fahmy, O. G. Differential induction of altered gene expression by carcinogens at mutant alleles of a *Drosophila* locus with a transposable element. — Cancer Res., 1983, 431, 801—808.
- Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. G., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. — Environ. Mutagen., 1984, 6, 153—188.
- Lamb, M. J., Lilly, L. J. Induction of recessive lethals in *Drosophila melanogaster* by aflatoxin В<sub>1</sub>. — Mutat. Res., 1971, 11, 430—433.
- Steffens, W. Die Bedeutung der Trockenfuttermittel für die industriemäßige Forellenproduktion. — Dtsch. Fisch. Ztg., 1970, 17, 116—121.
- Vogel, E. The relation between mutation pattern and concentration by chemical mutagens in *Drosophila*. — In: Screening Tests in Chemical Carcinogenesis. IARC Sci. Publ., 1976, N 12, 117—132.
- Wales, J. H. Hepatoma in rainbow trout. — In: A Symposium on Diseases of Fish and Shellfishes. Spec. Publ. N 5, Am. Fish. Soc. Washington, D. C., 1970, 351—365.
- Wunder, W., Otto, H. Aflatoxine als Ursache des Leberkrebses der Forelle. — Naturwiss., 1969, 56, 352—355.

Mori, H., Kamai, K., Ohbayoshi, F., Kuniyasu, T., Yamasaki, M., Hamasaki, T., Williams, G. M. Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary cultures/ DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. — Cancer Res., 1984, 44, 2918—2923.

Институт экспериментальной и клинической медицины  
МЗО Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
9/VII 1985

Всесоюзный онкологический научный центр Академии  
Медицинских наук СССР

Jelena SARUPITS, Jelizaveta HOVANOVA, Boris SERGEJEV, Sergei BOGOVSKI,  
Valentina JAGUZINSKAJA, Gennadi BELITSKI

### KANTSERØGEENSETE AFLATOKSIINIDE AVASTAMINE FORELLISØODAS *DROSOPHILA* LØHIAJALISE TESTI ABIL

Autorite eelnevates töödes on näidatud, et aflatoksiin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), mis kutsub esile hepatoome vikerforellil, avaldab tugevat mutageenset toimet ka *Drosophila melanogaster*'ile, põhjustades mutatsioone nii sugu- kui ka somaatilistes rakkudes. Käesolevas töös on uuritud AFB<sub>1</sub>-ga saastatud vikerforelli graanulsööda ja selle komponentide (maisijahu, maapähklivõi, siidiussikookonid) genotoksilisust *Drosophila*'l. Testitavate ekstraktide mutageensust hinnati heterosügootsetel emastel kärbestel geenide *yellow* (*y*), ja *singed* (*sn*) avaldamise alusel, mille tulemusel fenotüübis esinesid kollane kehavärvus ja/või keerdunud harjased. Selgus, et AFB<sub>1</sub>-ga saastatud graanulsöödate ja maisijahu ekstraktide mõju oli sama kui AFB<sub>1</sub> kontrollahuse oma. Mosaiklaikude sagedus *y*- ja *sn*-geenide puhul oli statistiliselt erinev. Maapähklivõi ja siidiussikookoni jahu ekstraktide mutageenne toime osutus nõrgemaks kui kolmes eelnevas proovis, kuigi AFB<sub>1</sub> kontsentratsioon neis oli ühesugune. Sõot, milles AFB<sub>1</sub> puudus, ei kutsunud *Drosophila*'l esile mutatsioone. Võrreldes N-nitro-N-metüül-N-nitrosoguanidiiniga osutus AFB<sub>1</sub> tugevamaks mutageeniks. Mosaiksus täiskasvanud kärbestel väljendus tugevamini juhul, kui AFB<sub>1</sub> lisati kultuurile vastsete varases arengustaadiumis.

Kirjeldatud meetod võimaldab suhteliselt kiiresti testida looduslike ainete komplekse, hinnata nende summaarset genotoksilist toimet ja selgitada, kas nad lisaks tuntud mutageensetele ainetele sisaldavad (mis tahes) mutageenset aktiivsust mõjustavaid ühendeid.

Yelena SHARUPICH, Yelizaveta KHOVANOVA, Boris SERGEYEV, Sergei BOGOVSKI,  
Valentina YAGUZHINSKAYA, Gennadi BELITSKY

### THE CARCINOGENIC CONTAMINATION OF THE RAINBOW TROUT FEED BY AFLATOXINS REVEALED IN *DROSOPHILA* SHORT-TERM TEST

In our previous studies it has been shown that aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) which is capable of inducing hepatomas in rainbow trout, had also strong mutagenic effect in *Drosophila melanogaster* and caused mutations both in germinal and somatic cells. The method for the screening of genotoxic carcinogens was applied in order to study the extracts of the AFB<sub>1</sub> contaminated rainbow trout dry vegetable feedstuff pellets and its compounds: yellow corn (maize) meal, finished peanut butter and silk-worm cocoon meal. The water solutions of AFB<sub>1</sub> and N-nitro-N-methyl-N-nitrosoguanidine (NMNG) in 40% DMSO were used as controls.

The genotoxic action of the afore-mentioned substances is revealed in the presence of yellow body and/or singed bristles in heterozygote fly females, which confirms that mutations in the *Drosophila* larvae in the recessive yellow (*y*) and singed (*sn*) genes had taken place.

It was shown that dry vegetable feedstuff pellet extracts N 1 and 2 and the extracts of yellow corn meal had almost the same mutagenic activity as in the control AFB<sub>1</sub> solution (2.45, 2.77, 2.70 v. s. 2.23 mosaic spots). The frequency of mosaic spots in genes *y* and *sn* taken separately differed significantly. Extracts of finished peanut butter and silk-worm cocoon meal showed a minor mutagenic effect, nevertheless these specimens maintained approximately the same dose of AFB<sub>1</sub> as the three preceding samples. The feedstuff pellet extract without AFB<sub>1</sub> showed no mutagenic action. The result confirms that mutagenicity is due to AFB<sub>1</sub>. AFB<sub>1</sub> showed the more expressed mutagenic effect than NMNG. If AFB<sub>1</sub> was administered to the *Drosophila* larvae in the early stage of embryogenesis, there was, as a rule, more expressed mosaicism in adult flies as compared to the ones affected later.

The described method allows relatively quickly, without any preliminary cleaning of the extracts, to screen the natural products and evaluate their real summarized effect which consists of all the mutagenic additives of any mechanism of action, and any modifying agents.