

**EVALUACIJA GENOTOKSIČNOG POTENCIJALA AMITRAZA
CITOGENETIČKIM TESTOM *IN VIVO*******EVALUATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF AMITRAZ BY
CYTOGENETIC TEST IN VIVO***

Ivana I. Pejin, Z. Stanimirović, Jevrosima B. Stevanović, Z. Kulišić**

Obavljena su ispitivanja genotoksičnog efekta amitraza (3,6 mg/kg t.m, 1,8 mg/kg t.m, 0,9 mg/kg t.m) na ćelijama kostne srži miša HAN soja *in vivo*, praćenjem učestalosti numeričkih i strukturnih hromozomskih aberacija, dok je citostatski efekat istog preparata praćen preko mitotskog indeksa. Prva eksperimentalna doza (3,6 mg/kg t.m) uslovlila je statistički značajno ($p < 0,01$) povećanje mitotskog indeksa, dok su druga (1,8 mg/kg t.m) i treća (0,9 mg/kg t.m) eksperimentalna doza statistički značajno ($p < 0,01$) smanjile vrednost mitotskog indeksa kod jedinki oba pola. Sve primenjene doze pokazale su sposobnost indukcije numeričkih (aneuploidije i poliploidije) i strukturnih (Robertsonove translokacije) hromozomskih aberacija. Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da ispitivana supstancija pokazuje genotoksični dozno zavisni efekat.

Ključne reči: amitraz, genotoksičnost, citostatski efekat, mitotski indeks, strukturne aberacije, numeričke aberacije

Uvod / Introduction

Amitraz je triazapentadiensko jedinjenje, N-(2,4-dimetilfenil)-N-[[2,4-dimetilfenil]imino]metil]-N-metilmetanimidamid, član formamidinske klase hemikalija. Amitraz je u širokoj primeni u poljoprivredi i veterinarskoj medicini, kao visoko efikasan akaricid i insekticid sa širokim spektrom delovanja. Interaguje sa oktopaminskim receptorima u centralnom nervnom sistemu ektoparazita kao agonist insekatskog neurotransmitera oktopamina i uzrokuje povećanje neuralne aktivnosti ili smrti insekata [1, 2]. Amitraz je agonist α_2 -adrenoceptora i izaziva

* Rad primljen za štampu 6. 6. 2006. godine

** Ivana I. Pejin, saradnik, dr Zoran Stanimirović, van. profesor, mr Jevrosima Stevanović, asistent, Katedra za biologiju, dr Zoran Kulišić, red. profesor, Katedra za parazitologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

promene u biohemijskim i fiziološkim procesima. Inhibiše moždanu monoamin-oksidadazu i motorne funkcije kod pacova [3]. Suprimira nivo cAMP-a i oslobađanje insulina iz β ćelijske linije pacova [4] i smanjuje sadržaj glutationa u jetri miša [5].

Amitraz indukuje aktivaciju multiplih formi citohrom P450-zavisne monoooksigenaze u jetri pacova i pokazuje slabu antiestrogenu aktivnost u MCF-7 ćelijama humanog kancera dojke, a istu aktivnost pokazuje i kod polno nezrelih ženki pacova [6]. Amitraz je slabo toksičan za sisare ako se unese oralno [7]. Ukazano je da je amitraz teratogen za laboratorijske životinje [8, 9, 10, 11, 12, 13], ali i da prouzrokuje tumore kod ženki miševa, mada nije klasifikovan kao humani kancerogen [11, 12, 14]. Pri neuobičajeno visokim koncentracijama, može da nastane trovanje ljudi, naročito dece, sa izraženim kliničko toksikološkim manifestacijama [11]. Formamidini se metabolišu kod intraperitonealno (i.p) tretiranih pacova u prisustvu hepatičnih oksidacionih sistema u 2,4 i 2,6 disupstituisane aniline koji se dalje prevode u odgovarajuće nitrozobenzene koji su pokazali mutageni efekat u Ejmsovom testu [15]. Osano i saradnici su pokazali da su izvorna jedinjenja pesticida, formamidina i hloraacetanilida, toksičnija u testu akutne toksičnosti na larvama mušice *Chironomus riparius* [16]. Microtox® testom (test akutne toksičnosti na bakterijama *Vibrio fischeri*) ukazao je da su degradacioni produkti formamidina toksičniji od izvornih jedinjenja, a Mutatox® test (test genotoksičnosti na bakterijama *Vibrio fischeri*) dao je pozitivne rezultate na genotoksičnost hloraacetanilida i formamidina, kao i njihovih degradacionih produkata [16].

Cilj rada je bio da se utvrdi postojanje eventualnog genotoksičnog efekta amitraza i njegovih rezidua *in vivo*, praćenjem učestalosti numeričkih i strukturnih hromozomskih aberacija u ćelijama kostne srži miša HAN soja, dok smo citostatski efekat ovog akaricida procenjivali na osnovu mitotskog indeksa.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Eksperiment je bio izveden na albino laboratorijskim miševima soja HAN oba pola (50 posto mužjaka i 50 posto ženki), uzrasta oko 7 nedelja, telesne mase od 25 do 30 grama. Ispitivano je delovanje tri različite doze (3.6 mg/kg amitraza, što je LD₅₀ za pčele pri raspršivanju; 1.8 mg/kg, što je 50 posto LD₅₀ za pčele i 0.9 mg/kg, što je 25 posto od LD₅₀ za pčele). Svaki *in vivo* test obuhvata tri grupe eksperimentalnih životinja: pozitivnu kontrolu [K(+)-tretman ciklofosfamidom], negativnu kontrolu [K(-)-netretirane jedinke] i eksperimentalnu grupu. Eksperimentalna grupa je podeljena na tri podgrupe – za svaku dozu po jedna (E1 - 3.6 mg/kg amitraza, E2 - 1.8 mg/kg i E3 - 0.9 mg/kg). Amitraz je aplikovan intraperitonealno dva puta u razmaku od 24 časa, a žrtvovanja su izvedena 24 časa posle druge aplikacije. Eksperimentom je bilo obuhvaćeno osam ciklusa.

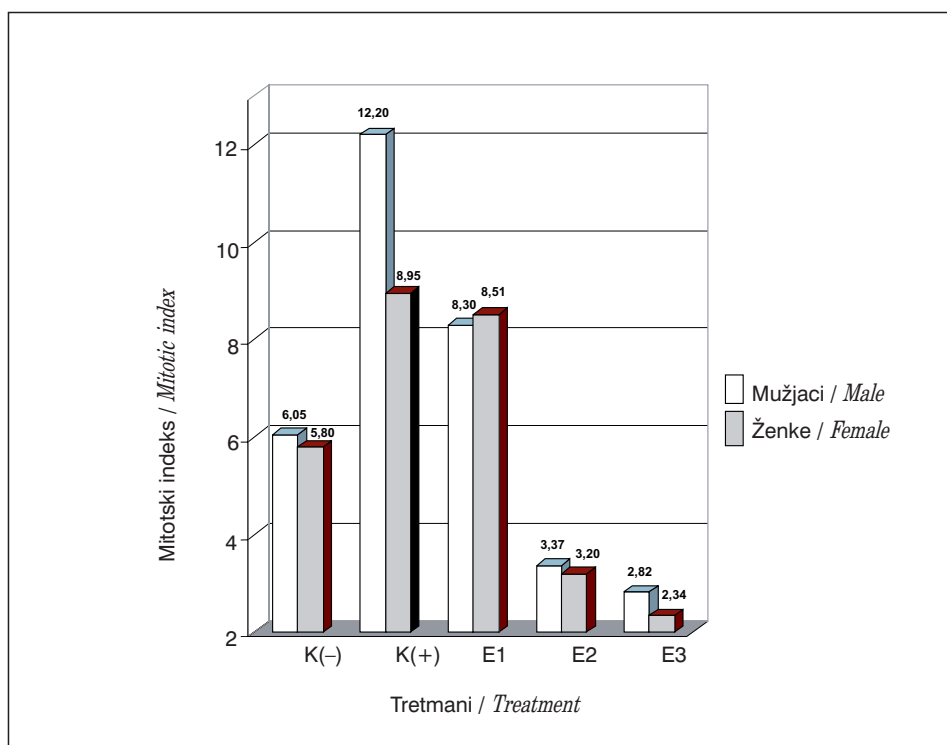
Preparacija kostne srži miševa i pravljenje citoloških preparata obavljani su na osnovu metode koju su postavili Hsu i Paton [17], a modifikovao Stanimirović [18]. Procena hromozomskih aberacija (numeričkih i strukturnih) je obav-

Ispitivanje je provedeno proučavanjem 2400 ćelija kostne srži, odnosno, 1200 ćelija koje potiču od ženki i isto toliko koje potiču od mužjaka. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom t-testa.

Statistička obrada je izvedena softverskim programom Statistica 6.0, a za analizu varijanse korišćen je ANOVA program.

Rezultati i diskusija / Results and discussion

Rezultati ispitivanja uticaja različitih doza amitraza na proliferativnu sposobnost ćelija kostne srži jedinki HAN soja oba pola (faktor A: muški pol a_1 i ženski pol a_2), odnosno na mitotski indeks, kao meru proliferacije ćelija, prikazan je u grafikonu 1.



Grafikon 1. Mitotski indeks ćelija kostne srži miša oba pola u kontrolama i eksperimentalnim grupama

Graph 1. Mitotic index of bone marrow cells in mice (both sexes) in controls and experimental groups

Iz datog grafikona se vidi da različite doze amitraza različito utiču na proliferativnu aktivnost posmatrane vrste ćelija oba pola. Prva doza (3,6 mg/kg -

E1) stimuliše proliferaciju ćelija kostne srži, odnosno, uslovljava povećanje vrednosti mitotskog indeksa (8.30 ± 0.60 mušjaci, 8.51 ± 0.70 ženke) u odnosu na negativnu kontrolu (6.05 ± 0.26 mušjaci, 5.80 ± 0.37 ženke). Druga (1.8 mg/kg - E2) i treća (0.9 mg/kg - E3) doza snižavaju vrednosti mitotskog indeksa kako kod mužjaka, tako i kod ženki u poređenju sa netretiranim jedinkama iz negativne kontrolne grupe: E2= 3.37 ± 0.42 (mušjaci), E2= $3.20 \pm 0.0.42$ (ženke); E3= 2.82 ± 0.35 (mušjaci) i E3= 2.34 ± 0.46 (ženke).

Analizom varijanse u dvofaktorijalnom ogledu i F-testom, utvrđeno je da između svih grupa životinja postoje veoma značajne razlike ($p < 0.01$) uslovljene uticajem pola eksperimentalnih životinja i različitih doza ispitivane supstance.

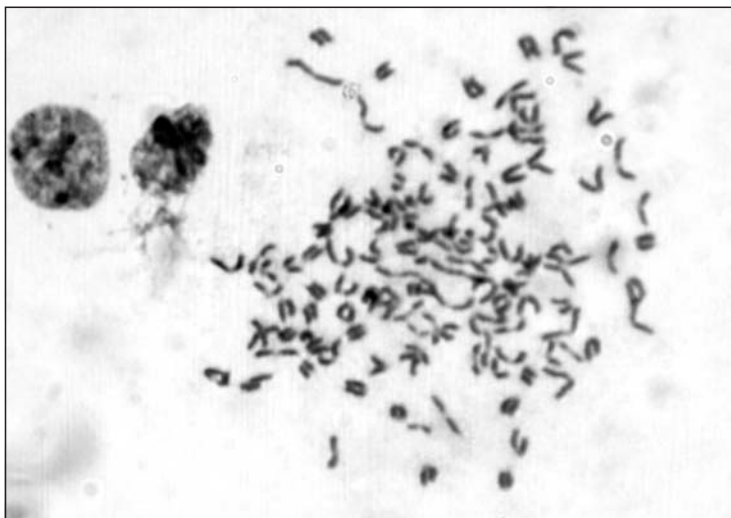
Prva doza (3,6 mg/kg) u E1 je stimulatивно delovala na proliferaciju ćelija kostne srži miša, odnosno, uslovlila je povećanje mitotskog indeksa. Druga (1.8 mg/kg) i treća (0.9 mg/kg) doza su, u našem slučaju, smanjile vrednost MI kod jedinki oba pola. Iz ovih rezultata se vidi da ista vrsta ćelija može da reaguje, u biološkom smislu, različito na različite doze iste hemijske supstance. Poznato je da ćelije mogu da ispolje različiti stepen osetljivosti na citotoksične agense, u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa, od doze primenjene supstance i od dužine trajanja tretmana [19]. Prema Madoc-Jonesu i Maurou [20] ciklus-specifični agensi deluju na ćeliju u tačno određenoj fazi ćelijskog ciklusa, mada ne mora da znači da se tačka maksimalne osetljivosti ćelija podudara sa momentom ispoljavanja citostatičkog ili citotoksičnog efekta date hemikalije. Naprotiv, ciklus-specifični agens prvo stupa u reakciju sa najosetljivijim ćelijskim komponentama odgovornim za proliferativnu aktivnost, a tek u kasnijem vremenskom periodu dolazi i do vidljivih posledica, tj. do smanjenja broja ćelija. Ustanovljeno je da kod pojedinih ciklus-specifičnih hemijskih agenasa, u pogledu uticaja na proliferaciju ćelija kostne srži sa povećanjem doze, ne dolazi i do manifestnog povećanja citotoksičnog efekta koji bi se ispoljio većim smanjenjem broja ćelija. To je zato što ekspozicija takvim hemijskim sredstvima uslovljava delimičnu sinhronizaciju ćelija kostne srži. Takvi agensi ostvaruju svoj citostatski ili citotoksični efekat na najosetljivijim ćelijama, dok u životu ostaju ćelije koje su ili manje osetljive ili neosetljive na dato hemijsko sredstvo. Te ćelije nesmetano prolaze kroz deobu i vremenom se njihova ćelijska populacija uvećava sve dok određena hemikalija i na ove ćelije ne ostvari potpuni citostatski ili citotoksičan efekat [21].

Amitraz je ispoljio citoproliferativan efekat koji je naročito izražen u E1, dok su E2 i E3 imale nizak MI čak i u odnosu na netretirane jedinke iz negativne kontrolne grupe. Može da se kaže da su ćelije kostne srži ispoljile dozno-zavisni odgovor, mada je u poređenju sa negativnom kontrolom reč o supresiji odgovora u E2 i E3. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima Younga *et al* [22], koji su ustanovili da 0.035 posto amitraza redukuje broj ćelija u WIL2NS limfoblastnoj ćelijskoj liniji samo dva časa posle izlaganja, tj. amitraz smanjuje broj limfocita u centralnom krvotoku kod ljudi. Pretpostavljamo da je amitraz kod laboratorijskih životinja uticao na loze ćelija krvi u kostnoj srži. Takođe, može da se pretpostavi da

veće doze mogu brže da deluju u smislu citotoksičnog efekta, a samim tim i da ćelije kostne srži brže nadoknađuju izgubljeni pul ćelija (kostna srž je visoko proliferativno tkivo koje brzo nadoknađuje gubitak ćelija usled izloženosti citotoksičnim agensima), pa da iz tog razloga kod E1 i E2 imamo nizak MI. Amitraz je ispoljio citoproliferativan efekat što može da bude polazna tačka za promene genetičkog materijala na nivou gena i hromozoma [23].

Pored uticaja na mitotsku aktivnost ćelija kostne srži miša ispitivane doze amitraza pokazale su sposobnost indukcije kako numeričkih hromozomskih aberacija tipa aneuploidija i poliploidija, tako i strukturnih aberacija tipa Robertsonovih translokacija. Rezultati ovih istraživanja prikazani su u tabelama 1 i 2.

U tabeli 1 su prikazani rezultati kako pojedinačne učestalosti aneuploidija i poliploidija, tako i ukupna učestalost tih numeričkih aberacija hromozoma u ćelijama kostne srži jedinki oba pola u zavisnosti od eksperimentalnih doza (slika 1). Iz tabele 1 se vidi da su sve ispitivane doze amitraza pokazale sposobnost indukcije numeričkih hromozomskih promena u ćelijama kostne srži, a poređenjem induktivne sposobnosti ispitivanih doza i primenjenih kontrola vidi se da vrlo visoke signifikantne razlike ($p < 0.001$) postoje između E1 i E3, E1 i E2, E3 i K(+), E2 i K(+), dok takve razlike nisu uočene između K(+) i E1, odnosno između E2 i E3. Pol nema statistički značajan uticaj na pojavljivanje numeričkih hromozomskih aberacija.



Slika 1. Poliploidija u kariotipu laboratorijskog miša HAN soja
Figure 1. Polyploidy in karyotype of HAN mouse

Tabela 1. Numeričke hromozomske aberacije u ćelijama kostne srži miševa (oba pola) u kontrolama i eksperimentalnim grupama tretiranim rastućim dozama amitraza
 Table 1. Numerical chromosomal aberrations in mouse marrow cells in mice (both sexes) in controls and experimental groups treated with increasing doses of amitraz

Sredstvo / Agent	ΣN	Ukupan broj numeričkih hromozomskih aberacija / Total number of numerical chromosomal aberrations (ΣN)						Aneuploidije / Aneuploidy						Poliploidije / Polyploidy					
		ženke / female n	%	mužjaci / male n	%	tp	p<	ženke / female n	%	mužjaci / male n	%	tp	p<	ženke / female n	%	mužjaci / male n	%	tp	p<
Negativna kontrola / Negative control K(-)	1200	11	0.92	9	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pozitivna kontrola / Positive control K(+)	1200	474	39.49	449	37.42	0.667	NS	377	31.41	356	29.67	0.333	NS	97	8.08	93	7.75	0.250	NS
Amitraz u dozi 3.6 mg/kg / Amitraz at dose 3.6 mg/kg (E1)	1200	461	38.41	439	36.58	0.333	NS	370	30.83	338	28.16	1.000	NS	91	7.58	101	8.42	0.250	NS
Amitraz u dozi 1.8 mg/kg / Amitraz at dose 1.8 mg/kg (E2)	1200	295	24.59	264	22.00	0.750	NS	269	22.42	225	18.75	0.750	NS	26	2.16	39	3.25	0.250	NS
Amitraz u dozi 0.9 mg/kg / Amitraz at dose 0.9 mg/kg (E3)	1200	335	27.91	301	25.08	1000	NS	289	24.08	243	20.25	1.000	NS	46	3.38	58	4.83	0.250	NS

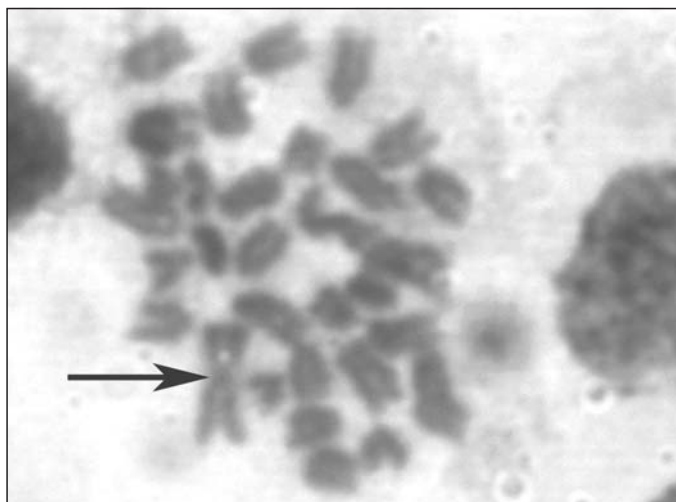
d f = 60 t 0.05 = 2.00 t 0.001 = 3.460
 d f = 120 t 0.05 = 1.980 t 0.001 = 3.373
 d f = 8 t 0.05 = 1.9600 t 0.001 = 3.2905

Tabela 2. Razlike u zastupljenosti Rb translokacija kod miševa oba pola u odnosu na primenjenu dozu amitraza
 Table 2. Differences in Rb translocations in mice of both sexes depended of applied dose of amitraz

Sredstvo / Agent	Ukupan broj pregledanih ćelija / Total number of analyzed cells	Robertsonova translokacija / Robertsonian translocation		Pozitivna kontrola / Positive control K(+)		Amitraz u dozi 3.6 mg/kg / Amitraz at dose 3.6 mg/kg (E1)		Amitraz u dozi 0.9 mg/kg / Amitraz at dose 0.9 mg/kg (E3)	
		n	%	tp	p<	tp	p<	tp	p<
Pozitivna kontrola / Positive control K(+)	2400	632	26.30	-	-	0.154	NS	11.818	0.001
Amitraz u dozi 3.6 mg/kg / Amitraz at dose 3.6 mg/kg (E1)	2400	586	24.41	-	-	-	-	-	-
Amitraz u dozi 1.8 mg/kg / Amitraz at dose 1.8 mg/kg (E2)	2400	233	9.70	14.545	0.001	14.00	0.001	3.333	0.001
Amitraz u dozi 0.9 mg/kg / Amitraz at dose 0.9 mg/kg (E3)	2400	322	13.40	-	-	11.00	0.001	-	-

df = 8, $t_{0.005} = 1.9600$, $t_{0.01} = 2.5758$, $t_{0.001} = 3.2905$

Jedan od sigurnih pokazatelja genotoksičnosti ispitivane supstancije jeste pojava strukturnih hromozomskih aberacija [24]. Sve ispitivane doze amitraza pokazale su sposobnost indukcije strukturnih hromozomskih aberacija tipa Robertsonovih translokacija (Rb). Preduslov za nastanak Rb translokacija, ako se radi o supstanciji sa genotoksičnim potencijalom, jesu prekidi u neposrednoj blizini centromera na oba hromozomska kraka [25, 26]. Ovaj tip strukturnih aberacija se javlja u svim eksperimentalnim grupama, mada doza primenjena u E1 podgrupi ima najveću sposobnost indukcije Robertsonovog hromozoma (slika 2). Iz tabele 2 može da se zapazi da se ukupna zastupljenost Robertsonovih translokacija kod svih eksperimentalnih grupa, međusobno, vrlo visoko značajno ($p < 0.001$) razlikuje u zavisnosti od doze, osim kod E1 i K(+), gde razlika u broju ćelija sa Robertsonovim hromozomom nije statistički značajna.



Slika 2. Kariotip laboratorijskog miša HAN soja tretiranog najvećom dozom amitraza (3,6 mg/kg t.m) – strelica pokazuje Robertsonovu translokaciju
Figure 2. Karyotype of the HAN strain mouse treated with the highest dose of amitraz (3.6 mg/kg b.w) arrow indicates the Robertsonian translocation

Naši rezultati povećanja frekvencije numeričkih (aneuploidija i poliploidija) i strukturnih hromozomskih aberacija (Robertsonove fuzije) su verovatno posledica dejstva metabolita amitraza, što je u saglasnosti sa nalazima grupe autora, čije su studije rađene na sisarskim test-sistemima *in vivo* i *in vitro* [27, 28], kao i studije rađene na bakterijama [29]. Svi navedeni radovi ukazuju na genotoksičnost ispitivanih metabolita amitraza *in vivo* i *in vitro*. Kako su u Muta-tox® testu (test genotoksičnosti na bakterijama *Vibrio fischeri*) dobijeni pozitivni rezultati na genotoksičnost hlороacetanilida i formamidina, kao i njihovih degradacionih produkata [16], a imajući u vidu činjenicu da je i sam amitraz iz grupe for-

mamidina, lako mogu da se očekuju slični efekti i samog amitraza, odnosno njegovih metabolita, mada u ovom slučaju dobijeni rezultati genotoksičnosti degradacionih produkata amitraza, odnose se na prokariotski sistem. U osnovi svih navedenih promena su verovatno poremećaji u reper enzimskim sistemima, koji usled oštećenja ne uspevaju da obave popravke oštećenja na naslednoj osnovi nastale dejstvom ovog radiomimetika [23].

Zaključak / Conclusion

1. Različite doze amitraza različito utiču na proliferativnu aktivnost posmatrane vrste ćelija oba pola: prva eksperimentalna doza stimuliše proliferaciju ćelija kostne srži (povećava vrednost MI) u odnosu na negativnu kontrolu, dok druga i treća snižavaju vrednost MI u poređenju sa netretiranim jedinkama iz negativne kontrolne grupe.

2. Analizom varijanse u dvofaktorijalnom ogledu i F-testom, utvrđeno je da između svih grupa životinja postoje veoma značajne razlike ($p < 0.01$) uslovljene uticajem pola eksperimentalnih životinja i različitih doza ispitivane supstance.

3. Ispitivane doze amitraza mogu da izvrše hemijsku indukciju numeričkih hromozomskih promena u ćelijama kostne srži laboratorijskog miša i te induktivne sposobnost mogu vrlo mnogo da se razlikuju ($p < 0.001$) među grupama [E1-E3, E1-E2, E3-K(+), E2-K(+)], ali među nekim eksperimentalnim grupama te razlike nisu uočene [E1 i K(+), E2 i E3].

4. Ukupna zastupljenost Robertsonovih translokacija se, kod svih eksperimentalnih grupa, međusobno, značajno ($p < 0.001$), razlikuje što zavisi od doze osim kod E1 i K(+) gde razlika u broju ćelija sa Robertsonovim hromozomom nije statistički značajna.

Literatura / References

1. Evans P. D., Gee J. D.: Action of formamidine pesticides on octopamine receptors, *Nature*, 287, 60-62, 1980. - 2. Nathanson J. A: Characterization of octopamine-sensitive adenylylase: Elucidation of a class of potent and selective octopamine - 2 receptor agonists with toxic effects in insects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 599-603, 1985. - 3. Moser V. C., MacPhail R. C.: Differential effects of formamidine pesticides on fixed-interval behavior in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 84, 315-324, 1986. - 4. Chen T. H., Hsu W. H.: Inhibition of insulin release by a formamidine pesticide amitraz and its metabolites in a rat beta-cell line: an action mediated by alpha-2 adrenoceptors, a GTP-binding protein and a decrease in cyclic AMP. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271, 1240-1245, 1994. - 5. Costa L. G., Gastel J., Murphy S. D.: The formamidine pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione content in mice through an interaction with alpha2-adrenoceptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33, 349-358, 1991. - 6. Tzou-Huei Ueng, Chia-Chi Hung, Hui-Wu Wang, Ping-Kun Chan: Effects of amitraz on cytochrome P450-dependent monooxygenases and estrogenic activity in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats, *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1785-1794, 2004. - 7. Briggs Shirley: Basic guide to Pesticides,

Hemisphere Publishing, Washington, DC, 1992. - 8. Al-Thani A. S. Al-Thani A. Elbetiejha H. Darmani: Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice, *Toxicology Letters* 138, 2003, 253-260, 2003. - 9. Goldman J. M., Cooper R. L., Edwards T. L., Rehnberg G. L., McElroy W. K., Hein J. F.: Suppression of the luteinizing hormone surge by chlordimeform in ovariectomized, steroid-primed female rats. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 131-136, 1991. - 10. Cooper R. L., Goldman J. M., Stocker T. E.: Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use esticides. *Toxicol. Ind. Health* 15, 26 /36, 1999. - 11. U.S. Environmental Protection Agency, EPA Fact sheet No. 147 Amitraz. U.S. EPA. Washington, DC., 1987. - 12. Hayes W., Jr., Laws, E.R., Jr. (Eds.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 1. Academic Press, Inc, New York NY, 1991. - 13. Osano O., Admiraal W., Klamer H. J. C., Pastor D., Bleeker E.A. J.: Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*, *Environmental Pollution*, 119, 195-202, 2002. - 14. Thomson W. T.: *Agricultural Chemicals. Book II: Herbicides*. Thomson Publications, Fresno, CA., 1993. - 15. Kimmel E. C., Casida J. E., Ruzo L. O.: Formamidine insecticides and chloroacetanilide herbicides: disubstituted anilines and nitrosobenzenes as mammalian metabolites and bacterial mutagens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 34, 157-161, 1986. - 16. Osano O., Admiraal W., Klamer H. J. C., Pastor D., Bleeker E. A. J.: Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*, *Environmental Pollution*, 119, 195-202, 2002. - 17. Hsu T. C., Patton G. L.: Bone marrow preparations for chromosome studies. In: Benirische K. (Ed). *Comparative Mammalian Cytogenetics*, Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, New York, 454-460, 1969. - 18. Stanimirović Z.: Hromozomski polimorfizam prirodnih populacija vrste *Mus musculus*, Linne 1758, na teritoriji Jugoslavije – magistarska teza, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 1992. - 19. Ingelman-Sundberg M.: Genetic variability in susceptibility and response to toxicants, *Toxicol. Lett.* 120 259-268, 2001. - 20. Madoc-Jones H, Mauro F.: Site of action of cytotoxic agents in the cell life cycle. *Antineoplastic and immunosuppressive 1*, Edited by A.C.Sartorellia and CD. G. Johns, Springer-Verlag New York, 205-219, 1974. - 21. Beutler E.: *Chemical toxicology of the erythrocyte*, *Toxicology of blood and bone marrow*, Edited by R.D. Irons, Raven press-New York, 39-50.S., 1985. - 22. Young F. M., Phungtamdet W, Sanderson B.: Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS, *Toxicology in vitro* 19-8, 1051-1059, 2005. - 23. Preston-Martin S., Pike M. C., Ross R. K., Jones P. A., Henderson B. E.: Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Res.* 50, 1990, 7415-7421, 1990. - 24. Brogger A.: Cytogenetic cell, *Genet.* 33,14-19, 1982. - 25. Marković B.: Genotoksični efekat antibiotskih preparata Carbaox, Tiamulin S i Gastrogal 10. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu., 1999. - 26. Marković B., Stanimirović Z., Đelić N.: Evaluation of genotoxic effects of Tiamulin S *in vivo*, *Acta vet.* Beograd 54, 2-3, 239-246, 2004. - 27. Hounsell I. A. G., Walker A. K.: A micronucleus study in mice using BTS 24868 (2,4-dimethylaniline). Unpublished report No. TOX/84/179-97 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd., 1983. - 28. Petzold G. L., Swenberg J. A., Bedell, M.: Evaluation of amitraz (U-36,059) and its metabolites (U-40,481, U-36,893, U-54,915A and U-54,914) in the DNA damage/alkaline elution assay. Unpublished report No. 7268/77/7268/001 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd., 1977. - 29. Richold M., Jones E., Fenner L. A.) Technical BTS 27271, Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. FSB 61A/83580 from Huntingdon Research Centre plc, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd., 1983.

ENGLISH

**EVALUATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF AMITRAZ BY CYTOGENETIC TEST
*IN VIVO***

Ivana I. Pejin, Z. Stanimirovic, Jevrosima B. Stevanovic, Z. Kulisic

The genotoxic effect of amitraz (3.6 mg/kg b.m, 1.8 mg/kg b.m, 0.9 mg/kg b.m) on bone marrow cells of HAN strain mice was examined *in vivo* by following the frequency of numeric and structural chromosomal aberrations, while the cytostatic effect of the same preparation was followed through the mitotic index. The first experimental dose (3.6 mg/kg b.m) caused a statistically significant ($p < 0.01$) increase in the mitotic index, while the second (1.8 mg/kg b.m) and the third (0.9 mg/kg b.m.) experimental dose statistically significantly ($p < 0.01$) decreased the value of the mitotic index in animals of both sexes. All the applied doses exhibited an ability to induce numeric (aneuploidy and polyploidy) and structural (Robertsonian translocation) chromosomal aberrations. It can be concluded on the basis of the obtained results that the examined substance exhibits a genotoxic dose-dependant effect.

Key words: amitraz, genotoxicity, cytostatic effect, mitotic index, structural aberrations, numeric aberrations

РУССКИЙ

**ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АМИТРАЗА
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ ТЕСТОМ *IN VIVO***

Ивана И. Пеин, З. Станимирович, Евросима Б. Стеванович, З. Кулишич

Сделаны испытания генотоксического эффекта amitraza (3.6 мг/кг м.т, 1.8 мг/кг м.т, 0.9 мг/кг м.т) на клетках костного мозга мыши ХАН штамма *in vivo* слежкой частоты нумерационных и структурных aberrаций, пока цитостатический эффект такого же препарата слежен через митотический индекс. Первая экспериментальная доза (3.6 мг/кг м.т) обусловила статистически значительно ($p < 0.01$) увеличение митотического индекса, пока вторая (1.8 мг/кг м.т) и третья (0.9 мг/кг м.т) экспериментальная доза статистически значительно ($p < 0.01$) уменьшили стоимость митотического индекса у отдельных животных оба пола. Все применённые дозы показали способность индукции нумерационных (анеуплоидии и полиплоидии) и структурных (транслокации Робертсона) хромосомных aberrаций. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что испытанная субстанция показывает генотоксический дозно зависимый эффект.

Ключевые слова: amitraz, генотоксичность, цитостатический эффект, митотический индекс, структурные aberrации, нумерационные aberrации