

УДК: 575.224.23:599.323:612.64

¹С.Ж. Колумбаева*, ¹А.В. Ловинская, ²Д.А. Бегимбетова,
¹А.М. Калимагамбетов, ¹Б.Б. Жунусбекова

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

²Назарбаев Университет, Республика Казахстан, г. Астана

*E-mail: S_kolumb@mail.ru

Мутагенные эффекты несимметричного диметилгидразина и нитрозодиметиламина в организме млекопитающих

В результате проведенного цитогенетического и ДНК-комет исследования установлено, что несимметричный диметилгидразин (НДМГ) и нитрозодиметиламин (НДМА) при всех дозах и сроках воздействия на экспериментальных животных (острое, подострое) оказывал выраженный генотоксический эффект, проявившийся в статистически значимом увеличении частоты аберрантных клеток и уровня полиплоидии. Установлена органоспецифичность генотоксического действия НДМГ и НДМА в висцеральных органах лабораторных мышей, которые по чувствительности к ДНК-повреждающему действию можно расположить в следующем порядке: легкие < селезенка < печень < почки.

Ключевые слова: ксенобиотик, несимметричный диметилгидразин, N-нитрозодиметиламин, абберрации, метод ДНК-комет.

С.Ж. Колумбаева, А.В. Ловинская, Д.А. Бегимбетова, А.М. Калимагамбетов, Б.Б. Жунусбекова

Сүтқоректілер организміндегі симметриялық емес диметилгидразиннің және нитрозодиметиламиннің мутагендік әсері

Цитогенетикалық және ДНК-комет зерттеулердің нәтижесінде экспериментальдық жануарларға симметриялық емес диметилгидразин (НДМГ) және нитрозодиметиламиннің (НДМА) қолданған барлық мөлшері, әсер ету мезгілдері (бір реттік және көп реттік жағдайларда) генотоксиндік әсер ететіні, яғни аберранттық клеткалардың жиілігі, полиплоидияның деңгейі сенімді ретінде көбеюі анықталды. Лабораториялық тышқандардың висцеральдық мүшелерінде НДМГ мен НДМА-ның генотоксиндік әсерінің мүшелік ерекшелігі анықталды. Оларды ДНК-ы зақымдану әсеріне қатысты келесі қатарға қоюға болады: өкпелер < көк бауыр < бауыр < бүйректер.

Түйін сөздер: ксенобиотик, симметриялы емес диметилгидразин, N-нитрозодиметиламин, абберрации, ДНК-комет әдісі.

S.Zh. Kolumbayeva, A.V. Lovinskaya, D.A. Begimbetova, A.M. Kalimagambetov, B.B. Zhunusbekova

Mutagenic effects of unsymmetrical dimethylhydrazine and n-nitrosodimethylamine on mammals

The article represents the application of cytogenetic and Comet assay for studying mutagenic effects of unsymmetrical dimethylhydrazine and N-Nitrosodimethylamine. The statistical analysis revealed a dose-dependent and time-dependent (acute, subacute study) genotoxic activity of these xenobiotics on mice. Statistically significant increases of cells with aberrant metaphases and level of polyploid cells were observed. Organ-specific genotoxicity of UDMH and NDMA is established. The mice organs may be arranged by sensitivity to DNA damaging action as follows: lungs < spleen < liver < kidney.

Keywords: xenobiotics, unsymmetrical dimethyl, N-nitrosodimethylamine, aberrations, DNA – comet method.

Бурное развитие всех отраслей промышленности и сельского хозяйства сопровождается выбросами и сбросами загрязняющих химических, радиоактивных и биологических веществ в окружающую среду. В настоящее время в сельском хозяйстве, промышленности, быту и медицине используются разнообразные искусственно синтезируемые химические соединения, в том числе пестициды, пищевые добавки, лекарственные препараты, красители, детергенты и другие вещества, число которых ежегодно увеличивается. Для ряда этих веществ показана мутагенная, канцерогенная и тератогенная активность [1].

Интенсивная ракетно-космическая деятельность на территории России и Казахстана привела к загрязнению значительных территорий вокруг полигонов и мест падения отработанных ступеней ракет токсическими остатками ракетного топлива. Проводимые с конца 90-х годов масштабные мониторинговые исследования на территориях районов падений отделяющихся частей ракетносителей позволяют утверждать, что компоненты жидкого ракетного топлива способны накапливаться в экосистемах [2, 3].

В большинстве используемых ракетносителей в качестве топлива применяется несимметричный диметилгидразин (НДМГ, $(\text{CH}_3)_2\text{N}_2\text{H}_2$), который из-за высокой токсичности для животных и человека отнесен ВОЗ к особо опасным химическим соединениям. Опасны также отдаленные эффекты НДМГ, так как он обладает канцерогенным действием [4]. В организме млекопитающих он метаболизируется до ряда производных, среди которых N-нитрозодиметиламин (НДМА, $(\text{CH}_3)_2\text{N}_2\text{O}$), отличающийся высокой токсичностью и мутагенностью [5].

Результаты российских и казахстанских комплексных экспедиционных работ на местах падения остаточных частей космических ракет свидетельствуют о наличии компонента ракетного топлива НДМГ и продуктов его окисления, в частности НДМА, в почве, воде и растениях в концентрациях, превышающих ПДК. Особую опасность представляют ксенобиотики, обладающие мутагенной активностью. Поражение наследственного материала вызывает различного рода генетические дефекты, которые могут передаваться из поколения в поколение. Поэтому исследование генотоксического потенциала компонентов ракетного топлива представляет несомненную актуальность.

Целью настоящего исследования явилось изучение мутагенного эффекта компонента ракет-

ного топлива НДМГ и его производного НДМА в соматических клетках грызунов с помощью метода метафазного анализа хромосом и метода щелочного гель-электрофореза.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования явились клетки костного мозга и висцеральные органы лабораторных мышей.

В качестве исследуемых на генотоксичность и токсичность веществ были использованы несимметричный диметилгидразин (НДМГ) и продукт его распада нитрозодиметиламин (НДМА), встречающиеся в объектах окружающей среды (почва, вода, флора, фауна) на территориях, подверженных воздействию космодрома Байконур.

В экспериментах по изучению НДМГ было использовано 35 мышей линии *BALB/cYwal* в возрасте 2-3-х месяцев с массой тела 20-25 г, разделенных на 7 групп: I – интактные животные; для изучения органоспецифичности II – животные, получавшие однократно НДМГ в дозе 13,2 г/кг (время воздействия 4 часа); III – животные, получавшие однократно НДМГ в дозе 26,4 мг/кг (время воздействия 4 часа); для цитогенетического исследования IV – животные, получавшие однократно НДМГ в дозе 13,2 мг/кг (время воздействия 24 часа); V – животные, получавшие однократно НДМГ в дозе 26,4 мг/кг (время воздействия 24 часа); VI – животные, получавшие в течение 10 дней НДМГ в дозе 6,6 мг/кг; VII – животные, многократно в течение 10 дней получавшие НДМГ в дозе 13,2 мг/кг.

В эксперименте по изучению НДМА было использовано 35 мышей линии *BALB/cYwal* в возрасте 2-3-х месяцев, разделенных на 7 групп по 5 особей в каждой: I – интактные животные; для изучения органоспецифичности II – животные, получавшие однократно НДМА в дозе 8,0 мг/кг (время воздействия 4 часа); III – животные, получавшие однократно НДМА в дозе 4,0 мг/кг (время воздействия 4 часа); для цитогенетического исследования IV – животные, получавшие однократно НДМА в дозе 4,0 мг/кг (время воздействия 24 часа); V – животные, получавшие однократно НДМА в дозе 8,0 мг/кг (время воздействия 24 часа); VI – животные, получавшие в течение 10 дней НДМА в концентрации 2,0 мг/кг; VII – животные, многократно в течение 10 дней получавшие НДМА в концентрации 4,0 мг/кг.

Дозировки ксенобиотиков была выбрана исходя из имеющихся сведений о $\text{LD}_{50} = 132 \text{ мг/кг}$

НДМГ (для мышей) и 40 мг/кг НДМА (для мышей) при внутрибрюшинном введении [5]. Для интоксикации животных использовали водные растворы НДМГ и НДМА. Интактные и опытные животные содержались в условиях вивария на стандартном рационе.

Мышей забивали под эфирным наркозом, забирали образцы висцеральных органов (печень, почки, селезенку, легкие) для исследования ДНК с помощью метода ДНК-комет, образцы костного мозга – для цитогенетического анализа.

Для получения цитологических препаратов из клеток костного мозга мышей для проведения цитогенетического анализа использовали общепринятую методику [6].

Внутрибрюшинно мышам вводили 0,04%-й раствор колхицина из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Через 1,5-2 часа после ввода колхицина мышей забивали и из бедренной кости вымывали костный мозг гипотоническим раствором хлорида калия (0,56 %, $t=37^{\circ}\text{C}$) в центрифужную пробирку емкостью 10 мл. Вымытый костный мозг тщательно суспендировали для гомогенизации клеточной суспензии. Пробирки с клеточной суспензией помещали в водяную баню ($t=37^{\circ}\text{C}$) на 8-12 минут. После гипотонической обработки суспензию клеток центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывали пипеткой, осадок фиксировали в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (1:1). Зафиксированные клетки ресуспендировали в фиксаторе и суспензию наносили на охлажденные влажные предметные стекла. Для окраски хромосом использовали краситель азур-эозин по Романовскому-Гимзе. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ всех проведенных количественных исследований проводили по общепринятой методике с использованием критерия Стьюдента. Для получения усредненных значений показателей статистические величины обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [7].

Органоспецифичность генотоксического действия НДМГ и НДМА определяли с помощью метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет») в соответствии с рекомендациями [8].

Клетки иммобилизовали в 0,5% теплой ($t_{\text{LMA}}^0=37^{\circ}\text{C}$) легкоплавкой агарозе. Полученную взвесь клеток наносили на подготовленный слайд (1% нормоплавкая агароза на воде), затем клетки лизировали в течение 1 часа при 4°C (2,5 М хлорида натрия, 100 mM EDTA, 10 mM Трис, с добавлением непосредственно перед экспериментом 10% DMSO и 1% Triton X100 (от конечного нужного раствора), pH10). Слайды, содержащие лизат клеток, помещали в щелочной буферный раствор (10 N NaOH и 200 mM EDTA, pH13) на 20 минут для раскручивания спирали ДНК и реализации щелочелавильных сайтов в однонитевые разрывы. Затем проводили электрофорез (0,7В/см, 200мА, 20 мин.). После электрофореза слайды переносили в фиксирующий раствор (70% этиловый спирт) на 10 минут, высушивали при комнатной температуре, в темноте, окрашивали акридиновым оранжевым на основе фосфатно-буферного раствора примерно 2-3 минуты. Флуоресцентный анализ препаратов проводили с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). На каждый препарат рандомизированно анализировали не менее 100 «ДНК-комет», которые фотографировали и подсчитывали процент ДНК в «хвосте «кометы»» с помощью программы TriTek CometScore™. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Win Stat – приложения для Excel. Уровень значимости определяли по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты исследований и их обсуждение

НДМГ в результате острого воздействия на мышей индуцировал в клетках костного мозга хромосомные aberrации с частотой, достоверно превышающей контрольный уровень. Наряду с увеличением уровня aberrантных клеток наблюдалось увеличение числа структурных перестроек на 100 метафаз. Аналогичная картина выявлена и у животных, подвергшихся острому воздействию НДМА. Уровень метафаз с структурными мутациями и число хромосомных перестроек был достоверно выше по сравнению с интактными животными.

Спектр наблюдаемых структурных нарушений хромосом у животных как контрольной, так и опытной групп был представлен перестройками хромосомного и хроматидного типов (рисунок 1).

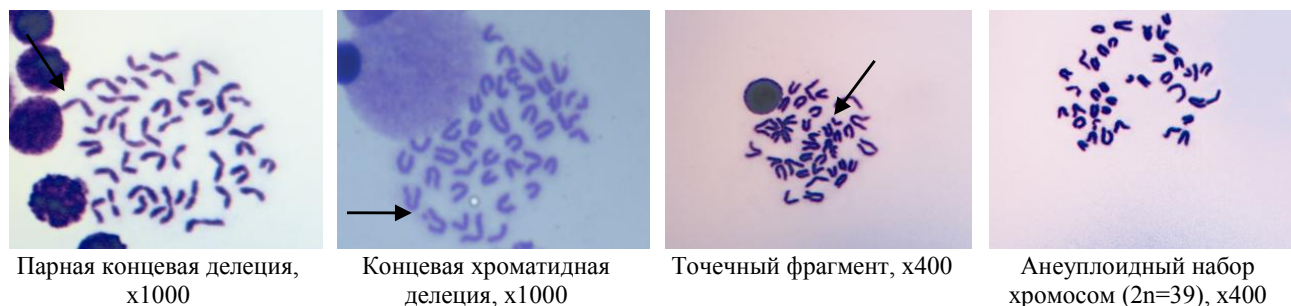


Рисунок 1 – Хромосомные aberrации, индуцированные НДМГ в клетках костного мозга мышей

Среди нарушений хромосомного типа отмечены главным образом парные концевые фрагменты, однако, встречались и единичные центрические кольца. Что касается нарушений хроматидного типа, то они были представлены одиночными концевыми делециями, ацентрическими кольцами и единичными точечными фрагментами.

Наряду со структурными aberrациями хромосом в клетках костного мозга мышей, интоксцированных компонентом ракетного топлива несимметричным диметилгидразином и продуктом его окисления нитрозодиметиламином, были обнаружены и геномные нарушения, которые выражались в появлении анеуплоидных и полиплоидных наборов хромосом. Необходимо отметить, что достоверное увеличение числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз происходило за счет перестроек хроматидного типа.

Подострое воздействие ксенобиотиков на опытных животных в течение 10 дней привело к увеличению как частоты aberrантных клеток, так и числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз. Спектр хромосомных aberrаций также был представлен перестройками хромосомного и хроматидного типов, с превалированием последних. Также наблюдалось увеличение частоты метафаз с геномными мутациями, среди которых превалировали метафазы с полиплоидными наборами хромосом.

Сравнительный анализ результатов цитогенетического исследования интоксцированных НДМГ и НДМА мышей показал, что с увеличением продолжительности и дозы воздействия ксенобиотиков возрастает и уровень индуцированного мутагенеза.

С использованием метода ДНК-комет были определены органы-мишени у экспериментальных животных при интоксикации компонентами

и продуктами распада ракетного топлива. Установлены генотоксические эффекты ксенобиотиков в печени, селезенке, почках и легких опытных животных, проявляющиеся в одностранных разрывах ДНК (рисунок 2). Сравнительный анализ процента ДНК в хвосте кометы показал, что количество низкомолекулярной ДНК в виде одностранных фрагментов, образовавшихся в результате разрывов и реализации щелочлабильных участков ДНК, в исследуемых органах интоксцированных животных достоверно различается.

Полученные результаты свидетельствуют об органоспецифичности генотоксического действия несимметричного диметилгидразина и нитрозодиметиламина. Среди изученных висцеральных органов наибольший процент ДНК в хвосте комет обнаружен в клетках почек, а наименьший – в клетках легких. В целом висцеральные органы интоксцированных животных по чувствительности к ДНК-повреждающему действию изучаемых ксенобиотиков можно расположить в следующем порядке: легкие < селезенка < печень < почки.

Таким образом, в результате проведенного цитогенетического и ДНК-комет исследования установлено, что НДМГ и НДМА при всех дозах и сроках воздействия на экспериментальных

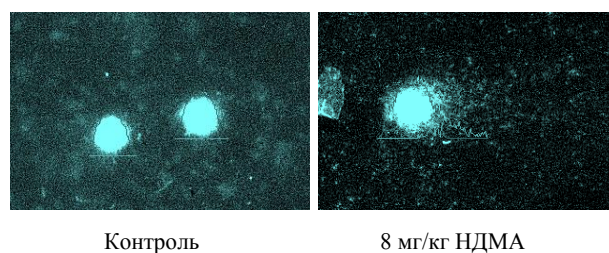


Рисунок 2 – ДНК-кометы клеток печени при различных дозах воздействия НДМА

животных (острое, подострое в течение 10 дней) оказывали выраженный генотоксический эффект, проявившийся в статистически значимом увеличении частоты и спектра абберрантных клеток, общего числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз и уровня полиплоидии по сравнению с интактными животными. Степень мутагенного эффекта изучаемых ксенобиотиков зависела от продолжительности их воздействия. Установлена органоспецифичность генотоксического действия НДМГ и НДМА в висцеральных органах

лабораторных мышей. Наиболее чувствительными к ДНК-повреждающему действию оказались печень и почки. Полученные результаты согласуются с данными ранее проведенных исследований цитогенетического эффекта изучаемых ксенобиотиков на белых беспородных крысах [9-11].

Работа выполнена в рамках грантового проекта МОН РК «Изучение генотоксических эффектов загрязнителей окружающей среды в организме млекопитающих», ГРН0112РК00580, 2012-2014 г.г.

Литература

- 1 Информационный экологический бюллетень. – Алматы, 2003-2013 г.г.
- 2 Экологические проблемы и риски воздействий ракетно-космической техники на окружающую природную среду: справочное пособие / под общ. ред.: В.В. Адушкина, СИ. Козлова, А.В. Петрова. – М.: Анкил, 2000. – С.10-15.
- 3 Айдосова С.С., Ахметова А.Б., Долгова Н.Д., Кенесов Б. Исследование содержания несимметричного диметилгидразина в пробах почв и растений // Вестник КазНУ. Серия химическая. – 2005. – № 1(37). – С.131-134.
- 4 Toxicological profile for hydrazines. – U.S. Department of health and human services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. – 1997. – P.185.
- 5 Lijinsky W. Chemistry and Biology of N-nitroso-compounds. – 2011. – 482 p.
- 6 Графодатский, А.С., Раджабли, С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. – Новосибирск: Наука, 1988. – 127 с.
- 7 Рокицкий Н.А. Введение в статистическую генетику. – Минск: Высшая школа, 1978. – 448 с.
- 8 Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений / Методические рекомендации. – М., 2006.
- 9 Carlsen L., Kenessov B.N., Batrbekova S.Ye., Kolumbaeva S.Zh., Shalakhmetova T.M. Assesment of the mutagenic effect of 1,1-dimethyl hydrazine // Environment Toxicology and Pharmacology. – 2009. – Vol. 28. – P.448-452
- 10 Колумбаева С.Ж., Шалахметова Т.М., Бегимбетова Д.А., Берсимбаев Р.И., Калимагамбетов А.М. Мутагенное действие компонента ракетного топлива несимметричного диметилгидразина на крыс разного возраста // Генетика. – 2007. – Т. 43. – №6. – С. 742-746.
- 11 Колумбаева С.Ж. Генотоксическое действие нитрозодиметиламина на крыс разного возраста // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2008. – №4 (268). – С.30-33.

References

- 1 Informacionnyj jekologicheskij bjulleten'. – Almaty, 2003-2013 g.g.
- 2 Jekologicheskie problemy i riski vozdejstvij raketno-kosmicheskoy tehniky na okruzhajushhuyu prirodnuju sredyu: Spravochnoe posobie / Pod obshh. red. V.V. Adushkina, SI. Kozlova, A.V. Petrova. – M.: Ankil, 2000. – S.10-15
- 3 Ajdosova S.S., Ahmetova A.B., Dolgova N.D., Kenesov B. Issledovanie sodержaniya nesimmetrichnogo dimetilgidrazina v probah pochv i rastenij // Vestnik KazNU. Seriya himicheskaja. – 2005. – № 1(37). – S.131-134.
- 4 Toxicological profile for hydrazines. – U.S. Department of health and human services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. – 1997. – P.185.
- 5 Lijinsky W. Chemistry and Biology of N-nitroso-compounds. – 2011. – 482 p.

6 Grafodatskij, A.S., Radzhabli, S.I. Hromosomy sel'skohozjajstvennyh i laboratornyh mlekoпитajushhih. – Novosibirsk: Nauka, 1988. – 127 s.

7 Rokickij N.A. Vvedenie v statisticheskuyu genetiku. – Minsk: Vyshejschaja shkola, 1978. – 448 s.

8 «Primenenie metoda shhelochnogo gel'-jelektroforeza izolirovannyh kletok dlja ocenki genotoksicheskikh svoystv prirodnyh i sinteticheskikh soedinenij» / Metodicheskie rekomendacii: M. – 2006.

9 Carlsen L., Kenessov B.N., Batrbekova S.Ye., Kolumbaeva S.Zh., Shalakhmetova T.M. Assesment of the mutagenic effect of 1,1-dimethyl hydrazine // Environment Toxicology and Pharmacology. – 2009. – Vol. 28. – P.448-452

10 Kolumbaeva S.Zh., Shalahmetova T.M., Begimbetova D.A., Bersimbaev R.I., Kalimagambetov A.M. Mutagennoe dejstvie komponenta raketnogo topliva nesimmetrichnogo dimetilgidrazina na krys raznogo vozrasta // Genetika.- 2007. – T. 43. – №6.- S. 742-746.

11 Kolumbaeva S.Zh. Genotoksicheskoe dejstvie nitrozodimetilamina na krys raznogo vozrasta // Izvestija NAN RK. Serija biologicheskaja i medicinskaja.- 2008.-№4 (268).- S.30-33.