

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО
И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ДОЗ
НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ**

Томилин Н. В., Филько О. А., Гайкова О. Н., Храброва А. В., Соловьева Н. Е.,

Краснов К. А., Утсаль В. А

ФГБУН ИТ ФМБА России, Санкт-Петербург

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, Тел. (812) 365-06-80;

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Резюме

Цель работы. Исследование механизмов генотоксического и цитотоксического действия НДМА) в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг в течение 7, 14 и 21 сут.

Материалы и методы. Объектами настоящего исследования были лейкоциты и гепатоциты белых крыс. Генотоксическое и цитотоксическое действие НДМА исследовали с помощью метода щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет). Величину окислительного повреждения ядерной ДНК определяли методом ДНК-комет с формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg).

Результаты. Было показано, что генотоксическое действие НДМА на лейкоциты проявляется при введении в дозе 1 мг/кг в течение 7, 14 и 21 сут. При этом количество клеток с высокой степенью повреждения ядерной ДНК (hedgehogs) не менялось. Степень повреждения ядерной ДНК гепатоцитов увеличивалась после введения НДМА в дозе 1 мг/кг в течение 7 сут. Через 14 и 21 сут был получен дозозависимый рост степени повреждения ДНК после введения в дозах 0,1 и 1 мг/кг. Количество hedgehogs резко увеличивалось (в 12 раз) через 21 день введения НДМА в дозе 1 мг/кг.

Окислительное повреждение ядерной ДНК лейкоцитов, обнаружено после введения НДМА через 14 и 21 сут в дозе 1 мг/кг. В гепатоцитах через 7 сут введения НДМА было получено дозозависимое увеличение окислительного действия на ДНК, но достоверным было значение только после введения в дозе 1 мг/кг. После 14 и 21 сут введения НДМА в дозе 1 мг/кг степень окислительного повреждения ДНК возвращалась к контрольному значению, сохраняя тенденцию к увеличению в дозах 0,01 и 0,1 мг/кг.

Закключение. Уменьшение окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов через 14 и 21 сут введения в дозе 1 мг/кг, вероятно, можно объяснить гибелью части гепатоцитов с высокой степенью повреждения ДНК. Это подтверждается результатами морфологических исследований, обнаружившими единичные очаги некроза через 14 сут при введении НДМА в дозе 1 мг/кг и множественные очаги некрозов через 21 сут.

Ключевые слова: генотоксичность, цитотоксичность, лейкоциты, гепатоциты, метод ДНК-комет, формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза

**THE STUDY OF MECHANISMS OF GENOTOXIC AND CYTOTOXIC ACTION
OF LOW DOSES OF NITROSODIMETHYLAMINE IN CHRONIC ADMINISTRATION**

Tomilin N. V., Filko O. A., Gaikova O. N., Khrabrova A. V., Solovyeva N. E.,
Krasnov K. A., Utsal V. A.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency

St. -Petersburg, Russia, 192019, ul. Bekhtereva, 1 Tel. (812) 365-06-80,

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Abstract

The aim of study. This study is to explore the mechanisms of the genotoxic, cytotoxic and oxidative effects of nitrosodimethylamine (NDMA) in doses of 0,01, 0,1 and 1 mg/kg for 7, 14 and 21 days.

Materials and methods. The objects of this study were leukocytes and hepatocytes of white rats. Genotoxic and cytotoxic effects of NDMA were investigated by the alkaline gel electrophoresis method (Comet assay). The oxidative damage of nuclear DNA was determined by comet assay with formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (Fpg).

Results. It is shown that the genotoxic effect of NDMA on leukocytes appears when administered at a dose of 1 mg/kg for 7, 14, and 21 days. The number of “hedgehogs” did not change. An increase of nuclear DNA damage of hepatocytes was first obtained with the administration of NDMA at a dose of 1 mg/kg for 7 days. After 14 and 21 days, a dose-dependent increase of DNA damage was found after administration at doses of 0,1 and 1 mg/kg. The number of “hedgehogs” increased dramatically (12 times) after 21 days of administration at a dose of 1 mg/kg.

The oxidative effect on the nuclear DNA of leukocytes was revealed after administration of NDMA after 14 and 21 days at a dose of 1 mg/kg. A dose-dependent increase of the oxidizing DNA damage in hepatocyte was obtained after 7 days of NDMA administration, but the difference was significant only after administration at a dose of 1 mg/kg. After 14 and 21 days of administration of NDMA at a dose of 1 mg/kg, the degree of oxidative DNA damage returned to the control value, while maintaining a tendency to increase in doses of 0,01 and 0,1 mg/kg.

Conclusion. The decrease in oxidative damage to hepatocyte nuclear DNA after 14 and 21 days of administration at a dose of 1 mg/kg can probably be explained by the death of some hepatocytes with a high degree of DNA damage. This is confirmed by morphological studies that revealed the appearance of a single foci of necrosis after 14 days of administration of NDMA at a dose of 1 mg/kg, and a multiple foci of necrosis after 21 days.

Key words: genotoxicity, cytotoxicity, leukocytes, hepatocytes, Comet assay, formamidopyrimidine DNA glycosylase

ВВЕДЕНИЕ

Нитрозодиметиламин (НДМА, CAS 62-75-9) высокотоксичный гепатотоксикант и канцероген. Согласно классификации IARC он относится к группе 2а, вероятно, является канцерогенным для человека [1]. Широкое распространение НДМА требует использования специальных методов для диагностики его токсического действия, особенно для людей, профессионально связанных с действием этого токсиканта [2, 3].

НДМА также применяют в качестве реагента для промышленного синтеза гептила (1,1-диметилгидразина, НДМГ), который используется в качестве жидкого топлива в ракетно-космической отрасли. НДМА всегда содержится в продуктах распада НДМГ под действием влаги и кислорода окружающего воздуха [4].

Механизмы токсического действия НДМА достаточно хорошо изучены. Известно, что НДМА представляет собой генотоксикант непрямого действия и требует метаболической активации цитохром Р450-зависимыми монооксигеназами (СYP2E1) в печени млекопитающих, после которой образуется реактивный метильный радикал [5].

Кроме того, в результате биотрансформации НДМА, преимущественно в печени, образуются активные формы кислорода (АФК), в частности гидроксильные радикалы. Таким образом, НДМА – прооксидант, он повреждает ядерную ДНК гепатоцитов вследствие повышенного уровня окислительного стресса в клетках печени [6, 7].

Совместное алкилирующее и окислительное действие токсических доз НДМА на гепатоциты вызывает гибель клеток печени в результате апоптоза с последующим развитием центролобулярных некрозов гепатоцитов, повреждение эндотелия синусоидального пространства и, как следствие, появление локальных геморрагий, нарушений трабекулярной структуры печени и развитие фиброза [8, 9, 10].

Механизмы токсического действия НДМА в субтоксических дозах изучены недостаточно. Поэтому целью настоящей работы была оценка генотоксического и цитотоксического действия НДМА на лейкоциты периферической крови и гепатоциты белых крыс в дозах 0,01, 0,1 и 1,0 мг/кг в течение 7, 14 и 21 сут с помощью метода ДНК-комет, а также оценка величины оксидативного стресса с использованием фермента репарации азотистых оснований формамидопирин-ДНК-гликозилазы (Fpg).

Материалы и методы

В исследовании использовались беспородные самцы белых крыс массой 180–220 г.

НДМА вводили ежедневно внутривбрюшинно в течение трех недель в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг. Животные контрольной группы вместо НДМА получали дистиллированную воду в соответствии с массой тела. Каждая группа содержала не менее пяти животных.

После 7, 14 и 21-дневного введения у животных из хвостовой вены забирали по 0,25 мл крови в пробирки с К₃ЭДТА. Аликвоту 0,1 мл смешивали с равным объемом фосфатно-солевого раствора Дюльбекко (ФСР) без кальция и магния с 20% ДМСО и замораживали в низкотемпературном морозильнике при температуре –70° С.

Затем крыс подвергали эвтаназии с помощью метода цервикальной дислокации. Для получения суспензии гепатоцитов кусочки (массой 150–200 мг) вырезали из левой доли печени, и измельчали их специальными ножницами в 0,8 мл охлажденного ФСР с 10% ДМСО и 20 мМ Na₂ЭДТА, pH 7,4 при температуре 0–+4° С.

20 мкл суспензий гепатоцитов заключали в 150 мкл 0,5%-ной агарозы (с низкой температурой гелеобразования), растворенной в ФСР. Затем аликвоту суспензии объемом 30 мкл монтировали на предметные стекла, предварительно покрытые 0,75%-ной рутинной агарозой.

Полученные препараты с гепатоцитами помещали в лизисный раствор на один час и подвергали электрофорезу при pH 13,5 в течение 30 мин при токе 300 мА и напряжении 15 В.

Клетки крови размораживали на второй день, изготавливали препараты, выполняли лизис и электрофорез. В этом случае использовали аликвоту объемом 10 мкл на 150 мкл агарозы.

Полученные препараты окрашивали бромистым этидием и анализировали с помощью микроскопа с флуоресцентной приставкой Nikon Eclipse 50i и программы Comet IV. В качестве основного параметра, определяющего степень повреждения ДНК, использовали относительное содержание ДНК в хвосте кометы.

Для определения цитотоксического действия подсчитывали число hedgehogs, степень повреждения ДНК которых не могла быть корректно определена программой.

Величину окислительного повреждения ядерной ДНК определяли с помощью фермента эксцизионной репарации ДНК – формамидпирингликозилазы (Fpg, M024L, New England BioLabs), 8000 ед/мл [11].

Приготовленные препараты лейкоцитов и гепатоцитов после лизиса трижды отмывали в буфере 40 мМ HEPES, 0,1 М KCl, 0,5 мМ EDTA, 0,2 мг/мл BSA, pH 8,0 при

$t = 4^{\circ} \text{C}$. Избыток буфера с предметных стекол удаляли фильтровальной бумагой, и помещали по четыре стекла в чашки Петри диаметром 150 мм с предварительно увлажненной фильтровальной бумагой. На каждое пятно с заключенными в агарозу клетками помещали 50 мкл буфера с Frg, разбавленной в 1000 раз (8 ед/мл), и быстро закрывали препарат покровным стеклом 20x20 мм. Чашки Петри с препаратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин.

В качестве контроля служили параллельные препараты, которые инкубировали при 37°C в течение 30 мин в буфере без добавления Frg.

После инкубации препараты переносили в камеру для электрофореза, выдерживали в электрофорезном растворе pH 13,5 в течение 30 мин для раскручивания ДНК. Электрофорез выполняли в течение 30 мин при токе 300 мА и напряжении 15 В.

Величина окислительного действия рассчитывалась как разница относительного содержания ДНК в хвосте кометы после инкубации в буфере с ферментом и в буфере без добавления фермента.

Степень содержания ядерной ДНК в хвосте кометы оценивали с помощью компьютерной программы Comet Assay IV.

Кометам с высокой степенью повреждения (hedgehogs), которые нельзя было правильно проанализировать с помощью программы, присваивали фиксированную величину содержания ДНК в хвосте кометы равную 90 % [12].

Для патоморфологических исследований токсического действия НДМА фиксировали печень трех животных из каждой группы. Вырезанные кусочки из левой доли печени каждого животного фиксировали 10 %-ным забуференным формалином и заливали в парафин. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, и после заключения под пленку исследовали под микроскопом Leica DM1000.

Статистический анализ выполняли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики.

Достоверность различий данных о величине повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах и гепатоцитах крыс между контрольными и экспериментальными группами оценивали с помощью непараметрического теста Манн-Уитни. Дозозависимое действие определяли с помощью критерия Джонкхиера-Терпстры.

Сравнение относительного содержания hedgehogs осуществляли с помощью параметрического критерия Стьюдента. Зависимость эффекта от величины дозы проверяли по линейному тренду (One-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования генотоксического и цитотоксического действия НДМА на лейкоциты периферической крови

В результате исследований было установлено, что величина повреждения ядерной ДНК лейкоцитов в крови белых крыс достоверно увеличивалась после введения НДМА в течение 7, 14 и 21 суток в дозе 1 мг/кг. Количество hedgehogs при этом не менялось.

Это означает, что генотоксическое действие на ядерную ДНК лейкоцитов проявляется при введении в дозе 1 мг/кг НДМА уже через 7 суток введения. При этом цитотоксическое действие НДМА отсутствовало (рисунок 1).

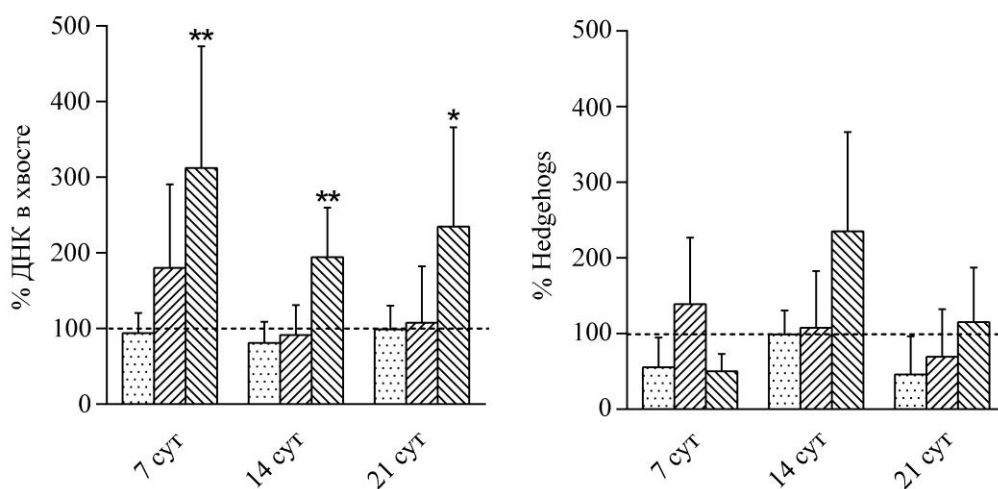


Рис. 1. Степень повреждения ядерной ДНК лейкоцитов (слева) и содержание hedgehogs (справа) в крови белых крыс через 7, 14 и 21 день после введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг.

Отрезки на всех рисунках обозначают стандартное отклонение.

*, ** – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно, критерий Манн-Уитни)

Изменения величины повреждения ядерной ДНК гепатоцитов и содержания клеток с высокой степенью повреждения представлены на рисунке 2.

Степень повреждения ядерной ДНК гепатоцитов не менялась при введении НДМА в течение трех недель в дозе 0,01 мг/кг. Введение НДМА в дозах 0,1 и 1 мг/кг через две и три недели приводит к достоверному дозозависимому росту степени повреждения ДНК ядер гепатоцитов.

Количество hedgehogs резко увеличивалось через три недели введения НДМА в дозе 1 мг/кг, что свидетельствует о его цитотоксическом действии (рис. 2).

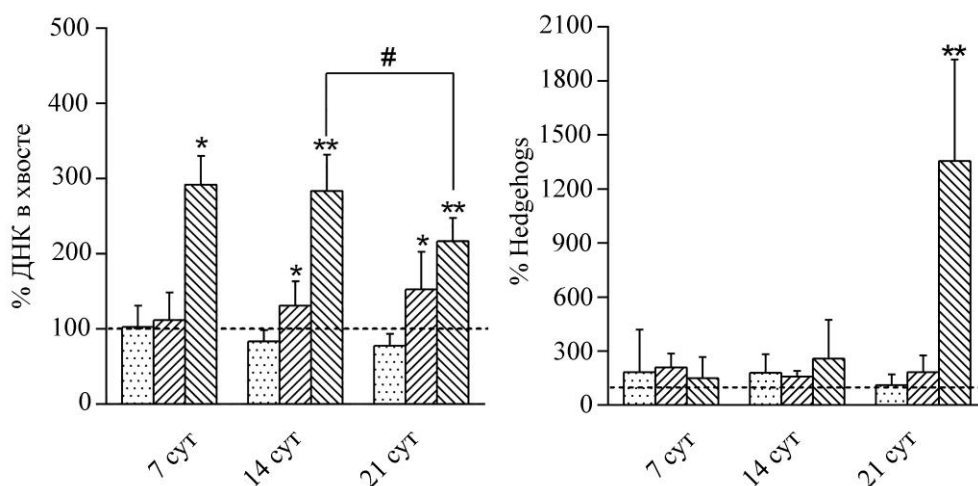


Рис. 2. Степень повреждения ядерной ДНК гепатоцитов (слева) и содержание hedgehogs (справа) белых крыс через 7, 14 и 21 сут после введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг.

*, ** – Достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, критерий Манн-Уитни)

Интересно отметить достоверное снижение степени повреждения ядерной ДНК гепатоцитов через три недели введения НДМА в дозе 1 мг/кг по сравнению с этой величиной через одну и две недели (рис. 2). Это, по-видимому, объясняется гибелью клеток с высокой степенью повреждения ядерной ДНК апоптозом.

Результаты исследования окислительного действия НДМА на ядерную ДНК лейкоцитов периферической крови

На рис. 3 представлены результаты оценки степени окислительного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов белых крыс после 7 сут введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг.

Увеличения окислительного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов после введения НДМА в течение 7 сут при всех испытанных дозах не было обнаружено (рис. 3).

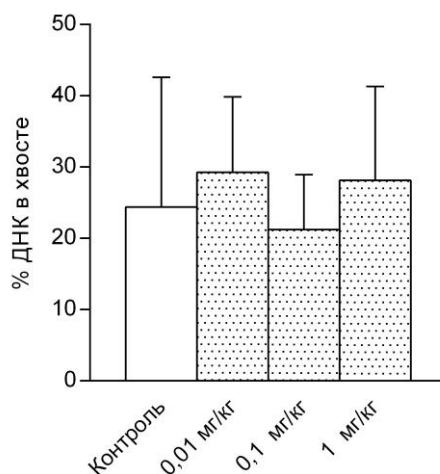


Рис. 3. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов через 7 сут. после введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг

Через 14 сут введения НДМА в дозе 1 мг/кг обнаружено достоверное увеличение степени окислительного повреждения ДНК после инкубации препаратов лейкоцитов с Fpg, свидетельствующее об увеличении внутриклеточной концентрации АФК (рис. 4).

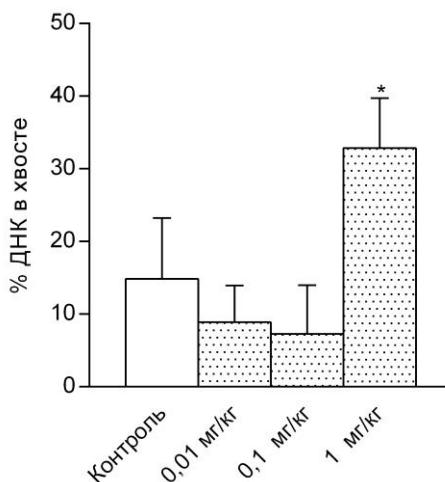


Рис. 4. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов после 14 сут введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг.

* – Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$, критерий Манн-Уитни)

Сходные изменения сохранялись после трехнедельного введения НДМА, что может означать достижение определенного динамического равновесия между процессами метилирования, окислительного действия и репарации на ядерной ДНК лейкоцитов после введения НДМА в дозе 1 мг/кг (рис. 5).

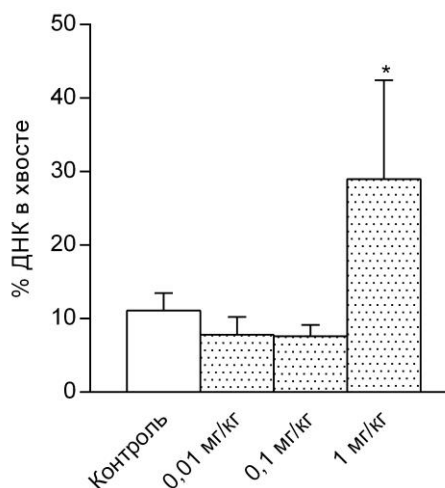


Рис. 5. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК лейкоцитов через 21 сут после введения НДМА.

* – Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$, критерий Манн-Уитни)

Результаты исследования окислительного действия НДМА на ядерную ДНК гепатоцитов

Введение НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг в течение 7 сут вызывало дозозависимое увеличение окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов (рис. 6).

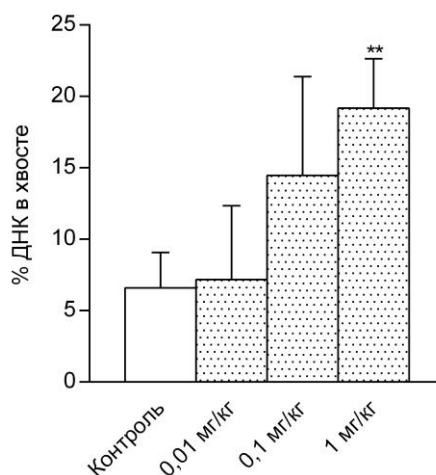


Рис. 6. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов через 7 сут введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг.

** – Достоверное отличие от контроля ($p < 0,01$, критерий Манн-Уитни)

После введения НДМА на протяжении 14 и 21 сут сохранялась тенденция к увеличению окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов, если дозы составляли 0,01 и 0,1 мг/кг, а при 1 мг/кг степень повреждения ядерной ДНК неожиданно снижалась до контрольной величины (рис. 7 и 8).

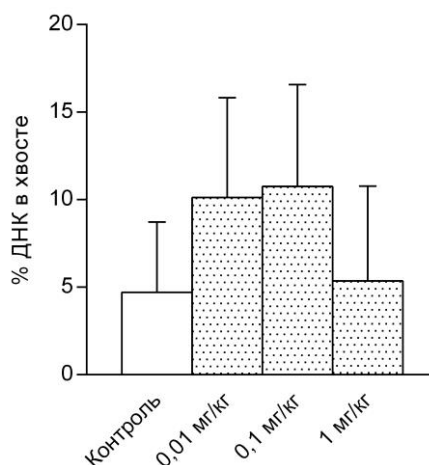


Рис. 7. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов через 14 сут введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг

Это может быть связано с гибелью клеток и/или с адаптивной активацией системы репарации. Нельзя также исключить возможность цитотоксического действия, когда часть клеток с высокой степенью повреждения ДНК погибает в результате апоптоза/некроза или переходит в состояние, характеризующееся устойчивостью к апоптозу и ингибированием пролиферации [13]. Это предположение также подтверждается снижением степени повреждения ядерной ДНК гепатоцитов после 21 дня введения НДМА в дозе 1 мг/кг по сравнению со степенью повреждения ДНК после 14 сут введения в этой дозе (рис. 2) и одновременным увеличением содержания hedgehogs.

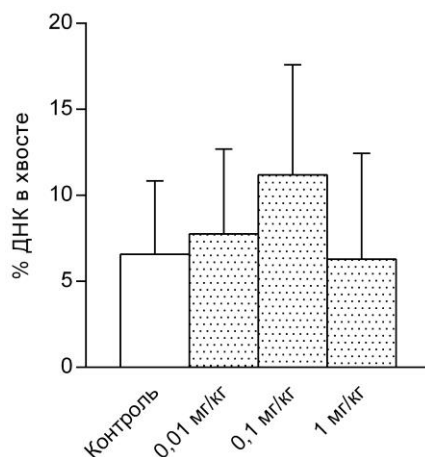


Рис. 8. Степень окислительного повреждения ядерной ДНК гепатоцитов через 21 сут введения НДМА в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг

Патоморфологические исследования выявили через 21 сут введения НДМА в дозе 0,1 мг/кг отдельные очаги некрозов гепатоцитов, а при дозе 1 мг/кг – множественные очаги некрозов (рис. 9). В морфологических исследованиях апоптоз гепатоцитов не был обнаружен.

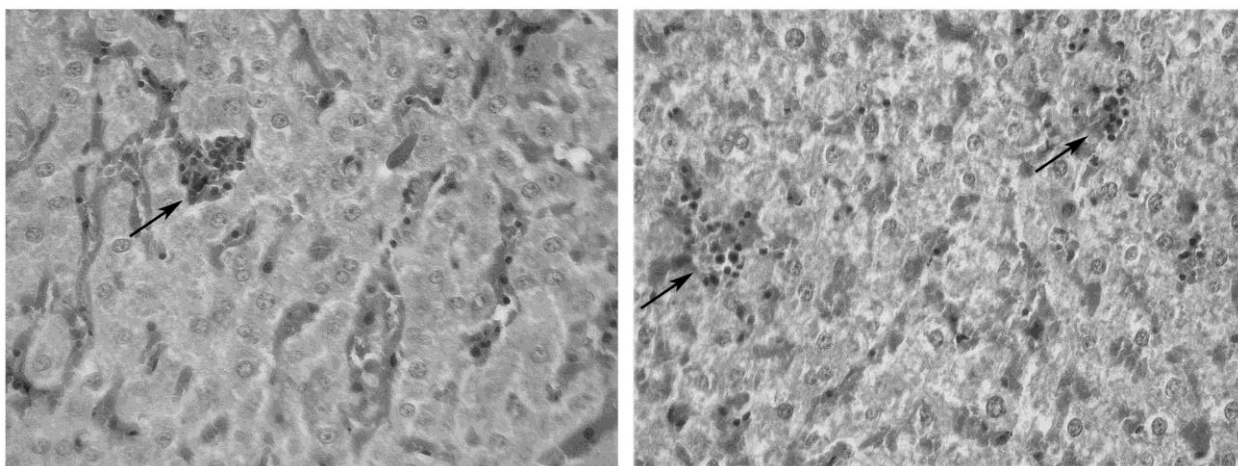


Рис. 9. Участки печени белых крыс через 21 сут введения НДМА в дозе 0,1 (слева) и 1 мг/кг (справа)

Окраска гематоксилин-эозином. Стрелки указывают на очаги некроза. Объектив 40х

Из литературы и наших собственных данных известно, что при введении гепатотоксикантов в низких дозах апоптозы сначала можно обнаружить только по появлению апоптотических тел в гепатоцитах. Апоптоз гепатоцитов наблюдается после введения НДМА в более высоких дозах [14, 15]. Поэтому можно предположить, что апоптоз и/или некроз отдельных гепатоцитов начинается после 14 сут действия НДМА в дозе 1 мг/кг, когда достигается критический уровень повреждения ядерной ДНК, что связано с аддитивным алкилирующим и окислительным действием токсиканта.

Литература

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. – Lyon, 1987. – 68 p.
2. N-Nitrosodimethylamine in drinking-water // Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. – Geneva, Switzerland, 2008. – 29 p.
3. Пособие по токсикологии, гигиене, химии, индикации, клинике, диагностике острых и хронических интоксикаций и профилактике профессиональных заболеваний при работе с несимметричным диметилгидразином // Под общей редакцией М. Ф. Киселева, В. Р. Рембовского, В. В. Романова. – СПб., 2009. – 249 с.
4. Смоленков А. Д., Родин И. А., Смирнов И. А., Татаурова О. Г., Шпигун О. А. Применение ионной и ион-парной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для определения несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. – Химия, 2012. – Т. 53 (5). – С. 312-319.
5. Lee V. M., Keefer L. K., Archer M. C. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and alpha-hydroxylation in the hepatotoxicity of N-Nitrosodimethylamine // Chem Res Toxicol. – 1996. – Vol. 9 (8). – P. 1319-1324.
6. Arranz N., Haza A. I., Garcia A., Rafter J., Morales P. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay // Tox. in Vitro. – 2007. – Vol. 21. – P. 1311–1317.
7. Chin W., Lee V. M., Archer M. C. Evidence that the hepatotoxicity of N-Nitrosodimethylamine in the rat is unrelated to DNA methylation // Chem. Res. Toxicol. – 1993. – Vol. 6. – P. 372-375.
8. Pritchard D. J., Butler W. H. Apoptosis-the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity // Hepat. J. Pathology. – 1989. – Vol. 158. – P. 253-260.
9. Shikata N., Oyaizu T., Senzaki H., UEMURA Y., Tsubura A. Liver apoptosis after dimethylnitrosamine administration in shrews // Exp. Toxic. Pathol. – 1996. – Vol. 48. – P. 307-311.
10. George J., Rao K. R., Stern R., Chandrakasan G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen // Toxicology. – 2001. – Vol. 156. – P. 129–138.
11. Trzeciak A. R., Mohanty J. G., Jacob K. D., Barnes J., Ejiogu N., Lohani A., Zonderman A. B., Rifkind J., Evans M. K. // Oxidative damage to DNA and single strand break repair capacity: relationship to other measures of oxidative stress in a population cohort – Mutat Res. – 2012 – Vol 736 – P. 93–103.
12. Koppen G., Azqueta A., Pourrut B., Brunborg G., Collins A. R., Sabine A. S. Langie S. A. S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop // Mutagenesis. – 2017. – Vol. 32. – P. 397–408.

13. Prokhorova E. A., Zamaraev A. V., Kopeina G. S., Zhivotovsky B., Lavrik I. N. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72. – P. 4593–4612.

14. Takashima R., Takasawa H., Kawasako K., Ohyama W., Okada E., Narumi K., Fujiishi Y., Wako Y., Yasunaga K., Hattori A., Kawabata M., Nakadate K., Nakagawa M., Hamada S. Evaluation of a repeated dose liver micronucleus assay in rats treated with two genotoxic hepatocarcinogens, dimethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene: The possibility of integrating micronucleus tests with multiple tissues into a repeated dose general toxicity study // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2015. – Vol. 780-781. – P. 18-24.

15. Томилин Н. В., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е., Утсаль В. А., Луговкина Н. В. Экспериментальная оценка генотоксического действия несимметричного диметилгидразина при однократном и субхроническом введении белым крысам // *Материалы II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения, профессионально обусловленных заболеваний»* Сочи, 2014. – С. 340-342.