

УДК 575.224.46

¹А.В. Ловинская*, ¹З.Б. Алимова, ¹А.Б. Касен, ¹Д.Б. Амержанова, ¹С.Ж. Колумбаева, ²С.К. Абилов, ¹Н.В. Воронова

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

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия,

*e-mail: annalovinska@rambler.ru

Органоспецифичность мутагенного действия химических загрязнителей окружающей среды

В результате проведенных исследований с помощью высокочувствительного метода ДНК-комет на лабораторных мышах установлена генотоксичность несимметричного диметилгидразина, нитрозодиметиламина и фипронил. Генотоксические эффекты проявлялись в одностранных разрывах ДНК в клетках легких, селезенки, печени и почках. С увеличением дозы изучаемых веществ наблюдалось усиление их ДНК-повреждающего эффекта. Установлена различная чувствительность висцеральных органов к генотоксическому действию ксенобиотиков.

Ключевые слова: фипронил, несимметричный диметилгидразин, нитрозодиметиламин, разрывы ДНК, органоспецифичность, генотоксичность

А.В. Ловинская, З.Б. Алимова, А.Б. Касен, Д.Б. Амержанова, С.Ж. Колумбаева, С.К. Абилов, Н.В. Воронова

Қоршаған орта ластағыштарының мутагендік әсерінің органикалық ерекшелігі

Зертханалық тышқандарын жоғары сезімталдық ДНК-комет әдісі көмегімен зерттеу жұмыстарының нәтижесінде симметриялық емес диметилгидразин, нитрозодиметиламин және фипронил генетикалық уыттылығы анықталды. Генотоксикалық әсерлер өкпе, көк бауыр, бауыр және бүйрек жасушаларының ДНК біржіптік ажырауында айқындалған. Зерттеліп жүрген заттар мөлшері көбеюімен, олардың ДНК бұзу әсерінің күшейтуі анықталған. Ксенобиотиктердің генотоксикалық әсеріне висцералдық мүшелердің түрлі сезгіштігі қойылған.

Негізгі сөздер: фипронил, симметриялық емес диметилгидразин, нитрозодиметиламин, ДНК ажырауы, органикалық ерекшелігі, генетикалық уыттылығы

A. V. Lovinskaya, Z. B. Alimova, A. B. Kasen, D. B. Amerzhanova, S. Zh. Kolumbayeva, S. K. Abilev, N. V. Voronova

Organ specific mutagenic effects of chemical pollutants

The studies using highly sensitive comet assay in mice detected genotoxicity of unsymmetrical dimethylhydrazine, N-nitrosodimethylamine and fipronil. Genotoxic effects were in DNA single-strand breaks in cells of the lung, spleen, liver and kidneys. As the dose of this contaminants increases were raised their DNA-damaging effect. It is established the different sensitivity of visceral organs to genotoxic effects of xenobiotics.

Keywords: fipronil, unsymmetrical dimethylhydrazine, N-nitrosodimethylamine, DNA breaks, organ specificity, genotoxicity

В условиях высокой экологической напряженности, когда 80% вредных веществ, поступающих в окружающую среду, обладают мутагенными и канцерогенными свойствами, особое значение приобретает генетический мониторинг. Целью генетического мониторинга является получение информации об изменениях наследственных признаков, необходимой и достаточной для принятия решений о мерах по защите генофонда от мутагенных и канцерогенных факторов окружающей среды, ослаблению их действия и

предупреждению еще не выявленных последствий [1].

Появлению новых экологически опасных факторов, негативно влияющих на состояние окружающей среды и здоровье человека способствует космическая индустрия. Результаты российских и казахстанских комплексных экспедиционных работ на местах падения остаточных частей космических ракет свидетельствуют о наличии компонента ракетного топлива несимметричного диметилгидразина (НДМГ) и продукта его

окисления нитрозодиметиламина (НДМА) в почве, воде и растениях в концентрациях, превышающих ПДК. В литературе недостаточно сведений о генотоксическом потенциале указанных ксенобиотиков, но хорошо известны их токсические эффекты [2-4]. Поэтому исследование генотоксического потенциала компонентов ракетного топлива представляет несомненную актуальность.

Повсеместное использование пестицидов для борьбы с вредителями сельского хозяйства стало причиной загрязнения окружающей среды синтетическими химикатами, многие из которых обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Однако их использование в настоящее время экономически оправданно. Широкое применение получили пестициды на основе фипронила. В настоящее время ФАО включило его в качестве основного препарата для борьбы с пустынной саранчой [5]. Действующее вещество фипронил является основой таких препаратов, используемых в Казахстане, как регент и адонис [6]. Ранее были показаны генотоксические эффекты фипронила на лабораторных животных в цитогенетических тестах [7, 8]. Однако сведений об органоспецифичности у млекопитающих к его генотоксическому действию отсутствуют.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось изучение органоспецифичности ДНК-повреждающего действия компонента ракетного топлива НДМГ, продукта его окисления НДМА, а также действующего вещества ряда пестицидов фипронила на лабораторных грызунов.

Материалы и методы

Объектами исследования явились висцеральные органы лабораторных мышей. В качестве исследуемых на генотоксичность веществ были использованы водные растворы несимметричного диметилгидразина (НДМГ), нитрозодиметиламина (НДМА) и фипронила.

В экспериментах было использовано 35 мышей линии *BALB/cYwal* в возрасте 2-3-х месяцев с массой тела 20-25 г, разделенных на 7 групп по 5 особей в каждой: I – интактные животные; II-III – животные с 4-часовой экспозицией НДМГ в дозе 13,2 мг/кг и 26,4 мг/кг; IV- V группа – животные с 4-часовой экспозицией НДМА в дозе 8,0 мг/кг и 4,0 мг/кг;

VI-VII – животные с 6-часовой экспозицией фипронила в дозах 4,75 мг/кг и 9,50 мг/кг.

Дозировки ксенобиотиков были выбраны исходя из имеющихся сведений о ЛД₅₀ = 132 мг/кг НДМГ, 40 мг/кг НДМА, 95 мг/кг фипронила при внутрибрюшинном введении для мышей [9, 10]. Животных забивали под изофлурановым наркозом, забирали образцы висцеральных органов (печень, почки, селезенку, легкие) для исследования ДНК с помощью метода ДНК-комет. Содержание и уход за лабораторными животными осуществляли в соответствии с международными принципами [11]. Генотоксические свойства изучаемых веществ определяли с помощью метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет», Comet assay). Приготовление материала для анализа проводили по методическим рекомендациям «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» [12].

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, затем подсчитывали процент ДНК в «хвосте «кометы»» с помощью программы TriTek CometScore™. Показатель «% ДНК в хвосте кометы» отражает количество низкомолекулярной ДНК в виде одонитевых фрагментов, образовавшихся в результате разрывов и реализации щелочеллабильных участков ДНК и мигрировавших в сторону анода при электрофорезе. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Win Stat - приложения для Excel. Уровень значимости определяли по U-критерию Манна-Уитни. Показателем выраженного генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), превышающий 2.

Результаты и их обсуждение

Несимметричный диметилгидразин при интоксикации лабораторных животных индуцировал одонитевые разрывы ДНК в клетках висцеральных органов.

У интактных животных (контрольная группа) содержание ДНК в «хвосте кометы» составило $1,15 \pm 0,07\%$ (легкие), $0,96 \pm 0,06\%$ (селезенка), $1,23 \pm 0,07\%$ (почки), $1,51 \pm 0,06\%$ (печень). При введении животным НДМГ в дозах 13,2 мг/кг и 26,4 мг/кг уровень поврежденной ДНК в клетках достоверно возрос и составил соответственно вводимым дозам $5,61 \pm 0,26\%$ и $6,29 \pm 0,25\%$ (легкие), $4,56 \pm 0,15\%$ и $5,45 \pm 0,12\%$ (селезенка), $7,59 \pm 0,56\%$ и $8,16 \pm 0,62\%$ (почки), $6,53 \pm 0,21\%$ и $7,71 \pm 0,28\%$ (печень). При интоксикации животных НДМГ в дозе 13,2 мг/кг индекс повреждения в легких составил 4,88; в селезенке – 4,75; в почках – 6,17, а в печени – 4,32. При воздействии ксенобиотика в дозе 26,4 мг/кг ИП составил в легких – 5,47, в селезенке – 5,68; в почках – 6,63 и в печени – 5,11.

Сравнительный анализ процента ДНК в хвосте кометы в клетках различных висцеральных органов мышей, интоксигированных НДМГ, выявил зависимость уровня повреждения ДНК от дозы препарата. При интоксикации животных НДМГ в дозе 26,4 мг/кг по сравнению с дозой 13,2 мг/кг процент ДНК в хвосте кометы возрос в печени в 1,18; в легких - 1,12 и в селезенке - 1,20, $p < 0,001$, в то время как в почках наблюдаемое увеличение было статистически не достоверным.

Нитрозодиметиламин при интоксикации лабораторных животных также индуцировал однонитевые разрывы ДНК в клетках висцеральных органов.

При введении животным НДМА в дозах 4,0 мг/кг и 8,0 мг/кг уровень поврежденной ДНК в клетках достоверно возрос и составил соответственно вводимым дозам $6,17 \pm 0,18\%$ и $9,12 \pm 0,21\%$ (легкие), $6,62 \pm 0,18\%$ и $12,15 \pm 0,19\%$ (селезенка), $9,97 \pm 0,41\%$ и $17,40 \pm 0,51\%$ (почки), $10,47 \pm 0,35\%$ и $18,92 \pm 0,86\%$ (печень). При интоксикации животных НДМА в дозе 4,0 мг/кг индекс повреждения ДНК в клетках легких составил 5,37; в селезенке – 6,90; в почках – 8,11, а в печени – 6,93. При воздействии ксенобиотика в дозе 8,0 мг/кг ИП составил в легких – 7,93, в

селезенке – 12,66; в почках – 14,15 и в печени – 12,53.

При интоксикации лабораторных мышей НДМА также была выявлена зависимость уровня повреждения ДНК от используемой дозы. НДМА в дозе 8,0 мг/кг увеличил процент ДНК в хвосте кометы по сравнению с дозой 4,0 мг/кг в печени в 1,81; в легких - 1,48, в селезенке - 1,84 и в почках - 1,75; $p < 0,001$ (рисунок).

Особый интерес представляет выявление органоспецифического эффекта действия пестицидов при малых дозах, приближенных к рассеиванию в природных условиях. Поэтому нами были также изучены генотоксические эффекты малых доз фипронила.

При введении животным фипронила в дозах 4,75 мг/кг и 9,50 мг/кг уровень поврежденной ДНК в клетках достоверно возрос и составил соответственно вводимым дозам $1,46 \pm 0,08\%$ и $1,68 \pm 0,07\%$ (легкие), $1,38 \pm 0,07\%$ и $2,18 \pm 0,10\%$ (селезенка), $1,36 \pm 0,05\%$ и $1,54 \pm 0,07\%$ (печень). При интоксикации животных фипронилом в дозе 4,75 мг/кг индекс повреждения ДНК в клетках легких составил 1,67; в селезенке – 1,20, а в печени – 1,18. При воздействии ксенобиотика в дозе 9,50 мг/кг ИП составил в легких – 1,92, в селезенке – 1,89 и в печени - 1,34. При увеличении дозы фипронила с 4,75 мг/кг до 9,50 мг/кг статически значимое увеличение уровня повреждения ДНК наблюдалось только в клетках селезенки и увеличилось в 1,58 раза.

В результате проведенных исследований с помощью высокочувствительного метода ДНК-комет на лабораторных мышах установлена генотоксичность несимметричного диметилгидразина, нитрозодиметиламина и фипронила. Генотоксические эффекты проявлялись в однонитевых разрывах ДНК в клетках легких, селезенки, печени и почках. С увеличением дозы изучаемых веществ наблюдалось усиление их ДНК-повреждающего эффекта. Установлена различная чувствительность висцеральных органов к генотоксическому действию ксенобиотиков.

Литература

- 1 Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. высш. проф. образования / С.А. Гераськин, Е.И. Сарапульцева, Л.В. Цаценко и др.; под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарапульцевой. – М.: Издательский центр «Академия», 2010. – 208 с.
- 2 Лупандин В.М. О загрязнении окружающей среды и состоянии здоровья населения в районах ракетно-космической деятельности // Сборник трудов «Социально-экологические последствия ракетно-космической деятельности». – М., 2000. - С.100-105.
- 3 Экологические проблемы и риски воздействий ракетно-космической техники на окружающую природную среду: Справочное пособие / под общ. ред. В.В. Адушкина, С.И. Козлова, А.В. Петрова. – М.: Анкил, 2000. - С.10-15.
- 4 Шойхет Я.Н. Заболеваемость населения территорий, прилегающих к районам падения отделяющихся частей ракет-носителей. –Барнаул, 2005.–188 с.
- 5 Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А./ Под ред. профессора С.Я Попова. Основы химической защиты растений. - М.: Арт-Лион, 2003. - 208 с.
- 6 DPR. Pesticide Use Report. Annual 1995. Indexed by Chemical and by Crop. Sacramento, CA: Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency; 1996.- 661p.
- 7 Kolumbaeva S.Zh., Begimbetova D.A., Kalimagambetov A.M., Lovinskaya A.V. Mutagenic effects of phenylpirazole pesticides // Материалы Всекитайской конференции по современной генетике. – Урумчи, Китай, 2011. - С. 310.
- 8 Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А. Мутагенные эффекты загрязнителей окружающей среды. – Алматы: Казак университети, 2013. – 196 с.
- 9 Lijinsky W. Chemistry and Biology of N-nitroso-compounds. – 2011: Cambridge Monographs on Cancer Research. - 482 p.
- 10 Белан С.Р., Грапов А.Ф., Мельникова Г.М. Новые пестициды. Справочник. - М.: «Грааль», 2001.- 196с.
- 11 Guide for the care and use of laboratory animals: Eight Education. - The National Academies Press, 2011. – 246 p.
- 12 «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» / Методические рекомендации: М., 2006. - 15 с.