

УДК 575.224.23:599.323.4

С.Ж. КОЛУМБАЕВА

## ГЕНТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОЗОДИМИЛАМИНА НА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

(НИИ проблем экологии КазНУ имени аль-Фараби)

Изучено генотоксическое действие нитрозодиметиламина (НДМА) на крыс разного возраста. Установлено, что НДМА при подостром ингаляционном воздействии оказал генотоксический эффект, увеличив частоту aberrантных клеток. Индуцированные НДМА структурные нарушения хромосом были представлены всеми типами перестроек с преобладанием aberrаций хроматидного типа. Уровень индуцированного мутагенеза зависел от концентрации ксенобиотика и возраста животных.

Загрязнение окружающей среды мутагенными соединениями, как известно, может увеличить частоту неблагоприятных наследственных изменений и способствовать резкому возрастанию генетического груза в популяциях живых организмов /1, 2/. В результате этого увеличивается частота нарушений эмбрионального и постнатального развития животных и человека. Кроме того, воздействие мутагенных факторов на соматические клетки человека может привести к развитию злокачественных новообразований и гибели организма /3/. Значимость указанных проблем в связи с глобальными экологическими изменениями среды обитания очевидна. Однако следует отметить недостаточную изученность мутагенного, токсического и канцерогенного влияния многих распространенных ксенобиотиков. Одними из опасных загрязнителей ОС является нитрозодиметиламин (НДМА), который широко распространен в окружающей среде вследствие большого количества источников и способности перемещаться на большие расстояния. НДМА применяется в производстве каучука, при дублении кож, обработке продовольствия, в литейных заводах, органической химической промышленности, присутствует в различных технических и коммерческих пестицидах, используемых в сельском хозяйстве /4/. Несмотря на достаточную изученность данного ксенобиотика, отсутствуют сведения о его влиянии на организм в онтогенезе /5/. В связи с изложенным, целью настоящего исследования явилось изучение мутагенного действия НДМА на крыс разного возраста.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы белые беспородные крысы-самцы в возрасте 1, 6 и 12 месяцев. Каждая возрастная группа состояла из 5 животных. В подостром опыте животные каждой возрастной группы подвергались ингаляционному воздействию НДМА в концентрации 2.4, 12.0 и 48.0 мг/м<sup>3</sup> по 2 часа ежедневно в течение 10 дней. Дозировка была выбрана исходя из имеющихся сведений о  $LC_{50} = 240$  мг/м<sup>3</sup> (для крыс) /ATSDR, 1989/. Ингаляционное воздействие НДМА на крыс осуществляли в специально изготовленном герметичном боксе. У животных после забоя забирали костный мозг из бедренной кости, готовили цитологические препараты по общепринятой методике /6/. Цитогенетический анализ осуществляли с помощью метафазного метода, определяли общую частоту и спектр хромосомных aberrаций. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss), подаренном фондом А. фон Гумбольдта биологическому факультету КазНУ им. аль-Фараби. Статистическую обработку результатов наблюдений проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента /8/.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

НДМА при многократном ингаляционном воздействии на крыс достоверно увеличил как общую частоту aberrантных клеток, так и число хромосомных нарушений на 100 метафаз у животных разных возрастных групп при всех использованных концентрациях по сравнению с

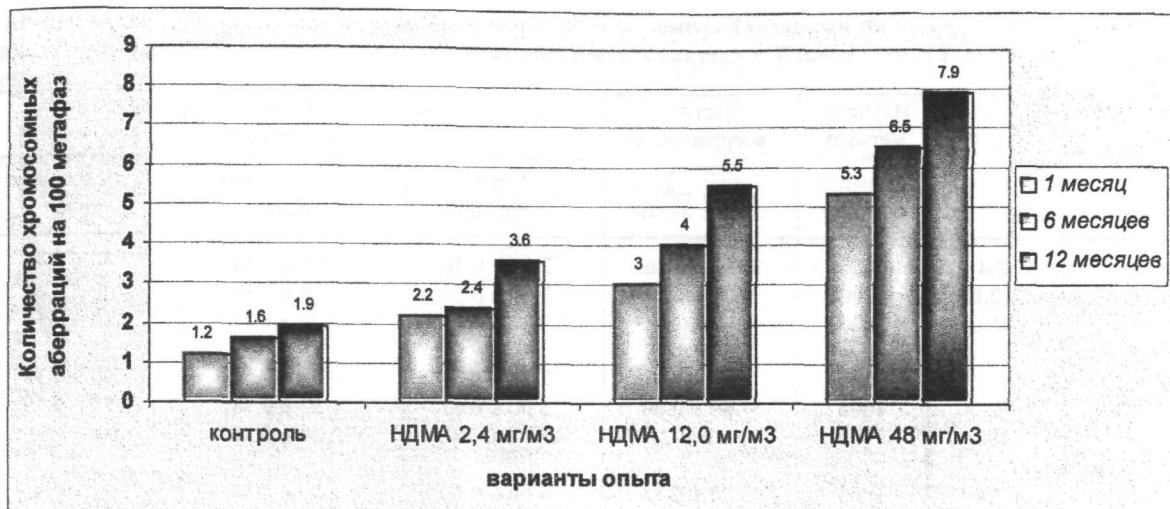


Рис. Общая частота хромосомных aberrаций, индуцированных НДМА в клетках костного мозга крыс разных возрастных групп

контролем (рисунок). При интоксикации крыс НДМА в концентрации 2.4 мг/м<sup>3</sup> достоверно увеличилось число структурных перестроек на 100 метафаз только у особей в возрасте 12 месяцев (3.60, p<0.05). НДМА в концентрации 12.0 мг/м<sup>3</sup> достоверно увеличил как частоту аберрантных клеток, так и число структурных перестроек хромосом у особей всех 3-х возрастных групп, составив соответственно 3.00, 3.60, 4.70 и 3.00, 4.00, 5.50 (p<0.05). При интоксикации крыс ксенобиотиком в концентрации 48.0 мг/м<sup>3</sup> с высокой достоверностью возрастали изучаемые показатели по сравнению с контролем. Если у интактных животных в возрасте 1, 6 и 12 месяцев частота аберрантных клеток соответственно составила 1.10, 1.50, 1.70, то при воздействии НДМА в данном варианте опыта этот показатель составил 4.8 (p<0.01), 5.9 и 6.7 (p<0.001). С высокой достоверностью увеличилось и число хромосомных aberrаций на 100 метафаз у животных всех возрастных групп (p<0.001).

Спектр индуцированных aberrаций хромосом при подостром воздействии НДМА был представлен всеми типами нарушений. У животных в возрасте 1 и 6 месяцев, интоксикованных НДМА в концентрации 12.0 мг/м<sup>3</sup>, достоверно увеличилось число aberrаций хроматидного типа по сравнению с контролем с 0.80 и 1.00 до 2.00 и 2.50, соответственно (p<0.05).

У годовалых животных достоверно увеличивалось число aberrаций хромосомного (2.10, p<0.05) и хроматидного (3.40, p<0.01) типов. У

животных всех возрастных групп, интоксированных НДМА в концентрации 48.0 мг/м<sup>3</sup>, наблюдалось достоверное увеличение структурных перестроек хромосомного типа (2.20, 2.60, 3.10; p<0.01) и хроматидного типа (3.10, 3.90; p<0.01; 5.00, p<0.001), соответственно.

Структурные нарушения хромосомного типа были представлены парными концевыми делециями, центрическими кольцами, парными ацентрическими кольцами; хроматидного типа – одиночными концевыми фрагментами, одиночными ацентрическими кольцами, точечными фрагментами.

Результаты сравнительного анализа частоты структурных нарушений хромосом, индуцированных многократным воздействием НДМА различной концентрации на крыс разных возрастных групп, представлены в таблице.

Анализ представленных результатов выявил достоверную разницу по частоте аберрантных клеток и числу хромосомных aberrаций на 100 метафаз при воздействии НДМА во всех использованных концентрациях у животных всех возрастных групп. Наблюдается корреляционная зависимость частоты аберрантных клеток от концентраций НДМА: у 1 месячных животных – r = 0.999, у 6 месячных – r = 0.983, у 12 месячных – r = 0.962.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о выраженному генотоксическом эффекте НДМА, степень которого зависела от концентрации ксенобиотика и возраста животных.

Таблица. Частота структурных нарушений хромосом, индуцированных многократным воздействием НДМА различных концентраций в клетках костного мозга крыс разных возрастных групп

Возраст животных (мес.)	НДМА (мг/м <sup>3</sup> )	Изучено метафаз	Частота аберрантных клеток (M ± m%)	Число хромосомных аберраций на 100 метафаз		
				Всего аберраций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
1	2.4	1000	2.20 ± 0.46	2.20 ± 0.46	0.60 ± 0.24	1.60 ± 0.40
	12.0	1000	3.00 ± 0.54	3.00 ± 0.54	1.00 ± 0.31	2.00 ± 0.44
	48.0	1000	4.80 ± 0.68*	5.30 ± 0.71**?	2.20 ± 0.46*	3.10 ± 0.55
6	2.4	1000	2.20 ± 0.46	2.40 ± 0.48	0.90 ± 0.30	1.50 ± 0.38
	12.0	1000	3.60 ± 0.60	4.00 ± 0.62	1.50 ± 0.38	2.50 ± 0.49
	48.0	1000	5.90 ± 0.74**?	6.50 ± 0.78**?	2.60 ± 0.50*	3.90 ± 0.61*
12	2.4	1000	3.00 ± 0.54	3.60 ± 0.60	1.50 ± 0.38	2.10 ± 0.45
	12.0	1000	4.70 ± 0.67	5.50 ± 0.72	2.10 ± 0.45	3.40 ± 0.57
	48.0	1000	6.70 ± 0.79**	7.90 ± 0.85**	3.10 ± 0.55*	5.00 ± 0.69**

Примечание: \* - P<0.05; \*\* - P<0.01 в сравнении с НДМА в концентрации 2.4 мг/м<sup>3</sup>

? - P<0.05 в сравнении с НДМА в концентрации 12.0 мг/м<sup>3</sup>

НДМА – возможный источник введения в молекулы ДНК метильной группы (-CH<sub>3</sub>). Известно, что метилирование азотистого основания гуанина снижает прочность его связи с дезоксирибозным остатком, в результате чего модифицированные основания выпадают и остаются апуриновые пробелы. Предполагается, что разрывы цепей ДНК по таким апуриновым пробелам – одна из причин возникновения хромосомных аберраций /9/.

Рядом авторов показано, что в результате интоксикации лабораторных животных НДМА образуются ДНК-аддукты, основным из которых является N7-метилгуанин, составляющий 65 % всех аддуктов. Вторичный продукт метилирования Об-метилгуанин составляет около 7 % всех аддуктов, образующихся первоначально. К другим ДНК-аддуктам относятся N3-метиладенин и O4-метилтимин. N7-метилгуанин в результате депуринизации может привести к замене гуанина на тимин /10/. Об-метилгуанин может привести к замене G:C на A:T пары, в то время как O4-метилтимин, наоборот, A:T на G:C пары /10, 11/. Доступные в литературе сведения дают основание предполагать, что именно наличие вторичного ДНК-аддукта Об-метилгуанина является причиной канцерогенной активности НДМА /10-12/. Активность фермента ДНК-метилтрансферазы, по-видимому, играет решающую роль в удалении вторичного ДНК-аддукта и вос-

приимчивости тканей к развитию опухолей. Кроме того, молекулы ДНК непрерывно подвергаются воздействию различных факторов внешней среды, вызывающих генетические повреждения. Некоторые из этих повреждений сразу приводят к хромосомным аберрациям или генным мутациям. Однако значительная их часть благодаря работе системы репарации устраняется. Можно предположить, что НДМА подавляет активность ферментов репарации, что способствует переходу первичных повреждений в стойкие мутации.

Представленная работа выполнена в рамках проекта Фонда науки МОН РК, № ГР 0106РК00279 (2006-2008 гг.).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тарасов В.А., Тарасов А.В., Любимова И.К., Асланян М.М. Проблема количественной оценки опасности химических соединений в генетической токсикологии // Успехи современной биологии. 2002. Т.122. №2. С.136-147.
2. Тарасов В.А., Абильев С.К. и др. Эффективность батареи тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений // Генетика. 2001. Т.39. №10. С.1406-1418.
3. Денисов В.Л. О канцерогенной активности некоторых природных химических соединений гидразина// Вопросы онкологии. 1998. Т.32. №7. С.3-9.
4. Жидкие ракетные топлива. - Справочник. М.: Институт биофизики. 1991. С. 263.
5. Concise International Chemical Assessment Document 38. N-Nitrosodimethylamine. - World Health Organization. Geneva. 2002. – 357 p.

6. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. - Новосибирск.: Наука, 1988. 127 с.

7. Роскин Г.И. Микроскопическая техника. - М: 1957. 467 с.

8. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. - Минск: Вышешшая школа. 1974. 448с.

9. Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. - М.:Мир. 1981. 598 с.

10. Swenberg JA, Hoel DG, Magee PN. Mechanistic and statistical insight into the large carcinogenesis bioassays on N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine // Cancer research. 1991. V.51. P. 6409–6414.

11. Souliotis VL, Chhabra S, Anderson LM, Kyrtopoulos SA. Dosimetry of O6-methylguanine in rat DNA after low-dose, chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA). Implications for the mechanism of NDMA hepatocarcinogenesis // Carcinogenesis. 1995. V.16. P. 2381–2387.

12. Haggerty HG, Holsapple MP. Role of metabolism in dimethylnitrosamine-induced immunosuppression: a review // Toxicology. 1990. V.63. P. 1–23.

### Резюме

Нитрозодиметиламиннің (НДМА) өртүрлі жастағы егеуқұрықтарға генотоксингідік өсері зерттелді. НДМА-ның созылмалы өсері генотоксингідік нәтиже береді, яғни аберранты клеткалардың жиілігін жоғарылатады. Хромосомалардың құрылымдық бұзылыстарында олардың барлық типтері кездеседі, сонымен бірге хроматидтік типті аберрациялардың артуы байқалды. Индуцияланған мутагенездің деңгейі жануарлардың және ксенобиотиктің концентрациясына төуелділігі айқындалды.

### Summary

Genotoxic effect of nitrosodimethylamine (NDMA) on rats of different age groups upon subacute treatment was established. Induced by NDMA structural infringements of chromosomes have been presented by all types of chromosomal aberrations with prevalence of chromatid-type aberrations. The level of mutagenesis depend on concentration of xenobiotic and age of animals.