

УДК 612.084

**ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА ПРИ ОСТРОМ
И СУБХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ**

Н. В. Томилин, О. А. Филько, А. В. Храброва, Н. Е. Соловьева,
В. А. Утсаль, К. А. Краснов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»,
Санкт-Петербург

Ключевые слова: несимметричный диметилгидразин, генотоксичность, цитотоксичность, лимфоциты, ретикулоциты, щелочной гель-электрофорез, микроядерный тест.

Аннотация. Объектами настоящего исследования были лейкоциты, ретикулоциты и гепатоциты белых крыс.

Цель работы - экспериментальное исследование генотоксического и цитотоксического действия несимметричного диметилгидразина (НДМГ) с помощью методов щелочного гель-электрофореза на лейкоцитах и гепатоцитах и микроядерного теста на ретикулоцитах и на лимфоцитах, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Генотоксическое и цитотоксическое действие НДМГ исследовали через 3 и 24 ч после внутрибрюшинного однократного введения в дозах 25 и 50 мг/кг и после субхронического введения в дозах 10 и 20 мг/кг в течение 7 и 14 суток.

Из полученных результатов следует, что после однократного и субхронического введения НДМГ степень фрагментации ядерной ДНК лейкоцитов и гепатоцитов не увеличивалась, как и частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах и лимфоцитах (генотоксическое действие). Дозозависимое снижение относительного содержания двуядерных лимфоцитов (цитотоксическое действие) зарегистрировано только после субхронического введения НДМГ в культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком.

Таким образом, доказана возможность использования культуры лимфоцитов с цитокинетическим блоком в мониторинговых исследованиях здоровья людей, имеющих профессиональный контакт с НДМГ во время его производства, использования или утилизации.

**GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF UNSYMMETRICAL
DIMETHYLHYDRAZINE IN ACUTE AND SUBCHRONIC EXPOSURE**

N. V. Tomilin, O. A. Filko, A. V. Khrabrova, N. E. Solovyeva., K. V. Sizova,
V. A. Utsal, K. A. Krasnov
«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency,
St.-Petersburg, Russia

Key words: unsymmetrical dimethylhydrazine, genotoxicity, cytotoxicity, lymphocytes, reticulocytes, alkaline gel-electrophoresis, micronucleus assay.

Annotation. The objects of this study were leukocytes, reticulocytes and hepatocytes of white rats.

The aim of this work is to study the genotoxic and the cytotoxic effects of unsymmetrical dimethylhydrazine (UDMH) using alkaline gel-electrophoresis on leukocytes and hepatocytes, and reticulocyte micronucleus test and lymphocytes by the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay.

The genotoxicity and cytotoxicity were studied after the acute intraperitoneal administration of UDMH in doses of 25 and 50 mg/kg at 3 and 24 hours exposure and after daily administration in doses of 10 and 20 mg/kg for 7 and 14 days. It was found that after a single and subchronic injection of UDMH, the fragmentation of the nuclear DNA of leukocytes and hepatocytes did not change. The frequency of micronuclei in reticulocytes and lymphocytes did not change either (genotoxic action).

A dose-dependent decrease in the relative content of binuclear lymphocytes (cytotoxic effect) was only detected by CBMN assay after subchronic administration of UDMH.

Thus, the possibility of using CBMN in monitoring studies concerning health of people who have professional contact with UDMH during its manufacture, use or utilization has been confirmed.

Введение. Несимметричный диметилгидразин (1,1-диметилгидразин, НДМГ) – высокотоксичное химическое вещество (1-й класс опасности) и возможный канцероген (группа 2В) для человека [6]. Широкое использование НДМГ в качестве ракетного топлива представляет серьезную опасность загрязнения производственной и окружающей среды. Это определяет необходимость постоянного контроля здоровья людей, имеющих контакт с указанным веществом во время его производства, использования или утилизации. В отличие от симметричного диметилгидразина (1,2-диметилгидразина) и нитрозодиметиламина (НДМА) мутагенное действие НДМГ нельзя считать доказанным [7]. Пути метаболизма НДМГ в организме млекопитающих изучены недостаточно. Известна единственная работа, в которой было показано метилирование ДНК при действии НДМГ с образованием N7-метилгуанина, причем эффективность метилирования была в 100 раз ниже по сравнению с влиянием НДМА [9]. Противоречивость данных при оценке мутагенного действия НДМГ объясняется его нестабильностью и способностью распадаться под действием света и кислорода окружающего воздуха с образованием диметиламина, тетраметилтетразена, НДМА и формальдегида [1]. Следует отметить, что НДМА используется в качестве промежуточного компонента при промышленном синтезе НДМГ. В исследованиях механизмов токсического действия чистота препарата НДМГ зачастую не контролировалась, и регистрация его мутагенного действия в отдельных случаях может быть вызвана содержанием примесей НДМА.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании механизмов токсического действия НДМГ и поиске биомаркеров, с помощью которых можно достоверно выявлять ранние проявления его влияния у людей, в силу профессиональных обязанностей имеющих контакт с указанным веществом. Для исследования генотоксического и цитотоксического действия НДМГ после однократного и субхронического его введения белым крысам использовали метод щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет), микроядерный тест на ретикулоцитах и на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком.

Методы и организация исследований. Исследования были выполнены на самцах беспородных белых крыс массой 180–220 г. В каждой группе насчитывалось четыре – пять животных.

Методом хроматомасс-спектропии было установлено, что содержание НДМА в препарате НДМГ, используемом в наших экспериментальных исследованиях, не превышала 0,01 %.

Водный раствор НДМГ вводили внутривентриально. При исследовании острого действия препарата использовали дозы 25 и 50 мг/кг. Забор крови и получение суспензии гепатоцитов осуществляли через 3 и 24 ч после введения. В субхронических экспериментах НДМГ вводили ежедневно в дозах 10 и 20 мг/кг в течение 7 и 14 дней.

В контрольных группах животные получали соответствующий их массе объем дистиллированной воды.

Метод щелочного гель-электрофореза выполняли на лейкоцитах периферической крови и гепатоцитах. Для этого клетки заключали в 0,5 %-ную агарозу с низкой температурой гелеобразования и наслаивали на предметные стекла, предварительно покрытые рутинной агарозой. Полученные препараты подвергали лизису в течение двух часов и щелочному электрофорезу ($pH > 13$) в течение 30 мин. После промывки препараты окрашивали бромистым этидием и анализировали с помощью программы Comet assay IV. В качестве параметра для оценки степени повреждения ядерной ДНК использовали относительное содержание ДНК в хвосте кометы.

Параллельно изготавливали препараты крови, на которых после окраски акридиновым оранжевым определяли частоту встречаемости ретикулоцитов с микроядрами (мутагенное действие) и количество ретикулоцитов (цитотоксическое действие).

Для получения культуры лимфоцитов клетки крови белых крыс отмывали от плазматического фактора, ингибирующего их стимуляцию. Деление клеток стимулировали фитогемагглютинином (ФГА-П) и конканавалином А [8]. Цитохалазин Б добавляли после 44 ч культивирования лимфоцитов. Фиксацию клеток осуществляли через 28 ч после добавления цитохалазина Б.

Мутагенное действие НДМГ оценивали по относительному содержанию двуядерных лимфоцитов с микроядрами, а цитотоксическое – по отношению содержания двуядерных клеток к суммарному содержанию одно-, дву-, трех- и четырехъядерных клеток.

Статистический анализ выполняли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики. В таблице приведены средние значения и величина стандартной ошибки. Достоверность различий степени повреждения ядерной ДНК и данных относительного содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами (мутагенное действие) между контрольными и экспериментальными группами оценивали с помощью непараметрического метода Крускала – Уоллеса. Сравнение содержания двуядерных лимфоцитов (цитотоксическое действие) в экспериментальных группах относительно контрольной группы осуществляли при использовании параметрического критерия Даннета. Зависимость от дозы устанавливали с помощью линейного тренда (Anova).

Результаты исследований и их обсуждение. В исследованиях на лейкоцитах и суспензии гепатоцитов с помощью метода ДНК-комет после однократного введения НДМГ в дозах 25 и 50 мг/кг не обнаружено увеличения фрагментации ядерной ДНК. Субхроническое введение НДМГ в дозах 10 и 20 мг/кг в течение 7 и 14 суток также не вызывало увеличения степени повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах и гепатоцитах (данные не показаны).

Одновременно с исследованиями степени фрагментации ядерной ДНК лейкоцитов генотоксическое и цитотоксическое действие НДМГ в условиях субхронического введения оценивали с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах крови тех же животных. Частота встречаемости микроядер (МЯ) в ретикулоцитах и их концентрация в крови экспериментальных животных после введения НДМГ в течение 7 и 14 суток достоверно не отличались от величин у животных контрольной группы (данные не показаны).

Микроядерный тест на ретикулоцитах крови человека и крыс характеризуется низкой чувствительностью вследствие малого содержания ретикулоцитов в крови и высокой активности селезенки, активно удаляющей поврежденные ретикулоциты. Поэтому параллельно мы выполнили дополнительные исследования с использованием микроядерного теста на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком, который успешно используется в биомониторинговых исследованиях оценки стабильности генома людей, подверженных действию вредных химических факторов [5].

После однократного введения НДМГ в дозах 25 и 50 мг/кг через 3 и 24 ч мутагенного действия НДМГ (частота встречаемости двуядерных лимфоцитов с микроядрами) и его цитотоксического действия (относительное содержание двуядерных лимфоцитов) не обнаружено (данные не показаны).

Субхроническое ежедневное введение НДМГ в течение 7 и 14 суток в дозах 10 и 20 мг/кг также не вызывало мутагенного действия, но было зарегистрировано дозозависимое снижение относительного содержания двуядерных лимфоцитов, что свидетельствует о цитотоксическом действии НДМГ (таблица).

Таблица

Изменения содержания двуядерных лимфоцитов с микроядрами и двуядерных лимфоцитов через 7 и 14 суток после введения НДМГ

Группы	7 суток		14 суток	
	Двуядерные лимфоциты с МЯ, %	Двуядерные лимфоциты %	Двуядерные лимфоциты с МЯ, %	Двуядерные лимфоциты %
Контроль	0,75±0,12	40,2±1,6	0,76±0,17	44,2±1,6
10 мг/кг	0,73±0,08	32,1±2,2*	0,87±0,07	35,0±0,8**
20 мг/кг	1,03±0,11	29,2±2,01**	0,97±0,13	38,7±1,4*
Достоверные отличия от контрольных значений * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, критерий Даннета. Линейный тренд (Anova): 7 суток $p=0,0030$, 14 суток $p=0,0145$				

Таким образом, в проведенных исследованиях не выявлено генотоксического действия НДМГ на лейкоциты и гепатоциты после однократного (3 и 24 ч) и субхронического (7 и 14 суток) введения в испытанных дозах. Цитотоксическое действие зарегистрировано только с помощью микроядерного теста на культуре лимфоцитов после субхронического введения НДМГ в течение 7 и 14 суток.

Необходимо отметить, что препарат НДМГ, использованный в наших исследованиях, не содержал примесей НДМА ($\leq 0,01\%$). Генотоксическое действие НДМА, в отличие от НДМГ, проявляется в дозозависимом увеличении фрагментации ядерной ДНК лейкоцитов и гепатоцитов белых крыс уже через 3 и 24 ч после однократного введения в дозах 7,5, 15 и 30 мг/кг [2]. Фрагментация ДНК может быть репарирована и не вызывать мутации. С помощью микроядерного теста на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком нами было доказано мутагенное действие НДМА в условиях однократного и субхронического введения [3]. Важно, что мутагенное действие НДМА фиксируется до проявлений его цитотоксического действия. Это свидетельствует, что НДМА представляет собой алкилирующий генотоксикант непрямого действия. Однако, как следует из литературы, при высоких дозах НДМА отмечается его цитотоксическое действие, обусловленное не только его способностью метилировать ДНК, но и влиянием активных форм кислорода (АФК) при метаболической активации НДМА [4].

Механизмы цитотоксического действия НДМГ изучены недостаточно. Предполагается, что оно может объясняться, как и для НДМА,

метаболическими превращениями, которые сопровождаются нарастанием концентрации АФК.

Заключение. Из полученных результатов можно заключить, что совместное использование метода ДНК-комет на лейкоцитах и микроядерного теста на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком перспективно для биомониторинга стабильности генома людей, имеющих контакт с НДМГ во время его производства, использования или утилизации.

В случаях низкого содержания примеси НДМА цитотоксичность НДМГ будет регистрироваться только в культуре лимфоцитов. При увеличении концентрации метаболитов НДМА в крови положительный эффект проявится сначала в нарастании фрагментации ДНК, затем и в повышении частоты встречаемости микроядер в двуядерных лимфоцитах.

Список литературы

1. Смоленков А. Д. Применение ионной и ион-парной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для определения несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации / А. Д. Смоленков, И. А. Родин, И. А. Смирнов, О. Г. Татаурова, О. А Шпигун. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2012. – Т. 53 (5). – С. 312-319.
2. Томилин Н. В. Исследование генотоксического действия N-нитрозодиметиламина на лейкоциты, гепатоциты и клетки коры головного мозга белых крыс / Н. В. Томилин, О. А. Филько, А. В. Храброва, Н. Е. Соловьева, В. А. Утсаль, К. А. Краснов // Изв. Рос. военно-медицинской академии. – 2017. – Т. 36. – С. 69-70.
3. Томилин Н. В. Сравнительное экспериментальное исследование мутагенного и цитотоксического действия нитрозодиметиламина в условиях острого и субхронического введения с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах и лимфоцитах периферической белых крыс / Н. В. Томилин, О. А Филько., А. В. Храброва, Н. Е. Соловьева, К. В. Сизова, В. А. Утсаль, К. А. Краснов // Биомедицинский журнал Medline. ru – 2017. – Т. 18. – С. 382-394.
4. Albano E. Free radical activation of monomethyl and dimethyl hydrazines in isolated hepatocytes and liver microsomes / E. Albano, A. Tomasi, L. Gjria-Gatti, A. Iannone // Free Radical Biology & Medicine. – 1989. – Vol. 6. –P. 3-8.
5. Bonassi S. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans / S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W. P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M. P. Bigatti, Bolognesi C., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., G. Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M. R. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa, M. Fenech // Carcinogenesis. – 2007. – Vol. 28 (3). – P. 625-631.
6. 1,1-Dimethyl hydrazine // IARC Monographs. Vol. 71. On the evaluation of carcinogenic risks to humans. – Lyon, 1999. – P. 1425-1436.

7. Godoy H. M. Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats / Godoy H. M., M. I. Diaz Gomez, J. Castro // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1983. – Vol. 71 (5) – P. 1047-1051.
8. Kligerman A. D. Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage in vivo / A. D. Kligerman, G. L. Erexson, J. L. Wilmer // *Basic Life Sci.* – 1984. – Vol. 29, Pt. B. – P. 569-584.
9. Sagelsdorff P. DNA methylation in rat liver by daminozide, 1, 1-dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine / P. Sagelsdorff, W. K. Lutz, C. Schlatter // *Fund. Appl. Toxicol.* – 1988. – Vol. 11. – P. 723-730.

References

1. Smolenkov A. D. Application of ion and ion-pair chromatography with mass spectrometric detection for determination of asymmetric dimethylhydrazine and its transformation products / A. D. Smolenkov, I. A. Rodin, I. A. Smirnov, O. G. Tataurova, O. A. Shpigun. // *Vestn. Moscow. University. Ser. 2. Chemistry.* – 2012. – V. 53 (5). – P. 312-319. (In Russian)
2. Tomilin N. V. Investigation of the genotoxic effect of N-nitrosodimethylamine on leukocytes, hepatocytes and cells of the cerebral cortex of white rats / N. V. Tomilin, O. A. Filko, A. V. Khrabrova, N. Y. Solov'ev, V. A. Utsal, K. A. Krasnov, "Izv. Ros. Military Medical Academy. – 2017. – V. 36. – P. 69-70. (In Russian)
3. Tomilin N. V. A comparative experimental study of the mutagenic and cytotoxic effects of nitrosodimethylamine in acute and subchronic administration using a micronuclear test on reticulocytes and lymphocytes of white rats / N. V. Tomilin, O. A. Filko, A. V. Khrabrov, N. E. Solov'eva, K. V. Sizova, V. A. Utsal, K. A. Krasnov // *Bio-medical journal Medline. ru* – 2017. – V. 18. – P. 382-394. (In Russian)
4. Albano E. Free radical activation of monomethyl and dimethyl hydrazines in isolated hepatocytes and liver microsomes / E. Albano, A. Tomasi, L. Gjria-Gatti, A. Iannone // *Free Radical Biology & Medicine.* – 1989. – Vol. 6. – P. 3-8.
5. Bonassi S. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans / S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W. P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M. P. Bigatti, Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., G. Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M. R. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa, M. Fenech // *Carcinogenesis.* – 2007. – Vol. 28 (3). – P. 625-631.
6. 1,1-Dimethyl hydrazine // *IARC Monographs. Vol. 71. On the evaluation of carcinogenic risks to humans.* – Lyon, 1999. – P. 1425-1436.
7. Godoy H. M. Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats / H. M. Godoy, M. I. Diaz Gomez, J. Castro // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1983. – Vol. 71 (5) – P. 1047-1051.

8. Kligerman A. D. Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage in vivo / A. D. Kligerman, G. L. Erexson, J. L. Wilmer // Basic Life Sci. – 1984. – Vol. 29, Pt. B. – P. 569-584.
9. Sagelsdorff P. DNA methylation in rat liver by daminozide, 1, 1-dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine / P. Sagelsdorff, W. K. Lutz, C. Schlatter // Fund. Appl. Toxicol. – 1988. – Vol. 11. – P. 723-730.

Сведения об авторах. **Николай Владимирович Томилин** - ведущий научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, кандидат биологических наук, Nikolay_Tomilin@rambler.ru; **Ольга Александровна Филько** - старший научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, кандидат биологических наук, ollalex@mail.ru; **Алла Викторовна Храброва** - старший научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, кандидат биологических наук; **Нина Евгеньевна Соловьева** - научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, кандидат биологических наук, Ninasolovey19@mail.ru; **Виктор Альбертович Утсаль** - старший научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, Utsal@bk.ru; **Константин Андреевич Краснов** - ведущий научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России, кандидат химических наук, Krasnov_tox@mail.ru.