

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА НА СОМАТИЧЕСКИЕ И ГЕНЕРАТИВНЫЕ КЛЕТКИ МЫШЕЙ

© А.В. Ловинская¹, С.Ж. Колумбаева¹, О.Л. Коломиец², С.К. Абилов^{2,3}

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы;

²ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Для цитирования: Ловинская А.В., Колумбаева С.Ж., Коломиец О.Л., и др. Генотоксическое действие нитрозодиметиламина на соматические и генеративные клетки мышей // Экологическая генетика. — 2017. — Т. 15. — № 3. — С. 34–41. doi: 10.17816/ecogen15334-41.

Поступила в редакцию: 04.05.2017

Принята к печати: 11.07.2017

Установлено, что нитрозодиметиламин (НДМА) при остром и подостром воздействии на лабораторных мышей проявил генотоксические свойства. Выявлена органоспецифичность генотоксического действия НДМА с помощью метода ДНК-комет. Наиболее чувствительными органами к действию НДМА оказались почки и печень. Поврежденность ДНК в клетках печени животных, интоксцированных НДМА в дозах 4,0 и 8,0 мг/кг, по сравнению с контролем увеличилась в 6,9 и 12,5 ($p < 0,001$), а в клетках почек — в 8,1 и 14,2 раза ($p < 0,001$) соответственно. НДМА также проявил генотоксическую активность в половых клетках экспериментальных животных, вызывая нарушения структуры синаптомемных комплексов сперматоцитов. У животных, интоксцированных НДМА в дозе 2,0 мг/кг в остром и подостром опытах, уровень сперматоцитов с поврежденными синаптомемными комплексами статистически значимо возрос в 6,0 и 7,0 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с контролем.

Ключевые слова: нитрозодиметиламин (НДМА); генотоксичность; метод ДНК-комет; разрывы ДНК; синаптомемный комплекс.

GENOTOXIC EFFECTS OF N-NITROSODIMETHYLAMINE IN SOMATIC AND GENERATIVE CELLS OF MICE

© A.V. Lovinskaya¹, S.Zh. Kolumbayeva¹, O.L. Kolomiets², S.K. Abilev^{2,3}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

For citation: Lovinskaya AV, Kolumbayeva SZh, Kolomiets OL, et al. Genotoxic effects of N-nitrosodimethylamine in somatic and generative cells of mice. *Ecological genetics*. 2017;15(3):34-41. doi: 10.17816/ecogen15334-41.

Received: 04.05.2017

Accepted: 11.07.2017

N-Nitrosodimethylamine (NDMA) was shown to have genotoxic properties in acute and subacute studies on laboratory mice. The organ-specificity of the genotoxic effect of NDMA was revealed using the Comet assay. The most sensitive organs to the action of NDMA were kidneys and liver. DNA damage in liver cells of NDMA-treated animals at doses of 4.0 and 8.0 mg/kg, increased compared to control in 6.9 and 12.5 ($p < 0.001$), and in kidney cells — in 8.1 and 14.2 times ($p < 0.001$), respectively. NDMA also showed genotoxic activity in the reproductive cells of experimental animals, causing structural disorders of synaptonemal complexes in spermatocyte. In NDMA-treated animals at a dose of 2.0 mg/kg in acute and subacute studies, the level of spermatocytes with damaged synaptonemal complexes increased statistically significantly compared to control in 6.0 and 7.0 ($p < 0.05$) times, respectively.

Keywords: N-nitrosodimethylamine (NDMA); DNA strand breaks; synaptonemal complex.

Загрязнение биосферы различными мутагенными факторами привлекает все большее внимание исследователей. Каждый год появляются тысячи новых искусственно синтезированных химических соединений, но только малая их часть проходит оценку на токсическую, мутагенную и канцерогенную активность. Тем не менее они широко используются в сельском хозяйстве, в пищевой и легкой промышленности, в медицине, при производстве парфюмерно-косметических товаров,

при изготовлении детских игрушек и в других сферах жизни современного общества [1].

По данным регистра Chemical Abstracts Service (CAS) от 26.06.2017, зарегистрировано более 130 млн химических соединений. Ежедневно регистр CAS пополняется около 15 000 новыми веществами [2]. Для ряда этих химикатов показана токсическая, мутагенная, канцерогенная и тератогенная активность [3]. Повышение загрязнения окружающей среды (ОС) ксенобиотиками может

привести к увеличению мутационного фона популяций, в том числе и человека. К сожалению, до настоящего времени не выработаны однозначные качественные критерии для оценки частоты возникновения мутаций в популяциях [1, 4].

Обострение глобальной кризисной экологической ситуации связано с повсеместным загрязнением ОС различными химическими соединениями. Следствием накопления в ОС тяжелых металлов, пестицидов, поверхностно-активных веществ, компонентов ракетного топлива становятся рост заболеваемости населения, дестабилизация природных экосистем и снижение биологического разнообразия [5–9]. Возникновение мутаций в зародышевых клетках приводит к выкидышам и врожденным порокам развития, в половых клетках — к возникновению наследственных заболеваний, а в соматических — к возникновению и развитию злокачественных новообразований [10, 11].

Нитрозодиметиламин (син. диметилнитрозамин) — представитель канцерогенных нитрозаминов, обладающий высоким токсическим, мутагенным, тератогенным и эмбриотоксическим действием. Несмотря на ряд отрицательных характеристик, НДМА образуется и присутствует как побочный продукт в литейной промышленности, в производстве резины, ракетного топлива, пестицидов (бромацил, беназолин, 2,4-D, дикамба, МСРА, мекопроп), красителей, при дублении кожи, в пищевой индустрии (при копчении и солении продуктов питания и их термической обработке, при изготовлении некоторых сортов алкоголя) [12]. НДМА может формироваться в сточных водах в результате биологических и химических трансформаций алкиламинов. Табачный дым также служит источником НДМА. Синтез НДМА происходит в кислой среде желудка человека после приема пищи, богатой нитритами, вторичными или третичными аминами, а также некоторых лекарственных препаратов [12–14].

Ранее было установлено, что НДМА индуцирует мутации, выявляемые в тестах Эймса, по учету генных и хромосомных мутаций, сестринских хроматидных обменов, незапланированного синтеза ДНК [15–19]. Однако исследования *in vivo* на млекопитающих немногочисленны и носят противоречивый характер [20–23]. Практически не изучено влияние НДМА на половые клетки и репродуктивный потенциал животных. В этой связи нами была поставлена задача исследовать на мышах повреждающее действие НДМА на ДНК клеток печени, почек, селезенки и легких, а также его генотоксическое действие на мейотические клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали N-нитрозодиметиламин (N-nitrosodimethylamine; dimethylnitrosamine; CAS62-75-9, производства Sigma, США).

В экспериментах было использовано 40 лабораторных мышей-самцов линии *BALB/cYwal* в возрасте 2–3 месяцев с массой тела 25–30 г, разделенных на 8 групп по 5 мышей в каждой. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в международном руководстве “Guide for the care and use of laboratory animals” и правилам, утвержденным ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [24, 25]. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории.

В экспериментах с использованием теста ДНК-комет выделены следующие группы: I — контрольные животные; II–III — животные, получавшие однократно НДМА в дозах 4,0 и 8,0 мг/кг соответственно, с забоем через 4 часа после введения ксенобиотика; IV — животные, получавшие однократно циклофосфамид в дозе 50,00 мг/кг, с забоем через 4 часа после введения (позитивный контроль).

В экспериментах по изучению действия НДМА на синаптомембранный комплекс животные были разделены на группы: I — контрольные животные; II — животные, получавшие НДМА в дозе 2,0 мг/кг, с забоем через 3 часа после однократного воздействия; III–IV — животные, получавшие ежедневно в течение 10 дней НДМА в дозе 2,0 мг/кг, с забоем после последнего введения через 3 часа и 10 дней соответственно.

Дозировки НДМА были выбраны исходя из имеющихся сведений о ЛД₅₀ для мышей при внутрибрюшинном введении — 40,0 мг/кг [26]. Водный раствор НДМА вводили животным внутрибрюшинно, максимальная доза соответствовала 8,0 мг/кг, или 1/5 ЛД₅₀. Забой животных осуществляли под изофлурановым наркозом.

Для оценки уровня повреждений ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет (DNA-comet assay, другое название — гель-электрофорез изолированных клеток). Материал для анализа по методу ДНК-комет готовили по методическим рекомендациям [27].

Для изучения повреждения ДНК клеток внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие) образцы тканей гомогенизировали, клетки иммобилизовали в 0,5 % теплой (37 °С) легкоплавкой агарозе. Полученную взвесь клеток наносили на подготовленное предметное стекло (1 % нормоплавкая агароза на воде), затем клетки подвергали действию лизирующего раствора (2,5 мМ NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 10 мМ Tris с добавлением непосредственно в день эксперимента 10 % DMSO и 1 % Triton-x100 (в процентах от конечного объема), pH10) в течение 1 часа при 4 °С. Предметные стекла, содержащие лизат клеток, помещали в щелочной буфер (1 мМ Na₂EDTA, 300 мМ NaOH, pH13) на 20 минут для раскручивания спирали ДНК и реализации щелочно-лабильных сайтов в одно- и двунитевые разрывы. После этого последовательно проводили элек-

трофорез (0,7 В/см, 200 мА, 10 мин), нейтрализацию слайдов в нейтрализующем буфере (Tris, pH 7,5) и их высушивание. Далее предметные стекла окрашивали акридиновым оранжевым и проводили флуоресцентный анализ препаратов с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). Учитывали содержание ДНК в «хвосте комет» (в %) с помощью программы Comet score. На каждый орган анализировали не менее 500 ДНК-комет без учета типа hedgehog. Показатель «процент ДНК в „хвосте кометы“» отражает количество фрагментов ДНК, образовавшихся в результате одно- и двунитевых разрывов и щелочно-лабильных сайтов ДНК и мигрировавших в сторону анода при электрофорезе.

Индекс повреждения (ИП) ДНК показывает кратность превышения поврежденности ДНК под воздействием фактора по сравнению с контролем. ИП, превышающий 2, указывает на выраженные генотоксические свойства исследуемого фактора [28].

Тотальные препараты распластанных синаптомных комплексов (СК) получали и фиксировали по методу J. Navarro et al. [29] с модификациями O.L. Kolomiets et al. [30]. Иммуноокрашивание тотальных препаратов проводили по методу L.K. Anderson et al. [31]. СК и осевые элементы хромосом выявляли с помощью кроличьих антител против белка SCP3 в разведении 1 : 250 (Abcam, Cambridge, UK). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против IgG кролика, меченные FITC (Jackson Immunoresearch), в разведении 1 : 400. Центромеру выявляли с использованием первичных антител IgG человека против белков кинетохора (CREST), 1 : 500 (Antibody Incorporated, California, USA), и вторичных козых антител против IgG человека, конъюгированных с Alexa Fluor 546,

1 : 200 (Invitrogen, USA). Отмывали препараты водно-солевым буфером и заключали в среду Vectashield с DAPI. Иммунофлуоресцентный анализ препаратов СК выполняли с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). Учитывали ядра с фрагментацией, ассоциацией аутосом с половым бивалентом, преждевременным десинапсисом половых хромосом, нарушением формирования полового тельца, кольцевыми СК, атипичной структурой СК.

Статистическую обработку данных проводили в надстройке «Анализ данных» Microsoft Excel, StatPlus и WINPIPI. Во всех случаях определяли средние значения и ошибки среднего. Достоверность различий средних оценивали, используя непараметрический *U*-тест Манна – Уитни (метод ДНК-комет) и точный тест Фишера (метод учета нарушений СК) [30, 32]. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований установлена чувствительность различных органов лабораторных мышей к генотоксическому действию НДМА в зависимости от используемой дозы ксенобиотика (рис. 1). НДМА при всех дозах через 4 часа после введения животным статистически значимо увеличил повреждения ДНК в клетках печени, почек, легких и селезенки по сравнению с негативным контролем. Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» в клетках внутренних органов животных, интоксцированных НДМА в дозе 8,0 мг/кг, было сопоставимо с таковым у животных, получавших циклофосфамид (позитивный контроль) в дозе 50 мг/кг, а при дозе 4,0 мг/кг снижалось.

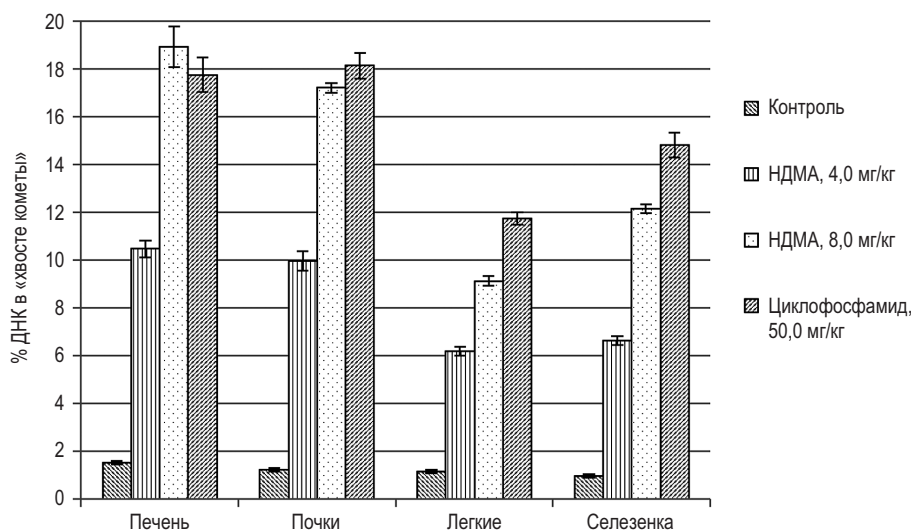


Рис. 1. Содержание ДНК в «хвосте кометы» в клетках внутренних органов мышей, однократно интоксцированных нитрозодиметиламином

Fig. 1. DNA content in the comet tail in the cells of internal organs of mice intoxicated once with N-nitrosodimethylamine

Были определены индексы ИП ДНК, отражающие степень генотоксического действия НДМА. ИП при воздействии НДМА в дозах 4,0 и 8,0 мг/кг составил соответственно в печени 6,93 и 12,53; в почках — 8,11 и 14,15; в легких — 5,37 и 7,93; в селезенке — 6,90 и 12,66.

С увеличением дозы НДМА в клетках печени, почек, легких и селезенки мышей наблюдалось статистически значимое увеличение процента ДНК в «хвосте кометы». Поврежденность ДНК в клетках печени животных, интоксцированных высокой дозой ксенобиотика, по сравнению с животными, интоксцированными низкой дозой, увеличилась через 4 часа после инъекции в 1,81 раза ($p < 0,001$), а в клетках почек — в 1,73 раза ($p < 0,001$). Поврежденность ДНК в клетках легких увеличилась соответственно в 1,48 раза ($p < 0,001$), а в клетках селезенки — в 1,84 раза ($p < 0,001$).

Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что НДМА в дозах, соответствующих $1/5$ и $1/10$ ЛД₅₀, дал выраженный генотоксический эффект в клетках всех изученных органов мышей. Наиболее чувст-

вительными к ДНК-повреждающему действию НДМА оказались почки и печень, а менее чувствительными — селезенка и легкие.

Для определения генотоксического действия НДМА на мейотические клетки нами было использовано однократное и многократное (в течение 10 дней) его введение животным в дозе 2,0 мг/кг. В качестве показателя генотоксичности НДМА учитывали частоту и спектр нарушений синаптонемных комплексов в стадиях пахитены и диплотены мейоза. Частота и спектр различных типов нарушений СК в сперматоцитах животных при разных сроках воздействия ксенобиотика представлены в табл. 1.

В остром опыте у животных, интоксцированных НДМА в дозе 2,0 мг/кг, через 3 часа после введения ксенобиотика уровень клеток с поврежденными СК статистически значимо возрос в 5,97 раза по сравнению с контролем. Спектр нарушений синаптонемного комплекса был представлен фрагментацией СК, ассоциацией аутосом с ХУ-бивалентом, преждевременным десинапсисом

Таблица 1

Частота и спектр нарушений синаптонемных комплексов, индуцированных нитрозодиметиламином в сперматоцитах лабораторных мышей, выявленных на разных сроках после окончания его введения
Frequency and spectrum of disorders of synaptonemal complexes induced in spermatocytes of laboratory mouse at different times after the end of nitrosodimethylamine administration

№	Варианты опыта	Всего изучено клеток	Частота ядер с нарушениями СК, %	Спектр нарушений СК, % от общего количества просмотренных клеток					
				атипичная структура СК	фрагментация СК	ассоциация аутосом с ХУ-бивалентом	нарушение формирования полового тельца	десинапсис половых хромосом	кольцевые СК
1	Контрольные животные	500	13,07 ± ± 2,24	6,23 ± ± 1,55	7,42 ± ± 3,33	1,36 ± ± 0,69	0	0	0
Острый опыт									
2	Самцы, забитые через 3 часа после однократного введения НДМА в дозе 2,0 мг/кг	500	78,07 ± ± 1,86*	75,46 ± ± 6,02*	35,15 ± ± 4,91*	33,13 ± ± 4,37*	5,08 ± ± 2,60	7,08 ± ± 2,71	3,51 ± ± 1,84
Подострый опыт									
3	Самцы, забитые на 1-е сутки после окончания 10-дневного введения НДМА в дозе 2,0 мг/кг (ежедневно)	500	87,95 ± ± 4,24*	79,75 ± ± 3,42*	50,14 ± ± 0,70*	28,61 ± ± 1,39*	7,06 ± ± 0,80	13,23 ± ± 1,65	5,76 ± ± 1,50
4	Самцы, забитые на 10-е сутки после окончания 10-дневного введения НДМА в дозе 2,0 мг/кг (ежедневно)	500	91,20 ± ± 2,50**	83,93 ± ± 2,06**	55,68 ± ± 6,22*	43,60 ± ± 1,40*	11,74 ± ± 1,23	13,24 ± ± 1,66	3,56 ± ± 2,31

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ статистически значимо в сравнении со значением контроля; СК — синаптонемные комплексы; НДМА — нитрозодиметиламин

половых хромосом, нарушением формирования полового тельца, кольцевыми СК, атипичной структурой СК. Необходимо отметить, что встречалась множественная фрагментация СК (так называемая «мейотическая катастрофа») и/или единичные фрагменты СК. К атипичным структурам осевых элементов СК отнесены изгибы, петли, истончение осевых элементов и скопление их в виде клубка. Преобладающими нарушениями были атипичная структура СК, ассоциации аутосом с половым бивалентом и фрагментация СК. Так, атипичная структура СК в 12,11 раза выявлялась чаще в ядрах животных, интоксцированных НДМА в дозе 2,0 мг/кг, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), с фрагментацией СК — в 4,74 раза ($p < 0,05$), а с ассоциацией аутосом с половым бивалентом — в 24,36 раза ($p < 0,05$). Под воздействием НДМА не только увеличивалась частота нарушений СК, но и расширялся спектр нарушений. У животных контрольной группы не обнаружены такие структурные нарушения, как нарушение формирования полового тельца, униваленты половых хромосом и кольцевые СК.

В подостром опыте животных подвергали ежедневной интоксикации НДМА в дозе 2,0 мг/кг в течение 10 дней. Анализировали сперматоциты мышей, забитых в первые сутки и на 10-й день с момента последней инъекции ксенобиотика.

В сперматоцитах животных, интоксцированных НДМА в течение 10 дней и забитых через 3 часа после последней инъекции, частота ядер с нарушениями СК была статистически значимо выше контрольного уровня в 6,73 раза ($p < 0,05$). Спектр повреждений СК был аналогичным таковому в остром опыте. При этом ядра с атипичной структурой СК выявлялись чаще в 12,80 раза ($p < 0,05$), с фрагментацией СК — в 6,76 раза ($p < 0,05$), с ассоциацией аутосом с половым бивалентом — в 21,04 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными.

Сравнительный анализ частоты клеток с нарушениями СК показал, что с увеличением продолжительности воздействия НДМА до 10 дней возрастала общая частота ядер с повреждениями СК и ядер с различными типами нарушений СК, за исключением ядер с ассоциацией аутосом с половым бивалентом, однако эта разница была статистически недостоверна.

У животных, многократно интоксцированных НДМА, с забоем через 10 суток с момента последнего введения частота поврежденных сперматоцитов была статистически значимо выше по сравнению с контрольными животными в 6,98 раза ($p < 0,05$), но на уровне значений у животных с забоем через 3 часа от последнего введения токсиканта. При этом у животных данной опытной группы атипичная структура СК выявлялась в ядрах чаще в 13,47 раза ($p < 0,01$), с фрагментацией СК — в 7,50 раза ($p < 0,05$), с ассоциацией аутосом с половым бивалентом — в 32,06 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными животными.

Сравнительный анализ частоты возникающих при подостром воздействии НДМА типов нарушений синнаптонемных комплексов, выявляемых на первые сутки и на 10-е сутки после последнего введения ксенобиотика, показал статистически значимое увеличение частоты ядер с ассоциацией аутосом с половым бивалентом в 1,52 раза ($p < 0,05$) и с нарушением формирования «полового тельца» в 1,66 раза ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

НДМА является одним из первых химических соединений, для которых еще в 1969 г. в тесте с млекопитающим-посредником (host-mediated assay) было показано, что мутагенная активность связана с их биотрансформацией в организме млекопитающего [33]. Вслед за этим было установлено, что НДМА индуцирует мутации у тест-штаммов *Salmonella* в тесте Эймса, а в клеточных культурах — генные и хромосомные мутации, сестринские хроматидные обмены и незапланированный синтез ДНК. Результаты основных исследований мутагенной и генотоксической активности НДМА обобщены в монографии Международного агентства по изучению рака (IARC) [34]. По классификации IARC НДМА отнесен к группе 2А — вероятные канцерогены для человека.

Особый интерес представляют исследования генотоксичности НДМА в различных органах млекопитающих в связи с его канцерогенной активностью. Такие исследования ранее были проведены в условиях *in vivo* с использованием метода ДНК-комет. НДМА вызывал повреждение ДНК в печени крыс, а также печени и желудка мышей [16]. Целью наших исследований было определение органной специфичности генотоксического действия НДМА, и поэтому анализ разрывов ДНК проводили параллельно в четырех органах мышей: печени, почках, легких и селезенке. Установлено, что более чувствительны к ДНК-повреждающему действию НДМА клетки почек и печени, а менее чувствительны — клетки селезенки и легких.

НДМА, по данным базы по канцерогенному потенциалу химических соединений (CPDB — Carcinogenic Potential Data Base), вызывает развитие рака в печени, легких и почках самцов крыс, а у самцов мышей — рак печени и центральной нервной системы [35]. Видовая, половая и органная специфичность химических канцерогенов обусловлена особенностями их биотрансформации в организме, то есть уровнем экспрессии активирующих и деактивирующих их ферментов в различных тканях [36].

В случае НДМА основным ферментом, запускающим его биотрансформацию, является цитохром CYP2E1, показывающий наибольшую активность в печени. Известны два пути метаболизма НДМА (α -гидроксилирование или денитрозирование), где в результате действия цитохрома CYP2E1 образуется ион

метилдиазония ($\text{CH}_3\text{N}^+\equiv\text{N}$), способный алкилировать ДНК, РНК и белки [12]. Эти реакционно-способные метаболиты в организме конъюгируют с такими эндогенными метаболитами, как глутатион, сульфаты и глюконовая кислота, при участии глутатионтрансферазы, сульфотрансферазы и глюконилтрансферазы и выводятся из организма. Поэтому полученные нами данные, по-видимому, отражают уровень активных метаболитов НДМА, прореагировавших с ДНК клеток печени и почек в большей степени, чем с ДНК клеток селезенки и легких. Таким образом, с учетом всех факторов, влияющих на образование и деактивацию реакционно-способных метаболитов НДМА, у использованных в эксперименте самцов мышей линии *BALB/cYwal* наиболее чувствительными к ДНК-повреждающему действию НДМА оказались почки и печень, а менее чувствительными — селезенка и легкие.

Воздействие химических веществ на человека может привести к вредным последствиям и для репродуктивного здоровья. Например, пренатальное воздействие токсикантов может увеличить риск рака у потомков, вызвать у взрослых мужчин изменение качества спермы, бесплодие и рак простаты; а у женщин — нарушение развития репродуктивной функции, в том числе полового созревания, менструации и овуляции, плодовитости и менопаузы [37].

Результаты ранее проведенных исследований действия НДМА на половые клетки носят противоречивый характер. Так, A. Baumgartner et al. с помощью метода ДНК-комет установили, что НДМА увеличивает количество разрывов ДНК в сперматозоидах человека *in vitro*, при этом эффект возрастал в условиях метаболической активации [38]. Однако в исследованиях S. Watanabe et al. показано, что НДМА не вызывал хромосомных aberrаций в человеческих сперматозоидах *in vitro*, обработанных фракцией S9, хотя в соматических клетках положительные результаты наблюдались [19].

В наших исследованиях с помощью иммуноцитохимического анализа СК было установлено выраженное генотоксическое действие НДМА на сперматоциты I порядка, проявившееся в статистически значимом увеличении частоты ядер с нарушениями СК.

Нами была использована как однократная, так и 10-кратная интоксикация животных НДМА с целью выяснения разницы в спектре и уровне нарушений СК при острых и субхронических воздействиях. Увеличение количества клеток с нарушениями СК у самцов, забитых на 10-й день после окончания многократного введения НДМА, по сравнению с самцами, забитыми на первые сутки после многократного введения, может быть обусловлено тем, что введение НДМА вызывает нарушения структуры хромосом в сперматогониях, которые постепенно доходят до стадии сперматоцитов I порядка, на которой подвергаются селекции посредством механизма пахитенного ареста.

Нарушение сперматогенеза может быть обусловлено различными причинами и происходить на разных этапах. Причинами нарушения сперматогенеза могут быть дефектная миграция зародышевых клеток, гибель сперматогонимальных стволовых клеток, нарушения в структуре СК в профазе I мейоза, дефектный спермиогенез или нарушение функций микроокружения [39]. Фрагментация СК может быть следствием апоптоза или некроза мейотических клеток, а высокие уровни (20–70 %) — следствием развития блока мейоза на стадии сперматоцитов I порядка [40]. У самцов млекопитающих нарушение синапсиса аутосом, нарушение формирования «полового тельца» по причине ассоциации аутосом с XY-бивалентом приводит к блоку мейоза или пахитенному аресту, то есть гибели сперматоцитов, в которых к началу пахитены остались неспаренные участки хромосом [41]. Также отмеченные нарушения приводят к увеличению ошибок в мейотической сегрегации хромосом, снижая уровень рекомбинации и транскрипции. У человека такие нарушения могут быть причиной самопроизвольного аборта на ранних стадиях беременности или рождения потомков с такими заболеваниями, вызванными анеуплоидией, как синдромы Дауна, Клайнфельтера, Эдвардса и Тернера [42].

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено генотоксическое действие НДМА на соматические и генеративные клетки лабораторных мышей. Генотоксическая активность НДМА проявлялась в разрывах ДНК в клетках печени, почек, селезенки и легких. Определена органоспецифичность к генотоксическому действию НДМА, наибольшую чувствительность показали почки и печень. Впервые с помощью иммуноцитохимического анализа СК была выявлена генотоксичность НДМА в половых клетках, выразившаяся в статистически значимом увеличении частоты ядер с нарушениями СК в сперматоцитах I порядка.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК ГР № 0112РК00580, руководитель проекта — С.Ж. Колумбаева. Работа частично финансировалась Программой Президиума РАН «Живая природа», руководитель проекта — С.К. Абилов, и грантом РФФИ № 16-04-01447а, руководитель гранта — О.Л. Коломиец.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абилов С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. — М.; СПб.: Нестор-История, 2015. — 304 с. [Abilev SK, Glazer VM. Mutagenез s osnovami genotoksikologii: uchebnoe posobie. Moscow; Saint Petersburg: Nestor-Istoriya; 2015. 304 p. (In Russ.)]
2. Актуальный размер базы Chemical Abstracts Service (CAS), <http://www.cas.org/content/chemical-substances> (cited 24.04.2017).

3. Абилев С.К., Глазер В.М. Генетическая токсикология: итоги и проблемы // Генетика. — 2013. — Т. 49. — № 1. — С. 81–93. [Abilev SK, Glaser VM. Genetic toxicology: findings and challenges. *Russian Journal of Genetics*. 2013;49(1):70-80. (In Russ., Engl.). doi: 10.7868/S0016675813010025.
4. Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие / под ред. С.А. Гераськина, Е.И. Сарапульцевой. — М.: Издательский центр «Академия», 2010. — 208 с. [Biologicheskii kontrol' okruzhayushchei sredy: geneticheskii monitoring: ucheb. posobie / pod red. S.A. Geras'kina, E.I. Sarapul'tsevoi. Moscow: Izdatel'skii tsentr "Akademii"; 2010. 208 p. (In Russ.)]
5. Mai H, Cachot J, Brune J, et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar Pollut Bull*. 2012;64(12):2663-2667. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.10.009.
6. Kolumbayeva S, Begimbetova D, Shalakhmetova T, et al. Chromosomal instability in rodents caused by pollution from Baikonur cosmodrome. *Ecotoxicology*. 2014;23(7):1283-1291. doi: 10.1007/s10646-014-1271-1.
7. de Lemos CT, Iranço F, de Oliveira NC, et al. Bio-monitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (characiformes: *Characidae*) at sites under petrochemical influence. *Science of the Total Environment*. 2008;406:337-343.
8. Pizzino G, Bitto A, Interdonato M, et al. Oxidative stress and DNA repair and detoxification gene expression in adolescents exposed to heavy metals living in the Milazzo-Valle del Mela area (Sicily, Italy). *Redox Biology*. 2014;2:686-693. doi: 10.1016/j.redox.2014.05.003.
9. Carlsen L, Kenesov BN, Bатырбекoвa SYe, et al. Assessment of the mutagenic effect of 1,1-dimethylhydrazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009;28(3):448-452. doi: 10.1016/j.etap.2009.08.004.
10. Chen K-H, Wang K-J, Wang K-M, et al. Applying Particle Swarm Optimization-Based Decision Tree Classifier for Cancer Classification on Gene Expression Data. *Applied Soft Computing*. 2014;24:773-780. doi: 10.1016/j.asoc.2014.08.032.
11. Zampieri M, Ciccarone F, Palermo R, et al. The epigenetic factor BORIS/CTCF regulates the *NOTCH3* gene expression in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839(9):813-825. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.06.017.
12. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document N-Nitrosodimethylamine (NDMA). Ottawa: Health Canada; 2011.
13. Осипенко Б.Г., Полякова Л.О. Нитрозодиметил-амин — гепатотропный яд и канцероген: токсиколого-гигиенические аспекты его биологического действия (сообщение 1) // Сибирский медицинский журнал. — 2005. — Т. 53. — № 4. — С. 5–9. [Osipenko BG, Polyakova LO. Nitrosodimethylamine — hepatotropic toxin and carcinogene: Toxicological and hygienic aspects of its biological effect (Report 1). *Sibirskii meditsinskii zhurnal*. 2005;53(4):5-9. (In Russ.)]
14. N-Nitrosodimethylamine in Drinking-water. Geneva: World Health Organization; 2008.
15. Liviac D, Creus A, Marcos R. Genotoxic evaluation of the non-halogenated disinfection by-products nitrosodimethylamine and nitrosodiethylamine. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;185(2-3):613-618. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.09.062.
16. Hobbs ChA, Recio L, Streicker M, et al. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;786-788:172-181. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.03.003.
17. Wagner ED, Hsua K-M, Lagunas A, et al. Comparative genotoxicity of nitrosamine drinking water disinfection byproducts in *Salmonella* and mammalian cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012;741(1-2): 109-115. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.11.006.
18. Ooka M, Takazawa H, Takeda Sh, et al. Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere*. 2016;144:1901-1907. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.085.
19. Watanabe S, Kamiguchi Yu. Chromosome analysis of human spermatozoa following in vitro exposure to cyclophosphamide, benzo(a)pyrene and N-nitrosodimethylamine in the presence of rat liver S9. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2001;491(1-2):57-63. doi: 10.1016/S1383-5718(00)00170-4.
20. Morrison V, Ashby J. Reconciliation of five negative and four positive reports of the activity of dimethylnitrosamine in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*. 1994;9(4):361-365.
21. Souliotis VL, van Delft JHM, Steenwinkel M-JoST, et al. DNA adducts, mutant frequencies and mutation spectra in *lacZ* transgenic mice treated with N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*. 1998;19(5):731-739.
22. Suzuki T, Itoh T, Hayashi M, et al. Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice. *Environ Mol Mutagen*. 1996;28:348-353.
23. Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T. Pharmacokinetic parameters determined from the clastogenic activity of ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in mice *in vivo*. *Mutation Research*. 1998;412:315-322.
24. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. The National Academies Press; 2011. 246 p.

25. ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». — М.: Стандартинформ, 2010. 12 с. [GOST R53434-2009 "Printsipy nadlezhashchei laboratornoi praktiki". Moscow: Standartinform; 2010. 12 p. (In Russ.)]
26. Lijinsky W. Chemistry and Biology of N-nitroso-compounds. Cambridge: Cambridge Monographs on Cancer Research; 2011.
27. Hartmann A, Agurell E, Beevers C. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45-51. doi: 10.1093/mutage/18.1.45.
28. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., и др. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: метод. рекомендации / утв. РАМН и РАСН. — М., 2006. — 27 с. [Durnev AD, Zhanataev AK, Anisina EA, et al. Primenenie metoda shchelochnogo gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoistv prirodnykh i sinteticheskikh soedinenii: metod. rekomendatsii: utv. RAMN i RASN. Moscow; 2006. 27 p. (In Russ.)].
29. Navarro J, Vidal F, Quitart M. A method for the sequential study of synaptonemal complex by light and electron microscopy. *Human Genet*. 1981;59:419-423.
30. Kolomiets OL, Matveevsky SN, Bakloushinskaya IYu. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females. *Comparative Cytogenetics*. 2010;4(1):55-66.
31. Anderson LK, Reeves A, Webb ML, Ashley T. Distribution of Crossing Over on Mouse Synaptonemal Complexes Using Immunofluorescent Localization of MLH1 Protein. *Genetics*. 1999;159(April):1569-1579.
32. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*. 2003;18(2):159-166. doi: 10.1093/mutage/18.2.159.
33. Gabridge MG, Legator MS. A host-mediated microbial assay for the detection of mutagenic compounds. *Proc Soc Exp Biol*. 1969;130:831-834.
34. IARC. Monographs. N-Nitrosodimethylamine. 1987. Vol. 17, Supl. 7.
35. The Carcinogenic Potency Database (CPDB), <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/> (cited 28.06.2017).
36. Худoley В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. — СПб.: НИИ «Химия»; СПбГУ, 1999. — 419 с. [Khudolei VV. Kantserogeny: kharakteristiki, zakonomernosti, mekhanizmy deistviya. Saint Petersburg: NII "Khimiya", SPbGU; 1999. 419 p. (In Russ.)].
37. Sutton P, Perron J, Giudice LC, Woodruff TJ. Pesticides matter: a primer for reproductive health physicians. San Francisco (CA): University of California, San Francisco; 2011. 25 p.
38. Baumgartner A, Kurzawa-Zegota M, Laubenthal J, et al. Comet-assay parameters as rapid biomarkers of exposure to dietary/environmental compounds — An *in vitro* feasibility study on spermatozoa and lymphocytes. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2012;743:25-35. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.027.
39. Jan SZ, Hamer G, Repping S, et al. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(12):1838-50. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.008.
40. Tassistro V, Ghalamoun-Slaimi R, Saias-Magnan J, et al. Chronology of meiosis & synaptonemal complex abnormalities in normal & abnormal spermatogenesis. *Indian J Med Res*. 2009;129(3):268-278.
41. Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 2007;134(10):1823-31. doi: 10.1242/dev.000018.
42. Guiraldelli MF, Eyster C, Wilkerson JL, et al. Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis. *PLoS Genet*. 2013;9(3): e1003383. doi: 10.1371/journal.pgen.1003383.

✿ Информация об авторах

Анна Владимировна Ловинская — научный сотрудник лаборатории мутагенеза, факультет биологии и биотехнологии. Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы. E-mail: ankalav@mail.ru.

Сауле Жанабаевна Колумбаева — профессор кафедры молекулярной биологии, факультет биологии и биотехнологии. Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы. E-mail: saule.kolumbayeva@kaznu.kz.

Оксана Леонидовна Коломиец — заведующая лабораторией цитогенетики. ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва. E-mail: olkolomiets@mail.ru.

Серикбай Каримович Абилев — профессор кафедры генетики, биологический факультет. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; заместитель директора по научной работе. ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва. E-mail: abilev@vigg.ru.

✿ Information about the authors

Anna V. Lovinskaya — Researcher worker, Faculty of Biology and Biotechnology, Laboratory of Mutagenesis Research. al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan. E-mail: ankalav@mail.ru.

Saule Zh. Kolumbayeva — Professor, Faculty of Biology and Biotechnology, Department of Molecular Biology and Genetics. al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan. E-mail: saule.kolumbayeva@kaznu.kz.

Oksana L. Kolomiets — Head of the Laboratory of Cytogenetics. N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: olkolomiets@mail.ru.

Serikbay K. Abilev — Professor, Biological faculty, Department of Genetics. Lomonosov Moscow State University; Deputy Director for Science. N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: abilev@vigg.ru.