

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ МУТАГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС

М. В. Усольцев, Я. Л. Капкова, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин¹

Методом флюориметрического анализа целостности ДНК (FADU) изучена генотоксичность циклофосфамида у крыс. Установлены дозовая и временная зависимость проявления мутагенных эффектов в различных органах и тканях. Выявлено соответствие результатов, полученных при использовании метода FADU, данным, регистрируемым стандартными цитогенетическими методами. Подтверждена целесообразность применения метода FADU в доклинических исследованиях фармакологических препаратов.

Ключевые слова: циклофосфамид, ДНК-повреждения, FADU, DNA- unwinding, тканевая специфичность

ВВЕДЕНИЕ

Оценка генотоксических свойств ксенобиотиков *in vivo* как правило проводится путем регистрации повреждения генетических структур в клетках одной ткани. Вместе с тем исследованиями в области индуцированного мутагенеза обоснована необходимость разработки и внедрения методов, позволяющих проводить одномоментную оценку генотоксичности в разных тканях [3, 11]. Для решения этой проблемы на первых этапах необходима валидизация используемых методов исследования.

В 1981 г. Н. С. Birnboim и J. J. Jevsack предложили метод флюориметрической оценки целостности ДНК (FADU) [12]. Подтверждена его высокая чувствительность [21] и эффективность при оценке генотоксичности в клетках крови [5, 12], печени [8, 15], слизистой толстой кишки [9].

Настоящая работа посвящена изучению возможности применения метода для оценки органо- и тканеспецифичности эффектов модельного мутагена циклофосфамида у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили по методу FADU в ранее предложенной модификации [8]. Использовали следующие растворы: раствор А — 12 мМ Na₂EDTA, 0,15 М NaCl (рН 7,4 – 7,6); раствор В — 20 мМ Na₂EDTA, 6 М мочевины, 0,07 % SDS, 40 мМ NaOH (рН 11,2 – 11,6); раствор С — 10 мМ Na₂EDTA, 3 М мочевины, 0,035 % SDS, 0,25 М NaOH (рН 13,2 – 13,5); раствор D — 1 М глюкоза, 14 мМ меркаптоэтанол (рН 5,7 – 6,3); раствор E — $1,7 \cdot 10^{-5}$ М этидиум бромид (рН 9,8 – 10,2).

Исследование проведено на беспородных крысах-самцах массой 200 – 230 г (питомник “Крюково”

РАМН). Животных содержали при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище в виварии Института фармакологии РАМН. Циклофосфамид вводили внутривенно однократно в дозах 40, 20 и 10 мг/кг на срок 15, 30, 45 и 60 мин, а также на 6, 12, 18 и 24 ч. Ранее было показано, что мутаген в дозах 40 и 20 мг/кг обладает выраженным кластогенным эффектом, но не проявляет подобной активности при использовании из расчета 10 мг/кг [2 – 4].

Под наркозом, шприцем емкостью 20 мл, содержащим 2 мл раствора А, с иглой 25 G из сердца собирали кровь, которую в объеме 2 мл помещали в пробирки с 6 мл раствора А. В сухие чистые пробирки помещали 2,5 мл раствора градиента плотности с $\rho = 1,119$. Сверху наслаивали раствор градиента плотности с $\rho = 1,077$ (“Sigma”) и 8 мл разведенной крови. Центрифугировали при 1000 g в течение 40 мин на центрифуге Beckman J-6B (Швеция). Интерференционные кольца собирали. К лейкоцитарной массе добавляли 10 мл раствора А, ресуспендировали и центрифугировали на ОПН-3 (Россия) 15 мин при 1000 об/мин для очистки от градиента плотности. Супернатант сливали и лейкоцитарную массу ресуспендировали в 3 мл буферного раствора А.

Выделенные из семенников клетки гомогенизировали с 10 мл раствора А и центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин на центрифуге ОПН-3.

Супернатант снимали и центрифугировали при 500 g в течение 10 мин на центрифуге Beckman J-6B. Полученные клетки гомогенизировали в 3 мл буферного раствора А.

Печень промывали раствором А, выделяли и взвешивали. Селезенку выделяли без промывания. Органы измельчали и гомогенизировали в трехкратном объеме буферного раствора А. Полученные гомогенаты цент-

¹ НИИ фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

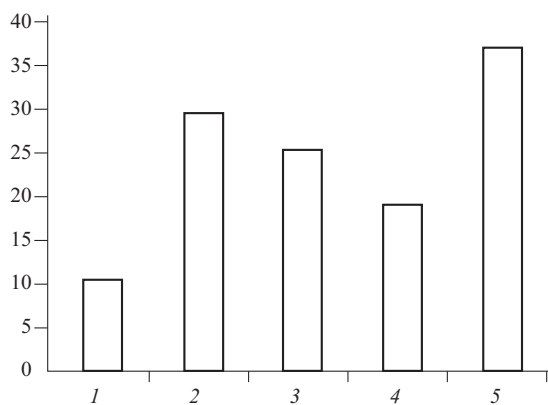


Рис. 1. Величина расщепленности ДНК в контроле.

1 — печень, 2 — костный мозг, 3 — селезенка, 4 — ядра содержащие клетки периферической крови, 5 — клетки семенников.

рифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин на центрифуге ОПН-3. Супернатант снимали и центрифугировали при 500 g в течение 10 мин на центрифуге Beckman J-6B. Супернатант сливали, полученные ядра печени гомогенизировали в 10 мл, селезенки — в 3 мл буферного раствора А.

Костный мозг вымывали из берцовой кости 0,55 % раствором КС1. Ресуспендировали и термостатировали 10 мин для прохождения лизиса клеток и центрифугировали на ОПН-3 10 мин при 1000 об/мин. Полученные ядра гомогенизировали в 3 мл буферного раствора А.

К выделенному материалу добавляли трехкратный объем раствора В. Лизис проводили при температуре 0 – 4 °С в течение 30 мин.

Использовали три набора образцов.

1. *Образец (Т)*, содержащий целостную ДНК, не подвергающуюся воздействию рН больше 11,5. Для приготовления этого образца к 0,25 мл раствора С и 0,75 мл раствора D добавляли 0,5 мл лизата. Полученный раствор имел конечный рН 10,3 – 10,6.

2. *Образец (В)*, содержащий денатурированную ДНК, использовали для оценки вклада во флюоресценцию компонентов, отличных от двунитовой ДНК. Для его приготовления к 1 мл раствора С добавляли 0,5 мл лизата. После добавления лизата полученный образец пять раз пропускали через иглу 21 G.

3. *Образец (Р)*. Здесь ДНК подвергается щелочному раскручиванию при значении рН > 11,5. Этот образец готовили путем добавления 0,5 мл лизата к 0,25 мл раствора С. При этом величина рН 12,5 – 12,8.

Все образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин для прохождения щелочного раскручивания ДНК в образце Р [8]. По истечении указанного времени в образец Р добавляли 0,75 мл раствора D. Каждое определение при анализе конкретного образца воспроизводили трехкратно.

Во все образцы добавляли 0,178 мл раствора Е. Флюоресценцию измеряли на флюориметре HITACHI

F-4000 (Япония) с длиной волны возбуждения 520 нм и длиной волны эмиссии 590 нм.

Процент повреждения ДНК (D) циклофосфамидом рассчитывали по формуле:

$$D = \left[\frac{1 - P - B}{T - B} \right] \cdot 100\%,$$

являющейся модификацией формулы, предложенной С. Birnboim и J. J. Jevsack [12].

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью критерия достоверности Стьюдента, используя статистический программный пакет STATISTICA V.5 for Windows 95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования определяли уровни величины расщепленности ДНК в клетках исследуемых органов и тканей контрольных животных. Установлено, что наименьшие значения расщепленности ДНК наблюдаются в клетках печени, а наибольшие — в клетках костного мозга (рис. 1).

На втором этапе исследования оценивали дозозависимость ДНК — повреждающего действия циклофосфамида в печени, селезенке, костном мозге, в клетках семенников и лейкоцитах крови крыс (рис. 2).

Установлено, что циклофосфамид в дозе 40 мг/кг вызывает статистически достоверное увеличение величины ДНК - повреждений в клетках печени при 15-, 30- и 45-минутной экспозиции (рис. 2, Ia). В дозе 20 мг/кг мутаген достоверно увеличивал ДНК-повреждения после 15 мин экспозиции (рис. 2, IIa). После введения циклофосфамида в дозах 40 и 20 мг/кг через 1, 6, 18 и 24 ч статистически достоверных различий в уровне ДНК-повреждений по отношению к контролю не выявлено.

В костном мозге статистически достоверное увеличение уровня ДНК — повреждений обнаружено через 15, 30, 45 мин и через 1, 6, 24 ч после введения мутагена в дозе 40 мг/кг (рис. 2, Ib), при дозе 20 мг/кг — через 15 мин, а также через 6 и 24 ч экспозиции (рис. 2, IIb).

В селезенке крыс статистически достоверное увеличение уровня ДНК- повреждений установлено при экспозиции циклофосфамида в дозе 40 мг/кг в течение 15 и 30 мин, а также 1, 6 и 24 ч (рис. 2, Iv). В дозе 20 мг/кг препарат вызывал увеличение ДНК-повреждений через 15 мин, а также через 6 и 24 ч (рис. 2, Vv).

В клетках семенников ДНК — повреждающее действие зарегистрировано через 6; 18 и 24 ч при введении препарата в дозе 40 мг/кг (рис. 2, Ir) и через 18 и 24 ч при введении в дозе 20 мг/кг (рис. 2, Igr).

В лейкоцитах крови мутаген в дозе 40 и 20 мг/кг достоверно увеличивает расщепленность ДНК в течение всех интервалов времени. Максимальная генотоксическая активность препарата проявляется при 30 и

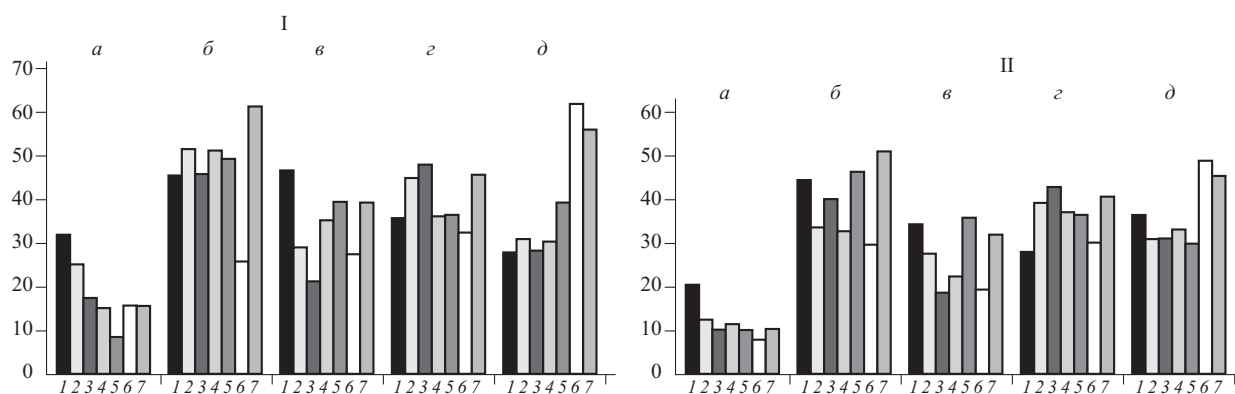


Рис. 2. Целостность ДНК в тканях крыс, обработанных циклофосфамидом в дозе 40 мг/кг (I) и 20 мг/кг (II).

По оси абсцисс: а — печень, б — костный мозг, в — селезенка, г — ядродержащие клетки периферической крови, д — клетки семенников. По оси ординат — абсолютная величина расплетенности ДНК, %: 1 — 15 мин, 2 — 30 мин, 3 — 45 мин, 4 — 1 ч, 5 — 6 ч, 6 — 18 ч, 7 — 24 ч.

45 мин, а также при 24 ч экспонирования (рис. 2, Id, Пд).

В дозе 10 мг/кг циклофосфамид не оказывал достоверного ДНК — повреждающего действия на клетки исследованных органов и тканей.

На третьем этапе исследования проведена сравнительная оценка чувствительности различных тканей к генотоксическому действию циклофосфамида. Для точек, где циклофосфамид показал статистически достоверное отличие от контроля, произведено вычисление относительного увеличения уровня расплетенности ДНК, получаемого как разница между абсолютными значениями опытного образца и контрольного. Полученные результаты представлены в таблице.

В результате анализа установлено, что при введении циклофосфамида в дозах 40 и 20 мг/кг при 15-минутной экспозиции максимальной чувствительностью обладают печень и селезенка, при экспозиции 30 и 45 мин — кровь. В печени и костном мозге отмечается сходный результат. При экспозиции 18 и 24 ч препарат в дозах 40 и 20 мг/кг проявлял максимальную генотоксическую активность в клетках семенников, крови и костного мозга.

Полученные данные свидетельствуют о сложной нелинейной зависимости ДНК — повреждающего действия циклофосфамида от времени экспозиции препарата. Это не является неожиданным, поскольку циклофосфамид является мутагеном непрямого действия и проявляет генотоксическую активность за счет образуемых *in vivo* метаболитов.

Повреждающая активность циклофосфамида связана с образованием фосфорамидиприта, период полураспада которого в клетках составляет около 40 мин, после чего он спонтанно гидролизует в реактивный азирид, который и алкилирует ДНК [10]. Минорными цитотоксическими и генотоксическими продуктами являются хлороацетальдегид и норазотистый иприт. Акролеин, который продуцируется в эквиволярных количествах, также высоко токсичен, установлена его способность подавлять синтез белков, ингибировать

тканевое дыхание, интенсифицировать перекисное окисление липидов, промежуточные и конечные продукты которого обладают генотоксической и мутагенной активностью [1, 3, 6, 7].

На основании этих данных можно предположить, что генотоксическая активность циклофосфамида, установленная в настоящей работе в интервале времени до 1 ч вызвана действием метаболитов. В дальнейшем, вероятно, доминируют другие механизмы, связанные с накоплением продуктов перекисного окисления липидов.

По имеющимся литературным данным, циклофосфамид не имеет специфического распределения в органах и тканях [10], его концентрация в тканях соответствует таковой в плазме крови. Пик в плазме достигается примерно к 1 ч после введения препарата. Половина введенного количества выводится между 5 и 8,2 часами, 20 % циклофосфамида циркулирует в крови в свободном виде, около 67 % — в виде альбумина-

Относительное увеличение расплетенности ДНК после введения животным циклофосфамида*

Доза	Время	Печень	Селезенка	Костный мозг	Кровь	Сперматогонии
40 мг/кг	15 мин	21,29	22,02	8,40	10,46	0
	30 мин	14,59	4,42	14,70	19,94	0
	45 мин	6,95	0	9,08	22,85	0
	1 ч	0	10,51	14,07	11,04	0
	6 ч	0	14,68	12,12	11,61	10,08
	18 ч	0	0	0	7,23	32,63
	24 ч	0	14,57	24,63	20,85	26,35
20 мг/кг	15 мин	10,29	9,52	7,40	2,92	0
	30 мин	0	0	0	14,32	0
	45 мин	0	0	0	17,81	0
	1 ч	0	0	0	12,25	0
	6 ч	0	10,99	9,58	11,54	0
	18 ч	0	0	0	5,25	19,52
	24 ч	0	7,51	14,20	15,78	15,99

Примечание: * — в таблице представлены данные, имеющие статистически достоверное отличие от соответствующего контроля.

тов [17]. Соответственно этому какой-либо специфической кинетики ДНК-повреждений, связанной с накоплением циклофосфамида или его метаболитов, в исследуемых органах и тканях крыс обнаружено не было.

Уменьшение содержания метаболитов в крови и связанное с ним снижение уровня ДНК — повреждающего действия показано при использовании метода сестринских хроматидных обменов в интервале времени 0,5 – 8 ч [14].

Результаты, демонстрирующие наличие у циклофосфамида генотоксических свойств при его применении в дозах 20 и 40 мг/кг и отсутствие таковых при использовании из расчета 10 мг/кг, согласуются с данными других авторов, использовавших для оценки временных и дозовых зависимостей эффектов циклофосфамида цитогенетические методы, учет хромосомных повреждений [3, 18 – 20] и микроядер [7, 13, 16].

Таким образом, результаты, характеризующие генотоксичность циклофосфамида в клетках костного мозга и крови, полученные с помощью метода FADU, согласуются с данными его цитогенетического изучения.

Полученные данные показывают, что метод FADU может быть успешно использован для оценки генотоксичности непрямого мутагена циклофосфамида в различных органах и тканях. В соответствии с ранее полученными данными [8] это позволяет сделать заключение о применимости метода FADU для оценки генотоксического действия в тканях при доклиническом изучении применимости лекарственных средств.

ВЫВОДЫ

1. Методом флуоресцентного анализа целостности ДНК установлено генотоксическое действие циклофосфамида в дозах 10, 20 и 40 мг/кг в клетках указанных тканей и его отсутствие в дозе 10 мг/кг.

2. Показана зависимость ДНК-повреждающего действия циклофосфамида в дозах 20 и 40 мг/кг от времени его экспозиции в органах животных и установлено, что при экспозиции до 6 ч относительной устойчивостью к генотоксическому действию циклофосфамида обладают клетки печени, селезенки, костного мозга; от

6 до 24 ч — клетки семенников. Ядродержащие клетки крови обладают одинаковой чувствительностью при всех сроках экспозиции.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ф. Блюгер, А. Я. Майоре, *Усп. гепатол.*, Рига (1978), вып. 7, сс. 22 – 24.
2. А. Д. Дурнев, Г. М. Волгарева, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. Фармакол.*, **61**(2), 4 – 12 (1998).
3. А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий)*, Медицина, Москва (1998).
4. Н. Н. Ильинских, В. В. Новицкий, Н. Н. Ванчугова, И. Н. Ильинских, *Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность*, Изд-во Том. Ун-та (1991).
5. И. А. Илюшина, Т. М. Решетнюк, Е. Н. Москалева и др., *Вест. РАМН.*, № 9, 36 – 38 (1993).
6. М. Н. Копылова, З. В. Вицупе, *Биохимия патологических процессов*, Рига (1978), сс. 58 – 61.
7. А. В. Олейник, *Вопр. онкол.*, том XXXI, № 7, (1985).
8. М. В. Усольцев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(2) (2000).
9. J. Adrian, Percy and James K. Chipman, *Toxicol. Letters.*, **56**, 69 – 77 (1991).
10. D. Anderson, J. B. Bishop, R. C. Garner, et al., *Mutat. Res.*, **330**, 115 – 181 (1995).
11. J. Ashby, M. P. Waters, Preston et al. *Mutat. Res.*, **352**, 153 – 157 (1996).
12. H. C. Birnboim and J. J. Jevcack, *Cancer Res.*, **41**, 1889 – 1892 (1981).
13. C. Borbarasa, D. Luca, F. Postica, and M. Covie, *Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol.*, **25**, 369 – 372 (1979).
14. K. L. Dearfield, D. Jacobson-Kram., S. K. Buenaventura, and J. R. Williams, *Mutat. Res.*, **158**, 97 – 104 (1985).
15. S. Grilli, A. Mauro, and M. Mazzullo, *J. Environ. Sci. Helth.*, **A30**(5), 1119 – 1127 (1995).
16. G. Krishna, M. L. Kropko, V. Ciaravino, and J. C. Theliss, *Mutat. Res.*, **264**, 29 – 35 (1987).
17. M. J. Moor, *Clin. Pharmacokin.*, **20**, 194 – 208 (1991).
18. K. Neda, K. Yamamate, H. Sato, et al., *Folia Pharmacol. Japan.*, **73**, 651 – 656 (1977).
19. C. W. Shev, J. K. Lee, C. A. Arras. R. L. Janes, and K. S. Lavoppa, *Environ. Mol. Muta-gen.*, **16**, 320 – 323 (1990).
20. A. P. Simula and B. G. Priestly, *Mutat. Res.*, **271**, 49 – 58 (1992).
21. YP. Yung, HE Xu, and CL. Lu, *Chung Hua Yu Fang J. Hsueh Tsa Chih.*, **28**, Sep., 275 – 277 (1994).

Поступила 00.11.2001

MUTAGEN EFFECTS IN VARIOUS ORGANS AND TISSUES OF RATS STUDIED BY FLUOROMETRIC ANALYSIS

M. V. Usol'tsev, Ya. L. Kapkova, A D. Durnev, and S. B. Seredenin

Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

The method of fluorometric analysis for DNA unity (FADU) was used to study the genotoxic effects of cyclophosphamide in rats. The dose dependence and time variation of mutagenicity manifestations in various organs and tissues of the experimental animals was studied. It was established that FADU results agree with the data obtained by conventional methods of cytogenetics. The results confirm the expediency of using FADU for the preclinical investigations of drugs.