

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ГРУППЫ МИКОТОКСИНОВ IN VIVO МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

Ереванский государственный университет, Республика Армения

Микотоксины зеараленон, афлатоксин В1 и охратоксин А являются наиболее распространенными контаминантами продуктов питания и кормов и обладают генотоксическими и канцерогенными свойствами. Методом ДНК-комет было изучено комбинированное генотоксическое воздействие афлатоксина В1 (0,0257 мг), охратоксина А (0,0128 мг) и зеараленона (0,0064 мг) *in vivo* в клетках костного мозга и лейкоцитах крови крыс линии Вистар при 15-, 30- и 60-дневной обработке. Выявлена генотоксическая активность изученной группы микотоксинов, которая в лейкоцитах крови оказалась наиболее выраженной после 60-дневной обработки, а в клетках костного мозга – также после 30-дневной обработки. Показано, что клетки костного мозга крыс значительно более чувствительны к действию изученной комбинации микотоксинов, чем лейкоциты крови.

Ключевые слова: генотоксичность, микотоксины, метод ДНК-комет, костный мозг, лейкоциты.

Введение

Микотоксины – вторичные метаболиты плесневых грибов, которые вызывают токсические эффекты у животных и представляют алиментарную опасность для человека. Эти вещества вызывают хромосомные перестройки и сестринские хроматидные обмены [9], иммуносупрессорные и аллергические эффекты, а также могут стать причиной возникновения рака. На сегодняшний день известны около 300–400 микотоксинов, примерно 12 из них обнаружены в пищевых продуктах в количествах, достаточных для токсического действия на человека и животных. Обычно на контаминированном субстрате обнаруживается более одного типа микотоксинов [2]. Установлено, что до 25% продовольственных культур контаминированы микотоксинами, которые продуцируются в основном *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium* [7].

Зеараленон – вторичный метаболит различных видов рода *Fusarium* (но в основном продуцируется *Fusarium graminearum*), которые являются одними из основных контаминантов злаковых. Канцерогенный эффект зеараленона показан у мышей и крыс [8].

Афлатоксины – биологически активные вторичные метаболиты, которые в основном продуцируются *A. flavus* и являются контаминантами арахиса, хлопка, кукурузы, орехов и других растений [12]. Все афлатоксины токсичны, являются мутагенами и канцерогенами, особенно афлатоксин В1, который является мощным гепатотоксином и гепатокарциногеном. ВОЗ классифицировала афлатоксин В1 как канцероген 1-й группы. Метаболит афлатоксина В1 – 8,9-эпоксид ковалентно связывается с ДНК и образует ДНК-аддукты, что является критическим шагом к индуцированию гепатокарциногенеза [5].

Охратоксин А, продуцируемый несколькими видами родов *Aspergillus* и *Penicillium*, является одним из самых распространенных микотоксинов в мире [2]. Этот микотоксин является нефротоксином, обладает иммуносупрессорным, тератогенным и канцерогенными свойствами. Пероральное воздействие приводит к образованию опухолей в различных тканях у мышей и крыс. Охратоксин А также может быть причиной злокачественных новообразований у людей [11].

В целом, механизмы генотоксических эффектов зеараленона, афлатоксина В1 и охратоксина А недостаточно изучены. Данные о генотоксическом воздействии микотоксинов *in vivo* немногочисленны. Комбинированные эффекты микотоксинов *in vitro* и *in vivo* также изучены недостаточно.

Исходя из того, что афлатоксин В1, зеараленон и охратоксин А способны вызывать повреждения ДНК [10, 13, 14], для оценки их комбинированного действия нами был применен метод ДНК-комет (гель-электрофорез единичных клеток), позволяющий быстро и эффективно идентифицировать их генотоксические эффекты [6].

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было изучение комбинированного генотоксического действия зеараленона, афлатоксина В1 и охратоксина А *in vivo* в клетках костного мозга и лейкоцитах крови крыс линии Вистар методом ДНК-комет.

Материалы и методы

Тестируемые соединения – зеараленон (белый порошок, молекулярная масса = 318,37, ЛД₅₀ = 10 000 мг/кг), афлатоксин В1 (белый порошок, молекулярная масса = 312,3, ЛД₅₀ = 6,25 мг/кг), охратоксин А (желтые кристаллы, молекулярная масса = 403,8, ЛД₅₀ = 20 мг/кг).

Повреждения ДНК анализировали в лейкоцитах и клетках костного мозга крыс линии Вистар с массой 150–200 г, которые ежедневно получали с кормом смесь микотоксинов в дозе: афлатоксина В1 – 0,0257 мг, охратоксина А – 0,0128 мг и зеараленона – 0,0064 мг. Подопытные животные были разделены на группы, которые отличались между собой по продолжительности опыта. Животные 1-й группы ежедневно получали загрязненный микотоксинами корм в течение 15 дней, животные 2-й группы – в течение 30 сут, а животные 3-й группы – в течение 2 мес.

Животных усыпляли путем разъединения спинного и головного мозга в участке соединения атланта и аксиса. Клетки костного мозга вымывали из бедренной кости с помощью PBS (натрий-фосфатный буфер), а лейкоциты периферической крови были получены из хвостовой вены.

Для анализа повреждений ДНК использовали щелочную версию метода ДНК-комет [1]. На предметные стекла наносили два слоя агарозы в следующей последовательности: предметные стекла предварительно покрывали слоем 1% раствора агарозы (Normal Melting Agarose – Hi Media RM273) и оставляли их в термостате при 37 °С на 12–24 ч. Затем на предметные стекла наносили второй слой – смесь 20 мкл клеточной суспензии с 80 мкл 0,5 % раствора агарозы, имеющего низкую температуру плавления [«Low Melting Point Agarose» (LMPA) – Sigma]. После нанесения второго слоя препараты покрывали покровными стеклами и помещали на 10 мин в холодильник при 4 °С до образования геля. После затвердевания геля клетки лизировали в течение 1 ч при 4 °С в растворе, содержащем 2,5 М NaCl; 100 мМ EDTA (рН 8,0); 10 мМ Tris; рН 10,0 с Тритоном X-100 (1 мл). По окончании лизиса препараты оставляли на 20 мин (при 4 °С) в растворе для электрофореза – 300 мМ NaOH и 1 мМ EDTA (рН 10,0) для раскручивания цепей ДНК и выявления односторонних разрывов и щелочно-лабильных сайтов. Электрофорез проводили в течение 25 мин при напряжении поля 25 В/см и силе тока 300 А. После электрофореза препараты промывали 10 мин нейтрализационным буфером (0,4 М Tris; рН 7,4), затем окрашивали раствором бромистого этидия (20 мкг/мл, «Sigma») и помещали во влажную камеру при 4 °С до просмотра.

Изображения комет регистрировали с помощью видеокамеры с повышенной чувствительностью («Variocam, PCO», Германия) и обрабатывали на компьютере программой Comet Assay IV (Version 4.3). Препараты комет анализировали

с использованием флуоресцентного микроскопа с соответствующими для конкретного красителя фильтрами при увеличении 200–400. На трех препаратах анализировали по 50 изображений.

Уровень повреждений ДНК оценивали по трем параметрам: интенсивность хвоста (процентное содержание ДНК в хвосте), длина хвоста (расстояние от центра ядра до кончика хвоста кометы) и момент хвоста Оливе (произведение расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста кометы на процент ДНК в хвосте).

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ SPSS-19 и Statgraphics Plus 5.1 с применением непараметрического теста Mann–Whitney (U-test).

Результаты и их обсуждение

Актуальность изучения комбинированного генотоксического эффекта микотоксинов обусловлена тем, что обычно на контаминированном субстрате обнаруживают несколько видов микотоксинов. Комбинированное воздействие многих микотоксинов на уровень повреждений ДНК изучено недостаточно.

Нами было протестировано комбинированное воздействие афлатоксина В1 (0,0257 мг), охратоксина А (0,0128 мг) и зеараленона (0,0064 мг) в течение 15, 30 и 60 дней *in vivo* на крысах линии Вистар методом ДНК-комет. Результаты оценки уровней повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах крыс представлены на рис. 1–3.

Анализ полученных результатов показал статистически достоверное повышение уровня повреждений ДНК по изученным параметрам в клетках костного мозга и лейкоцитах у крыс, подвергшихся воздействию микотоксинов.

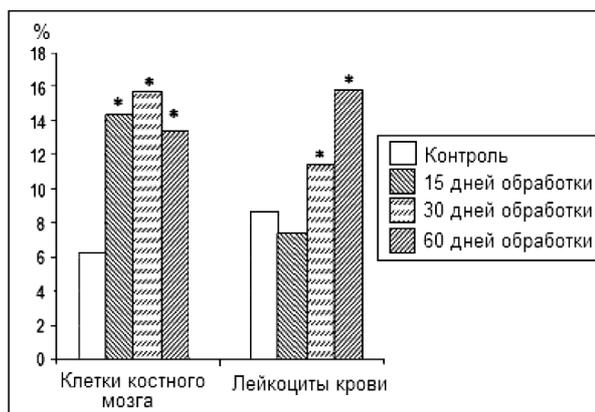


Рис. 1. Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах у крыс, обработанных микотоксинами перорально, по параметру процента ДНК в хвосте комет. Здесь и на рис. 2–3: * различия по отношению к контролю, $p < 0,05$.

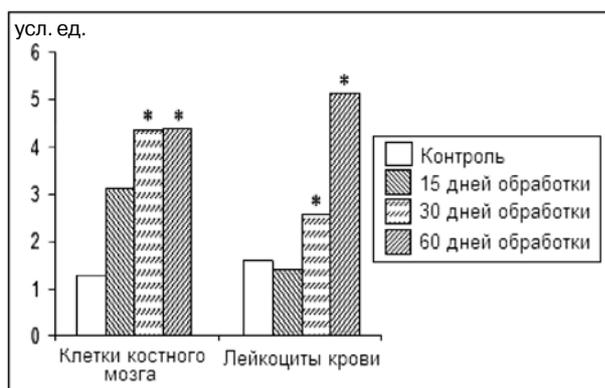


Рис. 2. Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах у крыс, обработанных микотоксинами перорально, по параметру момента хвоста Оливе.

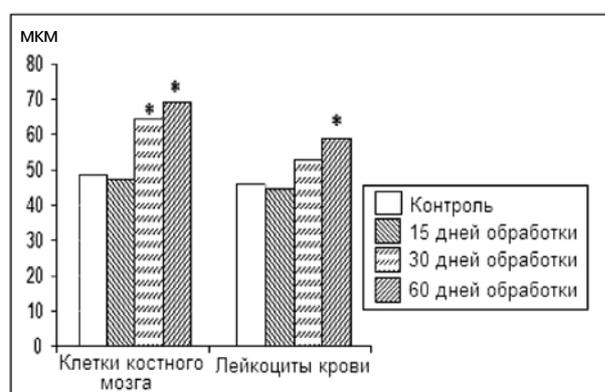


Рис. 3. Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах у крыс, обработанных микотоксинами перорально, по параметру длины хвоста.

В клетках костного мозга уровень повреждений ДНК по параметру интенсивности хвоста статистически достоверно повышался по сравнению с контролем после 15-, 30- и 60-дневного воздействия микотоксинами (см. рис. 1). По параметрам момента и длины хвоста статистически достоверное повышение наблюдалось только после 30- и 60-дневной обработки (см. рис. 2, 3).

В лейкоцитах крови статистически достоверное повышение уровня повреждений ДНК по параметрам интенсивности и момента хвоста наблюдалось только после 30- и 60-дневного воздействия (см. рис. 1, 2), а по параметру длины хвоста уровень повреждений ДНК повышался только после 60-дневной обработки (см. рис. 3).

На основе сравнения уровней повреждений ДНК клеток костного мозга и лейкоцитов крови у крыс, нами было выявлено, что уровень повреждений ДНК по параметру длины хвоста кометы был выше в клетках костного мозга по сравнению с лейкоцитами крови у крыс, подвергших-

ся воздействию микотоксинов в течение 30 и 60 дней. По параметру интенсивности хвоста кометы статистически достоверную разницу между клетками костного мозга и лейкоцитами крови наблюдали только у крыс, подвергшихся воздействию микотоксинов в течение 30 дней. По параметру момента хвоста кометы различий между клетками костного мозга и лейкоцитами крови не было выявлено.

Методом ДНК-комет были показаны эффекты раздельного действия изученных микотоксинов *in vitro* и *in vivo* в различных тест-системах. Зеараленон индуцировал повышение уровня повреждений ДНК вследствие окислительного стресса в клеточной линии печени человека Нер G2 [6]. Генотоксическая активность зеараленона и его двух метаболитов (α -зеараленол и β -зеараленол) также показана на клеточной линии Сасо-2 (клетки эпителия колоректальной карциномы человека) [3]. Генотоксическая активность афлатоксина В1 была показана в клеточной культуре Нер G2 методом ДНК-комет с применением рестрикционных ферментов (endo III и FPG). Обработка афлатоксином В1 приводила к повышению уровня активных форм кислорода. Генотоксический эффект афлатоксина В1 с метаболической активацией (S9-фракция из печени крысы) был выявлен через 3 ч, а без метаболической активации – через 24 ч после воздействия [5]. Способность охратоксина А вызывать повреждения ДНК по параметрам длины хвоста, интенсивности хвоста и момента хвоста кометы в клетках почек *in vivo* показана на крысах линии Вистар [14]. Было показано повышение уровня повреждений ДНК в клеточных линиях СНО-К1-ВН(4) (клетки яичников китайского хомячка) и ТК6 (лимфобластоидные клетки человека) методом ДНК-комет после воздействия охратоксином А. Результаты исследования также выявили кластогенный и анеугенный эффекты и способность охратоксина А связываться с ДНК и индуцировать апоптоз [4].

Наши результаты свидетельствуют о генотоксичности комбинированного действия зеараленона, афлатоксина В1 и охратоксина А для клеток костного мозга и лейкоцитов крови и дополняют литературные данные о способности микотоксинов повреждать ДНК на уровне организма.

Заключение

Из полученных результатов можно заключить, что при хроническом комбинированном воздействии низких доз микотоксинов: зеараленона, афлатоксина В1 и охратоксина А уровень повреждений ДНК в клетках костного моз-

га и лейкоцитах периферической крови достоверно повышается по сравнению с контролем. При этом уровень повреждений ДНК в клетках костного мозга выше, чем в лейкоцитах периферической крови.

Литература

1. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider // *Exp. Cell Res.* – 1988. – Vol. 175. – P. 184–191.
2. Bennett J.W., Klich M. Mycotoxins // *Clinical microbiology reviews.* – 2003. – Vol. 16, N 3. – P. 497–516.
3. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells / S. Abid-Essefi, C. Bouaziz, E.E. Golli-Bennour [et al.] // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2009. – Vol. 23, N 4. – P. 233–243.
4. Comparative analysis of micronuclei and DNA damage induced by Ochratoxin A in two mammalian cell lines / R. Ali, R.A. Mittelstaedt, J.G. Shaddock [et al.] // *Mutat Res.* – 2011. – Vol. 723, N 1. – P. 58–64.
5. Hong L., Yan L. Effects of bicyclol on aflatoxin B1 metabolism and hepatotoxicity in rats // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2002. – Vol. 23, N 10. – P. 942–945.
6. Lebrun S., Follmann W. Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay) // *Arch. Toxicol.* – 2002. – Vol. 75, N 11/12. – P. 734–741.
7. Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, and management of rice grains / K.R.N. Reddy, C.S. Reddy, H.K. Abba [et al.] // *Toxin Reviews.* – 2008. – Vol. 27. – P. 287–317.
8. NTP carcinogenesis bioassay of Zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice // *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* – 1982. – Vol. 235. – P. 1–155.
9. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes / M.B. Lioi, A. Santoro, R. Barbieri [et al.] // *Mutation. Research.* – 2004. – Vol. 557. – P. 19–27.
10. Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells / L.A. Corcuera, L. Arbillaga, A. Vettorazzi [et al.] // *Food. Chem. Toxicol.* – 2011. – Vol. 49, N 11. – P. 2883–2889.
11. Sebelius K. Ochratoxin A // *Report on Carcinogens.* – Twelfth Edition. – U.S. Department of Health and Human Services, 2011. – P. 499.
12. Strategies in Prevention of Preharvest Aflatoxin Contamination in Peanuts: Aflatoxin Biosynthesis, Genetics and Genomics / G. Baozhu, J. Yu, C. Holbrook [et al.] // *Peanut. Science.* – 2009. – Vol. 36. – P. 11–20.
13. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction / W. Hassen, I. Ayed-Boussema, A.A. Oscoz [et al.] // *Toxicology.* – 2007. – Vol. 232, N 3. – P. 294–302.
14. Zeljezić D., Domijan A.M., Peraica M. DNA damage by ochratoxin A in rat kidney assessed by the alkaline comet assay // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2006. – Vol. 39, N 12. – P. 1563–1568.