

УДК 615.9:599.323.4

ТРАНСГЕНЕРАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВИНИЛХЛОРИДА

Е.А. Капустина

ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр
экологии человека» Сибирское отделение
РАМН (ФГБУ ВСНЦ ЭЧ СО РАМН),
665827, Иркутская обл., г. Ангарск,
Российская Федерация

Изучено влияние винилхлорида (в условиях ингаляционной затравки в средней концентрации 1947 мг/м³ в течение 5 недель) на потомство, полученное от экспонированных крыс-самцов и интактных самок. При достижении животными возраста 3 месяцев проводилось обследование, включающее изучение поведения в открытом поле и исследование поврежденности ДНК с использованием гомогената головного мозга методом ДНК-комет. У потомства выявлено повышение ориентировочно-исследовательского поведения и снижение двигательной активности, повышенная поврежденность ДНК клеток нервной ткани при сравнении с крысами контрольной группы.

Ключевые слова: винилхлорид, белые крысы, потомство, поведение, поврежденность ДНК

Введение. В настоящее время особое внимание уделяется изучению воздействия различных химических веществ на здоровье детей мужчин, контактирующих с ними. В частности, у детей отцов, контактировавших с органическим растворителем в химическом производстве и некоторых других видах профессиональной деятельности отмечались дефекты полости рта, глаз, ушей, ЖКТ, конечностей, сердца [1]. М. Pino-Lopez et al. (2013) обнаружили повышенный уровень риска возникновения аутизма у детей, родители которых работали в контакте с растворителями, электромагнитными полями или в ночную смену [2], что указывает на возможное влияние изученных факторов и на нервно-психический статус последующих поколений.

Одним из широко используемых в промышленности токсикантов является винилхлорид (ВХ), вещество с мировым объемом производства 7,2 млн. тонн в год, в котором задействовано около 2,2 млн. человек [3]. Возможен и непромышленный контакт с данным токсикантом: через загрязненный воздух вблизи предприятий и мест расположения свалок

мусора или употреблении загрязненной воды, еды, напитков, медикаментов, упакованных в пленку ПВХ. Кроме того, ВХ присутствует в табачном дыме, образуется в грунтовых водах как продукт микробной жизнедеятельности при метаболизме три- и перхлорэтилена [4,5].

Доказано, что ВХ является репротоксикантом. У работающих мужчин при контакте с данным веществом свыше 5 лет выявляли снижение концентрации и удельного веса подвижных сперматозоидов, а у их жен обнаруживали возрастание количества мертворождений (2,3%, относительно группы сравнения – 0,4%, $p < 0,05$) [6]. В условиях однократной 4-часовой ингаляционной затравки ВХ в концентрации 4,4 г/м³ у нелинейных белых крыс-самцов выявлено уменьшение времени подвижности сперматозоидов [7]. При воздействии токсиканта в дозах 1000, 100, 10 мг/кг у крыс-самцов отмечено снижение уровня тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови и повышение уровней ингибина В и лютеинизирующего гормона, обнаружено поражение клеток Лейдига и Сертоли при гистологических исследованиях [8].

Вышеизложенное свидетельствует о воздействии ВХ на потомство.

Целью исследования являлось изучение поведения и поврежденности ДНК нервных клеток половозрелого потомства белых крыс-самцов, подвергавшихся воздействию ВХ.

Материалы и методы исследования. Ингаляционному воздействию ВХ подвергли 20 белых половозрелых нелинейных крыс-самцов массой 200-220 г. Общая продолжительность воздействия токсиканта составляла 5 недель по 4 часа ежедневно 5 дней в неделю. Средняя концентрация ВХ в затравочных камерах находилась на уровне 1947 мг/м³. Крысам контрольной группы (10 особей) в том же режиме подавался чистый воздух.

Сразу после окончания затравки животные опытной и контрольной групп были подсажены к интактным самкам (один самец и три самки) [9]. Полученное потомство распределили на 4 группы – опытные самцы и самки, контрольные самцы и самки, по 24 особи в каждой. Все животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 г.).

При достижении потомством возраста 3 месяцев проводилось обследование, включающее изучение поведения и исследование поврежденности ДНК с использо-

ванием гомогената головного мозга. В качестве интегрального показателя оценивалась масса тела животных.

Оценку поведения животных осуществляли в тесте «Открытое поле». Для проведения теста использовали круглую арену, наблюдение производили в течение 3 мин, изучали двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональность. Фиксировали латентность поведенческих актов – промежутки времени до начала осуществления какого-либо поведенческого акта в секундах [10].

Поврежденность ДНК в клетках головного мозга оценивали методом ДНК-комет в соответствии с рекомендациями [11]. Электрофорез проводили в камере «Sub Cell Model 96» (Bio-Rad), для окраски препаратов использовали SYBR Green I, регистрацию проводили на микроскопе «OLYMPUS BX-52», совмещенном с цифровой камерой «VEC-245». Полученные изображения ДНК-комет (по 100 клеток от каждого животного) анализировали с помощью программы «CASP 1.2.2». В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание их фрагментов в хвосте комет.

Результаты обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента (масса тела) и U-критерия Манна-Уитни (открытое поле, ДНК-кометы) с применением пакета прикладных программ «STATISTICA 6.1» (StatSoft). Нормальность распределе-

Таблица

Латентность поведенческих актов в открытом поле, Ме(Q25-Q75)

Поведенческие акты, с	Самцы			Самки		
	Опыт	Контроль	p	Опыт	Контроль	p
Обнюхивание	1,0(0,6-1,4)	2,2(1,6-2,6)	0,005	0,6(0,5-1,0)	2,7(1,9-4,2)	0,0005
Локомоции	6,8(3,4-18,8)	1,3(1,2-1,5)	0,0003	6,1(3,0-7,1)	3,3(3,6-4,2)	0,005
Движение на месте	26,4(10,4-66,5)	26,0(19,1-68,3)	0,79	17,0(7,7-12,6)	28,4(13,6-36,15)	0,63

ния оценивали с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Отличия считали статистически значимыми при значении соответствующего критерия $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов обследования потомства выявил статистически значимые отличия в ряде показателей. Взвешивание самцов показало отставание массы тела опытных от контрольных животных ($174,5 \pm 23,4$ г и $205,6 \pm 23,7$ г соответственно, $p = 0,004$). Такую же направленность имели показатели самок ($174,0 \pm 18,4$ г и $196,9 \pm 13,1$ г соответственно, $p = 0,003$).

У животных обоего пола обнаружены позы ориентировочно-исследовательского поведения, что обусловлено меньшей латентностью обнюхиваний и снижением двигательной активности, о чем свидетельствовала большая латентность локомоций. Эмоциональное состояние животных всех групп не имело отличий, что обусловлено одинаковой латентностью акта «движение на месте» у обследованных крыс.

При анализе результатов исследования поврежденности ДНК клеток головного мозга потомства в контрольной группе содержание ДНК в хвосте комет не имело половых отличий, и данные были объединены. У крыс-самцов и крыс-самок опытных групп обнаружено большее содержание фрагментов ДНК в хвосте комет, чем в контроле – $2,3(0,3-4,7)\%$, $p = 0,0001$ и $4,3(1,9-7,2)\%$, $p = 0,0005$, $0,9(0,1-3,5)\%$ соответственно. Значимое превышение содержания фрагментов ДНК в хвосте комет у опытных самцов и самок свидетельствует о большей поврежденности ДНК клеток у данных особей.

В настоящее время выявлен трансгенерационный эффект у ряда химических веществ, обладающих мутагенными свойствами [12]. Т.Г. Боровская с соавт. (2006) при исследовании состояния потомства крыс-самцов, получавших ингибиторы топозомеразной активности (везпид, иринотекан – цитостатические препараты), выявили угнетение двигательной активности, исследовательского поведения, эмоциональной реакции, значительное снижение способности крысят к обучению.

На различных моделях (дрозофилы, дрожжи, клетки млекопитающих, грызуны) подтверждены мутагенные свойства VX и его метаболитов, выражающиеся заменой оснований, генной конверсией, сестринскими хроматидными обменами, митотическими рекомбинациями, хромосомными абберациями и клеточной трансформацией [13,14]. Можно предположить, что токсикант вызывал мутации или эпигенетические изменения экспрессии генов, обусловленные геномным импринтингом или метилированием ДНК, в половых клетках крыс-самцов, подвергавшихся воздействию VX. Возможность такого эффекта описана А. Brevik et al. (2012), которые выявили у мышей повышение экспрессии ответственных за развитие эмбриона генов при воздействии бензапирена, обладающего мутагенным и репротоксическим свойствами. Авторы признают, что не достигли полного понимания причин данного явления. Было выдвинуто предположение, что этому могли способствовать как ДНК-аддукты, образованные бензапиреном и его метаболитами, так и эпигенетические модификации [15].

Результаты нашего эксперимента позволяют предположить, что выявленные изменения могли быть переданы зиготе сперматозоидами с поврежденным хроматином. Известно, что такие клетки остаются способны к оплодотворению ооцитов [16]. Отмеченные нарушения в поведении и целостности ДНК клеток у потомства самцов, подвергавшихся воздействию VX, могут свидетельствовать о нарушении функционального состояния клеток головного мозга.

Выявление факта трансгенерационного эффекта VX обуславливает необходимость изучения патогенетического механизма данного явления.

Заключение. Изучение воздействия VX на потомство первого поколения крыс-самцов, подвергавшихся воздействию токсиканта, выявило достоверное снижение массы тела, поведенческие изменения и повышенную поврежденность ДНК клеток головного мозга у данных особей, что свидетельствует о трансгенерационном эффекте VX.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Desrosiers T.A., Herring A.H., Shapira S.K., Hooiveld M., Luben T.J., Herdt-Lojavio M.L. et al. Paternal occupation and birth defects findings from the National Birth Defects Prevention Study.

Occup. Environ. Med. 2012; 69 (8): 534-542.

2. Pino-López M., Romero-Ayuso D.M. Parental occupational exposures and autism spectrum disorder in children. Rev. Esp.

Salud. Publica. 2013; 87 (1): 73-85.

3. Brandt-Rauf P. W., Li Y., Long C., Monaco R., Kovvali G., Marion M.J. Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chloride. J. Carcinog. 2012; 11 (5): 5-8.

4. Mutlu E., Collins L.B., Stout M.D., Upton P.B., Dave L.B., Winsett D. Development and application of an LC-MS/MS method for the detection of the vinyl chloride-induced DNA adduct

N(2),3-ethenoguanine in tissues of adult and weanling rats following exposure to [(13)C(2)]-VC. *Chem. Res. Toxicol.* 2010; 23 (9): 1485-14

5. Qiu Y.L., Wang W., Wang T., Liu J., Sun P., Qian J. Genetic polymorphisms, messenger RNA expression of p53, p21 and CCND1 and possible links with chromosomal aberrations in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17 (10): 2578-2584.

6. Sanotskiy I.V., Davtyan R.M., Glushchenko V.I. Study of male reproductive function under the action of certain chemicals. *Gigiena truda i professional'nye zabolovaniya.* 1980; 5:

28-31 (in Russian).

7. Kurlyandskiy B.A., Stovbur N.N., Dukhovnaya A.I. Probabilistic assessment of the relative sensitivity of the body's systems to vinyl chloride poisoning. *Gigiena i sanitariya.* 1978; 8: 51-55 (in Russian).

8. Wang X.X., Xiao J.W., Meng H.L., Cui T., Niu K.L., Li B. Effect of vinyl chloride on reproductive and endocrine system of male rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2010; 28 (7): 517-520.

9. Lang S.M., Uilson R.P. Lab rat. *Laboratornye zhivotnye.* 1993; 2: 101-110 (in Russian).

10. Samotrueva M.A., Teplyy D.L.,

Tyurenkov I.N. Experimental models of behavior. *Estestvennyye nauki.* 2009; 2: 140-152 (in Russian).

11. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidneva E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A. et al. Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds. Moscow, 2006.

12. Borovskaya T.G., Shchemerova Yu.F., Gol'dberg V.E. Condition offspring of male rats treated with inhibitors of topoisomerase. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2006; 4:33-36 (in Russian).

13. Dogliotti E. Molecular mechanisms of

carcinogenesis by vinyl chloride. *Ann Ist Super Sanita.* 2006; 42 (2): 163-169.

14. Giri A.K. Genetic toxicology of vinyl chloride-a review. *Mutat. Res.* 1995; 339 (1): 1-14.

15. Brevik A., Lindeman B., Rusnakova V., Olsen A.K., Brunborg G., Duale N. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicol. Sci.* 2012; 129 (1):157-1

16. Grenier L., Robaire B., Hales B.F. Paternal cyclophosphamide exposure induces the formation of functional micronuclei during the first zygotic division. *PLoS One.* 2011; 6 (11): e27600.

REFERENCES:

1. Desrosiers T.A., Herring A.H., Shapira S.K., Hooiveld M., Luben T.J., Herdt-Losavio M.L. et al. Paternal occupation and birth defects findings from the National Birth Defects Prevention Study. *Occup. Environ. Med.* 2012; 69 (8): 534-542.

2. Pino-López M., Romero-Ayuso D.M. Parental occupational exposures and autism spectrum disorder in children. *Rev. Esp. Salud. Publica.* 2013; 87 (1): 73-85.

3. Brandt-Rauf P. W., Li Y., Lonq C., Monaco R., Kovvali G., Marion M.J. Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chloride. *J. Carcinog.* 2012; 11 (5): 5-8.

4. Mutlu E., Collins L.B., Stout M.D., Upton P.B., Dave L.B., Winsett D. Development and application of an LC-MS/MS method for the detection of the vinyl chloride-induced DNA adduct

N(2),3-ethenoguanine in tissues of adult and weanling rats following exposure to [(13)C(2)]-VC. *Chem. Res. Toxicol.* 2010; 23 (9): 1485-14

5. Qiu Y.L., Wang W., Wang T., Liu J., Sun P., Qian J. Genetic polymorphisms, messenger RNA expression of p53, p21 and CCND1 and possible links with chromosomal aberrations in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17 (10): 2578-2584.

6. Sanotskiy I.V., Davtyan R.M., Glushchenko V.I. Study of male reproductive function under the action of certain chemicals. *Gigiena truda i professional'nye zabolovaniya.* 1980; 5: 28-31 (in Russian).

7. Kurlyandskiy B.A., Stovbur N.N., Dukhovnaya A.I. Probabilistic assessment of the relative sensitivity of the body's systems to vinyl chloride poisoning.

Gigiena i sanitariya. 1978; 8: 51-55 (in Russian).

8. Wang X.X., Xiao J.W., Meng H.L., Cui T., Niu K.L., Li B. Effect of vinyl chloride on reproductive and endocrine system of male rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2010; 28 (7): 517-520.

9. Lang S.M., Uilson R.P. Lab rat. *Laboratornye zhivotnye.* 1993; 2: 101-110 (in Russian).

10. Samotrueva M.A., Teplyy D.L., Tyurenkov I.N. Experimental models of behavior. *Estestvennyye nauki.* 2009; 2: 140-152 (in Russian).

11. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidneva E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A. et al. Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds. Moscow, 2006.

12. Borovskaya T.G., Shchemerova Yu.F., Gol'dberg V.E. Condition offspring of male rats treated with inhibitors of topoisomerase. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2006; 4:33-36 (in Russian).

13. Dogliotti E. Molecular mechanisms of carcinogenesis by vinyl chloride. *Ann Ist Super Sanita.* 2006; 42 (2): 163-169.

14. Giri A.K. Genetic toxicology of vinyl chloride-a review. *Mutat. Res.* 1995; 339 (1): 1-14.

15. Brevik A., Lindeman B., Rusnakova V., Olsen A.K., Brunborg G., Duale N. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicol. Sci.* 2012; 129 (1):157-1

16. Grenier L., Robaire B., Hales B.F. Paternal cyclophosphamide exposure induces the formation of functional micronuclei during the first zygotic division. *PLoS One.* 2011; 6 (11): e27600.

E.A. Kapustina

TRANSGENERATIONAL EFFECTS OF VINYL CHLORIDE

Federal State Budgetary Institution «East-Siberian Scientific Center for Human Ecology», Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 665827, Angarsk, Russian Federation

The impact of vinyl chloride (inhalation exposure at a mean concentration of 1947 mg/m³ during 5 weeks) on the offspring of exposed male rats and intact female rats was studied. The examination of sexually mature offspring included studying behavior in the open field and DNA damage investigation using brain homogenate with DNA-comet assay. It is revealed an increased orienting-exploratory behavior and decrease in the locomotor activity as well as increased DNA damage in the nervous tissue cells as compared with the control animals group .

Keywords: vinyl chloride, white rats, offspring, behavior, DNA damage.

Материал поступил в редакцию 03.07.2014 г.