

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-4-206-211>

УДК 57.085.23+57.044+ 575.224.46.044

© Коллектив авторов, 2019

Кудояров Э.Р.¹, Каримов Д.Д.¹, Каримов Д.О.¹, Репина Э.Ф.¹, Бакиров А.Б.¹, Данилко К.В.²

Оценка влияния индукции цитохрома P450 на генотоксичность тетрахлорметана *in vitro*

¹ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», ул. Степана Кувыкина, 94, Уфа, Россия, 450106;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», ул. Ленина, 3, Уфа, Россия, 450008

Введение. Одним из этапов патогенеза токсического действия тетрахлорметана является образование соединений активных форм кислорода с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), приводящих к модификации азотистых оснований. Частота образования модифицированных азотистыми основаниями нуклеотидов коррелирует с количеством одно- и двухцепочечных разрывов молекул ДНК. Инициатором образования активных форм кислорода и перекисного окисления липидов в клетках печени при поступлении тетрахлорметана является трихлорметильный радикал, образующийся при биотрансформации микросомальными ферментами цитохрома P450.

Цель исследования — проанализировать изменения генотоксичности тетрахлорметана в гепатоцитах при нормальной и повышенной активности цитохрома P450, вызванной воздействием индуктора (совола).

Материалы и методы. Оценка генотоксичности выполнена методом ДНК-комет после затравки тетрахлорметаном культуры гепатоцитов мыши МН22а в 96-луночных микропланшетах без индукции цитохрома P450 и при химической индукции цитохрома P450 соволом. Определение содержания ДНК в хвосте комет (%), длины хвоста комет (мкм) и момента хвоста проводили в программе ImageJ 1.48. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21.

Результаты. Представлены экспериментальные данные о генотоксическом воздействии тетрахлорметана на гепатоциты клеточной линии МН–22а без индукции цитохрома P450 и при химической индукции цитохрома P450 соволом. Обнаружено, что 0,5 мМ раствор тетрахлорметана через 1 час после добавления в культуральную среду является генотоксичным для гепатоцитов МН–22а без применения совола ($p < 0,001$). Отсутствие определяемых с помощью метода ДНК-комет признаков генотоксичности 5 мМ тетрахлорметана ($p > 0,05$) в культуральной среде, вероятно, объясняется переходом клеток в состояние паранекроза. Генотоксический эффект не выявляется методом ДНК-комет после 3 и 24 часов инкубации гепатоцитов МН–22а с 0,5 и 5 мМ растворами тетрахлорметана без прединкубации с соволом ($p > 0,05$), что может указывать на репарацию возникших повреждений. После 72 ч предварительной инкубации гепатоцитов с соволом и следующей за ней четырехчасовой затравки клеток 2,5 мМ раствором тетрахлорметана наблюдаются более высокие значения параметров ДНК-комет, чем при затравке тетрахлорметаном без инкубации с соволом ($p < 0,05$).

Выводы: По итогам проведенного исследования 72 ч индукции цитохрома P450 соволом повышает генотоксичность тетрахлорметана *in vitro*, по сравнению с 24 ч воздействия индуктора, что может косвенно указывать на более высокий уровень образовавшихся активных форм кислорода, вызванный повышенной соволом активностью ферментов цитохрома P450.

Ключевые слова: генотоксичность; тетрахлорметан; совол; ДНК-комета; МН–22а

Для цитирования: Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Каримов Д.О., Репина Э.Ф., Бакиров А.Б., Данилко К.В. Оценка влияния индукции цитохрома P450 на генотоксичность тетрахлорметана *in vitro*. *Мед. труда и пром. экол.* 2019. 59 (4): 206–211. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-4-206-211>

Для корреспонденции: Кудояров Эльдар Ренатович, мл. науч. сотр. отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека». E-mail: ekudoyarov@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Eldar R. Kudoyarov¹, Denis D. Karimov¹, Denis O. Karimov¹, Elvira F. Repina¹, Akhat B. Bakirov¹, Kseniya V. Danilko²

Estimation of the influence of cytochrome P450 induction on carbon tetrachloride genotoxicity *in vitro*

¹Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, 94, Stepana Kuvykina str., Ufa, Russia, 450106;

²Bashkir State Medical University, 3, Lenina str., Ufa, Russia, 450008

Introduction. One of the stages of the pathogenesis of the toxic effect of carbon tetrachloride is the formation of compounds of reactive oxygen species with DNA, leading to the modification of nitrogenous bases. The frequency of formation of nucleotides modified by nitrogenous bases correlates with the number of single- and double-chain breaks of deoxyribonucleic acid (DNA) molecules. The initiator of the formation of active forms of oxygen and lipid peroxidation in liver cells upon

receipt of carbon tetrachloride is a trichloromethyl radical formed during biotransformation by microsomal enzymes of cytochrome P450.

The aim of the study was to analyze the changes in the genotoxicity of carbon tetrachloride in hepatocytes at normal and increased activity of cytochrome P450 caused by the influence of an inductor (sovol).

Materials and methods. Evaluation of genotoxicity is performed by the method of DNA-comets after gavage with carbon tetrachloride culture of mouse hepatocytes MH22a in 96-well microplates without the induction of cytochrome P450 and chemical induction of cytochrome P450 by sovol. Determination of DNA content in comet tail (%), comet tail length (μm) and tail moment was performed in ImageJ 1.48. Statistical analysis of the results was performed in the program SPSS Statistics 21.

Results: Experimental data on the genotoxic effect of carbon tetrachloride on hepatocytes of the MN-22A cell line without induction of cytochrome P450 and chemical induction of cytochrome P450 by sovol are presented. It was found that 0.5 mm solution of carbon tetrachloride in 1 hour after addition to the culture medium is genotoxic for hepatocytes MH-22a without the use of sovol ($p < 0.001$). The lack of determined using the method of DNA-comet signs of genotoxicity of 5 mm carbon tetrachloride ($p > 0.05$) in the culture medium, probably due to the transition of the cells into a state of parametosis. Genotoxic effect is not detected by DNA comet after 3 and 24 hours of incubation of hepatocytes MN-22A with 0.5 and 5 mm solutions of carbon tetrachloride without preincubation with sovol ($p > 0.05$), which may indicate repair of the damage. After 72 hours of preliminary incubation of hepatocytes with sovol and the following four-hour cell priming with 2.5 mm tetrachloromethane solution, higher values of the parameters of DNA comets are observed than when seeding with tetrachloromethane without incubation with sovol ($p < 0.05$).

Conclusions: According to the results of the study 72 hours of cytochrome P450 induction by sovol increases the genotoxicity of carbon tetrachloride in vitro, compared with 24 h of inductor exposure, which may indirectly indicate a higher level of formed reactive oxygen species caused by increased activity of cytochrome P450 enzymes.

Key words: genotoxicity; carbon tetrachloride; sovol; DNA comet; MH-22A

For citation: Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Karimov D.O., Repina E.F., Bakirov A.B., Danilko K.V. Assessment of the effect of cytochrome P450 induction on the genotoxicity of carbon tetrachloride in vitro. *Med truda i prom ekol.* 2019. 59 (4): 206–211. <http://dx.doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-4-206-211>

For correspondence: Eldar R. Kudoyarov, junior research assistant of Department of toxicology and genetic of «Ufa Research Institute of occupational health and human ecology». E-mail: ekudoyarov@gmail.com

Funding: The study had no funding.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

Введение. Образование активных форм кислорода (АФК) является универсальным неспецифическим звеном в патогенезе многих заболеваний [1,2]. При токсическом отравлении страдают ткани, в которых создаются наибольшие концентрации АФК, реагирующих с любыми биомолекулами клетки, что является предпосылкой их мутагенного действия [3–6]. Образование соединений АФК с азотистыми основаниями коррелирует в ряде исследований с одно- и двухцепочечными разрывами молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [7,8], что позволяет использовать для оценки повреждений ДНК клеток метод «ДНК-комет» [9]. Метод ДНК-комет характеризуется высокой скоростью получения результата, по сравнению с классическими методами оценки генотоксичности, что дает возможность рекомендовать его в качестве экспресс-метода. В комплексе с методами мечення биомолекул флуоресцентными зондами или антителами метод ДНК-комет позволяет быстро выявлять повреждения определенных участков хромосом в одиночных клетках.

Одним из индукторов образования АФК и перекисного окисления липидов в клетках печени является тетрахлорметан (ТХМ) [2]. Его часто применяют в промышленном производстве в качестве растворителя масел, жиров и каучука. Одним из основных явлений патогенеза токсического действия ТХМ является образование соединений АФК с ДНК [2,3], что приводит к ошибкам репликации и, как следствие, к сдвигу рамки считывания и накоплению точечных мутаций [2,10]. У грызунов токсичность ТХМ связана с образованием активных метаболитов, образующихся главным образом под действием фермента CYP 2E1 [11].

К настоящему времени существует методика лабораторного получения фракции S9 печени грызунов, содержащей с использованием хлорпроизводных бифенила (ХПБ, арохлоры, совол) для оценки генных мутаций на клетках

млекопитающих¹ [12–14]. Ранее совол широко применялся в отечественной и зарубежной промышленности. С 1930 г. в мире произведено около 10^6 тонн ХПБ [13]. Миграция ХПБ в окружающую среду способствовала их кумуляции в живых организмах и экосистемах [13,15]. В ряде исследований выдвинуты предположения о том, что ХПБ, стимулируя образование соединений АФК с ДНК клеток печени и других тканей в течение длительного времени, могут являться инициаторами возникновения гепатоцеллюлярной карциномы [16].

Цель исследования — оценка влияния индукции цитохрома P450 в гепатоцитах мыши MN-22a на генотоксичность тетрахлорметана. Для оценки острой генотоксичности исследуемого вещества была поставлена задача затравить культуру гепатоцитов мыши MN-22a тетрахлорметаном после индукции цитохрома P450 соволом и без такой индукции.

Материалы и методы. Клеточная линия MN-22a (мышь СЗНА, гепатома, монослой) была получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия) и культивирована в стерильных условиях путем пассивирования в жидкой питательной среде (среда Игла МЕМ (Биолот, Россия), 10% сыворотка бычьей крови (Biosera, Франция)). Культура клеток выращивалась при +37 °C, 95% влажности, 5% CO₂ в камере инкубатора (NuAire, США). Дезагрегация клеточного монослоя проводилась с использованием 0,25% раствора трипсина с 1 mM ЭДТА-4Na (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Культура клеток была посеяна в стерильные 35 мм чашки Петри (Nunc, Дания) по $3 \cdot 10^5$ клеток/чашка и в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Pe-

¹ Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and Xprt genes. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. – 29 July 2016. URL: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264809-en>.

спублика Корея) по $5 \cdot 10^3$ клеток/лунка. Перед посевом количество клеток в суспензии подсчитывалось в камере Горяева под объективом бинокулярного микроскопа Carl Zeiss Jena (увеличение 200х). По окончании экспериментальных воздействий на клетки было приготовлено по 2 микропрепарата ДНК-комет на каждую группу.

Для исследования фрагментации ДНК клеток использовали метод ДНК-комет, руководствуясь рекомендациями МР 4.2.0014–10 [9] с изменениями. В качестве положительного контроля использовалась суспензия клеток культуры мышинной гепатомы МН–22а, инкубированная на льду 1 мин в 0,005% растворе пероксида водорода, полученного из 6% водного раствора путем разведения в фосфатном солевом буфере (рН 7.4). Микропрепараты ДНК-комет на предметных стеклах исследовались под микроскопом Zeiss Axio Imager.D2 (увеличение 100х) и фотографировались на камеру AxioCam MRc5, подключенную к персональному компьютеру. Определение содержания ДНК в хвосте комет (%), длины хвоста комет (мкм) и хвостового момента проводилось в программе ImageJ 1.48 (Wayne Rasband). По каждой экспериментальной группе были рассчитаны среднее арифметическое, стандартное отклонение и стандартная ошибка среднего. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21.

Для оценки генотоксичности ТХМ без индукции цитохрома Р450 было сформировано 12 групп: 3 группы отрицательного контроля — клетки, выращенные в нормальных условиях без затравок, 3 группы положительного контроля — клетки, выращенные в нормальных условиях, с последующей инкубацией в забуференном 0,005% растворе пероксида водорода, 3 группы клеток для затравки 0,5 мМ ТХМ и 3 группы клеток для затравки 5 мМ ТХМ. По 1 группе клеток для затравки были проинкубированы с 0,5 и 5 мМ ТХМ в течение 1, 3 и 24 часов. Контрольные группы инкубировались в нормальной питательной среде без добавок аналогичный период времени. Для установления значимости статистических различий между значениями показателей ДНК-комет из клеток, затравленных ТХМ, и группой отрицательного контроля применялся критерий Даннета.

Для оценки генотоксичности ТХМ с индукцией цитохрома Р450 было сформировано 6 групп: 2 группы отрицательного контроля — клетки для наращивания 24 и 72 ч культуры; 2 группы — 24 и 72 ч инкубации с соволом (0,3 мг/мл); 2 группы — 24 и 72 ч инкубации с соволом (0,3 мг/мл) с последующей затравкой ТХМ (2,5 мМ). Во все группы в период инкубации был добавлен диметилсульфоксид (0,5%) в качестве растворителя совола. Питательная среда в контрольных группах заменялась на свежую через 24 и 72 ч после начала инкубации экспериментальных групп с соволом. В каждом варианте индукции по завершении периода культивирования в одну из двух групп, инкубированных с соволом, добавлялась питательная среда с 2,5 мМ ТХМ, а во вторую — питательная среда без добавок. Фрагментация ДНК во всех группах оценивалась через 4 ч после начала затравки тетрахлорметаном. Для оценки статистической достоверности различий между группами рассчитывался U критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования. Результаты инкубации гепатоцитов с ТХМ в течение 1 часа представлены в таблицах 1 и 2. В табл. 1 приведены средние значения показателей ДНК-комет со стандартными отклонениями (SD) и стандартными ошибками средних (SEM, в скобках), полученных в результате 1 ч затравки гепатоцитов мыши МН22а

тетрахлорметаном. Значения параметров ДНК-комет при 3 и 24 ч инкубации не приведены ввиду отсутствия статистически значимых отличий по критерию Даннета между экспериментальными группами и отрицательным контролем ($p > 0,05$).

Обсуждение. При инкубации клеток мышинной гепатомы МН–22а в течение 1 часа с 0,5 мМ ТХМ (группа 1) наблюдается статистически значимое отличие от отрицательной контрольной группы по трем показателям. В группе 1 среднее содержание ДНК в хвосте кометы на 8,04% превышает значение аналогичного показателя в группе контроля ($p < 0,001$), а в группе 2 — лишь на 1,16% ($p > 0,05$). В группе 1 средняя длина хвоста комет в 4 раза, а средний момент хвоста в 11,75 раза превышают аналогичные значения в отрицательном контроле ($p < 0,001$). Совокупность значений параметров ДНК-комет группы 1 указывает на генотоксическое действие 0,5 мМ ТХМ при 1-часовой инкубации. Значения средней длины хвоста кометы и среднего момента хвоста ДНК-комет группы 2 статистически не отличаются от аналогичных значений отрицательной контрольной группы ($p > 0,05$). Снижение фрагментации ДНК при затравке клеток 5 мМ ТХМ, возможно, объясняется токсикологическими свойствами тетрахлорметана и переходом клеток в состояние паранекроза (по Насонову и Александрову), при котором в ней наблюдается снижение дисперсности ядерного и цитоплазматического содержимого [17]. При высоких концентрациях снижается его цитотоксичность и проявляется канцерогенность, что косвенно указывает на его непрямой механизм генотоксичности [11]. Кроме того, тетрахлорметан может снижать активность цитохрома Р450, и, как следствие, понизится уровень образования АФК. В исследовании Dai и Cederbaum (1995) показано: 2 мМ ТХМ за 24 ч инактивировал 30–50% от суммарного пула молекул СYP 2E1 и ускорил его деградацию в клеточной линии карциномы печени MVh2E1–9 с конститутивной повышенной экспрессией фермента СYP 2E1 человека [18]. Снижение активности СYP 2E1 после 24 ч инкубации с 2 мМ ТХМ привело к снижению окисления п-нитрофенола на 38% [18]. Возможно, отсутствие достоверных различий по показателям ДНК-комет при затравке 0,5 и 5 мМ тетрахлорметаном через 3 и 24 ч от аналогичных показателей ДНК-комет отрицательной контрольной группы объясняется понижением активности цитохрома Р450, и, вероятно, как следствие, трихлорметильных радикалов и активных форм кислорода в низких концентрациях становится недостаточно для фрагментации ДНК.

По значениям критерия U Манна-Уитни отмечены статистически значимые различия между группами отрицательного контроля и группой клеток, затравленных тетрахлорметаном после 24 часов инкубации с соволом ($p < 0,001$), но отсутствуют статистически значимые различия между группой гепатоцитов, инкубированных в течение 24 часов с соволом (без затравки ТХМ), и группой отрицательного контроля ($p > 0,05$) по параметрам ДНК-комет. В группе клеток после 24 ч инкубации с соволом, затравленных тетрахлорметаном, по сравнению с клетками, инкубированными только с соволом, среднее содержание ДНК в хвосте кометы выше на 0,93% ($p < 0,05$), средняя длина хвоста кометы выше на 16,8 мкм ($p < 0,001$), средний момент хвоста выше на 0,37 ($p < 0,01$).

Через 72 часа группы клеток, инкубированные в присутствии совола, достоверно отличаются по критерию U Манна-Уитни по 3 параметрам как от группы отрица-

Таблица 1 / Table 1

Показатели ДНК-комет гепатоцитов мыши МН–22а, затравленных в течение 1 часа 0,5 и 5 мМ ТХМ без индукции цитохрома Р450

Indicators of DNA comets of mouse hepatocytes MN–22A, hunted for 1 hour 0.5 and 5 mm THM without induction of cytochrome P450

Показатель	Отрицательный контроль	ТХМ 0,5 мМ	ТХМ 5 мМ	Положительный контроль
	1	2	3	4
Среднее содержание ДНК в хвосте кометы, % $\pm$ SD (SEM)	5,12 $\pm$ 3,41 (0,19)	13,16 $\pm$ 10,31 (0,37)	6,28 $\pm$ 5,04 (0,17)	42,35 $\pm$ 32,58 (1,88)
Средняя длина хвоста кометы, мкм $\pm$ SD (SEM)	34,20 $\pm$ 28,11 (1,55)	136,53 $\pm$ 131,05 (4,69)	36,23 $\pm$ 31,69 (1,05)	129,28 $\pm$ 115,24 (4,34)
Средний момент хвоста, $\pm$ SD (SEM)	2,57 $\pm$ 3,29 (0,18)	30,20 $\pm$ 56,67 (2,03)	3,53 $\pm$ 7,21 (0,24)	54,84 $\pm$ 78,29 (1,98)
Количество учтенных ДНК-комет	982	781	912	359

Примечания: SD — стандартное отклонение; SEM — стандартная ошибка среднего.

Note: SD is the standard deviation; SEM — standard error of the mean.

Таблица 2 / Table 2

Значения критерия Даннета, рассчитанного для сравнения групп клеток, затравленных в течение 1 часа 0,5 и 5 мМ ТХМ, с группой отрицательного контроля

The values of the criterion Dannetta calculated for the comparison of groups of cells inoculated for 1 hour 0.5 and 5 mm CTC, with a group of negative control

Концентрация ТХМ	Содержание ДНК в хвосте кометы	Длина хвоста кометы	Момент хвоста
0,5 мМ (группа 1)	7,6315*	102,3336*	8,1252*
5 мМ (группа 2)	0,7544	2,0318	0,2828

Примечание: * — $p < 0,001$.

Note: * — $p < 0,001$.

Таблица 3 / Table 3

Показатели ДНК-комет гепатоцитов мыши МН–22а после индукции цитохрома Р450

Indicators of DNA comets of mouse hepatocytes MN–22A after induction of cytochrome P450

Показатель	Индукция 24 часа			Индукция 72 часа		
	Отрицательный контроль	Совол, 0,3 мг/мл	Совол, 0,3 мг/мл, +2,5 мМ ТХМ	Отрицательный контроль	Совол, 0,3 мг/мл	Совол, 0,3 мг/мл, +2,5 мМ ТХМ
Среднее содержание ДНК в хвосте кометы, % $\pm$ SD (SEM)	5,60 $\pm$ 4,07 (0,23)	7,25 $\pm$ 8,17 (0,35)	8,18 $\pm$ 8,19 (0,38)	4,46 $\pm$ 4,97 (0,16)	25,58 $\pm$ 16,03 (0,87)	42,60 $\pm$ 10,97 (0,87)
Средняя длина хвоста кометы, мкм $\pm$ SD (SEM)	42,96 $\pm$ 54,97 (3,15)	52,14 $\pm$ 97,86 (4,15)	68,94 $\pm$ 97,73 (4,55)	24,77 $\pm$ 28,50 (0,91)	246,41 $\pm$ 48,31 (2,63)	393,22 $\pm$ 100,89 (8,00)
Средний момент хвоста, $\pm$ SD (SEM)	1,09 $\pm$ 2,27 (0,13)	3,10 $\pm$ 16,38 (0,69)	3,47 $\pm$ 11,77 (0,55)	0,51 $\pm$ 1,26 (0,04)	25,21 $\pm$ 25,54 (1,39)	51,96 $\pm$ 21,66 (1,72)
Количество учтенных ДНК-комет	305	557	462	987	337	159

Примечания: SD — стандартное отклонение; SEM — стандартная ошибка среднего.

Notes: SD is the standard deviation; SEM — standard error of the mean.

Таблица 4 / Table 4

Значения U критерия Манна-Уитни при сравнении групп по параметрам ДНК-комет после индукции цитохрома Р450

U values of the Mann-Whitney test when comparing groups by parameters of DNA comets after cytochrome P450 induction

Время инкубации гепатоцитов с соволом	Пары групп сравнения		Показатель		
			Содержание ДНК в хвосте кометы	Длина хвоста кометы	Момент хвоста
24 часа	Отрицательный контроль	0,3 мг/мл совол	78120	81295,5	80069,5
		0,3 мг/мл совол + 2,5 мМ ТХМ	58101***	58178,5***	58221,5***
	0,3 мг/мл совол	0,3 мг/мл совол + 2,5 мМ ТХМ	116792*	111085***	113465,5**
72 часа	Отрицательный контроль	0,3 мг/мл совол	20568***	21932***	18886,5***
		0,3 мг/мл совол + 2,5 мМ ТХМ	1926***	1052***	1140,5***
	0,3 мг/мл совол	0,3 мг/мл совол + 2,5 мМ ТХМ	11197***	12268***	11051,5***

Примечания: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Notes: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

тельного контроля ($p < 0,001$), так и друг от друга после воздействия на одну из них тетрахлорметана ($p < 0,001$). Совол повышает фоновый уровень фрагментации ДНК в гепатоцитах МН-22а через 72 часа, что проявляется в превышении значений показателей относительно группы отрицательного контроля: среднее содержание ДНК в хвосте кометы — в 5,7 раза, средняя длина хвоста кометы — в 10 раз, средний момент хвоста — в 15,5 раза. Вероятно, 72-часовая инкубация клеток с соволом приводит к повышенному накоплению молекул ферментов цитохрома P450, которые производят АФК в большем количестве, чем до индукции [12]. При этом антиоксидантные ферменты могут не справляться с высокой концентрацией АФК, поскольку полихлорированные бифенилы совола вызывают снижение уровня антиоксидантных молекул [19]. Возможно, увеличенное образование АФК приводит к повышению фрагментации ДНК.

Результаты экспериментов с индукцией цитохрома P450 соволом и последующей заправкой клеток тетрахлорметаном представлены в табл. 3 и 4.

После инкубации гепатоцитов МН-22а в течение 72 ч с соволом и 4 ч с тетрахлорметаном среднее содержание ДНК в хвосте комет составляет $42,60 \pm 0,87\%$, что на 17,02% выше относительно значений аналогичного показателя ДНК-комет из клеток, инкубированных 72 ч только с соволом ($p < 0,001$). Аналогично, средняя длина хвоста комет из гепатоцитов, инкубированных 72 ч с соволом и 4 ч с ТХМ, выше на 146,81 мкм ($p < 0,001$), а средний момент хвоста выше на 26,75, чем у клеток, инкубированных только с соволом ($p < 0,001$). При отсутствии индукции цитохрома P450 разница между группами клеток, инкубированных в течение 1 часа с 0,5 мМ ТХМ, и отрицательным контролем по значениям среднего содержания ДНК в хвосте кометы составляла всего лишь 8,04% ($p < 0,001$) (табл. 1). Таким образом, наличие сильно выраженной фрагментации ДНК из-за генотоксического действия тетрахлорметана в группе клеток с 72-часовой индукцией цитохрома P450 соволом, по сравнению с клетками, затравленными тетрахлорметаном без такой индукции, может косвенно указывать на более высокий уровень образовавшихся АФК вследствие увеличения пула молекул ферментов цитохрома P450.

Выводы:

1. Обнаружено, что 0,5 мМ ТХМ через 1 час после добавления в среду является генотоксичным для гепатоцитов МН-22а без добавления индуктора P450 (совола). 5 мМ ТХМ при тех же условиях заправки не вызывает фрагментации ДНК, достоверно различающейся с аналогичным показателем в отрицательной контрольной группе. Взаимодействие 5 мМ тетрахлорметана с мембранами клеток приводит к резкому снижению активности молекул цитохромных ферментов семейства P450, участвующих непосредственно в трансформации молекул ксенобиотика, что способствует снижению образования свободных радикалов. При концентрации тетрахлорметана 0,5 мМ, вероятно, не происходит перехода гепатоцитов в состояние паранекроза, поэтому биотрансформирующие ферменты способны производить свободные радикалы, вносящие разрывы между нуклеотидами в молекулах ДНК.

2. Генотоксический эффект не выявляется методом ДНК-комет через 3 и 24 ч инкубации гепатоцитов МН-22а с 0,5 и 5 мМ ТХМ без предынкубации с соволом, что указывает на возможную репарацию возникших повреждений при обеих концентрациях.

3. 72-часовая предынкубация гепатоцитов с соволом (0,3 мг/мл) приводит к более выраженному генотоксическому эффекту после 4 ч заправки клеток 2,5 мМ раствором тетрахлорметана, чем 24-часовая. Вероятно, 72-часовая инкубация клеток с соволом приводит к увеличению пула активных молекул ферментов цитохрома P450, которые производят свободные радикалы в большем количестве, чем до индукции. 24 ч предынкубации с соволом и 4 ч культивирования гепатоцитов в среде с тетрахлорметаном (2,5 мМ) не приводит к аналогичному результату, что объясняется наличием более длительного латентного периода, необходимого для активации биосинтеза ферментов цитохрома P450.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голиков С.Н., Саночкин И.В., Тиунов Л.А. *Общие механизмы токсического действия*. Л.: Медицина; 1986.
- Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. *Поражение печени химическими веществами (функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция)*. Уфа: «Гилем»; 2007.
- Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Усп. биол. хим.* 2013; 53:245–96.
- Balbo S., Turesky R. J., Villalta P. W. DNA adductomics. *Chem. Res. Toxicol.* 2014; 27(3): 356–66. DOI: 10.1021/tx4004352.
- Linhart K., Bartsch H., Seitz H. K. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014; 3: 56–62. DOI: 10.1016/j.redox.2014.08.009.
- Yamazaki H. *Fifty years of cytochrome P450 research*. Tokyo: Springer; 2016. DOI: 10.1007/978-4-431-54992-5.
- Ching E. W. K., Siu W.H.L., Lam P.K.S. et al. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. *Marine Poll. Bull.* 2001; 42(7): 603–10. DOI: 10.1016/S0025-326X(00)00209-5.
- Lloyd D. R., Carmichael P. L., Phillips D. H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 11(5): 420–27. DOI: 10.1021/tx970156l.
- МР 4.2.0014–10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*»: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.
- Haschek W. M., Rousseaux C.G., Wallig M.A. et al. (ed.). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. New York: Academic Press; 2013. DOI: 10.1016/C2010-1-67850-9.
- Fouw J. *Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride*. Geneva: World Health Organization; 1999.
- Белицкий Г.А., Фонштейн Л.М., Худолей В.В. и др. Совол как индуктор микросомальных ферментов, активирующих проканцерогены. *Экспериментальная онкология*. 1987; 9(3): 20–3.
- Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения/А.А. Бандман, Г.А. Войтенко, Н.В. Волкова и др.: Под ред. В.А. Филова и др. СПб: Химия; 1994.
- ГОСТ 32638–2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro*. [Текст]. Введ. 2015–06–01. М.: Стандартинформ, 2015.
- Barrett J. C., Vainio H., Peakall D. et al. 12th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environ Health Perspect.* 1997; 105(Suppl. 4): 699–737. DOI: 10.1289/ehp.97105s4699.

16. Ludewig G., Robertson L. W. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2013; 334(1): 46–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.041

17. Насонов Д. Н., Александров В.Я. Реакция живого вещества на внешние воздействия. Л.: Изд-во АН СССР; 1940.

18. Dai Y., Cederbaum A. I. Inactivation and degradation of human cytochrome P4502E1 by CCl4 in a transfected HepG2 cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275(3): 1614–22.

19. Murugesan P., Muthusamy T., Balasubramanian K., et al. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells. *Reproductive Toxicol.* 2008; 25(4): 447–54. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.04.003.

REFERENCES

1. Golikov C.N., Sanockij I.V., Tiunov L.A. *General mechanisms of toxic effects*. L.: Medicina; 1986 (in Russian).

2. Myshkin V.A., Ibatullina R.B., Bakirov A.B. *The defeat of the liver with chemical substances (functional metabolic disorders, pharmacological correction)*. Ufa: «Gilem»; 2007 (in Russian).

3. Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Usp. biol. him.* 2013; 53: 245–96 (in Russian).

4. Balbo S., Turesky R. J., Villalta P. W. DNA adductomics. *Chem. Res. Toxicol.* 2014; 27(3): 356–66. DOI: 10.1021/tx4004352.

5. Linhart K., Bartsch H., Seitz H. K. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014; 3: 56–62. DOI: 10.1016/j.redox.2014.08.009.

6. Yamazaki H. *Fifty years of cytochrome P450 research*. Tokyo: Springer; 2016. DOI: 10.1007/978-4-431-54992-5

7. Ching E. W. K., Siu W.H.L., Lam P.K.S. et al. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. *Marine Poll Bull.* 2001; 42(7): 603–10. DOI: 10.1016/S0025-326X(00)00209-5.

8. Lloyd D. R., Carmichael P. L., Phillips D. H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 11(5): 420–27. DOI: 10.1021/tx970156l.

9. MR 4.2.0014–10 “Evaluation of genotoxic properties by the method of DNA comets in vitro”: Methodological recommendations. M.: Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2011. (in Russian).

10. Haschek W. M., Rousseaux C.G., Wallig M.A. et al. (ed.). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. New York: Academic Press; 2013. DOI: 10.1016/C2010-1-67850-9.

11. Fouw J. *Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride*. Geneva: World Health Organization; 1999.

12. Belickij G.A., Fonshtejn L.M., Hudolej V.V. i dr. Sovol as an inducer of microsomal enzymes that activate procarcinogens. *Eksperimental'naya onkologiya*. 1987; 9(3): 20–3. (in Russian).

13. *Harmful chemicals. Halogen- and oxygen-containing organic compounds* A.L. Bandman, G.A. Vojtenko, N.V. Volkova et al.: Filova et al. eds. SPB: Himiya; 1994 (in Russian).

14. GOST 32638–2014 Test methods on the effects of chemical products on the human body. Method for assessing gene mutations in mammalian cells in vitro. [Tekst]. Vved. 2015–06–01. M.: Standartinform, 2015 (in Russian).

15. Barrett J. C., Vainio H., Peakall D. et al. 12th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environ Health Perspect.* 1997; 105 (4): 699–737. DOI:10.1289/ehp.97105s4699.

16. Ludewig G., Robertson L. W. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2013; 334(1): 46–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.041.

17. Nasonov D. N., Aleksandrov V.Ya. *Reakciya zhivogo veshchestva na vneshnie vozdejstviya*. L.: Izd-vo AN SSSR; 1940. (in Russian)

18. Dai Y., Cederbaum A. I. Inactivation and degradation of human cytochrome P4502E1 by CCl4 in a transfected HepG2 cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275(3): 1614–22.

19. Murugesan P., Muthusamy T., Balasubramanian K., et al. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells. *Reproductive Toxicol.* 2008; 25(4): 447–54. DOI: 10.1016/j.reprotox.2008.04.003.

Дата поступления / Received: 25.02.2019

Дата принятия к печати / Accepted: 15.03.2019

Дата публикации / Published: 18.04.2019