

УДК:612.112.94+636.3.,546.815

СИНТЕЗ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОВЕЦ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТУПЛЕНИИ СВИНЦА С РАЦИОНОМ

Э.Б. Мирзоев, В.О. Кобялко,
И.В. Полякова, О.А. Губина,
Н.А. Фролова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»,
249032, г. Обнинск, Калужской обл.,
Российская Федерация

Исследования были проведены на 12 овцах романовской породы, живой массой $33,0 \pm 1,1$ кг, в возрасте 1-1,5 года. Животные были разделены на 4 группы по 3 особи в каждой: 1 группа – контроль, 2, 3 и 4 группы ежедневно в течение 90 суток исследования с рационом получали нитрат свинца в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма. С учетом рациона (2 кг корма) суточное поступление металла в среднем составило 10, 50 и 300 мг, соответственно. В лимфоцитах периферической крови определяли общий и репаративный синтез ДНК. Образцы крови отбирали из яремной вены до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 56-е, 70-е и 90-е сутки интоксикации. Хроническое поступление свинца с рационом в организм овец характеризуется изменением общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе (5 мг/кг) в зависимости от срока исследования отмечали активацию или ингибирование синтетических и репарационных процессов. С увеличением концентрации металла в рационе (25 и 150 мг/кг) в лимфоцитах периферической крови наблюдали усиление общего и репаративного синтеза ДНК. Наиболее выраженный характер изменений регистрировали у животных 4-й группы (150 мг/кг). Предполагается, что при хроническом воздействии свинца основной вклад в интенсивность общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец вносит активация репарационных процессов.

Ключевые слова: овцы, лимфоциты, периферическая кровь, свинец, общий и репаративный синтез ДНК.

Введение. Ранее нами было показано, что поступление свинца с рационом в организм овец в течение 90 суток исследования характеризуется увеличением содержания металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови при одновременном снижении жизнеспособности клеток. При этом количество общего белка в лимфоцитах в начальные сроки интоксикации (7 суток) возрастало, а в последующие – было ниже контрольных значений [1]. Предполагается, что повышение уровня металлотионеинов обусловлено амплификацией МТ-генов вследствие повреждения ДНК [2]. Более того, металлотионеины стимулируют репликативный синтез ДНК и пролиферацию клеток костного

мозга мышей [3], хотя, активация синтеза ДНК происходит при отсутствии изменений мРНК МТ [4].

Функционирование и стабильность генома, в основном, обеспечиваются репарацией ДНК, так как ингибирование репарационных процессов приводит к увеличению частоты спонтанных и индуцированных мутаций и, в конечном итоге, гибели клеток. Следует отметить, что закономерности генетических нарушений при хроническом воздействии свинца получены в экспериментах на лабораторных животных и при проведении эпидемиологических исследований [5,6,7]. Сведения об интенсивности репарационных процессов в лимфоцитах перифе-

Мирзоев Эльдениз Балабек оглы (Mirzoev Eldeniz Balabek ogly), д.б.н., вед. н. с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, mirzoev.ed@yandex.ru

Кобялко Владимир Олегович (Kobyalko Vladimir Olegovich), к.б.н., зав. лабораторией радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, kobyalko@yandex.ru

Полякова Ирина Владимировна (Polyakova Irina Vladimirovna), мл.н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, irinaamchenkina@mail.ru

Губина Ольга Александровна (Gubina Olga Aleksandrovna), н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, Olgubina@yandex.ru

Фролова Наталья Александровна (Frolova Natalya Aleksandrovna), к.б.н., н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, nafc@yandex.ru

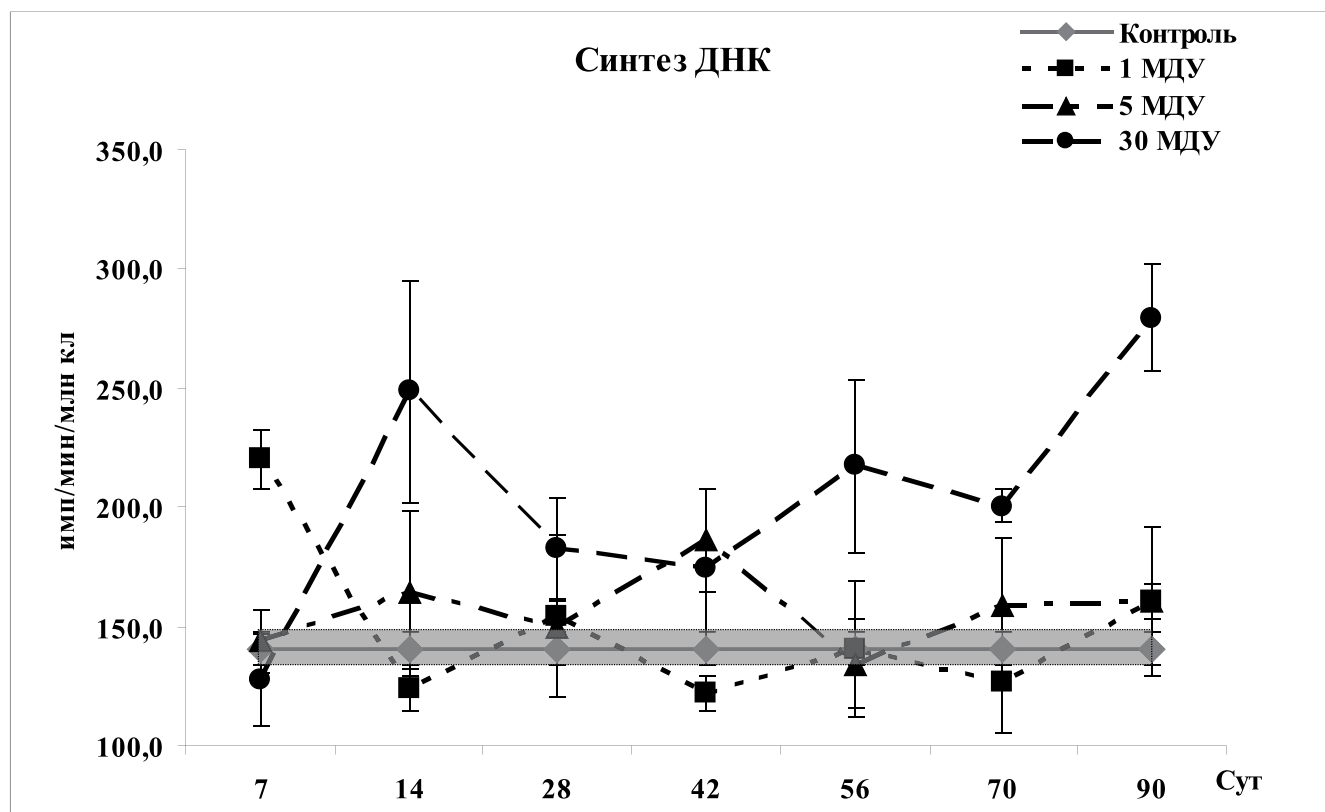


Рис.1. Синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма.

МДУ – максимально допустимый уровень; 1 МДУ – 5 мг/кг корма; 5 МДУ – 25 мг/кг корма; 30 МДУ – 150 мг/кг корма

рической крови овец при хроническом воздействии свинца отсутствуют. В связи с этим целью исследования стала оценка общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом в разных концентрациях.

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на 12 овцах романовской породы, живой массой $33,0 \pm 1,1$ кг, в возрасте 1-1,5 года. Содержание, кормление и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями «Правил лабораторной практики проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. №708 н). Овец содержали в условиях вивария Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных», кормили 2 раза в сутки при свободном доступе к воде. Рацион включал 0,3 кг комбикорма и 2 кг сена разнотравного. Рецепт комбикорма в %:

ячмень – 44; пшеница – 41,4; шрот подсолнечный – 11,7; соль поваренная – 1; обесфторенный фосфат – 1; премикс – 1. Состав сена в %: сырое вещество – 87,9; протеин – 8,89; жир – 2,26; клетчатка – 32,6; зола – 4,26;

Животные были разделены на четыре группы по 3 особи в каждой. 1 группа (интактные животные) служила контролем. Овцы 2-й, 3-й и 4-й групп ежедневно в течение 90 суток исследования получали с рационом нитрат свинца в концентрациях 5 мг/кг, 25 мг/кг и 150 мг/кг корма, соответственно. Содержание свинца в рационе животных 2-й группы соответствовало максимально допустимому уровню (1 МДУ) металла в кормах, 3-й группы – 5 МДУ, 4-й группы – 30 МДУ. Нитрат свинца задавали с комбикормом один раз в сутки с учетом количества корма (в среднем 2 кг), поступающего в желудочно-кишечный тракт. Для этого 100 г комбикорма смешивали с 50 мл раствора нитрата свинца необходимой концентрации. При этом суточное поступление металла для овец 2-й группы составило 10 мг, 3-й группы – 50 мг, 4-й группы – 300 мг, а доза воздействия, соответ-

ственно, – 0,3 мг/кг; 1,52 мг/кг и 9,1 мг/кг веса. Образцы крови брали из яремной вены овец до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 56-е, 70-е и 90-е сутки исследования. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия.

Лимфоциты периферической крови животных выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака [9, 10]. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Общий синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец оценивали по включению ³H-тимидина. Лимфоциты периферической крови овец (5 млн. клеток/мл) инкубировали 30 мин в среде содержащей 145 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л MgCl₂, 0,5 ммоль/л K₂HPO₄, 10 ммоль/л HEPES-трис, 5 ммоль/л глюкозы (рН 7,5; t-37°C). Затем добавляли 37 кБк ³H-тимидина и инкубировали 60 мин. Для остановки реакции использовали 10% раствор ТХУ и через 20 час содержимое пробирок переносили на фильтры с диаметром пор 1,2 мкм («Millipore»). Активность отмытых и высушенных фильтров измеряли в смеси ЖС-106. В качестве нулевой пробы использовали аликвоту суспензии клеток после добавления ³H-тимидина и фильтрации.

При оценке репаративного синтеза ДНК в суспензию лимфоцитов наряду с ³H-тимидином добавляли гидроксимочевину (конечная концентрация 10 ммоль/л). Радиоактивность образцов измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике («Triathler multilabel tester», Финляндия), (имп/мин/10⁶клеток).

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия значений считали достоверными при p<0,05 [11].

Результаты и обсуждение. Оценка общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови интактных овец (контрольная группа) не обнаружила существенных отклонений в течение всего периода исследования и в среднем составила 140,7±6,9 имп/мин/млн кл (рис. 1). У животных 2-й группы (1 МДУ) изменения значений показателя носили нелинейный характер. Так, на 7-е, 28-е и 90-е сутки исследования наблюдали увеличение синтеза ДНК относительно контроля на 56,4 % (p<0,05), 9,5 % и 14,4 %, а на 14-е, 42-е и 70-е – ингибирование на 12,2 %, 13 % и 9,8 %. В то же вре-

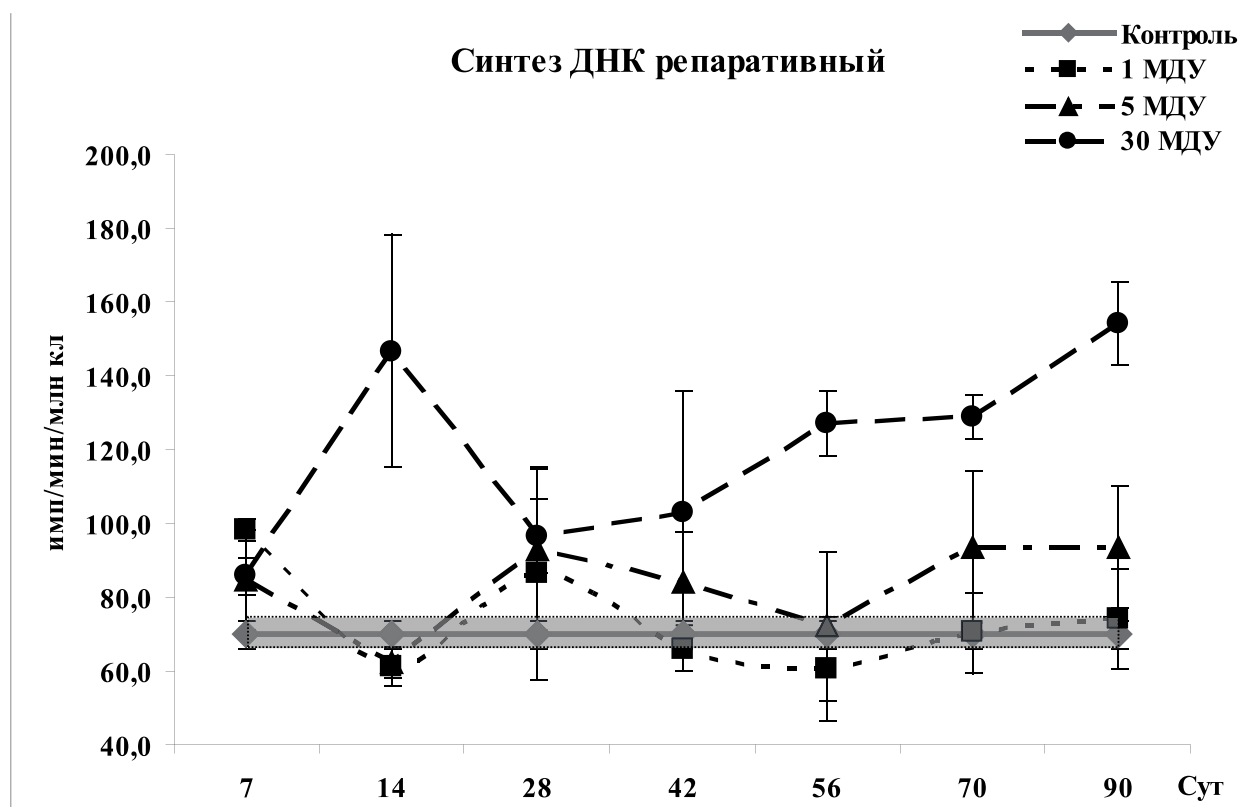


Рис.2. Репаративный синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма.

мя у овец 3-й группы (5 МДУ) отмечали тенденцию к росту значений показателя практически во все сроки исследования. С увеличением концентрации свинца в рационе (30 МДУ) интенсивность общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови возрастала. Достоверные различия значений у животных 4-й группы (30 МДУ) регистрировали на 14-е (77 %), 56-е (54 %), 70-е (43 %) и 90-е (99 %) сутки интоксикации.

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец модифицирует интенсивность синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе в зависимости от срока исследования наблюдали активацию или ингибирование процесса. В то же время увеличение концентрации металла в рационе приводило к росту значений показателя. Наиболее выраженный характер изменений отмечали у животных 4-й группы (30 МДУ).

Оценка интенсивности репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови интактных овец (контрольная группа) также не выявила существенных отклонений, и в среднем составила $70,0 \pm 3,8$ имп/мин/млн кл (рис. 2). У овец 2-й группы (1 МДУ) изменения значений показателя носили нелинейный характер. На 7-е, 28-е и 90-е сутки интоксикации интенсивность репарационных процессов была выше контроля на 41 % ($p < 0,05$), 23 % и 6 %, а на 14-е, 42-е и 70-е – ниже на 12,6 %, 5,6 % и 5,8 %. В то же время у овец 3-й группы (5 МДУ) наблюдали тенденцию к росту величины показателя практически во все сроки исследования. С увеличением концентрации свинца в рационе (30 МДУ) отмечали активацию репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. Достоверные различия значений у животных 4-й группы (30 МДУ) регистрировали на 7-е (22 %), 14-е (110 %), 28-е (38 %), 56-е (82 %), 70-е (101 %) и 90-е (180 %) сутки интоксикации.

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец характеризуется модификацией активности репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе (1 МДУ) в зависимости от срока исследования отмечали усиление или ингибирование интенсивности процесса, а с повышением концентрации металла в рационе (5 и 30 МДУ) репарационная активность возрастала. Наиболее существенные изменения регистрировали у животных 4-й группы (30 МДУ).

Сравнительный анализ полученных результатов выявил аналогичную динамику общего и репаративного синтеза ДНК. Так, при низких уровнях свинца в рационе в зависимости от срока исследования наблюдали усиление или ингибирование общего и репаративного синтеза ДНК, а высоких – активацию. Ярко выраженный характер изменений регистрировали у животных 4-й группы (30 МДУ). Возможно, с увеличением концентрации свинца в рационе и продолжительности его поступления в организм овец содержание металла в периферической крови повышается и, соответственно, токсическая нагрузка на лимфоциты возрастает. Это предположение подтверждают данные о концентрации свинца в периферической крови овец: при 5 мг/кг корма (1 МДУ) – 5,7-11,0 мкг/дл, 25 мг/кг корма (5 МДУ) – 10,1-14,1 мкг/дл, 150 мг/кг корма (30 МДУ) – 22,3-29,5 мкг/дл. (результаты исследования не опубликованы). Следует отметить, что рост повреждений ДНК в клетках периферической крови человека отмечают при уровнях свинца в крови от 25 мкг/дл и выше [12]. При этом повреждение ДНК может быть обусловлено как косвенным, так и прямым воздействием ионов Pb^{2+} [13].

В целом, при хроническом поступлении нитрата свинца в организм овец модификация интенсивности общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови сказывается на жизнеспособности клеток. Вместе с тем активация общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом воздействии свинца характеризует не только интенсивность репарационных процессов, но и образование металлопротеинов, которые, связывая ионы металла, снижают их токсическое действие [1].

Заключение. Хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец в концентрациях 5 (1 МДУ), 25 (5 МДУ) и 150 (30 МДУ) мг/кг корма характеризуется модификацией интенсивности общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях воздействия (1 МДУ) в зависимости от срока исследования наблюдали усиление или ингибирование общего и репаративного синтеза ДНК, а с увеличением токсической нагрузки синтетическая и репарационная активность лимфоцитов возрастала. Предполагается, что при хроническом воздействии свинца основной вклад в рост интенсивности общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец вносит активация репарационных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мирзоев Э. Б., Кобылко В. О., Полякова И. В., Губина О. А., Фролова Н. А. Содержание металлотионеинов и общего белка в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом. //Токсикологический вестник. 2014; 6: 36-37.
 2. Котеров А. Н., Филиппович И. В. Радиобиология металлотионеинов. Радиационная биология. // Радиоэкология. 1995; 35 (2): 162-180.
 3. Котеров А. Н., Требенко З. А., Пушкарева Н. Б., Никольский А. В. Возможный механизм противолучевого эффекта металлотионеина: стимуляция репликативного синтеза ДНК

и пролиферации клеток костного мозга. Радиационная биология. Радиоэкология. 1998; 38 (3): 432-437.
 4. Zglinicki T.V., Edwall C., Östlund E., Lind B., Nordberg M., Ringertz N.R. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. // Journal of Cell Science. 1992; 103: 1073-1081.
 5. U.S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for lead. Volume 1 of 20EPA/600/R-5/144aF.
 6. National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services Monograph on health effects of low-level lead. 20
 7. Grover P., Rekhadevi P.V., Danadevi K., Vuyyuri S.B., Mahboob M., Rahman

M.F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. Int J Hyg Environ Health. 2010; 213: 99-106/ doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.01.05
 8. Narayana K., Al-Bader M. Ultrastructural and DNA damaging effects of lead nitrate in the liver. Exp. Toxicol. Pathol. 2011; 63:43-51 / doi.org / 10.1016/j.etp.2009.09.007.
 9. Сунгуров А. Ю. Разделение и анализ клеток физическими методами / "Итоги науки и техники". ВИНТИ. Сер. "Цитология". 1985: 145 с.
 10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. //J. Clin. Invest. 1968; 21:77-89.
 11. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное

пособие для биол. спец. вузов -4-изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. (in Russian).
 12. Minozzo R., Deimling L.I., Santos-Mello R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytochrome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 2010; 697: 24-doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.01.009.
 13. Valverde M., Trejo C., Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? // Mutagenesis. 2001; 16(3):265-270.

REFERENCES:

1. Mirzoev E.B., Kobylko V.O., Polyakova I.V., Gubina O.A., Frolova N.A. Content of metallothioneins and the total protein in sheep peripheral blood lymphocytes under chronic dietary intake of lead nitrate. Toxicological Review. 2014; 6: 36-39 (in Russian).
 2. Koterov A.N., Filippovich I.V. Radiobiology of metallothioneins. Radiatsionnaya biologiya. // Radioekologiya. 1995; 35 (2): 162-180 (in Russian).
 3. Koterov A.N., Trebenok Z.A., Pushkareva N.B., Nikol'skii A.V. Possible mechanism of metallothionein radioprotective action: the stimulation of DNA replicative synthesis and bone marrow cell proliferation.

Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 1998; 38 (3): 432-437 (in Russian).
 4. Zglinicki T.V., Edwall C., Östlund E., Lind B., Nordberg M., Ringertz N.R. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. // Journal of Cell Science. 1992; 103: 1073-1081.
 5. U.S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for lead. Volume 1 of 20EPA/600/R-5/144aF.
 6. National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services Monograph on health effects of low-level lead. 20
 7. Grover P., Rekhadevi P.V., Danadevi K., Vuyyuri S.B., Mahboob M., Rahman

M.F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. Int// J Hyg Environ Health. 2010; 213: 99-106/ doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.01.05
 8. Narayana K., Al-Bader M. Ultrastructural and DNA damaging effects of lead nitrate in the liver. Exp. Toxicol. Pathol. 2011; 63:43-51 / doi.org / 10.1016/j.etp.2009.09.007.
 9. Sungurov A Yu. Separation and analysis of cells by physical methods / «Itogi nauki i tekhniki VINITI . Ser. «Tsitologiya». 1985: 4. (in Russian).
 10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. //J. Clin. Invest. 1968; 21:77-89.
 11. Lakin G.F. Biometriya: Uchebnoye

posobiye dlya boil. spets.vusov biol. -4-izd., pererab. i dop. M.: Visschaya shkola. 1990. (in Russian).
 12. Minozzo R., Deimling L.I., Santos-Mello R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytochrome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 2010; 697: 24-doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.01.009.
 13. Valverde M., Trejo C., Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? // Mutagenesis. 2001; 16(3):265-270.

E.B. Mirzoev, V.O. Kobylko, I.V. Polyakova, O.A. Gubina, N.A. Frolova

SYNTHESIS OF DNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN SHEEP AT DIETARY CHRONIC INTAKE OF LEAD

«All-Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology», 249032 Obninsk, Kaluzhskaya Region, Russian Federation

Studies were conducted on 12 sheep of Romanov breed, 1-1.5 years old and weighing $33,0 \pm 1.1$ kg. The animals were equally divided at random into 4 groups: group 1st received basic control diet (control group), 2nd, 3rd and 4th groups daily received feed with lead nitrate in concentrations of 5, 25 and 150 mg/kg during the 90 day experiment. With account of daily diet of 2 kg, a daily intake of metal was on average of 10, 50 and 300 mg respectively. A total and reparative DNA synthesis was determined in the peripheral blood lymphocytes. Blood samples were taken from the jugular vein before feeding on the 7th, 14th, 28th, 42nd, 56th, 70th and 90th days of investigation. The chronic lead intake with the diet in sheep was characterized by changes in the total and reparative DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes. It was observed that the low level of lead in diet (5 mg/kg) activates or inhibits the synthesis and reparation processes depending on the date of the study. The activation of the total and reparative DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes was observed with increase of the metal content in the diet (25 and 50 mg/kg). The most pronounced changes were registered in animals of the 4th group (150 mg/kg). It is supposed that the activation of the reparation process makes the main contribution to the intensity of the total DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes at a chronic exposure to lead.

Keywords: sheep, lymphocytes, peripheral blood, lead, total and reparative DNA synthesis.

Переработанный материал поступил в редакцию 28.09.2015 г.