

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ

*Н.В. Томилин, О.А. Филько,  
О.Н. Гайкова, А.В. Храброва,  
Н.Е. Соловьева, К.А. Краснов,  
В.А. Утсаль*

ФГБУН «Институт токсикологии  
Федерального медико-  
биологического агентства», 192019,  
г. Санкт-Петербург, Российская  
Федерация

**Ц**ель настоящего исследования – изучение механизмов токсического действия несимметричного диметилгидразина (НДМГ). В данном исследовании была выполнена оценка генотоксического и цитотоксического действия, патоморфологическое исследование и изучен вклад окислительного действия на ядерную ДНК при хроническом введении НДМГ белым крысам в течение 7, 14 и 21 суток в дозе 10 и 20 мг/кг.

В экспериментах использовали препарат НДМГ, в котором содержание 1,1-диметилгидроамина составляло 97,26 %. Кроме основного вещества препарат содержал 0,07 % нитрозодиметиламина.

Генотоксическое и цитотоксическое действие НДМГ определяли с помощью щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет) на лейкоцитах, гепатоцитах и клетках коры головного мозга. Показано, что трехнедельное введение НДМГ в дозах 10 и 20 мг/кг не вызывало значимого генотоксического и цитотоксического действия на ядерную ДНК в исследованных клетках.

В результате патоморфологического исследования токсического действия НДМГ выявлены умеренные изменения проводящих путей (разрежение нейропиля) в отделах головного мозга. В печени обнаружены полнокровие и единичные очаги некрозов гепатоцитов. С увеличением длительности введения НДМГ отмечено небольшое увеличение частоты встречаемости единичных очагов некроза гепатоцитов.

После определения окислительного действия НДМГ на ядерную ДНК лейкоцитов, гепатоцитов и клеток головного мозга с помощью метода ДНК-комет с формамидопиридингликозилазой установлено увеличение содержания активных форм кислорода в гепатоцитах после введения НДМГ в дозе 20 мг/кг в течение 14 и 21 дней.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии прямого генотоксического действия НДМГ на ядерную ДНК лейкоцитов, гепатоцитов и клеток головного мозга белых крыс. Окислительное повреждение ДНК в гепатоцитах, по-видимому, связано с высоким уровнем окислительного метаболизма НДМГ в печени после введения в дозе 20 мг/кг, что подтверждается патоморфологическими исследованиями.

**Ключевые слова:** генотоксичность; цитотоксичность; лейкоциты; гепатоциты; клетки коры головного мозга; несимметричный диметилгидразин; метод ДНК-комет; оксидативный стресс.

Цит: Н.В. Томилин, О.А. Филько, О.Н. Гайкова, А.В. Храброва, Н.Е. Соловьева, К.А. Краснов, В. А. Утсаль.

Экспериментальное исследование механизмов токсического действия несимметричного диметилгидразина при хроническом введении. Токсикологический вестник. 2020; 2: 53–59

**Томилин Николай Владимирович (Tomilin Nikolay Vladimirovich)**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [Nikolay\\_Tomilin@rambler.ru](mailto:Nikolay_Tomilin@rambler.ru);

**Филько Ольга Александровна (Filko Olga Aleksandrovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [ollalex@mail.ru](mailto:ollalex@mail.ru);

**Гайкова Ольга Николаевна (Gaikova Olga Nikolaevna)**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [Olga-gaikova@yandex.ru](mailto:Olga-gaikova@yandex.ru);

**Храброва Алла Викторовна (Khrabrova Alla Viktorovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

**Соловьева Нина Евгеньевна (Solovieva Nina Evgenievna)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [Ninasolovey19@mail.ru](mailto:Ninasolovey19@mail.ru);

**Краснов Константин Андреевич (Krasnov Konstantin Andreevich)**, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [Krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:Krasnov_tox@mail.ru);

**Утсаль Виктор Альбертович (Utsal Viktor Albertovich)**, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», [Utsal@bk.ru](mailto:Utsal@bk.ru).

**Введение.** Вследствие использования несимметричного диметилгидразина (1,1-диметилгидразин, гептил) в качестве основного компонента ракетного топлива (КРТ) необходимо применение специальных методов для ранней диагностики его токсического действия [1].

Несимметричный диметилгидразин (НДМГ, CAS 57-14-7) – высокотоксичное вещество. Согласно классификации IARC он относится к группе 2B, то есть может быть канцерогенным для человека [2].

Известно, что НДМГ под действием света, влаги и кислорода атмосферного воздуха окисляется с образованием диметиламина, тетраметилтетразена, нитрозодиметиламина (НДМА) и формальдегида [1, 3]. Поэтому в реальных условиях НДМГ всегда содержит некоторое количество НДМА, что необходимо учитывать при выполнении мониторинга стабильности генома у людей, профессионально связанных с КРТ.

В отличие от симметричного диметилгидразина (1,2-диметилгидразин) и НДМА, механизмы токсического действия НДМГ и его метаболические превращения в организме, несмотря на многолетние исследования, остаются недостаточно изученными [4]. Мутагенное действие НДМГ нельзя считать доказанным фактом [5].

Установлено, что НДМГ является слабым генотоксикантом, метилирующим ядерную ДНК гепатоцитов с образованием в 100 раз меньше N7-метилгуанина, чем НДМА [6].

В наших экспериментальных исследованиях механизма токсического действия НДМГ после острого и субхронического введения с помощью метода ДНК-комет на лейкоцитах крови белых крыс не обнаружено первичного промутагенного и мутагенного действия на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком действия НДМГ [7, 8]. Однако зарегистрировано цитотоксическое действие НДМГ, выражающееся в снижении эффективности пролиферации лимфоцитов в культуре после стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) [8].

Подобный эффект действия НДМГ ранее был показан на культуре лимфоцитов после стимуляции конканавалином А [9]. В этом исследовании была обнаружена гибель лимфоцитов в культуре при высоких дозах НДМГ без дополнительной стимуляции митогеном и в отсутствии микросомальной фракции печени. Поэтому можно предположить, что НДМГ не требует метаболической трансформации, хотя с учетом его нестабильности и в этом случае нельзя исключить образова-

ние примесей НДМА.

Нельзя не отметить, что снижение пролиферативной активности лимфоцитов в культуре после стимуляции митогенами конканавалином А и ФГА представляет собой широко используемый для оценки иммуно-токсического действия веществ метод бла-странсформации лимфоцитов [10, 11]. Значит, обнаруженное снижение пролиферации в результате действия НДМГ можно считать его иммунотоксическим действием.

Считается, что один из возможных путей токсического действия гидразинов – образование активных форм кислорода (АФК), образующихся во время окислительного метаболизма НДМГ в клетках, преимущественно в печени, и способных приводить к окислительному повреждению ядерной ДНК [12, 13, 14]. Экспериментальные доказательства окислительного повреждения ядерной ДНК при действии НДМГ в известной нам литературе отсутствуют.

*Цель настоящего исследования* – экспериментальное изучение механизмов токсического действия НДМГ, включающее оценку генотоксического и цитотоксического действия, патоморфологическое исследование и оценку вклада окислительного стресса в токсическое действие на ядерную ДНК в условиях хронического введения НДМГ белым крысам.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на беспородных самцах белых крыс массой 180–220 г.

Препарат, используемый в данном исследовании, по данным хроматомасс-спектрометрии содержал 97,26 % НДМГ. Кроме основного вещества в образце зарегистрировано незначительное количество диметилнитрозамина – 0,07 %, тетраметилтетразена – 0,47 %, диметилгидразон формальдегида – 1,96 %, диметиламина – 0,12 %, 1,1-диэтилгидразина – 0,06 %, бис-диметилгидразон глиоксаля – 0,05 %, диметилгидразон ацетальдегида – 0,02 % и триметилгидразина – 0,01 %.

Препарат вводили ежедневно внутрибрюшинно в дозах 10 и 20 мг/кг. После 7, 14 и 21-дневного введения у животных из хвостовой вены забирали по 0,25 мл крови в пробирки с K<sub>3</sub>ЭДТА. Аликвоту 0,1 мл смешивали с равным объемом фосфатно-солевого раствора Дюльбекко (ФСР) без кальция и магния с 20 %-ным ДМСО. Приготовленную пробу замораживали в низкотемпературном морозильнике при температуре –70° С.

Для получения суспензии гепатоцитов из левой доли печени вырезали кусочки (150–

200 мг) и измельчали их в 0,8 мл охлажденно-го ФСР с 10 %-ным ДМСО и 20 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА (рН 7,4).

Кусочки коры головного мозга (50–75 мг), вырезанные из двигательной зоны обоих полушарий коры, измельчали в 0,3 мл охлажденного раствора ФСР.

20 мкл суспензии гепатоцитов и клеток коры головного мозга заключали в 150 мкл 0,5 % агарозы (с низкой температурой гелеобразования), растворенной в ФСР. Затем 30 мкл аликвоты монтировали на предметные стекла, предварительно покрытые 0,75 %-ным водным раствором рутиновой агарозы.

Полученные препараты с гепатоцитами помещали в лизисный раствор на один час и подвергали электрофорезу при рН 13,5 в течение 0,5 ч при токе 300 мА и напряжении 15 В.

Лизис препаратов с клетками коры головного мозга продолжался в течение ночи. Электрофорез выполняли на следующий день.

Клетки крови размораживали на третий день, изготавливали препараты, выполняли лизис и электрофорез. В этом случае использовали аликвоту объемом 10 мкл на 150 мкл агарозы.

Полученные препараты окрашивали бромистым этидием и анализировали с помощью микроскопа с флуоресцентной приставкой Nikon Eclipse 50i и программы Comet IV. В качестве основного параметра, определяющего степень повреждения ДНК, использовали относительное содержание ДНК в хвосте комет.

Для определения цитотоксического действия регистрировали относительное содержание клеток с высокой степенью фрагментации ДНК hedgehogs (ежики), у которых практически нет нуклеоида.

Величину окислительного повреждения ядерной ДНК определяли по содержанию 8-оксигуанина с помощью бактериального фермента репарации ДНК – Fpg (M024L, New England BioLabs), 8000 ед/мл.

Препараты после лизиса трижды отмывали в буфере 40 мМ HEPES, 0,1 М KCl, 0,5 мМ EDTA, 0,2 мг/мл BSA, рН 8,0 при t = 4°C. Избыток буфера с предметных стекол удаляли фильтровальной бумагой и помещали по четыре стекла в чашки Петри диаметром 150 мм с предварительно увлажненной фильтровальной бумагой. На каждое пятно с заключенными в агарозу клетками добавляли 50 мкл буфера с Fpg, разбавленной в 3000 раз (2,7 ед/мл), затем быстро закрывали покров-

ным стеклом 20x20 мм. Чашки Петри с препаратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин.

В качестве контроля служили параллельные препараты, которые инкубировали при 37°C в течение 30 мин в буфере без добавления Fpg, и препараты, которые подвергались раскручиванию и электрофорезу сразу после лизиса.

После инкубации препараты переносили в камеру для электрофореза, выдерживали в электрофорезном растворе рН 13,5 в течение 30 мин для раскручивания ДНК. Электрофорез выполняли в течение 30 мин при токе 300 мА и напряжении 15 В.

Величину окислительного действия рассчитывали как разницу относительного содержания ДНК в хвосте комет после инкубации с ферментом и в буфере без добавления фермента.

Статистический анализ выполняли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики. В таблице показано среднее значение и величина стандартной ошибки.

Достоверность различий данных о величине повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах, гепатоцитах и клетках коры головного мозга крыс между контрольными и экспериментальными группами оценивали с помощью непараметрического теста Манн-Уитни.

Сравнение содержания клеток с высокой степенью повреждения ДНК (hedgehogs) осуществляли с помощью параметрического критерия t Стьюдента.

Для патоморфологических исследований крыс подвергали СО<sub>2</sub>-эвтаназии на 7, 14 и 21 сутки через 24 ч после последнего введения НДМГ. Выделенные органы фиксировали в 10 %-ном формалине. Затем вырезанные кусочки дополнительно фиксировали еще 24 ч. После обезжиривания и дегидратации в растворах изопропилового спирта образцы заключали в парафин. Срезы толщиной 5–10 мкм изготавливали на ротационном микротоме с расправлением на водяной бане и окрашивали гематоксилин-эозином. Заключенные под пленку препараты исследовали под микроскопом Leica DM1000 с цветной цифровой камерой при конечных увеличениях 400.

**Результаты и обсуждение.** Через 7, 14 и 21 суток после ежедневного введения НДМГ в дозах 10 и 20 мг/кг не удалось обнаружить его генотоксического и цитотоксического действия на лейкоциты. Отмечалась тенденция увеличения степени повреждения ядерной ДНК, а в одном случае через 7 дней введе-

ния НДМГ в дозе 20 мг/кг было получено достоверное увеличение по отношению к контрольным значениям (табл. 1).

Аналогичные результаты были получены в исследованиях на гепатоцитах, где также при тенденции к увеличению степени повреждения ядерной ДНК зарегистрирован только один случай достоверного увеличения этого параметра после введения НДМГ в дозе 10 мг/кг (табл. 2).

Необходимо отметить, что в ранее выполненных нами исследованиях с помощью метода ДНК-комет на лейкоцитах крови и гепатоцитах белых крыс в субхронических экспериментах с такими же дозами НДМГ, содержащего НДМА  $\leq 0,01$  % в течение 7 и 14 суток не обнаружено даже тенденции генотоксического действия [5].

В клетках коры головного мозга не выявлено генотоксического и цитотоксического действия НДМГ в условиях хронического введения в дозах 10 и 20 мг/кг. Тенденция к увеличению степени повреждения ядерной ДНК выражена значительно слабее, а в некоторых случаях содержание ДНК в хвосте кометы у экспериментальных животных ниже, чем у животных в контрольной группе (табл. 3).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии генотоксического и цитотоксического действия НДМГ в лейкоцитах, гепатоцитах и клетках коры головного мозга после трехнедельного введения в дозах 10 и 20 мг/кг.

В большинстве случаев не удалось обнаружить окислительного действия НДМГ на ядерную

Таблица 1

**Результаты исследования генотоксического и цитотоксического действия НДМГ на лейкоциты белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	3,22 ± 0,28	0,8 ± 0,3	2,26 ± 0,17	0,3 ± 0,2	5,98 ± 1,12	1,8 ± 0,6
10 мг/кг	3,44 ± 0,30	1,2 ± 0,4	2,80 ± 0,27	1,2 ± 0,3	6,55 ± 0,79	1,0 ± 0,3
Контроль	2,20 ± 0,25	0,4 ± 0,1	2,89 ± 0,44	0,2 ± 0,1	3,04 ± 0,41	0,4 ± 0,1
20 мг/кг	3,69 ± 0,25*	1,1 ± 0,4	4,06 ± 0,34	1,0 ± 0,4	4,14 ± 0,23	1,0 ± 0,3

Примечание. \* – достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Результаты исследования генотоксического и цитотоксического действия НДМГ на гепатоциты белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	9,27 ± 1,03	1,8 ± 1,1	8,23 ± 0,29	1,1 ± 0,6	12,84 ± 1,12	1,3 ± 0,4
10 мг/кг	11,00 ± 1,10	1,0 ± 0,3	11,35 ± 0,88*	1,2 ± 0,3	13,16 ± 1,63	0,6 ± 0,3
Контроль	10,92 ± 1,28	1,8 ± 1,1	13,58 ± 1,51	1,1 ± 0,6	14,91 ± 2,59	1,3 ± 0,4
20 мг/кг	17,84 ± 4,55	2,5 ± 0,7	16,01 ± 1,17	1,0 ± 0,2	20,13 ± 1,02	0,9 ± 0,4

Примечание. \* – достоверное отличие от контроля  $p < 0,05$ .



Таблица 3

**Результаты исследования генотоксического и цитотоксического действия НДМГ на клетки коры головного мозга белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	10,88 ± 1,64	1,8 ± 1,1	13,06 ± 1,12	1,1 ± 0,6	12,09 ± 1,19	1,3 ± 0,4
10 мг/кг	11,45 ± 0,71	1,0 ± 0,3	14,33 ± 0,95	1,2 ± 0,3	10,26 ± 1,21	0,6 ± 0,3
Контроль	11,98 ± 1,58	1,8 ± 1,1	10,86 ± 1,19	1,1 ± 0,6	11,54 ± 1,37	1,3 ± 0,4
20 мг/кг	11,52 ± 0,77	2,5 ± 0,7	12,45 ± 0,62	1,0 ± 0,2	12,97 ± 1,92	0,9 ± 0,4

Таблица 4

**Результаты исследования окислительного действия НДМГ на лейкоциты белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	7,51 ± 0,63	0,8 ± 0,3	6,26 ± 1,18	0,3 ± 0,2	13,02 ± 1,27	1,3 ± 0,4
10 мг/кг	8,94 ± 0,61	1,2 ± 0,4	8,02 ± 1,26	1,2 ± 0,3	13,92 ± 1,10	0,6 ± 0,3
Контроль	7,23 ± 0,76	0,4 ± 0,1	11,78 ± 0,44	0,2 ± 0,1	11,27 ± 2,35	0,9 ± 0,4
20 мг/кг	5,37 ± 0,75*	1,1 ± 0,4	13,96 ± 2,30	1,0 ± 0,4	11,16 ± 1,72	1,5 ± 0,4

Примечание. \* – достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$

ДНК лейкоцитов через 7, 14 и 21 суток после ежедневного введения НДМГ в дозах 10 и 20 мг/кг, хотя в одном случае через 7 дней введения НДМГ в дозе 20 мг/кг было получено достоверное снижение окислительного действия (табл. 4).

Ранее нами было показано, что цитотоксическое действие НДМГ на лимфоциты, выраженное в снижении их пролиферативной активности в культуре с цитокинетическим блоком, проявляется уже на 7 и 14 сутки после введения в дозах 10 и 20 мг/кг [8]. Из этого следует, что токсическое действие НДМГ на лимфоциты не связано с окислительным стрессом.

В препаратах гепатоцитов увеличение окислительного действия на ядерную ДНК было зарегистрировано после введения НДМГ в течение 14 и 21 суток в дозе 20 мг/кг (табл. 5).

В клетках коры головного мозга не выявлено окислительного действия НДМГ на ядерную ДНК в условиях субхронического введения в дозах 10 и 20 мг/кг (табл. 6).

Впервые обнаруженное нами окислительное действие НДМГ и/или его метаболитов на ядерную ДНК гепатоцитов крысы через 14 и 21 дней его введения в дозе 20 мг/кг может быть связано с высокой концентрацией активных форм кислорода (АФК), образующихся во время окислительного метаболизма НДМГ в печени.

Согласно результатам патоморфологических исследований в отделах головного мозга выявлены умеренные изменения проводящих путей (разрежение нейропиля). В печени обнаружено полнокровие и единичные очаги некрозов гепатоцитов (рис.).

Таблица 5

**Результаты исследования окислительного действия НДМГ на гепатоциты белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

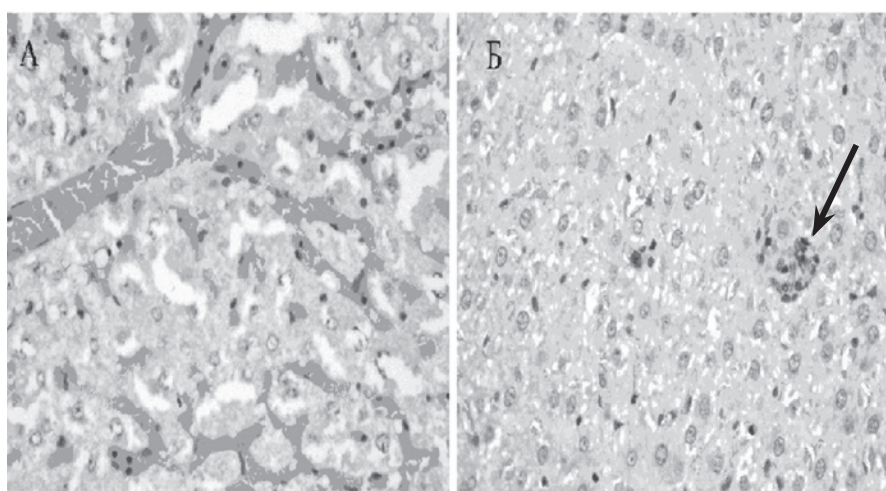
Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	-	-	12,33 ± 1,17	1,1 ± 0,6	11,29 ± 1,44	1,3 ± 0,4
10 мг/кг	-	-	12,44 ± 2,06	1,2 ± 0,3	12,30 ± 1,39	0,6 ± 0,3
Контроль	12,25 ± 2,76	2,5 ± 0,7	7,73 ± 0,95	1,0 ± 0,2	10,09 ± 1,50	0,9 ± 0,4
20 мг/кг	12,65 ± 5,16	0,9 ± 0,2	17,30 ± 2,04**	2,2 ± 0,3	20,35 ± 2,62**	1,5 ± 0,4

Примечания. \*\* – достоверное отличие от контроля  $p < 0,01$ , - - нет данных.

Таблица 6

**Результаты исследования окислительного действия НДМГ на клетки коры головного мозга белых крыс после 7, 14 и 21-дневного введения в дозах 10 и 20 мг/кг**

Группа	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %	ДНК в хвосте кометы, %	Hedgehogs, %
	7 дней		14 дней		21 день	
Контроль	-	-	31,32 ± 4,14	1,1 ± 0,6	14,09 ± 1,00	1,3 ± 0,4
10 мг/кг	-	-	26,67 ± 5,04	1,2 ± 0,3	16,19 ± 1,79	0,6 ± 0,3
Контроль	24,76 ± 4,26	2,5 ± 0,7	21,64 ± 3,40	1,0 ± 0,2	22,41 ± 1,00	0,9 ± 0,4
20 мг/кг	24,15 ± 1,63	0,9 ± 0,2	21,49 ± 2,39	2,2 ± 0,3	17,49 ± 2,88	1,5 ± 0,4



**Рис.** Печень, доза 20 мг/кг через 21 сутки после ежедневного введения НДМГ. Окраска гематоксилином и эозином. Х400. А – трабекулярное строение сохранено, умеренное полнокровие, Б – умеренно выраженная белковая и гидропическая дистрофия, единичный мелкий очаг некроза с лимфомакрофагальной инфильтрацией (указано стрелкой).

Через 7 суток введения НДМГ отмечено небольшое увеличение частоты встречаемости единичных очагов некроза гепатоцитов, которое сохранялось после введения препарата в течение 14 и 21 суток в дозах 10 и 20 мг/кг.

Можно предположить, что зарегистрированное нами окислительное действие НДМГ на ядерную ДНК гепатоцитов может быть связано, по крайней мере, частично с гибелью гепатоцитов в результате некроза.

**Заключение.** Таким образом, во всех исследованных случаях генотоксического и цитотоксического действия НДМГ на ядерную ДНК лейкоцитов, гепатоцитов и клеток головного мозга не обнаружено, за исключением двух случаев в лейкоцитах через 7 дней при дозе 20 мг/кг и в гепатоцитах через 14 дней при дозе 10 мг/кг. Ранее при исследовании препарата НДМГ, содержащего примесь НДМА 0,01 %, подобных отличий получено не было, то есть это может быть связано с действием примеси НДМА [8].

В результате исследования окислительного действия НДМГ на ядерную ДНК лейкоцитов периферической крови, гепатоцитов и клеток головного мозга с помощью метода ДНК-комет

с использованием фермента эксцизионной репарации азотистых оснований Fpg окислительное действие обнаружено только в гепатоцитах через 14 и 20 дней после начала введения в дозе 20 мг/кг.

Согласно результатам патоморфологического исследования токсического действия НДМГ в отделах головного мозга выявлены умеренные изменения проводящих путей (разрежение нейропиля). В печени обнаружены полнокровие и единичные очаги некрозов гепатоцитов. С увеличением длительности введения НДМГ отмечено увеличение частоты встречаемости единичных очагов некроза гепатоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии прямого генотоксического действия НДМГ на ядерную ДНК лейкоцитов, гепатоцитов и клеток головного мозга белых крыс. Окислительное повреждение ядерной ДНК в гепатоцитах связано с высоким уровнем АФК, по-видимому, образующихся в результате окислительного метаболизма НДМГ в печени, и может быть причиной единичных очагов некрозов, что подтверждается патоморфологическими исследованиями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев М.Ф., Рембовский В.Р., Романов В.В., ред. Пособие по токсикологии, гигиене, химии, индикации, клинике, диагностике острых и хронических интоксикаций и профилактике профессиональных заболеваний при работе с несимметричным диметилгидразином. СПб., 2009.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to Lyon; 1987.
3. Смоленков А.Д., Родин И.А., Смирнов И.А., Татаурова О.Г., Шпигун О.А. Применение ионной и ион-парной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для определения несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации. Вестн. Моск. Ун-та. Сер. Химия. 2012; 53 (5): 312-319.
4. Godoy H.M., Diaz Gomez M. I., Castro

- J.A. Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats. J Natl. Cancer Inst. 1983; 71 (5): 1047-1051.
5. Opinion of the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request from the commission related to the evaluation of daminozide in the context of Council Directive 91/414/EEC. The EFSA Journal. 2004; 61: 1-27.
6. Sagelsdorff P., Lutz W.K., Schlatter C. DNA methylation in rat liver by daminozide, 1, 1-dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine. Fund. Appl. Toxicol. 1988; 11: 723-730.
7. Томили Н.В., Филько О.А., Храброва А.В., Соловьева Н.Е., Утсаль В.А., Луговкина Н.В. Экспериментальная оценка генотоксического действия несимметричного диметилгидразина

- при однократном и субхроническом введении белым крысам. Материалы II Всероссийской научно-практической конференции: Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний. Сочи, 2014; 340-342.
8. Томили Н.В., Филько О.А., Храброва А.В., Соловьева Н.Е., Утсаль В.А., Краснов К.А. Генотоксическое и цитотоксическое действие несимметричного диметилгидразина при остром и субхроническом введении. Современные вопросы биомедицины. 2018; 2 (4): 178-185.
9. Bauer R.M, Tarr M.J., Olsen R.G. Effect of 1,1-dimethylhydrazine on lymphoproliferation and interleukin 2 immunoregulatory function. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1990; 19: 148-153
10. Frazier D.E., Tarr M.E., Olsen R.G. The in vitro and in vivo effects of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) on murine

- lymphocyte subsets and IA antigen expression. Immunoparm. Immunotox. 1991; 13 (1-2): 25-46.
11. Булычева Т.И., Дейченко Н.Л., Григорьев А.А. Иммуноцитохимическая оценка стимуляции лимфоцитов фитогемагглютинином реакции бласттрансформации лимфоцитов с моноклональными антителами Ki-Клиническая лабораторная диагностика. 2014; 7: 51-55.
12. Arranz N., Haza A. I., Garcia A., Raftar J., Morales P. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. Tox. in Vitro. – 20– Vol. – P. 1311-1317.
13. Портяная Н.И., Юшкова Г.Г., ред. Биохимия гидразинов. Ангарск; 1995; 81: 1
14. Ягужинский Л.С., ред. О токсичности гептила. Черноголовка; 20

## REFERENCES:

1. Kiselev M.F., Rembovsky V.R., Romanov V.V., ed. The manual on toxicology, hygiene, chemistry, indications, clinic, diagnosis of acute and chronic intoxications and the prevention of occupational diseases when working with unsymmetrical dimethylhydrazine SPb., 2009 (in Russian).
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to Lyon; 1987.
3. Smolencov A.D., Rodin I.A., Sмирнов R.S., Tataurova O.G., Shpigun O.A. Application of ion and ion-pair

- chromatography with mass-spectrometric detection as methods for determination of unsymmetrical dimethylhydrazine and its transformation products. Vestn. Mosc. Un-ty. Ser. Chemistry. 2012; 53 (5): 312-319 (In Russian).
4. Godoy H.M., Diaz Gomez M.I., Castro J.A. Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats. J Natl. Cancer Inst. 1983; 71 (5): 1047-1051.
5. Opinion of the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request from the

- commission related to the evaluation of daminozide in the context of Council Directive 91/414/EEC. The EFSA Journal. 2004; 61: 1-27.
6. Sagelsdorff P., Lutz W.K., Schlatter C. DNA methylation in rat liver by daminozide, 1, 1-dimethylhydrazine and dimethylnitrosamine. Fund. Appl. Toxicol. 1988; 11: 723-730.
7. Tomilin N.V., Filko O.A., Khrabrova A.V., Solovyeva N.E., Utsal V.A., Lugovkina N.V. Experimental evaluation of the genotoxic effect of unsymmetrical dimethylhydrazine with a single and subchronic administration to white rats. Proceeding of the II Russian scientific-

- practical conference: Actual problems of diagnosis, prevention and treatment of occupationally caused diseases. Sochi, 2014; 340-342 (In Russian).
8. Tomilin N.V., Filko O.A., Khrabrova A.V., Solovyeva N.E., Sizova K.V., Utsal V.A., Krasnov K.A. Genotoxicity and cytotoxicity of unsymmetrical dimethylhydrazine in acute and subchronic exposure. Current issues of biomedicine. 2018; 2 (4): 178-185 (In Russian).
9. Bauer R.M, Tarr M.J., Olsen R.G. Effect of 1,1-dimethylhydrazine on lymphoproliferation and interleukin 2 immunoregulatory function. Arch.

Environ. Contam. Toxicol. 1990; 19: 148-153.

10. Frazier D.E., Tarr M.E., Olsen R.G. The in vitro and in vivo effects of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) on murine lymphocyte subsets and IA antigen expression. Immunoparm.

Immunotox. 1991; 13 (1-2): 25-46.

11. Bulytcheva T.I., Deinyeko T.I., Grigoriyev A.A. The immune cytochemical evaluation of reaction of phytohemagglutinin stimulation of lymphocytes with monoclonal antibodies KI-Clinical Laboratory Diagnostics. 2014;

7: 51-55 (In Russian).

12. Arranz N., Haza A.I., Garcia A., Rafter J., Morales P. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. Tox. in Vitro. 2007; 21: 1311-1317.

13. Portyanaya N.I., Yushkova G.G., ed. Hydrazine Biochemistry. Angarsk; 1995 (In Russian).

14. Yaguzhinsky L.S., ed. About heptyl. Chernogolovka; 2014 (In Russian).

*N.V. Tomilin, O.A. Filko, O.N. Gaikova, A.V. Khrabrova, N.E. Solovyeva, K.A. Krasnov, V.A. Utsal*

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE MECHANISMS OF TOXIC ACTION OF UNSYMMETRICAL DIMETHYLHYDRAZINE IN CHRONIC ADMINISTRATION

Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

The purpose of this work was to study the mechanisms of toxic action of unsymmetrical dimethylhydrazine (UDMH). The evaluation of genotoxic and cytotoxic effects, the study of contribution of oxidative action of UDMH to nuclear DNA in chronic administration to white rats for 7, 14, and 21 days at a dose of 10 and 20 mg/kg as well as pathomorphological studies have been performed.

The unsymmetrical dimethylhydrazine used for the experiments contained 97,26% of 1,1-dimethylhydrazine and 0,07% of N-nitrosodimethylamine.

The genotoxic and cytotoxic effects of UDMH were determined using alkaline gel electrophoresis (DNA comet assay) on leukocytes, hepatocytes, and cortical cells. It has been shown that a three-week administration of UDMH at doses of 10 and 20 mg/kg did not cause significant genotoxic and cytotoxic effect on nuclear DNA in the studied cells.

The pathomorphological study of the toxic effect of UDMH revealed moderate changes in the conducting pathways (rarefaction of the neuropil) in the brain. Full blood and single foci of necrosis of hepatocytes have been found in the liver. A slight increase in the frequency of occurrence of single foci of hepatocyte necrosis with the increase in the duration of UDMH administration has been noted.

After determining the oxidative effect of UDMH on the nuclear DNA of leukocytes, hepatocytes, and brain cells using formamidopyrimidine glycosylase DNA comet assay, an increase in the content of reactive oxygen species in hepatocytes has been found after administration of UDMH at a dose of 20 mg/kg for 14 and 21 days.

The results obtained indicate the absence of direct genotoxic effects of UDMH on the nuclear DNA of leukocytes, hepatocytes, and brain cells of white rats. The oxidative damage to DNA in hepatocytes is apparently associated with a high level of oxidative metabolism of UDMH in the liver after administration at a dose of 20 mg/kg, which is confirmed by pathomorphological studies.

**Keywords:** *genotoxicity, cytotoxicity, leukocytes, hepatocytes, cortical cells, unsymmetrical dimethylhydrazine, DNA comet assay, oxidative stress.*

Quote: N.V. Tomilin, O.A. Filko, O.N. Gaikova, A.V. Khrabrova, N.E. Solovyeva, K.A. Krasnov, V.A. Utsal. Experimental study of the mechanisms of toxic action of unsymmetrical dimethylhydrazine in chronic administration. Toxicological Review. 2020; 2: 53-59

Материал поступил в редакцию 13.04.2020 г.

