

С.Д. Иванов¹, В.А. Александров^{2,3}, А.Л. Семенов^{1,2}, В.Г. Беспалов^{2,3}

Связывание ³H-ДМБА с биополимерами тканей матери и плода у крыс при трансплацентарном канцерогенезе

¹ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М.Гранова» МЗ РФ,

²ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» МЗ РФ,

³Университет ИТМО, Санкт-Петербург

Задачей работы явилось установление закономерности транслокации активированного ³H-7,12-диметилбензантрацена (ДМБА) в основных биополимерах тропных и нетропных в отношении опухолеобразования органов на начальном этапе трансплацентарного канцерогенеза. ДМБА вводили в/б на 21 день беременности крыс. Анализ тканей печени и почек матерей, а также печени, почек и головного мозга потомства осуществляли в сроки от 1 часа до 14 суток после введения канцерогена. В течение первых 6 ч после введения меченого канцерогена происходила закономерная, но транзитная неспецифическая аккумуляция радиоактивности ДМБА в липидной фракции преимущественно эмбриональных тканей. Через 6 ч наблюдали максимальное возрастание метки в РНК мозга и почек эмбрионов (тропных для индукции опухолей органов), после чего с 6 до 12 ч происходило повышение числа радиоактивных аддуктов в ДНК плодов, что сохранялось к 24 ч в тканях-мишенях. Повышенная аккумуляция метки в белках почек эмбрионов была зарегистрирована с 6 до 24 ч, а мозга - с 12 до 24 ч после введения ³H-ДМБА, и на 7 сутки в белках этих органов новорожденных крысят.

Ключевые слова: трансплацентарный канцерогенез, ³H-7,12-диметилбензантрацен, органы-мишени, липиды, нуклеиновые кислоты, белки

Известно, что к бластомогенному трансплацентарному действию ряда канцерогенов плод более чувствителен, чем материнский организм, и это может быть обусловлено различной активностью механизмов репарации ДНК в делящихся и неделящихся клетках [9]. Вместе с тем вопрос о специфичности действия химических канцерогенов при инициации процесса злокачественного перерождения тех или иных органов до настоящего времени окончательно не решён. У крыс при трансплацентарном воздействии нитрозэтилмочевины или 7, 12-диметилбенз(а)антрацена (ДМБА) на 18 или 21 дне беременности установлена избирательность к возникновению

опухолей головного мозга и почек у потомства, тогда как в других органах крысят, например, печени и щитовидной железы, новообразований возникало значительно меньше [6, 12]. Результаты измерения концентраций неизмененного канцерогена показали, что ДМБА способен проникать через плаценту в плод крыс, однако полученные данные не позволили предсказать последующий опухолевый рост в том или ином органе потомков [3]. Повреждающее действие канцерогенов опосредуется модификацией внутриклеточных молекул, включая биополимеры клеточных структур, в том числе мембранные – белки и липиды, а также информационные – ДНК и РНК [15]. Максимум ковалентного связывания ДМБА с ДНК клеток грызунов происходил после метаболизма канцерогена цитохромом P450 в микросомах и образования диол-эпоксидов [5, 14]. Затем в результате репарационной депуринизации образовывались аддукты: 7-метилбенз(а)антрацен (МБА)-12-CH₂-N7-аденин и 7-МБА-12-CH₂-N7-гуанин, но когда ДМБА связывался с РНК, то аддуктов депуринизации не определялось. Однако полная картина временной последовательности связывания гидрофобного канцерогена или продуктов его метаболизма основными биополимерами клеток тканей-мишеней в ходе инициации злокачественного перерождения при трансплацентарном канцерогенезе окончательно ещё не установлена. Задачей настоящей работы явилось определение закономерностей специфической транслокации в отношении опухолеобразования меченого активированного липофильного ДМБА с макромолекулами клеток тропных или нетропных тканей на начальном этапе трансплацентарного канцерогенеза у крыс.

Материалы и методы

Работа была проведена на 30 белых беспородных крысах самках разводки питомника «Рапполово» массой 200-150 г и 60 потомках от этих же животных, содержащихся в стандартных условиях вивария НИИ онкологии в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/ЕС от 22.9.2010 г.) о защите животных, используемых для научных целей. Все ма-

нируляции с крысами проводили под эфирным наркозом. ³H-ДМБА (фирма “Amersham”, США) примененный в экспериментах имел исходную удельную радиоактивность 14.5 кюри/мМ, куда был добавлен немеченый канцероген до конечной активности 50 мккюри/кг. Меченый канцероген вводили крысам-матерям внутривентриально однократно на 21 дне беременности в виде водно-липидной эмульсии в дозе 15 мг/кг в расчете на ДМБА. Эта доза являлась наиболее оптимальной для индукции опухолей мозга и почек у потомства, так как кинетические показатели клиренса и периода полужизни введенного ДМБА незначительно различались от таковых, при введении канцерогена в диапазоне от 5 до 50 мг/кг [11].

Животных умерщвляли через 1, 3, 6, 12, 24, 72, 168 и 336 часов после введения меченого канцерогена по 3-4 матери и 7-8 эмбрионов или потомков на каждый срок наблюдения. Для исследования брали у матерей – печень и почки, у эмбрионов и новорожденных крысят – печень, почки и головной мозг. После гомогенизации вырезанных органов и осаждения их биополимеров 5%-ным раствором НСЮ₄ промытый осадок экстрагировали последовательно холодным этанолом и смесью этанол: эфир (3:1 по объёму) для выделения липидов. Из высушенного осадка экстрагировали ДНК, РНК и белки путем химического фракционирования; измерения содержания в полученных фракциях белка осуществляли микробиуретовым методом, а концентраций нуклеиновых кислот - путём спектрофотометрии, как описано ранее [2]. Определение радиоактивности в исследуемых образцах производили на сцинтилляционном счётчике «Марк-П» (фирмы “Nuclear Chicago”, США) в диоксановом сцинтилляторе. Величину радиоактивности в пробе рассчитывали по отношению к содержанию в ней ткани или количеству соответствующего биополимера, вычисляя, таким образом, удельную радиоактивность (УР) в **имп/мин х мг**. Относительную удельную радиоактивность (ОУР) определяли путем деления величины УР биополимера на УР ткани, из которой этот биополимер был выделен.

Достоверность различий между группами определяли методами непараметрической статистики с использованием критерия Манна-Уитни. Коэффициенты корреляции Спирмена (R) в приведенных результатах представлены только для достоверно взаимосвязанных параметров (P < 0.01 или 0.05).

Результаты и обсуждение

Метаболиты ДМБА в тканях матери и плода

Результаты измерения радиоактивной метки в анализируемых тканях крыс-матерей и потомства в различные сроки после однократного введения меченого канцерогена представлены в

табл. 1. Из приведённых данных можно видеть, что уровни радиоактивности в печени матерей были примерно в 5 - 10 раз выше, чем в их почках, с максимумом через 1 час после введения. Изменения содержания радиоактивной метки в течение 2 недель в обоих этих органах достоверно коррелировали между собой (R = 0.973; P < 0.01).

В печени и почках потомков УР в сравнении с материнскими органами была ниже, а максимум метки проявлялся через 3 ч после введения канцерогена, что свидетельствовало о задержании значительной части его плацентой и согласуется с данными других авторов [3]. Обезвреживание и выведение канцерогена в течение 14 сут. у матерей было связано с более высоким содержанием этого токсиканта в печени и почках по сравнению с тканями эмбрионов, но после рождения крысят повышенная УР наблюдалась только в печени материнских организмов. Вместе с тем изменения этих показателей во времени у матерей и у потомков коррелировали между собой как для печени (R = 0.890; P < 0.01), так и для почек (R = 0.741; P < 0.05). С другой стороны, также коррелировали друг с другом изменения показателей УР в эмбриональных почках и мозге (R = 0.894; P < 0.01) - органах-мишенях возникновения опухолей у новорожденных крысят. Эти результаты, в общем, не свидетельствовали о специфическом связывании ДМБА с тканями тропных органов плода, которое могло привести к инициации развития злокачественных новообразований.

Метаболиты ДМБА во фракции липидов различных органов матери и потомства

Результаты определения радиоактивной метки во фракции липидов проанализированных органов матери и потомков представлены на рис. 1 (липиды). Из этих данных можно видеть, что количество метки из ДМБА в липидах как органов-мишеней плода (почек и мозга), так и нетропного органа (печени) плода постепенно нарастало после однократного введения канцерогена с мак-

Таблица 1. Удельная радиоактивность тканей (имп/мин х мг) матери и потомства крыс через различное время после введения ³H-ДМБА на 21 день беременности

Ткань	Время после введения ³ H-ДМБА (часы)							
	1	3	6	12	24	72	168	336
Печень матери	523,5** ±36,6	336,8** ±23,6	257,0** ±18,0	272,4** ±19,1	245,7** ±17,2	182,4** ±12,8	98,1** ±6,9	76,8** ±5,4
Почки матери	102,9** ±15,4	75,0** ±11,2	57,1** ±8,6	39,4* ±5,9	41,2* ±6,2	25,3 ±3,8	13,5 ±2,0	7,9 ±1,2
Печень потомков	33,1 ±6,9	36,8 ±7,7	17,9 ±3,8	19,5 ±4,1	16,8 ±3,5	15,2 ±3,2	8,3 ±1,7	6,0 ±1,3
Почки потомков	19,4 ±4,1	24,9 ±5,2	23,6 ±4,9	20,9 ±4,4	19,2 ±4,0	15,0 ±3,2	8,1 ±1,7	5,6 ±1,2
Мозг потомков	19,0 ±4,5	29,2 ±7,0	21,1 ±5,0	14,6 ±3,5	12,4 ±2,9	12,4 ±3,0	7,8 ±1,9	4,4 ±1,05

Примечание: знаками ** или * выделены уровни радиоактивности тканей матери, достоверно (P<0.01 или P<0.05, соответственно) отличающихся от уровня радиоактивности аналогичной ткани плода.

симумом к 6 часу, а затем к 24 ч снижалось. В липидах проанализированных органов эмбрионов наблюдалась тенденция большей аккумуляции максимальной метки в сравнении с печенью и почками матерей, тогда как уровень общей радиоактивности тканей у плодов был достоверно ниже, чем у крыс-матерей. Возможно, таким путём осуществлялась первичная временная, но уже в некоторой степени специфическая аккумуляция активированного канцерогена в липидном депо эмбриона из введённой в организм матерей водножировой эмульсии, так как неизменённого ДМБА в органах матери и плода к этому времени определялись лишь следовые количества. При этом в связи с повышенной пролиферацией клеток плода вероятно могла происходить и модификация липидного компонента их мембран. Между изменениями содержания радиоактивности в липидах органов-мишеней – почек и мозга эмбрионов и новорожденных крысят в течение 14 суток наблюдалась высокая корреляция ($R = 0.991$; $P < 0.01$). Вместе с тем, динамика изменений уровня этой метки была сходной в почках ($R = 0.986$; $P < 0.01$) матерей и потомков, что может свидетельствовать о способствовании ДМБА инициации канцерогенеза только с учётом фактора повышенной пролиферации клеток плода.

Радиоактивные аддукты ДМБА в нуклеиновых кислотах тканей матери и плода

Определение содержания радиоактивных аддуктов в РНК тканей матери и потомства показало, что максимальное возрастание ОУР в РНК наблюдалось в органах-мишенях - почках и мозге эмбрионов через 6 ч после введения канцерогена (рис. 1, РНК). Повышенный уровень ОУР РНК мозга снижался к 12 ч, а в почках потомства сохранялся до 3 суток после введения ДМБА. К 7 суткам наблюдалось снижение ОУР РНК почек, но на 14 сутки здесь вновь отмечалось возрастание метки. Отсутствие корреляции в динамике изменений связывания радиоактивности с РНК почек и мозга потомков с аналогичными показателями в других органах матери и плода, не являющихся тропными в отношении опухолеобразования, свидетельствовало об определённой специфичности зарегистрированных изменений в тканях-мишенях.

С появлением новых методов секвенирования и успехами транскрипционного анализа было выявлено, что до 70% экспрессируемой РНК используется не в качестве матрицы для синтеза белка, а принимают участие в активации или подавлении экспрессии генов, в том числе, в связи с процессами онкогенеза [1, 7, 13]. Это показано для ткани печени [11], почек [4] и головного мозга [10]. Следовательно, наблюдавшееся нами увеличение связывания метки из ^3H -ДМБА

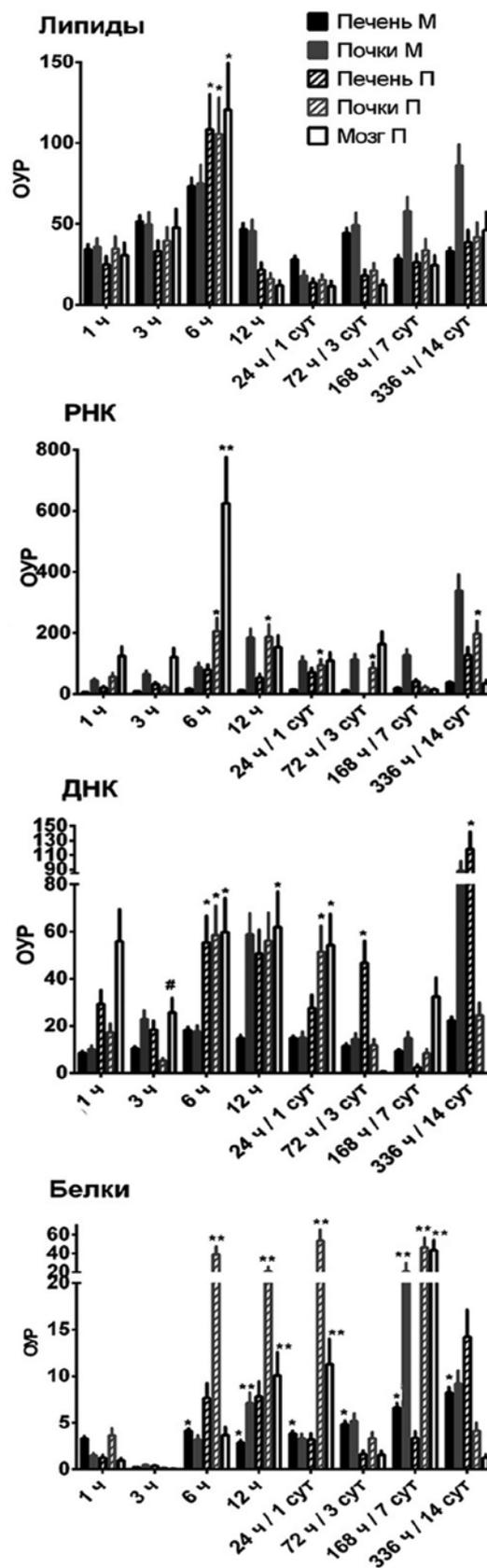


Рис. 1. Динамика транслокации во времени радиоактивной метки из ^3H -ДМБА в липидах, РНК, ДНК и белках органов матери (М) и плода (П). По оси абсцисс – время после введения ^3H -ДМБА (часы), по оси ординат - ОУР (отн. ед.). Знаками * и ** помечены величины, достоверно ($P < 0.05$ и $P < 0.01$, соответственно) отличающиеся от величин в тех же органах через 3 ч после введения меченого канцерогена; знаком # - достоверно ($P < 0.05$) отличающиеся от величины в мозге плода через 1 ч после введения метки.

с РНК отражало в значительной степени специфическое образование канцерогенных аддуктов с регуляторными рибонуклеотидами, что в сочетании с активной пролиферацией может обловить таргетную инициацию канцерогенеза.

Результаты измерения радиоактивности, связанной с ДНК в проанализированных органах беременных матерей и их потомства, представлены на рис. 1 (ДНК). Уже через 1 ч после введения меченого канцерогена повышенный уровень радиоактивности обнаруживался в ДНК мозга эмбрионов, но к 3 ч уровень метки снижался ($P < 0.05$), вероятно, в результате ещё не нарушенных к этому времени репарационных процессов, происходящих в клетках. Однако в течение 6–12 часов после введения ^3H -ДМБА во всех проанализированных тканях эмбрионов и печени матери наблюдали значимое повышение ОУР в ДНК, которое сохранялось до 24 ч только в органах-мишенях эмбрионов. Затем в почках и мозге новорожденных крысят уровень ОУР ДНК после временного снижения на 3 сут транзитивно возрастал в мозге на 7 сутки после введения ДМБА, а в ДНК их почек — на 14 сутки. На 14 сутки также увеличивалась радиоактивность в ДНК печени и почек матерей. Изменения величин ОУР ДНК, в течение 14 суток в материнских органах, а также в печени матери и плода коррелировали друг с другом ($R = 0.782$; $P < 0.05$ и $R = 0.911$; $P < 0.001$, соответственно), что отражало неспецифичность этих изменений в отношении индукции канцерогенного процесса. В то же время в изменениях ОУР ДНК органов-мишеней (почках и мозге потомства) не было выявлено корреляции как между собой, так и при сопоставлении с органами материнского организма, что отражает в определённой степени специфичность происшедших процессов и с учётом повышенной пролиферации клеток плода может иметь отношение к инициации канцерогенеза.

Метаболиты ДМБА и белки тканей матери и плода

Результаты определения канцерогенной метки в белках органов матери и потомства, подвергнутых анализу, представлены на рис. 1 (белки). Как видно из этих данных с 1 до 3 часа после введения ^3H -ДМБА радиоактивность общего белка всех проанализированных тканей имела тенденцию к понижению и к 3 часу наблюдался наименьший уровень метки в протеинах. Это снижение может быть связано с повышением аккумуляции ДМБА липидами. Последующий метаболизм канцерогена, работа систем обезвреживания и выведения экотоксикантов, поступивших в организм, отражались у матерей в нарастании уровня ОУР в белках печени с 6 ч до 14 суток и значительном увеличении метки

в протеинах почек с максимумами, приходящими на 12 часов и 7 сутки эксперимента. В эмбрионах с 6 по 24 ч. после введения ДМБА радиоактивность белков почек была повышена, причём специфично в отношении канцерогенеза, так как превышала величину аналогичного показателя в почках матерей. К 12 и 24 ч после введения меченого канцерогена возрастал также уровень ОУР белков и в тканях мозга. В белках почек и мозга новорожденных животных к 72 часу после введения ^3H -ДМБА было обнаружено снижение метки по сравнению уровнем, определённым в предыдущий период. Однако на 7 сутки после введения меченого канцерогена в протеинах тканей-мишеней крысят наблюдалось повышение радиоактивности, которое снижалось уже к 14 суткам, в противоположность белкам нетропной ткани (печени). Уровень метки, оставшейся в белках на 14 сутки эксперимента, не свидетельствовал о преимущественном связывании канцерогена с протеинами тканей-мишеней.

Таким образом, согласно данным, полученным в настоящей работе, меченый липофильный ДМБА сначала накапливается во временном липидном депо, вероятно, в мембранах пролиферирующих клеток преимущественно тканей эмбриона. К 6 часу образуются активированные формы канцерогена, способные специфически взаимодействовать с РНК (что способствует пост-трансляционной модификации синтеза белка, структур и функций целого ряда ферментов, в том числе ферментов репарации в почках и головном мозге эмбрионов, а также может приводить к формированию опухолевой экспрессии ДНК). Снижение канцерогенной метки в ДНК мозга эмбрионов с 1 к 3 ч могло свидетельствовать о репарации этой ДНК, а повышение метки в ДНК почек и мозга органов-мишеней плода, наблюдавшееся через 6 – 24 ч, отражает, вероятно, нарушение репарации, приводящее к дестабилизации генома, и в сочетании с повышенной пролиферацией клеток плода к моменту рождения крысят может определить локализацию развития злокачественной патологии. Взаимодействие активированного ДМБА с белками органов-мишеней плода через 6, 12, 24 ч, а также через 7 суток после введения могло приводить к модификациям структурных протеинов и функций ряда ферментов, в том числе и репарации, и таким путём способствовать развитию трансплацентарного канцерогенеза.

Благодарности

Часть работы выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кит О.И., Кириченко Е.Ю., Кириченко Ю.Г. и др. Длинные некодирующие РНК, ассоциированные с канцерогенезом: биологическое значение и перспективы применения в диагностике // *Клин. лаб. диагностика*. – 2016. – Т. 61. – № 1. – С. 13-16.
2. Строев Е.А., Макарова В.Г., Матвеева И.В. *Практикум по биологической химии*. – М.: МИА, 2012.
3. Autrup H. Transplacental transfer of genotoxins and transplacental carcinogenesis // *Env. Health Perspect.* – 1993. – Vol. 101. – Suppl. 2. – P. 33-38.
4. Catto J.W.F., Alcaraz A., Bjartell A.S. et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review // *European Urology*. – 2011. – Vol. 59. – № 5. – P. 671-681.
5. Devanesan P.D., RamaKrishna N.V., Padmavathi N.S. et al. Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in mouse skin // *Chem. Res. Toxicol.* – 1993. – Vol. 6. – № 3. – P. 364-371.
6. Diwan B.A., Rice J.M. Effect of stage of development on frequency and pathogenesis of kidney tumors induced in Noble (Nb) rats exposed prenatally or neonatally to N-nitrosoethylurea // *Carcinogenesis*. – 1995. – Vol. 16. – № 9. – P. 2023-2028.
7. Gutschner T., Diederichs S. The hallmark of cancer. A long non-coding RNA point of view // *RNA Biology*. – 2012. – Vol. 9. – № 6. – P. 703-719.
8. Hung C.-H., Chiu Y.-C., Chen C.-H., Hu T.-H. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma: carcinogenesis, progression, and therapeutic target // *BioMed Res. International*. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 486407. – P. 1-11. – doi: 10.1155/2014/486407.
9. Iyama T., Wilson III D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells // *DNA repair (Amst)*. – 2013. – Vol. 12. – № 8. – P. 620-636.
10. Moller H.G., Rasmussen A.P., Andersen H.H. et al. A systemic review of microRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion // *Molec. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 47. – № 1. – P. 131-144.
11. Niazi S.K., Hussain M. Disposition kinetics of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats // *Biopharmaceutics Drug Disposition*. – 1992. – Vol. 13. – P. 591-596.
12. Rice J.M., Wilbourn J.D. Tumors of the nervous system in carcinogenic hazard identification // *Toxicol. Pathology*. – 2000. – Vol. 28. – № 1. – P. 2002-2014.
13. Takahashi H., Carninci P. Widespread genome transcription: New possibilities for RNA therapies // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 452. – № 2. – P. 294-301.
14. Todorovic R., Ariese F., Denavasan P. et al. Determination of benzo[a]pyrene- and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands // *Chem. Res. Toxicol.* – 1997. – Vol. 10. – № 9. – P. 941-947.
15. Veskoukis A.S., Nsansakis A.M., Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration // *Cell Stress Chaperones*. – 2012. – Vol. 17. – № 1. – P. 11-21.

S.D. Ivanov¹, V.A. Aleksandrov^{2,3}, A.L. Semenov^{1,2}, V.G. Beshpalov^{2,3}

Binding of ³H-DMBA with biopolymers of mother and fetus tissues in rats during transplacental carcinogenesis

¹Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies,

²N.N. Petrov Research Institute of Oncology,

³ ITMO University, Saint-Petersburg

The aim of the study was to establish regularities of activated ³H-7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) translocation in the major biopolymers of target and non-target organs at the initiation stage of transplacental carcinogenesis. DMBA was administered i.p. to rats on the 21th day of the pregnancy. Analysis of liver and kidney tissues of mothers, as well as liver, kidney, and brain of offspring was performed at temporal points of 1 hr to 14 days after single carcinogen administration. A regular, but transient non-specific accumulation of DMBA-radioactivity in the lipid fraction mainly embryonic tissues was observed during the first 6 hrs after administration of the labeled carcinogen. By 6 hrs, the maximum increase of label in RNA of embryonic brain and kidney (target organ for tumor induction) was observed and then, from 6 to 12 hrs, an increase occurred in the number of radioactive DNA adducts of fetus that was maintained for 24 hrs in these tissues. Increased accumulation of label in proteins of embryonic kidney was recorded from 6 to 24 hrs, and brain - from 12 to 24 hrs after administration of ³H-DMBA and on the 7th day in proteins of these organs of newborn rats.

Key words: trans-placental carcinogenesis, ³H-7,12-dimethylbenz[a]anthracene, target organs, lipids, nucleic acids, proteins.

Поступила в редакцию 22.12.2017 г.