

Исследование генотоксичности в опытах *in vitro* химических веществ, мигрирующих из полимерных строительных материалов

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»¹,
Белорусский государственный университет²

Изучено *in vitro* генотоксическое действие формальдегида, стирола, дибутилфталата, диоктилфталата и их различных комбинаций, на уровне гигиенических регламентов.

Ключевые слова: генотоксичность, комбинированное действие, полимерные материалы.

Широкое применение полимерных материалов (ПМ) в строительстве жилых и общественных зданий обуславливает увеличение влияния на организм человека химических факторов малой интенсивности. Важность и актуальность данной проблемы определяется тем, что большинство населения проводит в закрытых помещениях от 10 до 23 часов в сутки [4, 5].

Результаты проведенных нами санитарно-химических исследований [6] показали, что преимущественно из ПМ выделяются следующие химические вещества: формальдегид, дибутилфталат (ДБФ), диоктилфталат (ДОФ), стирол, которые обнаруживаются в пределах ПДК для атмосферного воздуха.

В настоящее время имеются данные, характеризующие генотоксический эффект формальдегида в концентрациях выше 2,4 мг/м³. [3]. Международное агентство по изучению рака в своей классификации относит формальдегид к 1 группе – как вещество канцерогенное для человека. Стирол по той же классификации относится к группе 2Б как возможный канцероген, обладая доказанными мутагенными свойствами [2]. ДБФ и ДОФ не обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [7]. Однако, в литературе отсутствует информация, которая отражала бы генотоксическое действие комбинаций данных веществ, в связи с чем нами была предпринята попытка изучения их генотоксического действия на уровне гигиенических регламентов.

Большинство генотоксичных соединений активно взаимодействует с ДНК и вызывает в ней разнообразные повреждения. Нарушения в структуре ДНК, такие как разрывы нитей или поперечные сшивки, изменяют поведение всей макромолекулы, что и положено в основу определения ДНК-повреждающей активности химических соединений. Повреждения ДНК могут возникать при прямом химическом воздействии, таком как алкилирование оснований или косвенном действии, которое может быть химическим или ферментативным. Так, алкилированные пуриновые основания превращаются в апуриновые участки, а затем в однонитевые разрывы. Повреждения ДНК могут происходить и под влиянием ферментов, например для обнаружения нарушений структуры ДНК применяют ряд методов, среди которых наиболее простым и удобным является электрофорез [1].

Материал и методы

Для оценки генотоксического действия формальдегида, ДБФ, ДОФ, стирола и их комбинаций, использовали тестерную ДНК фага ? производства «Fermentas» (Вильнюс).

Поскольку исследуемые вещества (кроме формальдегида) не растворяются в воде, в качестве растворителя применяли диметилформамид (ДМФ). Конечные концентрации исследуемых веществ в реакционной смеси были следующими: формальдегид 0,05 мг/дм³, 0,1 мг/дм³, 0,2 мг/дм³; стирол 0,005 мг/дм³, 0,01 мг/дм³, 0,02 мг/дм³, 1,0 мг/дм³; ДБФ 0,125 мг/дм³, 0,25 мг/дм³, 0,5 мг/дм³, 1,0 мг/дм³; ДОФ 1,0 мг/дм³, 2,0 мг/дм³, 4,0 мг/дм³, 8,0 мг/дм³. Комбинации веществ: формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДОФ 2,0 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³.

При проведении электрофореза использовали прибор для горизонтального электрофореза, 0,9 % агарозный гель, 0,1 М трис-фосфатный буфер с 0,008 М ЭДТА. Интеркалирующий реагент – бромистый этидий, лидирующий краситель – бромфеноловый синий. Напряжение 12 В/см в течение 90 мин.

Прямое воздействие на ДНК фага ?. Объем реакционной смеси 20 мкл; 0,1М Трис-НСl буфер рН 7,4; ДНК фага ? = 0,15 мкг; исследуемое вещество или вещества. Конечная концентрация ДМФ во всех пробах, включая контрольные, составляла 20%. В маленьких пробирках Эппендорфа смешивали буфер, ДНК в физрастворе, и расчетное количество исследуемого вещества.

1. Смесь инкубировали в течение часа при 300С, затем в пробирки приливали по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя.

2. Смесь инкубировали в течение 3 часов при 300С и оставляли на 20 часов при комнатной температуре, затем в ячейки приливали по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя.

Воздействие на ДНК фага ? в системе метаболической активации. Объем реакционной смеси 20 мкл; 0,1М Трис-НСl буфер рН 7,4; пероксидаза хрена (ПХ) = 10⁻⁸ М; перекись водорода (Н₂О₂) = 10⁻³ М; ДНК фага ? = 0,15 мкг. Конечная концентрация ДМФ во всех пробах, включая контрольные, составляла 20%.

В маленьких пробирках Эппендорфа смешивали буфер, ДНК в физрастворе, раствор ПХ и расчетное количество исследуемого вещества или вещества. Реакцию начинали добавлением Н₂О₂. Смесь инкубировали в течение часа при 300С, затем в пробирки приливали по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя.

Для позитивного контроля в реакционную смесь вместо испытываемого вещества добавляли бензидин (БД) в возрастающей концентрации: 2,5*10⁻⁷; 5*10⁻⁷; 10⁻⁶; 2,5*10⁻⁶; 5*10⁻⁶; 10⁻⁵; 2,5*10⁻⁵; 5*10⁻⁵. Контролями также служили интактная ДНК фага ? (контроль в водном р-ре), ДНК фага ? (контроль 20% ДМФ), ДНК фага ? (контроль в водном р-ре) + ПХ + Н₂О₂, ДНК фага ? (контроль 20% ДМФ) + ПХ + Н₂О₂.

Приготовленные таким образом пробы вносили в гель (по 10 мкл на дорожку) и проводили электрофорез. Для обнаружения ДНК гели просматривали на трансиллюминаторе и сканировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

На дорожках (Рис. 1) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в водном р-ре); 2. ДНК фага ? + формальдегид 0,05 мг/дм³; 3. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³; 4. ДНК фага ? + формальдегид 0,2 мг/дм³; 5. ДНК фага ? + стирол 0,005 мг/дм³; 6. ДНК фага ? + стирол 0,01 мг/дм³; 7. ДНК фага ? + стирол 0,02 мг/дм³; 8. ДНК фага ? + стирол 1,0 мг/дм³; 9. ДНК фага ? (контроль в 20% ДМФ); 10. ДНК фага ? + ДБФ 0,125

мг/дм³; 11. ДНК фага ? + ДБФ 0,25 мг/дм³; 12. ДНК фага ? + ДБФ 0,5 мг/дм³; 13. ДНК фага ? + ДБФ 1,0 мг/дм³; 14. ДНК фага ? + ДОФ 1,0 мг/дм³; 15. ДНК фага ? + ДОФ 2,0 мг/дм³; 16. ДНК фага ? + ДОФ 4,0 мг/дм³; 17. ДНК фага ? + ДОФ 8,0 мг/дм³.

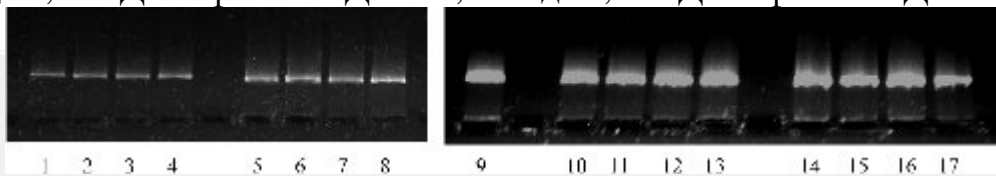


Рис. 1. Электрофореграммы полученные после прямого воздействия на ДНК фага ? исследуемых веществ в различных концентрациях. Воздействие при 300С в течение часа.

На дорожках (Рис. 2) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в водном р-ре); 2. ДНК фага ? + формальдегид 0,05 мг/дм³; 3. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³; 4. ДНК фага ? + формальдегид 0,2 мг/дм³; 5. ДНК фага ? + стирол 0,005 мг/дм³; 6. ДНК фага ? + стирол 0,01 мг/дм³; 7. ДНК фага ? + стирол 0,02 мг/дм³; 8. ДНК фага ? + ДБФ 0,125 мг/дм³; 9. ДНК фага ? + ДБФ 0,25 мг/дм³; 10. ДНК фага ? + ДБФ 0,5 мг/дм³; 11. ДНК фага ? + ДОФ 1,0 мг/дм³; 12. ДНК фага ? + ДОФ 2,0 мг/дм³; 13. ДНК фага ? + ДОФ 4,0 мг/дм³.

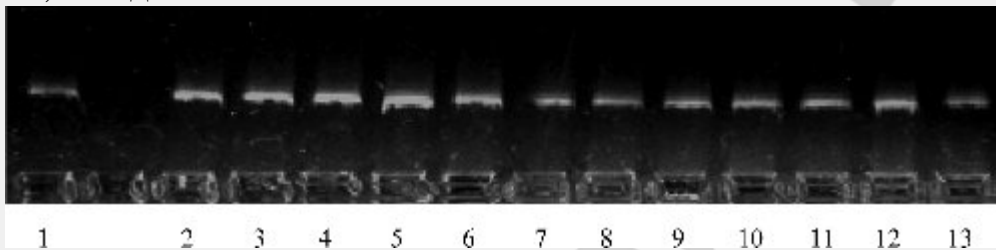


Рис. 2. Электрофореграмма полученная после прямого воздействия на ДНК фага ? исследуемых веществ в различных концентрациях. Воздействие при 300С в течение 3 часов и 20 часов при комнатной температуре.

На дорожках (Рис. 3) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в водном р-ре) + ПХ + Н₂О₂; 2. ДНК фага ? + ПХ + Н₂О₂ + формальдегид 0,1 мг/дм³; 3. ДНК фага ? + ПХ + Н₂О₂ + стирол 0,01 мг/дм³; 4. ДНК фага ? + ПХ + Н₂О₂ + ДБФ 0,25 мг/дм³; 5. ДНК фага ? + ПХ + Н₂О₂ + ДОФ 2,0 мг/дм³; 6. ДНК фага ? (контроль в 20% ДМФ) + ПХ + Н₂О₂.

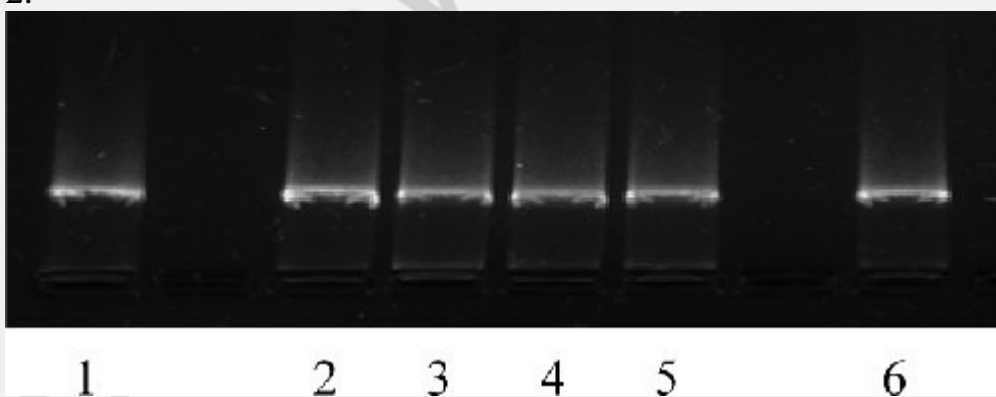


Рис. 3. Электрофореграмма полученная после инкубации ДНК фага ? в системе метаболической активации в присутствии исследуемых веществ.

На дорожках (Рис. 4) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в водном р-ре); 2. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³; 3. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДОФ 2,0 мг/дм³; 4. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; 5. ДНК фага ? + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; 6. ДНК фага ? + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; 7. ДНК фага ? (контроль в 20% ДМФ).

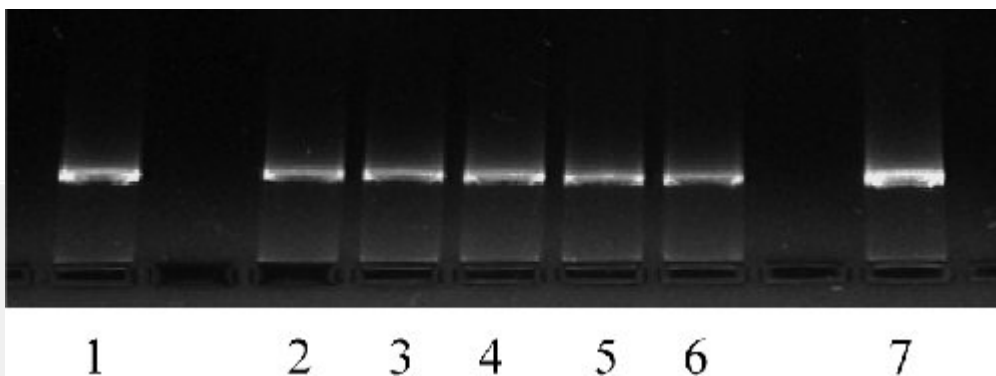


Рис. 4. Электрофореграмма полученная после прямого воздействия на ДНК фага ? исследуемых веществ, смешанных в различных соотношениях. Воздействие при 300С в течение 3 часов и 20 часов при комнатной температуре.

На дорожках (Рис.5) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в 20% ДМФ) + ПХ + H₂O₂; 2. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³; 3. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДОФ 2,0 мг/дм³; 4. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + формальдегид 0,1 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; 5. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; 6. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³;

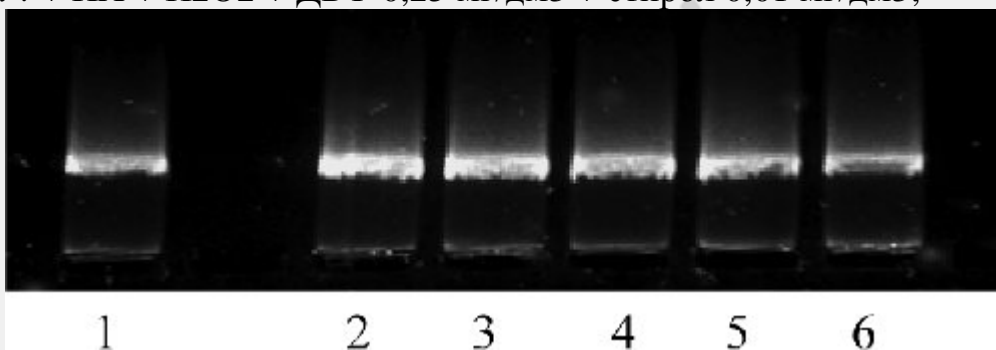


Рис. 5. Электрофореграмма полученная после инкубации в системе метаболической активации ДНК фага ? и исследуемых веществ, смешанных в различных соотношениях.

На дорожках (Рис.6) представлены: 1. ДНК фага ? (контроль в водном р-ре) + ПХ + H₂O₂. 2. ДНК фага ? (контроль 20% ДМФ) + ПХ + H₂O₂; Дорожки 3-10. ДНК фага ? + ПХ + H₂O₂ + бензидин в возрастающей концентрации: 3 – 2,5*10⁻⁷; 4 – 5*10⁻⁷; 5 – 10⁻⁶; 6 – 2,5*10⁻⁶; 7 – 5*10⁻⁶; 8 – 10⁻⁵; 9 – 2,5*10⁻⁵; 10 – 5*10⁻⁵.

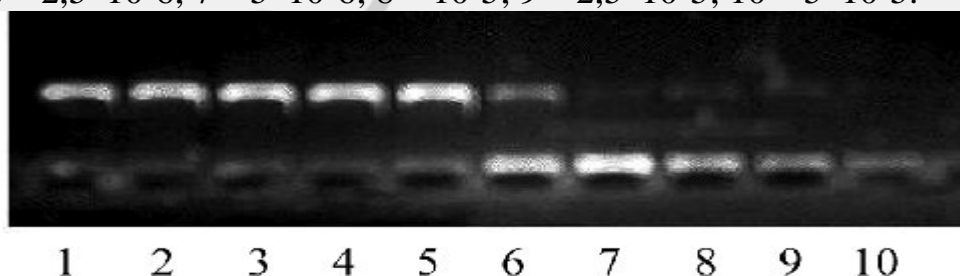


Рис. 6. Электрофореграмма иллюстрирующая повреждение бензидином ДНК фага ? в системе метаболической активации

Как видно из электрофореграммы (Рис. 6.), продукты пероксидазного окисления бензидина вызывают в ДНК поперечные сшивки, что выражается в резком снижении электрофоретической подвижности ДНК, при этом ее часть (6 дорожка) или вся она деградирует (7-10 дорожки) и остается на старте. ДМФ, используемый в качестве растворителя веществ, не влияет на подвижность ДНК (2 дорожка).

Выводы

• В опытах *in vitro* генотоксического действия формальдегида (концентрации 0,05 мг/дм³, 0,1 мг/дм³, 0,2 мг/дм³); стирола (концентрации 0,005 мг/дм³, 0,01 мг/дм³, 0,02 мг/дм³, 1,0 мг/дм³); ДБФ (концентрациях 0,125 мг/дм³, 0,25 мг/дм³, 0,5 мг/дм³, 1,0 мг/дм³); ДОФ (концентрациях 1,0 мг/дм³, 2,0 мг/дм³, 4,0 мг/дм³, 8,0 мг/дм³) при прямом воздействии на ДНК фага ?, а также в системе метаболической активации не установлено.

• Исследованные комбинации веществ: формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДОФ 2,0 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; формальдегид 0,1 мг/дм³ + ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³; ДБФ 0,25 мг/дм³ + стирол 0,01 мг/дм³ не вызывают повреждений ДНК фага ?, изменяющих ее электрофоретическую подвижность, как при прямом воздействии, так и в системе метаболической активации, что позволяет говорить об отсутствии генотоксического действия у исследованных комбинаций веществ.

Литература

1. Абилов, С.К., Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений / С.К.Абилов, Т.Г.Пороменко // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Токсикология, 1986. – Т. 14. – С. 29-32.
2. Авилова, Г.Г. Стирол5 / Г.Г.Авилова, Е.А.Карпухина; под общей редакцией Н.Ф.Измерова // Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1984. – 28 с.
3. Германова, А.Л. Формальдегид / А.Л.Германова; под общей редакцией Н.Ф.Измерова // Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1982. – 20 с.
4. Губернский, Ю.Д. Методические аспекты эколого-гигиенической оценки современных строительных и отделочных материалов / Ю.Д.Губернский, Н.В.Калинина // Гигиена и санитария. – 1996. – № 1. – С.33-37.
5. Губернский, Ю.Д. Эколого-гигиенические аспекты организации мониторинга жилой среды / Ю.Д.Губернский, Н.В.Калинина, А.И.Мельникова // Гигиена и санитария. – 1997. – № 3. – С.46-49.
6. Соболев, Ю.А. Полимерные материалы применяемые в строительстве. санитарно-химическая оценка / Ю.А.Соболев, Л.В.Половинкин, Ю.А.Присмотров // Вестник фармации. – 2004. ВГМУ. – №4 (26). – С. 96-100.
7. Тимофеевская, Л.А. Эфиры о-фталевой кислоты / Л.А.Тимофеевская; под общей редакцией Н.Ф.Измерова // Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1983. – 58 с