

**ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ИЗВЕСТНЫХ МУТАГЕНОВ (ЭТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТА,
МИТОМИЦИНА С И ЦИКЛОФОСФАМИДА) С ПОМОЩЬЮ МИКРОЯДЕРНОГО
ТЕСТА НА ЛИМФОЦИТАХ И РЕТИКУЛОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
И БЕЛОЙ КРЫСЫ**

Томилин Н. В., Филько О. А., Храброва А. В., Соловьева Н. Е., Сизова К. В.

ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, Тел. (812) 365-06-80;

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Резюме:

Объектами настоящего исследования являлись лимфоциты и ретикулоциты цельной крови человека и белых крыс.

Цель работы – оценка генотоксического действия известных мутагенов (этилметансульфоната, митомицина С и циклофосфамида) с помощью двух вариантов микроядерного теста: на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком и на ретикулоцитах крови человека и белой крысы.

Результаты сравнительного исследования показали, что микроядерный тест на лимфоцитах с цитокинетическим блоком, обладает большей чувствительностью и способен снизить влияние на результаты возможного сопутствующего цитотоксического действия ксенобиотиков. Это позволяет избегать ошибочного заключения об отсутствии генотоксического действия испытуемых химических соединений в случаях выраженного цитотоксического действия.

Ключевые слова: Генотоксичность, цитотоксичность, лимфоциты, ретикулоциты, этилметансульфонат, циклофосфамид, митомицин С, микроядерный тест

**EVALUATION OF GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF KNOWN
MUTAGENS (ETHYLMETHANESULFONATE, MITOMYCIN C AND
CYCLOPHOSPHAMIDE) WITH THE LYMPHOCYTE MICRONUCLEUS
CYTOKINESIS-BLOCK ASSAY AND THE RETICULOCYTE MICRONUCLEUS
TEST IN HUMAN BLOOD AND WHITE RAT**

Tomilin N. V., Filko O. A., Khrabrova A. V., Solovyeva N. E., Sizova K. V.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency

St. -Petersburg, Russia, 192019, ul Bekhtereva, 1 Tel. (812) 365-06-80,

e-mail: Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Abstract: The objects of this study were lymphocytes and reticulocytes in blood of human and white rats. The objective was to compare evaluation of genotoxic effects of known mutagens (ethylmethanesulfonate, mitomycin C and cyclophosphamide) with two types of micronucleus test: the lymphocyte micronucleus cytokinesis-block assay (CBMN) and the reticulocyte micronucleus test in blood of white rats. Results of the comparative study showed that CBMN has the higher sensitivity and capability to reduce the effect of confounding factor – cytotoxicity. This allowed to avoid false negative result of genotoxicity testing of chemicals.

Key words: genotoxicity, cytotoxicity, lymphocytes, reticulocytes, ethylmethanesulfonate, mitomycin C, cyclophosphamide, micronucleus assay

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность биомониторинговых обследований стабильности генома людей, профессионально связанных с воздействием вредных химических факторов, не вызывает сомнений. Одним из наиболее используемых методов для проведения такого рода обследований является метод щелочного гель-электрофореза (ДНК-комет), позволяющий выявлять первичные повреждения ядерной ДНК на лейкоцитах периферической крови человека.

Метод ДНК-комет способен оценить величину общего повреждения ядерной ДНК (одно- и двуспиральные разрывы, АП-сайты, величину неполной эксцизионной репарации и ДНК-ДНК, ДНК-белок сшивки), увеличение которых свидетельствует о риске возникновения различных заболеваний, в том числе и канцерогенных [1]. Известно, что генотоксиканты могут вызывать различные типы повреждений структуры ДНК, некоторые из них (этилметансульфонат, N-нитрозодиметиламин) успешно регистрируются с помощью метода ДНК-комет, а другие, например, циклофосфамид и митомицин С, способны образовывать ДНК-ДНК сшивки, что приводит к снижению миграции ДНК и затрудняет использование метода ДНК-комет для их обнаружения, особенно на фоне увеличенной активности процессов репарации. Необходимо также учитывать присутствие в клетках специальной системы репарации повреждений ДНК, которая способна успешно исправлять большинство регистрируемых с помощью метода ДНК-комет повреждений. Поэтому для увеличения прогностической силы подобного рода обследований метод ДНК-комет часто дополняется микроядерным тестом на ретикулоцитах, который способен регистрировать нерепарированные повреждения ДНК – хромосомные aberrации и анеуплоидные мутации.

Микроядерный тест на ретикулоцитах наиболее прост для выполнения, но низкое содержание этих клеток в крови человека (около 1%) и активная их элиминация селезенкой снижает надежность этого теста. Эта же причина также затрудняет использование проточной цитофлуориметрии.

Принципиальной особенностью другого микроядерного теста на культуре лимфоцитов, которые культивируются в условиях цитокинетического блока, является регистрация мутаций, которые лимфоциты уже несут в организме (*in vivo*), поскольку анализируются только двуядерные клетки сразу после первого митоза в культуре [2].

Методика получения культур лимфоцитов из периферической крови человека для микроядерного теста мало отличается от получения культур лимфоцитов для хромосомных aberrаций. Но микроядерный тест проще для анализа и, в отличие от

метода хромосомных aberrаций, позволяет дополнительно регистрировать анеуплоидные мутации. Кроме этого, величина спонтанной частоты встречаемости микроядер в 1000 двуклеточных лимфоцитов на порядок выше количества клеток с хромосомными aberrациями в 100 анализируемых метафазах, что существенно увеличивает надежность метода. Микроядерный тест на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком в настоящее время используется в биомониторинговых обследованиях в качестве единственного метода.

Целью настоящего сравнительного исследования является оценка величины генотоксического и цитотоксического действия известных мутагенов (этилметансульфоната, митомицина С и циклофосфамида) с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах и культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком.

Материалы и методы

В экспериментах использовали венозную кровь доноров (мужчин и женщин, не имевших в ближайшее время контакта с вероятными генотоксикантами) и периферическую кровь беспородных белых крыс, взятую из хвостовой вены, с массой тела 180-200 г.

Получение культуры лимфоцитов крови человека. Культуру лимфоцитов крови человека получали по методу Fenech [3, 4].

Венозную кровь (6 мл) собирали в специальные пробирки с литий гепарином и использовали в течение 4 часов после взятия.

Среду для культивирования готовили из среды RPMI-1640 с глутамином и гентамицином (10 мкг/мл), 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 8 мг/мл ФГА-П.

В каждую стерильную пробирку с плоским дном объемом 16 мл, содержащую 5 мл культуральной среды, добавляли по 0,5 мл крови. Для каждого пациента готовили две пробирки. Инкубацию выполняли в CO₂ инкубаторе (t – 37°C, CO₂ – 5 %).

Для получения культуры лимфоцитов с двуядерными клетками через 44 ч после начала инкубации в каждую пробирку добавляли по 300 мкл среды с цитохалазином Б, конечная концентрации которого составила 6 мкг/мл.

После добавления раствора цитохалазина Б инкубация продолжалась еще в течение 28 ч. Общее время инкубации после добавления пробы крови составило 72 ч.

После завершения инкубации пробы центрифугировались в течение 8 мин при 300 g и температуре 25° С. Супернатант аккуратно удаляли и клетки ресуспензировали в 5 мл 0,56% хлористого калия, суспензии клеток переносили в центрифужные пластиковые пробирки объемом 15 мл и инкубировали в термостате при 37° С в течение 15 мин.

Затем в каждую пробирку по-капельно с постоянным встряхиванием добавляли по 1 мл холодного метанол-уксусного фиксатора (3:1). Фиксация продолжалась в течение 15 мин.

Пробы снова центрифугировали и осадок ресуспензировали в 5 мл холодного свежего фиксатора и фиксация продолжалась следующие 15 мин.

Фиксацию повторяли дважды. После окончания последней фиксации супернатант удаляли не полностью. В пробирке оставляли от 100 до 200 мкл фиксатора, в зависимости от объема осадка.

Аликвоты суспензии клеток раскапывали на охлажденные чистые предметные стекла с высоты 25-30 см (по две капли на каждое стекло).

Полученные препараты окрашивали 3 %-ым красителем Гимзы в фосфатном буфере pH – 6,6 в течение 10–15 мин.

Получение культуры лимфоцитов крови белой крысы. Для получения культуры лимфоцитов периферической крови белой крысы требуется предварительная отмывка клеток от плазматического фактора, который ингибирует их стимуляцию с помощью митогенов. Кроме этого, для увеличения количества двуядерных лимфоцитов крысы требуется кроме ФГА-П дополнительная стимуляция клеток конконавалином А [5, 6].

Для этого 0,5 мл крови, взятую из хвостовой вены крысы в литий-гепариновые пробирки, центрифугировали при 300g в течение 5 мин и осадок ресуспензировали в 2 мл раствора Хенкса с гепарином натрия (10 Ед/мл). Супернатант удаляли, а к осажденным клеткам добавляли 5 мл раствора Хенкса с гепарином натрия. Последнюю операцию повторяли трижды. После последнего осаждения осадок ресуспензировали в 1 мл раствора Хенкса с гепарином.

По 0,5 мл крови, отмывкой от плазмы, добавляли к 4,5 мл клеточной среды, содержащей RPMI-1640 с глутамином и гентамицином, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% ФГА-П и 20 мкг/мл конконавалина А.

Дальнейшие процедуры для получения препаратов с двуядерными лимфоцитами сходны с таковыми для культуры лимфоцитов крови человека.

Определение относительного содержания двуядерных лимфоцитов и двуядерных лимфоцитов с микроядрами. Относительное содержание двуядерных лимфоцитов рассчитывали, как отношение их количества к сумме одно-, двух-, трех и четырехядерных клеток, при просмотре не менее 500 клеток. Этот параметр используется для оценки цитотоксического действия генотоксикантов.

Микроядра были морфологически идентичны, но по диаметру меньше, чем ядра лимфоцитов. При подсчете количества двуядерных лимфоцитов с микроядрами учитывали клетки, в которых диаметр микроядер составляет от 1/3 до 1/16 диаметра основного ядра [4].

Количество двуядерных лимфоцитов с микроядрами определяли при анализе не менее 1000 двуядерных клеток.

Оценка генотоксического действия этиметансульфоната (ЭМС) и митомицина (ММС) на культуре лимфоцитов человека. Эксперименты на культуре лимфоцитов человека выполняли *in vitro*.

Через 42 часа после начала инкубации к культуре лимфоцитов добавляли ЭМС, растворенный в 25, 50 и 100 мкл среды RPMI-1640 с глутамином и гентамицином для получения конечных концентраций – 5, 10 и 15 мМ, в контрольные пробирки добавляли соответствующий объем среды RPMI-1640 с глутамином и гентамицином [7]. После двух

часов экспозиции пробирки с культурами центрифугировали при 300 g в течение 8 мин. Супернатант удаляли и в каждую пробирку добавляли 5 мл свежей культуральной среды с цитохалазином Б.

Эксперименты с ММС выполняли по той же схеме с использованием следующих конечных концентраций: 0,6, 1,2 и 2,4 мкМ.

Оценка генотоксического действия ЭМС и циклофосфида (ЦФ) на культуре лимфоцитов крысы. Оба мутагена вводили животным внутрибрюшинно. ЭМС – однократно в дозах 100 и 300 мг/кг, а ЦФ инъектировали дважды в дозах 10 и 20 мг/кг с интервалом 24 ч. Забор крови осуществляли через 24 ч после введения ЭМС и через 48 ч после первой инъекции ЦФ. Контрольные животные получали соответствующий их массе объем дистиллированной воды.

Оценка генотоксического действия ЭМС и ЦФ на ретикулоцитах крови белых крыс.

Препараты для микроядерного теста на ретикулоцитах изготавливали по методу Хаяши [8]. На предметные стекла, предварительно покрытые акридин оранжевым, помещали 8 мкл крови и немедленно накрывали покровным стеклом. Анализ препаратов выполняли под флуоресцентным микроскопом с фильтром кубиком NB 2A. Для каждого животного изготавливали по два препарата, на которых анализировали по 2000 ретикулоцитов. Для каждого препарата рассчитывали процентное содержание микроядер. Средняя величина из двух препаратов определяла содержание микроядер для каждого животного.

Оценка цитотоксического действия ЭМС и ЦФ на ретикулоцитах крови белых крыс. Цитотоксическое действие определяли на тех же препаратах по относительному содержанию ретикулоцитов по отношению к количеству эритроцитов.

Для этого в 5 полях, взятых случайным образом при увеличении с объективом 40х, подсчитывали количество эритроцитов и ретикулоцитов. Для каждого изображения рассчитывали относительное содержание ретикулоцитов. Средняя величина, рассчитанная из 5 изображений, определяла относительное содержание ретикулоцитов для каждого животного.

Статистическая обработка. Достоверность различий в частоте встречаемости двуйдерных лимфоцитов с микроядрами и микроядер в ретикулоцитах в контрольных и экспериментальных группах оценивали с помощью непараметрического одностороннего теста Манн-Уитни. Наличие дозозависимого действия устанавливали с помощью критерия Джонкхиера-Терпстры.

Сравнение относительной плотности двуядерных лимфоцитов и содержания ретикулоцитов в экспериментальных группах относительно контрольных групп, осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Проверка зависимости эффекта от величины дозы проверяли с помощью критерия линейного тренда (One-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

Спонтанный уровень частоты встречаемости микроядер в двуядерных лимфоцитах составил в контрольных культурах лимфоцитов человека – $1,35 \pm 0,14\%$ ($n=8$), а в контрольных культурах белых крыс – $0,68 \pm 0,08\%$ ($n=10$).

Результаты экспериментального исследования действия различных концентраций ЭМС на культуру лимфоцитов человека в течение 2 часов на G1, S, и G2 стадиях клеточного цикла лимфоцитов [2] продемонстрировали, что генотоксическое действие имеет дозозависимый характер, но достоверно только при высокой концентрации 15 мМ (рис. 1).

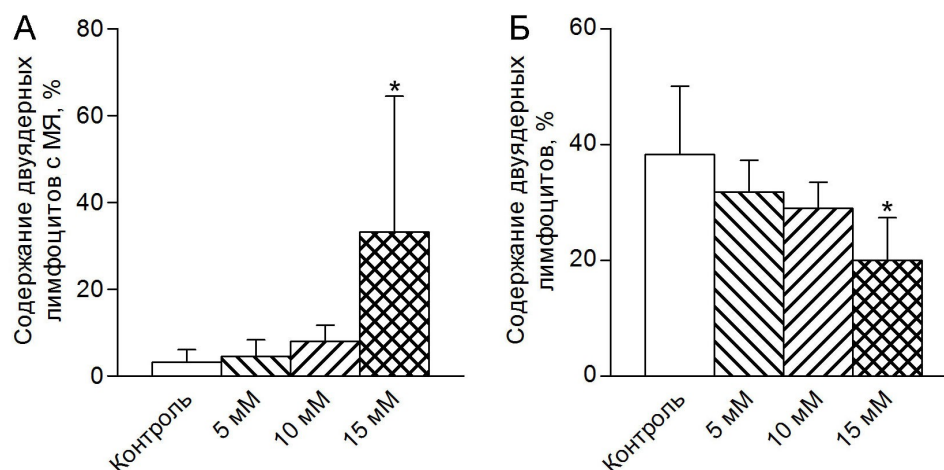


Рис. 1. А – относительное содержание двуядерных лимфоцитов человека с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех двуядерных лимфоцитов в культуре (цитотоксическое действие) после инкубации в течение 2 ч с ЭМС в концентрациях 5, 10 и 15 мМ. * – $p < 0,05$, тест Манн-Уитни (А), критерий *t*-Стьюдента (Б), $n=4$.

Снижение относительного содержания двуядерных лимфоцитов также было дозозависимым и статистически достоверным по сравнению с данными в контроле при концентрации ЭМС 15 мМ. Полученные результаты свидетельствуют, что, несмотря на цитотоксическое действие высокой концентрации ЭМС, его дозозависимая кинетика генотоксического действия сохраняется.

При определении генотоксического и цитотоксического действия ММС также была выявлена зависимость величины действия от дозы. Статистически достоверные отличия от контрольных значений были получены при концентрациях ММС 1,2 и 2,4 мкМ (рис. 2).

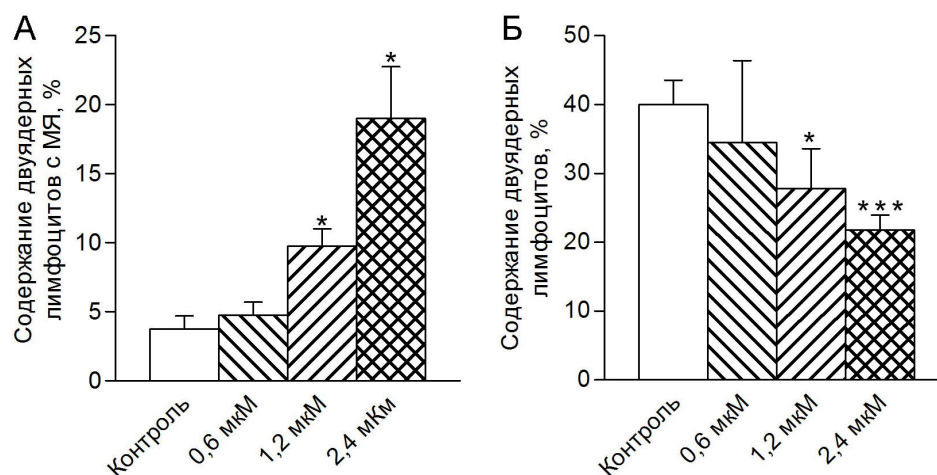


Рис. 2. А – относительное содержание двуядерных лимфоцитов человека с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех двуядерных лимфоцитов в культуре (цитотоксическое действие) после инкубации в течение 2 ч с ММС в концентрациях 5, 10 и 15 мМ. * – $p < 0,05$, тест Манн-Уитни (А), *** $p < 0,001$, критерий t -Стьюдента (Б), $n=4$.

И в этом случае, высокое цитотоксическое действие ММС при концентрациях 1,2 и 2,4 мМ ММС не маскировало его генотоксическое действие.

Исследования генотоксического и цитотоксического действия ЭМС выполняли также с помощью микроядерных тестов на лимфоцитах и на ретикулоцитах крови белых крыс через 24 ч после внутрибрюшинного введения в дозах 100 и 300 мг/кг.

Результаты исследований на культуре лимфоцитов выявили дозозависимое генотоксическое и цитотоксическое действие ЭМС при обеих дозах (рис. 3).

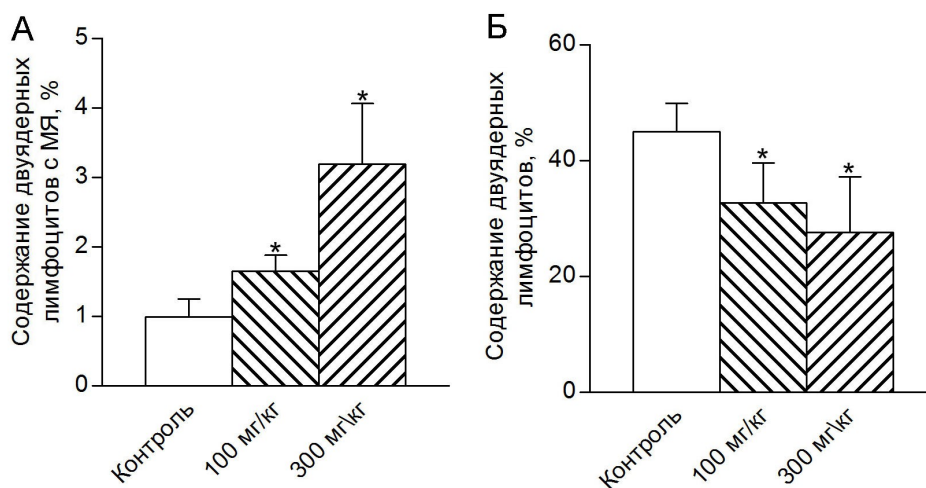


Рис. 3. А – относительное содержание двуядерных лимфоцитов белой крысы с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех двуядерных лимфоцитов в культуре (цитотоксическое действие) лимфоцитов через 24 ч после внутрибрюшинного введения ЭМС в дозах 100 и 300 мг/кг. * – $p < 0,05$, тест Манн-Уитни (А), критерий t -Стьюдента (Б), $n=4$.

С использованием микроядерного теста на ретикулоцитах генотоксическое действие ЭМС было выявлено только при дозе 100 мг/кг, а цитотоксическое действие – при 300 мг/кг (рис. 4). Снижение частоты встречаемости микроядер в ретикулоцитах при действии высокой концентрации ЭМС связано с высоким цитотоксическим действием на клетки-предшественники ретикулоцитов в костном мозге и/или с элиминирующей функцией селезенки.

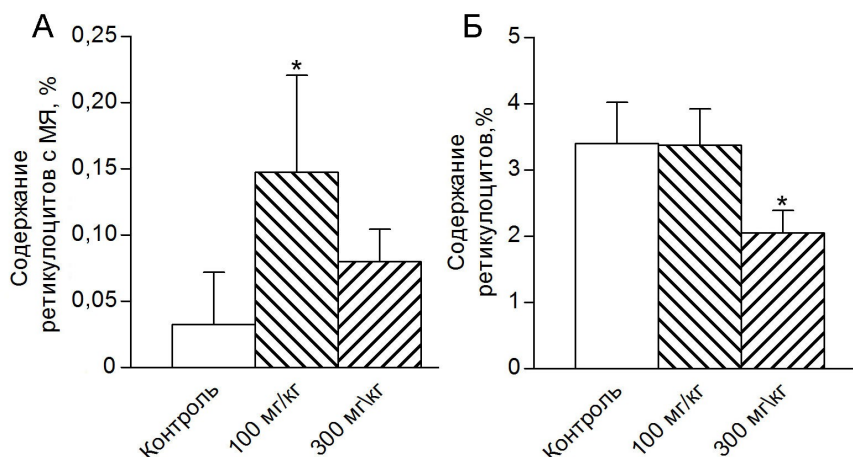


Рис. 4. А – относительное содержание ретикулоцитов белой крысы с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех ретикулоцитов (цитотоксическое действие) через 24 ч после внутрибрюшинного введения ЭМС в дозах 100 и 300 мг/кг. * – $p < 0,05$, тест Манн-Уитни (А), критерий t-Стьюдента (Б), $n=4$.

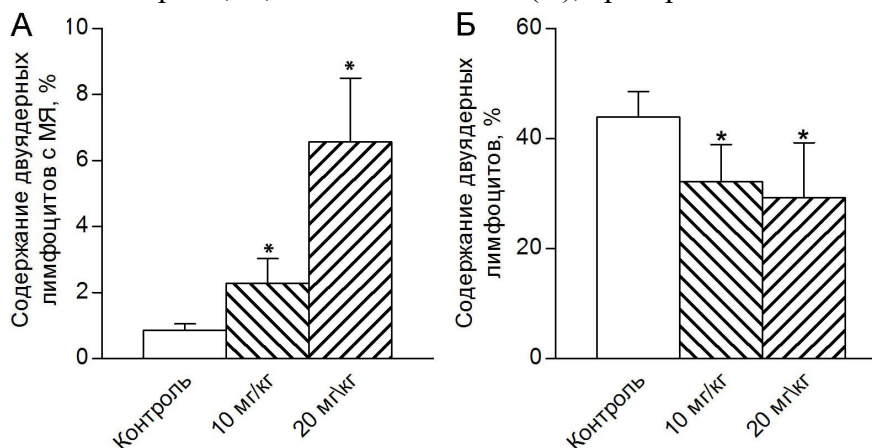


Рис. 5. А – относительное содержание двуядерных лимфоцитов белой крысы с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех двуядерных лимфоцитов в культуре (цитотоксическое действие) лимфоцитов через 24 ч после повторного внутрибрюшинного введения ЦФ в дозах 10 и 20 мг/кг. * – $p < 0,05$ (А), тест Манн-Уитни, критерий t-Стьюдента (Б), $n=4$).

В исследованиях генотоксического действия ЦФ после двукратного введения с интервалом в 24 ч в дозах 10 и 20 мг/кг с помощью микроядерного теста на лимфоцитах, культивируемых в условиях цитокинетического блока было показано дозозависимое увеличение генотоксического и цитотоксического действия ЦФ (рис. 5).

Микроядерный тест на ретикулоцитах после введения ЦФ также выявил дозозависимое генотоксическое и цитотоксическое действие для обеих доз (рис. 6).

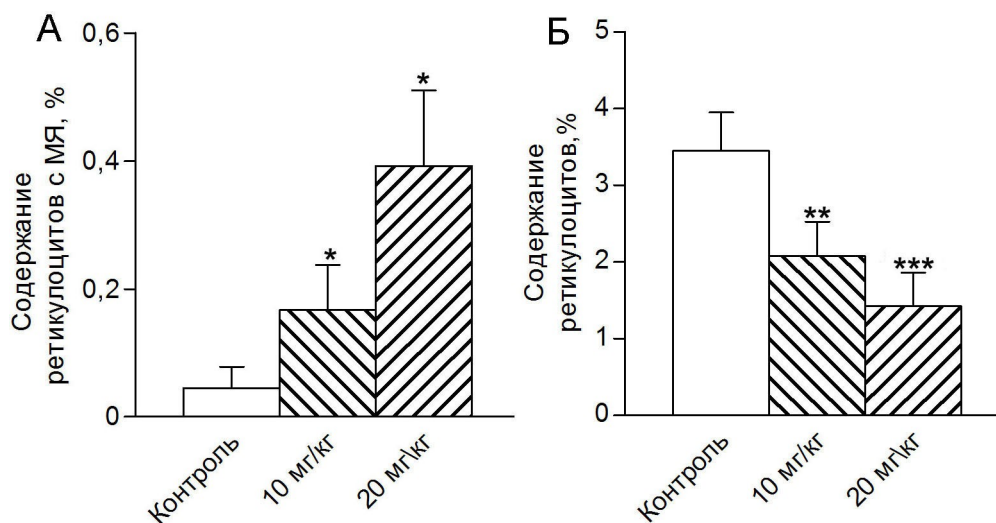


Рис. 6. А – относительное содержание ретикулоцитов белой крысы с микроядрами (генотоксическое действие); Б – относительное содержание всех ретикулоцитов (цитотоксическое действие) через 24 ч после повторного внутрибрюшинного введения ЦФ в дозах 10 и 20 мг/кг. * – $p < 0,05$, тест Манн-Уитни (А). **, *** – $p < 0,01$, $p < 0,001$, критерий t -Стьюдента (Б), $n=4$.

Сохранение дозозависимого генотоксического действия ЦФ при цитотоксическом действии свидетельствует о наличии у этого генотоксиканта сильных кластогенных и анеугенных свойств.

Необходимо отметить, что во всех выполненных экспериментах с использованием микроядерного теста на культуре лимфоцитов величины частоты встречаемости клеток с микроядрами на порядок выше, чем частота встречаемости микроядер в ретикулоцитах. Это обеспечивает более высокую надежность этого метода обнаружения генотоксического действия химических веществ.

Выводы

1. Оценка генотоксического действия химических веществ существенно зависит от соответствия механизмов их действия методам используемым для их тестирования.
2. Генотоксичность веществ, которые вызывают точечные повреждения ДНК, например ЭМС, регистрируется микроядерными тестами преимущественно после введения высоких доз.
3. Вещества, способные индуцировать ДНК-ДНК сшивки, обычно обладают сильным кластогенным и анеугенным действием (ЦФ и ММС), которое можно надежно определять с помощью микроядерного теста.

4. Сравнительное исследование двух вариантов микроядерных тестов продемонстрировало высокую чувствительность, независимость от возможного цитотоксического действия и высокую надежность микроядерного теста на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком.

Литература

1. Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., Stetina R. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis* 2008. – 2008. – Vol. 23 (3). – P. 143-151.
2. Fenech M. The in vitro micronucleus technique // *Mutat. Res.* – 2000. – Vol. 455 (1-2). – P. 81-95.
3. Fenech M., Morley A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes // *Mutat. Res.* – 1985. – Vol. 147 (1-2). – P. 29-36.
4. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2 (5). – P. 1084-1104.
5. Doherty A. T., Hayes J., Holme P., O'Donovan M. Chromosome aberration frequency in rat peripheral lymphocytes increases with repeated dosing with hexamethylphosphoramide or cyclophosphamide // *Mutagenesis*. – 2012. – Vol. 27 (5). – P. 533-539.
6. Kligerman A. D., Erexson G. L., Wilmer J. L. Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage in vivo // *Basic Life Sci.* – 1984. – Vol. 29 Pt. B. – P. 569-584.
7. Speit G., Linsenmeyer R., Schutz P., Kuehner S. Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture // *Mutagenesis*. – 2012. – Vol. 27 (6). – P. 743-747.
8. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M., Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides // *Mutat. Res.* – 1990. – Vol. 245 (4). – P. 245-249.