

Інститут агроєкології та біотехнології УААН, м. Київ

МІКРОЯДЕРНИЙ ТЕСТ У ВЕЛИКИХ ТА ДРІБНИХ ССАВЦІВ

Виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ), лейкоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних лейкоцитів, апоптозних клітин та клітин, що діляться в мазках периферичної крові лабораторних мишей ліній BALB/c, C57BL/6 та двох груп великої рогатої худоби червоної польської породи із різних господарств Тернопільської області. Виявлена відсутність виражених відмінностей за частотами зустрічальності вивчених цитогенетичних аномалій в клітинах периферичної крові у двох видів ссавців, що на ряд відрізняються за тривалістю життя.

Вступ

Мутації в соматичних клітинах широко використовуються для оцінки наявності або відсутності генотоксичних впливів, ймовірності розвитку різних соматичних патологій, прогнозу накопичення генетичного вантажу у нащадків. З цією метою розглядають мутації в нуклеотидних послідовностях, цитогенетичні аномалії. Але добре відомо, що ймовірність виникнення та швидкості елімінації клітин-носіїв різних мутацій суттєво відрізняються [4, 8]. У зв'язку з цим активно ведеться порівняльний аналіз інформативності характеристик мутаційних спектрів соматичних клітин для рішення завдань генетичної токсикології [7].

Відносно новим методом оцінки пошкоджень генетичного матеріалу став мікроядерний тест, за допомогою якого ведеться підрахунок клітин з мікроядрами, які містяться у цитоплазмі. Цей метод має ряд очевидних переваг. Насамперед його використання може замінити більш трудомісткий та довгий аналіз частот зустрічальності метафазних пластинок з хромосомними абераціями. Мікроядра можуть бути сформовані з фрагментів пошкоджених та з цілих хромосом, що відстали у процесі мітозу при їх розходженні в анафазі. Таким чином, подрахунок клітин з мікроядрами дозволяє врахувати одночасно декілька різних типів цитогенетичних аномалій (хромосомні аберації і анеуплоїдію). Але його використання ускладнюється тим, що до цих пір залишається недостатньо вивченою залежність результатів мікроядерного тесту від типу клітин, які аналізуються, від виду досліджуваних тварин. На сьогоднішній день залишається невирішеним питання щодо зв'язку мікроядерного тесту з більш традиційними оцінками цитогенетичних аномалій у метафазних пластинках.

З метою отримання такої інформації у даному дослідженні виконано порівняльний аналіз спонтанних частот зустрічальності клітин з мікроядрами у мазках крові двох порід великої рогатої худоби, а також двох ліній лабораторних мишей BALB/c та C57BL/6, контрастних за частотами зустрічальності метафазних пластинок з хромосомними абераціями [2, 1]. Розглядали мікроядра у популяціях еритроцитів та одноядерних лейкоцитів, а також двоядерні лейкоцити (без використання цитохалазину В). Слід відмітити, що досліджувані види відрізняються приблизно в 10^4 разів за масою та в 10 разів за тривалістю життя, що викликає зацікавленість та дозволяє розглянути відому гіпотезу про зв'язки між тривалістю життя та накопиченням генетичних дефектів [3].

Матеріали та методи

Дослідження виконувалися на мишах ліній BALB/c та C57BL/6, які відтворюються у віварії Інституту Молекулярної біології та генетики, а також на двох групах 2–3-річних корів червоної польської породи, одна з господарства ім. Шевченка Тернопільської області, інша – з ТОВ «Тарасівка» Збаразького району Тернопільської області. Для мікроядерного тесту кров у корів брали з яремної вени у гепаринізовані пробірки. Мишей забивали декапітацією та одночасно брали кров для дослідження. На підготовлені предметні скельця наносили краплину крові, розводили фізіологічним розчином у пропорції 1:2 – 1:3 та готували мазки. Мазки фіксували метиловим спиртом. Після висушування препарати фарбували барвником Гімза (Gymza Merk). Клітини кісткового мозку мишей готували стандартним методом [1]. Для аналізу клітин використовували бінокулярний мікроскоп фірми Carl Zeiss Jena при збільшенні у 1000 разів. Цитогенетичні аномалії фотографували на плівку

«Мікрат-300». Статистичну обробку експериментальних даних виконували за допомогою стандартної комп'ютерної програми «Statistica», достовірність розбіжностей оцінювали за критерієм Ст'юдента (t_s).

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ, рис.1), одноядерних лейкоцитів з мікроядрами (ЛМЯ, рис.2), двоядерних лейкоцитів (ДЛ, рис.3), апоптозних клітин (А, рис.4) та клітин на стадії метафази (МІ) у мазках периферичної крові мишей ліній BALB/c та C57BL/6. У результаті отримані дані представлені в табл.1. З даних таблиці видно, що частота зустрічальності ЕМЯ та ЛМЯ статистично достовірно ($P < 0$; $P < 0,05$ відповідно) вище у мишей лінії BALB/c у порівнянні з мишами лінії C57BL/6.

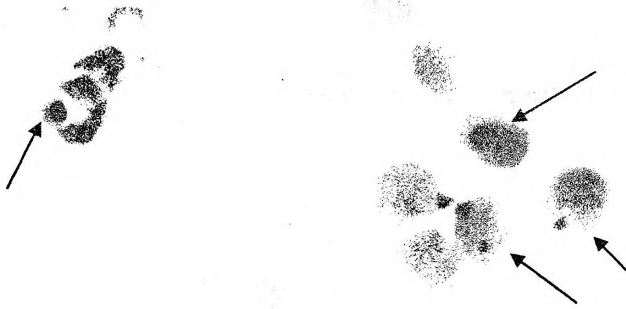


Рис.1. Еритроцити з мікроядрами (вказані стрілками) в мазках периферичної крові
Зліва – еритроцити миші; справа – великої рогатої худоби

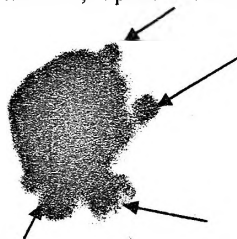


Рис.2. Лейкоцити з мікроядрами. Лейкоцит з декількома мікроядрами в мазку периферичної крові великої рогатої худоби.
Стрілками вказані мікроядра

Отримані дані добре погоджуються з результатами наших раніших досліджень [1] та з даними літератури [2] про те, що у першій лінії частоти зустрічальності метафазних пластинок з хромосомними аберациями статистично достовірно (приблизно у два рази) вище, ніж у другій лінії,

що, можливо, обумовлено відносно зниженою активністю ферментів репарації ДНК у мишей лінії BALB/c у порівнянні з мишами лінії C57BL/6 [9, 10]. Так, на рис. 5 як приклад приведена метафазна пластинка зі кісткового мозку миші лінії BALB/c з хроматидним обміном (показано стрілкою), який виник спонтанно, що призвів до формування дицентричної хромосоми – одного з типових «променевих маркерів» [5].

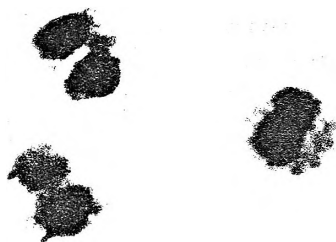


Рис.3. Двоядерні лейкоцити
Зліва – в мазку периферичної крові миші лінії BALB/c,
справа – великої рогатої худоби



Рис.4. Апоптоз. Клітина периферичної крові миші лінії BALB/c



Рис.5. Метафаза з дицентричною хромосомою (вказана стрілкою), яку
знайдено серед клітин кісткового мозку миші лінії BALB/c

Звертає увагу на себе той факт, що частоти зустрічальності ЕМЯ в обох лініях помітно вищі у порівнянні з частотами ЛМЯ (табл. 1). Напевно, це

пов'язано з тим, що наявність мікроядер в еритроцитах може бути результатом не тільки пошкодження генетичного апарату, яке призводить до формування мікроядер з відставших фрагментів, або цілих хромосом в останньому клітинному поділі, але й обумовлено екструзією (виштовхуванням) фрагментів ядра у процесі дозрівання еритроцитів.

Таблиця 1. Частоти зустрічальності різних цитогенетичних характеристик (на 1000 клітин) в периферичній крові мишей лінії BALB та C57BL/6 та в клітинах кісткового мозку (ХА – метафазні пластинки з хромосомними аберациями)

Миші	Кількість тварин	Периферична кров					Кістковий мозок			
		ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	А	МІ	ХА	ЛМЯ	ДЛ	МІ
BALB/с	10	9,1±1,7	7,4±2,4	4,7±2,0	1,7±1,3	0	5±2	9±1	6±1	6±1
C57BL/6	10	4,2±1,3	2,0±0,7	7,2±2,3	2,0±1,2	0	3±1	5±1	3±1	8±1

За такими показниками як ДЯ, А та МІ суттєвих межлінійних розбіжностей не виявлено. Цікаво відмітити, що у клітинах кісткового мозку цих же ліній мишей спостерігається виражений зв'язок між кількістю метафазних пластинок та двоядерних лейкоцитів (табл. 1, $r=0,4825$; $p=0,043$), на відміну від того, що спостерігається у клітинах периферичної крові. Очевидно, що такі розбіжності обумовлені тим, що у периферичній крові клітини, як правило, не діляться; у більшості випадків ділення закінчується у кістковому мозку. Тому виявлення двоядерних лейкоцитів у периферичній крові може бути обумовлено затримкою процесу клітинного поділу, пов'язаного з пошкодженням генетичного матеріалу. На користь цього припущення свідчать міжлінійні розбіжності у кореляційних взаємовідносинах у клітинах кісткового мозку між частотами зустрічальності ЛМЯ, ДЛ та МІ. Так, у мишей лінії BALB/с, для яких типова підвищена частота зустрічальності різних цитогенетичних аномалій, в клітинах кісткового мозку виявляється статистично достовірна кореляція між ЛМЯ та ДЛ ($r=0,9119$; $p=0,031$). У мишей лінії C57BL/6 така кореляція відсутня, однак присутні інші, негативні кореляції між кількістю метафаз з хромосомними аберациями та ДЛ ($r=-0,7748$; $p=0,024$), між МІ та ЛМЯ ($r=-0,9245$; $p=0,025$), які свідчать про те, що збільшення кількості клітин, які діляться (прискорення темпів оновлення клітинної популяції) супроводжується зменшенням кількості клітин з цитогенетичними дефектами (метафазних пластинок з хромосомними аберациями, ЛМЯ).

Таким чином, результати порівняльного аналізу клітин кісткового мозку та периферичної крові у двох ліній мишей дозволяють стверджувати, що використання підрахунку ЕМЯ та ЛМЯ у мазках периферичної крові

являються не менш точним показником дестабілізації хромосомного апарату, у порівнянні з більш традиційним підрахунком метафаз з хромосомними абераціями в клітинах кісткового мозку, які активно діляться. Тобто, для оцінки вираженості дестабілізації генетичного матеріалу трудомісткий аналіз метафазних пластинок, доступний тільки у кістковому мозку після забою тварини, або у периферичній крові після процедури її культивування та спеціальної індукції клітинного поділу, може бути замінений на мікроядерний тест у мазках периферичної крові, котрі взяті прижиттєво.

Розрахунок коефіцієнтів кореляції між досліджуваними цитогенетичними параметрами в клітинних популяціях периферичної крові показав, що статистично достовірний ($P < 0,05$) коефіцієнт кореляції спостерігається між частотами зустрічальності ЕМЯ та ЛМЯ тільки у мишей лінії BALB/c ($r = 0,7231$, $p = 0,018$). У них же спостерігається тенденція до позитивного зв'язку між частотами ЛМЯ и ДЛ ($r = 0,6071$, $p = 0,063$). Причому така тенденція зберігається й у C57BL/6 в периферичній крові ($r = 0,5115$, $p = 0,131$). У мишей лінії C57BL/6 відсутні кореляції між ЕМЯ та ЛМЯ ($r = 0,0328$, $p = 0,0928$).

Напевно, кореляційні взаємовідносини між частотами ЕМЯ та ЛМЯ виявляються легше тоді, коли достатньо виражена загальна компонента у механізмі їх виникнення – висока частота дволанцюгових пошкоджень ДНК, як у лінії мишей BALB/c. На фоні більш низької кількості хромосомних пошкоджень у мишей лінії C57BL/6, такі кореляційні зв'язки між ЕМЯ та ЛМЯ можуть зникати, оскільки мікроядра в еритроцитах можуть виникати не через пошкодження генетичного матеріалу в останньому поділі еритроblastів, а бути результатом їх дозрівання (екструзії фрагментів ядра). З цього випливає достатньо несподіване припущення, що наявність статистично достовірної кореляції між ЕМЯ, ЛМЯ та, напевно, ДЛ, може більш об'єктивно відображати факт дестабілізації генетичного матеріалу, ніж абсолютні значення мікроядерного тесту в лейкоцитах, чи в еритроцитах на невеликих виборках досліджуваних тварин, враховуючи високу індивідуальну різницю за обома варіантами цього тесту (табл.1).

У літературі є велика кількість робіт, в яких обговорюється можливість перенесення результатів оцінки генотоксичних ефектів різних впливів, отриманих на модельних об'єктах (як правило, лабораторних ліній мишей або крис, або дрібних мишоподібних гризунів, у випадку польових досліджень), на великих ссавцях, таких, як, наприклад, людина (Adler, 2000). Одна из трудностей такої екстраполяції заключається в тому, що тривалість життя модельних об'єктів, взагалі, на порядок менше, ніж великих ссавців, і у відповідності до відомої гіпотези про зв'язок механізмів старіння та накопиченням генетичних дефектів у клітинах сом [3], можна очікувати, що у клітинах дрібних ссавців частоти зустрічаємості різних генетичних дефектів набагато вище, ніж у великих.

Для того, щоб перевірити це припущення, нами були розглянуті частоти зустрічальності ЕМЯ, ЛМЯ, ДЛ, А та МІ у мазках периферичної крові у двох груп великої рогатої худоби червоної польської породи, яка відтворюється в двох різних господарствах України. Отримані дані представлені в табл.2.

Таблиця 2. Частоти зустрічальності еритроцитів з мікроядрами, одноядерних лімфоцитів з мікроядрами та двоядерних лімфоцитів у периферичній крові у корів червоної польської породи різних господарств Тернопільської області

Червона польська порода	Кількість тварин	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	А	МІ
Господарство «Шевченко»	12	6,7±1,3	3,3±1,4	5,4±1,2	1,5±0,6	0
Господарство «Тарасівка»	11	3,3±1,1	2,1±0,8	6,6±1,4	2,0±0,7	1,3±0,6

Видно, що у групі великої рогатої худоби господарства «Шевченко» частоти зустрічаємості ЕМЯ у два рази вище, ніж у групі другого господарства (на межі достовірності, $P < 0,05$). Приналежність груп тварин до однієї породи, відсутність різниці між групами по віку та статі дозволяє припустити, що група тварин першого господарства знаходиться у більш несприятливих зовнішніх умовах, які сприяють підвищеній частоті цитогенетичних аномалій саме в еритроцитах, ніж друга. У цій групі тварин не спостерігається кореляцій між частотами зустрічальності розглянутих цитогенетичних аномалій. Цікаво, що у групі великої рогатої худоби господарства «Тарасівка» спостерігається статистично достовірна кореляція між частотами зустрічальності ЕМЯ та А ($r=0,6237$; $p=0,040$), та достатньо високий коефіцієнт кореляції між ЛМЯ та ДЛ ($r=0,5248$; $p=0,097$), такий, як і в лініях мишей. Це свідчить на користь висунутого нами припущення про те, що у свавців частоти зустрічальності ДЛ у периферичній крові у певній мірі залежать від пошкодження генетичного апарату клітин та можуть розглядатися як цитогенетична аномалія, котра пов'язана з дестабілізацією генетичного матеріалу.

При порівнянні результатів мікроядерного тесту у ліній мишей та груп великої рогатої худоби (табл. 1 та 2) видно, що внутрішньовидові відмінності за частотою зустрічальності розглянутих цитогенетичних аномалій перебивають міжвидові відмінності. Як правило, у всіх розглянутих випадках частоти зустрічальності ЕМЯ вище, ніж ЛМЯ. Розбіжності співвідношень частот зустрічальності ДЛ та МІ у клітинах кісткового мозку та периферичної крові, тенденція до корелятивних зв'язків між ДЛ та ЛМЯ у периферичній крові у обох видів дозволяє вважати що, ДЛ у периферичній крові також можуть використовуватися у якості показника дестабілізації генетичного апарату, як і ЛМЯ. Отримані

дані свідчать на користь припущення, що у виникненні усіх трьох типів цитогенетичних аномалій бере участь загальний для них механізм, пов'язаний з пошкодженням генетичного матеріалу. Але сама частота зустрічальності кожної окремої аномалії контролюється й іншими факторами, що призводить й до високої індивідуальної мінливості й до зникнення кореляцій між цими параметрами. Особливо наглядним прикладом такої незалежної мінливості показників дестабілізації хромосомного апарату є відмінності між двома групами великої рогатої худоби однієї й тієї ж породи за частотою зустрічальності ЕМЯ при близьких значеннях ЛМЯ.

Отже, отримані дані дозволяють зробити наступні висновки.

Відсутні виражені відмінності за частотою зустрічальності розглянутих цитогенетичних аномалій у клітинах периферичної крові у двох видів ссавців, які на порядок відрізняються за тривалістю життя.

Результати підрахунку еритроцитів з мікроядрами, одноядерних лейкоцитів з мікроядрами у мазках периферичної крові співпадають з оцінкою розбіжностей за стабільністю генетичного матеріалу, виконаною за частотами зустрічальності серед клітин кісткового мозку метафазних пластинок з хромосомними аберациями. Це дозволяє запропонувати замінити трудоемкий аналіз генотоксичних ефектів в клітинах кісткового мозку, які діляться після забою тварин, більш простим, прижиттєвим дослідженням клітин, які не діляться з мікроядрами у мазках периферичної крові.

Порівняння трьох типів цитогенетичних аномалій – еритроцитів з мікроядрами, лейкоцитів з мікроядрами, двоядерних лейкоцитів у тварин двох видів свідчать про те, що всі вони, як і передбачалося, мають загальний компонент у механізмах формування пов'язаний з пошкодженням генетичного матеріалу. Однак, виникнення кожного з них контролюється й іншими, специфічними для еритроцитів та лейкоцитів факторами. Тому оцінки кореляцій між частотами еритроцитів з мікроядрами, лейкоцитів з мікроядрами, двоядерних лейкоцитів у мазках периферичної крові у великих та дрібних ссавців можуть нести додаткову інформацію про особливості дестабілізації генетичного матеріалу в еритроцитарних та лейкоцитарних клітинних популяціях.

Література

1. Глазко Т.Т., Сафонова Н.А., Бунтова О.Г., Глазко Г.В., Созинов А.А. Гетерогенность цитогенетической изменчивости в клетках костного мозга лабораторных и диких грызунов в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС//Цитология и генетика. – 1996. – Т.30. – С. 25–34.
2. Корогодина Ю.В., Лилья И.Г. Мутабельность соматических клеток мышей разных линий. Опыт 2//Цитология и генетика. – 1978. – № 12. – С. 134–136.

3. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. – М.: Наука. – 1995. – 158 с.
4. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре//Цитология. – 1996. – т.38, №8. – С. 787–814.
5. Пилинская М.А. Генетическая индикация и дозиметрия радиационного влияния: итоги, проблемы, перспективы//Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм / Под ред. Руднева М.И.). – К.: Наукова думка. – 1994. – С. 111–112.
6. Adler L.-D. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man//Andrologia. – 2000. – V. 32. – P.233–237
7. Collier H., Thilly W. Development and applications of mutational spectra technology//Environ.Sci.Technol. – 1994. – Vol.28. – № 11. – P. 478–487.
8. Munne S., Eskudero T., Sandalinas M., Sable D., Cohen J. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations//Cytogenet Cell Genet. – 2000. – 90:303–308.
9. Okayasu R., Suetomi K., Yu Y., Silver A., Bedford J.S., Cox R., Ullrich R.L. A Deficiency in DNA Repair and DNA-PKcs Expression in the Radiosensitive BALB/c Mouse// Cancer Research. – 2000. – V.60. – P.4342–4345
10. Sato S., Takizawa H., Inui N. Mouse strain differences in induction of micronuclei by base analogues and nucleosides//Mutat.Res. – 1993. – 301. – P. 45–4