

В.Ю. ЧЕРНЕНКО¹, Л.Л. ЛУКАШ¹,
Л.Л. МАЦЕВИЧ¹, Т.П. КОЧУБЕЙ¹, А.А. ЕЛЕСИЧЕВ,
Е.А. КЛИМЕНКО², Л.Н. ГОРБАНЬ³

¹ Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

² СКБ "Кварц" НПО "Наука", Киев

³ Институт медицины труда АМН Украины, Киев

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МИКРОЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МУТАГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА



Критерием индукции генетических повреждений в клетке в результате апоптоза или воздействия генотоксического фактора является образование одно- и двунитевых разрывов в ДНК, которые обнаруживаются методом микроэлектрофореза в агарозном геле. Нами изучалось генотоксическое действие соли тяжелого металла (хлорид никеля) на уровне ДНК индивидуальных клеток в условиях первичной культуры эмбриональных гемopoэтических клеток человека. Показано, что около 2 % клеток в исследуемых популяциях in vitro находились в состоянии апоптоза, а хлорид никеля вызывал повышение частоты формирования электрофоретических треков типа «комет», содержащих поврежденную ДНК.

© В.Ю. ЧЕРНЕНКО, Л.Л. ЛУКАШ, Л.Л. МАЦЕВИЧ,
Т.П. КОЧУБЕЙ, А.А. ЕЛЕСИЧЕВ, Е.А. КЛИМЕНКО,
Л.Н. ГОРБАНЬ, 2004

Введение. Для выявления в клеточных популяциях апоптозных клеток и изучения последствий влияния на геном растворимых цитотоксических и генотоксических агентов, в том числе солей тяжелых металлов, используется метод микроэлектрофореза ДНК в агарозном геле [1, 2]. Данный метод достаточно информативен, так как позволяет количественно определять одно- и двунитевые разрывы в ДНК на уровне индивидуальной клетки и, соответственно, оценивать состояние ее генома. Чувствительность метода составляет один разрыв в молекуле ДНК на 10^{10} дальтон (10 ГДа) [2–4]. Наблюдаемый при этом с помощью флуоресцентного микроскопа электрофоретический трек объективно отражает степень повреждения ДНК [3].

Суть метода состоит в следующем. Исследуемые клетки вносят в раствор легкоплавкой агарозы, из которой формируется микрогель размером 18×18 мм и толщиной 100 мкм. Затем в агарозном геле проводится мягкий лизис клеток и последующий электрофорез ДНК. В процессе лизиса клеточные структуры диссоциируют, хроматин или матрикс освобождается от цитоплазмы и выходит в гель агарозы. ДНК в составе матрикса под влиянием электрического поля мигрирует к аноду, при этом вокруг матрикса формируется ореол, или галло, образованное релаксированной ДНК. Характер миграции матрикса и форма галло тесно связаны со степенью поврежденности ДНК [3]. При воздействии электрического поля на неповрежденную ДНК наблюдается равномерный ореол вокруг матрикса. В случае действия генотоксического агента, который вызывает одно- или двунитевые разрывы в ДНК, галло трансформируется, образуя электрофоретический трек, похожий на комету. Чем больше повреждена ДНК, тем длиннее электрофоретический трек [2–5].

В качестве модельной клеточной системы для тестирования однонитевых разрывов в ДНК использовалась первичная культура эмбриональных гемopoэтических клеток человека [6]. Наличие высокого пролиферативного потенциала у эмбриональных клеток и повышенная чувствительность к действию цитотоксических и генотоксических факторов обуславливает приоритетность выбора данного типа клеток в качестве модельной тест-системы.

Материалы и методы. Для получения гемопоэтических клеток использовали метод, разработанный в отделе генетики человека Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины [6].

Получение и обработка клеточных культур. Клетки изолировали из абортивного материала, эмбриональной печени 8–9-недельного периода гестации путем ферментативно-механической дезагрегации ткани. При этом печень инкубировали в смеси 0,25 %-ного раствора трипсина и раствора Версена в соотношении 1:1 при 37 °С в течение 30 мин, затем раствор удаляли, печень отмывали несколько раз стандартной средой Игла и механически гомогенизировали в небольшом объеме среды без сыворотки. Определяли количество клеток в камере Горяева и переносили клетки в чашки Петри диаметром 40 мм. Посевная доза составляла $1 \cdot 10^6$ клеток на чашку. После посева клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 в питательной среде следующего состава: среда Игла — 40 %; лактальбумина гидролизат — 40 %; эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота — 20 %; канамицин — 50 мкг/мл.

При культивировании наблюдалось расслоение разных типов клеток по объему культурального сосуда: гепатоциты адсорбировались на дне чашки Петри, образуя монослой, а гемопоэтические клетки размножались в суспензионном состоянии. Гепатоциты одновременно выполняли роль тканеспецифичного фидера, который синтезирует колониестимулирующие фак-

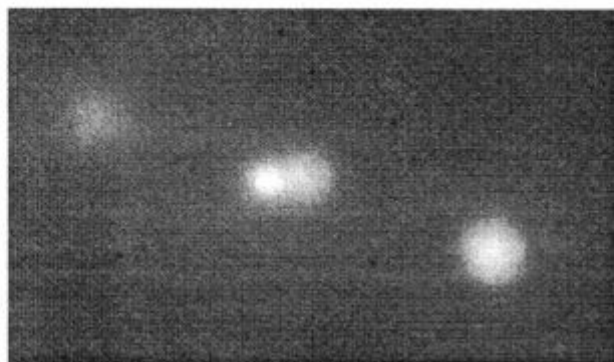


Рис. 1. Компьютерное изображение ядерных матриц с ореолом (галло), полученных из гемопоэтических клеток контрольной культуры: питательная среда не содержит генотоксических факторов. Электрофоретические треки ДНК типа «кометы» отсутствуют

торы, необходимые для полноценного размножения и дифференцировки гемопоэтических клеток. Через 24 ч и в последующие сроки оценивали качество гепатоцитов по образованию на дне чашки Петри клеточного монослоя, кроме того, отбирали пробы гемопоэтических клеток для исследования жизнеспособности клеток.

Эффективность посева оценивали по количеству живых клеток при окрашивании 0,3 %-ным раствором трипанового синего. Жизнеспособность изолированных клеток в культуре при данном методе культивирования обычно составляет около 90 % [6]. Ростовые свойства культуры гемопоэтических клеток оценивали по их количественному приросту.

Тестируемый фактор — хлорид никеля — добавляли в культуру клеток в концентрации 500 мкг/мл, после чего инкубировали клетки в течение 24 ч и брали пробы для дальнейшего анализа с помощью микроэлектрофореза. В качестве позитивного контроля использовали перекись водорода, в качестве негативного — соответствующую клеточную культуру, не подвергавшуюся обработке.

Подготовка клеточных суспензий для проведения микроэлектрофореза ДНК. Клетки, находящиеся в суспензионном состоянии, отбирали в стерильные пробирки и отмывали от питательной среды центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 5 %-ном растворе глюкозы до конечной концентрации 500 тыс. клеток/мл и суспензию вносили по 180 мкл в пробирки «Эппендорф», подогреваемые на водяной бане при 42 °С. К клеточной суспензии добавляли равный объем раствора 2 %-ной легкоплавкой агарозы (low melting temperature agarose, «Serva» в 5 %-ном растворе глюкозы), охлажденный до 58 °С, суспензию перемешивали вибромиксером. Смесь быстро наносили по 120 мкл на предварительно прогретые до 42 °С специальные предметные стекла, на которые наклеены гелеформирующие пластинки толщиной 100 мкм. Раствор накрывали нагретыми до 42 °С покровными стеклами (18 × 18 мм). После остывания в течение 10 мин при комнатной температуре гели, содержащие заплавленные клетки, подвергали обработке лизирующим раствором: 10 мМ Трис-НCl, pH 8,0; 10 мМ ЭДТА- Na_2 ; 1 % ДСН; 0,5 % Тритон X-100; 0,5 % саркозил;

этидиума бромид в концентрации 40 мкг/мл. Лизис клеток продолжался в течение 40–60 мин, что контролировали с помощью инвертированного микроскопа. Затем лизирующий раствор смывали дистиллированной водой, предметные стекла с микрогелями переносили в камеру для горизонтального электрофореза.

Проведение микроэлектрофореза ДНК индивидуальных клеток. В качестве электродного буфера использовали 0,5 × раствор трис-борат-ЭДТА-буфера (0,089 М трис; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА, pH 8,5) [7]. Электрофорез проводили при напряжении 5 В/см в течение 15 мин [8]. После промывания микрогелей водой наносили краситель, раствор этидиума бромида (40 мкг/мл) в бидистиллированной воде, для окрашивания ДНК ядерных матриксов и электрофоретических треков. Инкубировали микрогели при комнатной температуре в

течение 10–15 мин. Затем микрогели отмывали бидистиллированной водой и накрывали покровными стеклами.

Используя соответствующую комбинацию светофильтров на люминесцентном микроскопе, анализировали наличие и характер свечения (галло) ядерных матриксов, образовавшихся в результате лизиса клеток, а также формирование электрофоретических треков ДНК типа «комет» в контрольных и опытных культурах.

Изображения ядерных матриксов и электрофоретических треков поврежденной ДНК, окрашенных раствором этидиума бромида, регистрировали с помощью видеокамеры, установленной на тубусе люминесцентного микроскопа, и анализировали на компьютере «Pentium» в операционной среде Windows'95. Для автоматизированной обработки полученного изображения использовали специальную прог-

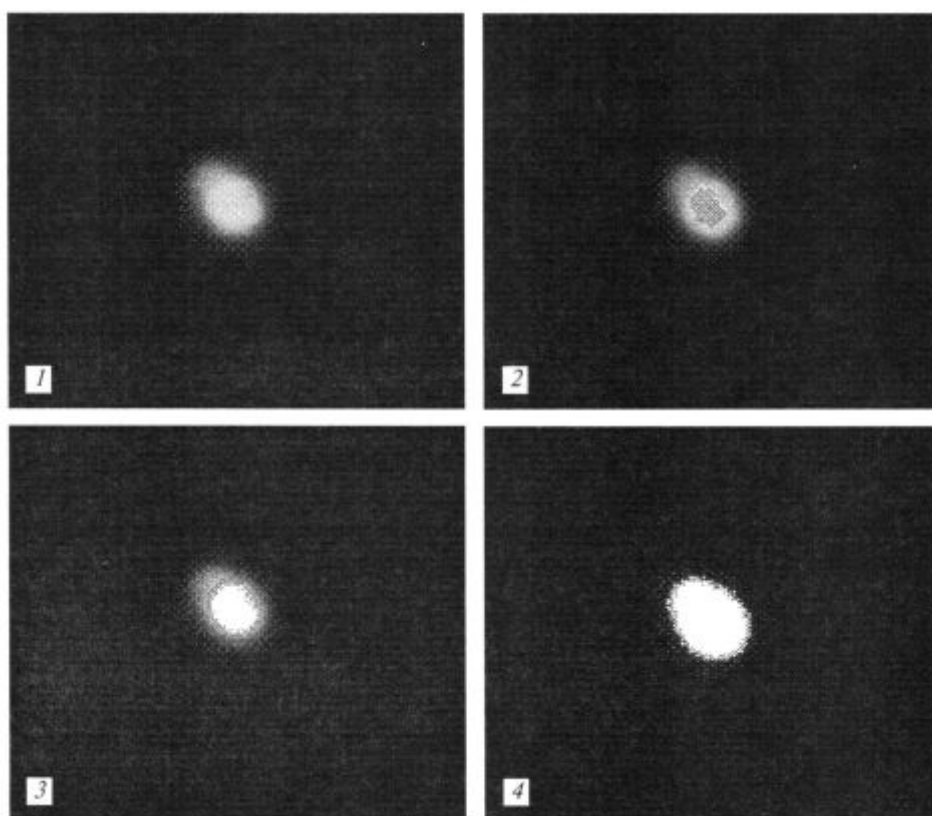


Рис. 2. Компьютерное изображение электрофоретического трека ДНК типа «кометы», полученного из гемопозитической клетки, инкубированной в присутствии хлорида никеля (500 мкг/мл.). Определение оптической плотности ДНК в ядерной и трековой части «кометы» проводилось поэтапно: 1 — первичное изображение трека; 2 — оптическая плотность ДНК ядерного матрикса. Разница оптической плотности ДНК в целой «комете» (4) и ядре «кометы» (3) составляет основу статистической верификации содержания поврежденной ДНК в трековой части «кометы»

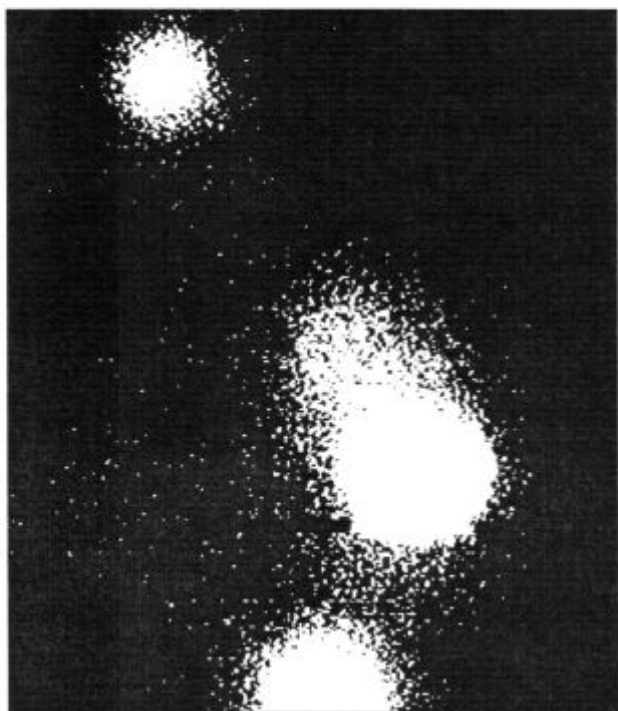


Рис. 3. Увеличенное изображение электрофоретического трека ДНК типа «кометы», полученного из гемопоэтической клетки, инкубированной в присутствии хлорида никеля (500 мкг/мл)

рамму, разработанную СКБ «Кварц» НПО «Наука».

Результаты исследований и их обсуждение. В процессе работы с первичной культурой гемопоэтических клеток было показано, что в отсутствие генотоксических агентов (негативный контроль) электрофоретические треки ДНК типа «комет», как правило, отсутствуют. На рис. 1 показано, как выглядят ядерные матриксы и светящийся ореол (галло) в контроле на примере гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека 9-недельной гестации. Но в некоторых контрольных клеточных популяциях тем не менее встречались деформированные ядерные матриксы, имеющие треки, с относительно невысокой частотой — 1,5–2 % исследуемых случаев. Возможно, это обусловлено запуском механизма запрограммированной гибели клеток *in vitro*, в результате чего в популяции появляются клетки в состоянии естественного апоптоза. Именно этим, по-видимому, и объясняется присутствие на контрольных препаратах «комет» поврежденной ДНК, которые необходимо отличать от

электрофоретических треков ДНК, вызванных действием генотоксических агентов. Полученные данные указывают на необходимость определения содержания апоптозных клеток в контрольных и опытных культурах [8] с использованием моноклональных антител типа CD-95 (ICO-160), специфичных к апоптоз-ассоциированному FAS-антигену.

После обработки клеточной популяции хлоридом никеля в концентрации 500 мкг/мл в подавляющем большинстве исследуемых случаев обнаружено появление «комет» поврежденной ДНК. На рис. 2 и 3 представлен пример образования электрофоретического трека ДНК под влиянием хлорида никеля в популяции гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека 9-недельной гестации. На компьютерных изображениях (рис. 1–3) выявляются четкие различия формы галло у контрольных и опытных гемопоэтических клеток и показано формирование электрофоретического трека ДНК после обработки клеток генотоксическим агентом. Наши наблюдения согласуются с литературными данными [3, 9].

С помощью оценки таких параметров, как соотношение общей длины «кометы» к ее треку, а также диаметра ядра «кометы» к общей площади трека, можно качественно оценить повреждающее действие генотоксического агента на клеточную ДНК. В настоящее время нами разрабатывается алгоритм оценки такого показателя, как общее содержание ДНК в «комете» и соотношение материала ДНК в ядре и трековой части «кометы» (рис. 2).

Метод микроэлектрофореза клеточной ДНК позволяет выявлять гетерогенность клеточной популяции, включая внутритканевую гетерогенность, а также дифференцировать клетки по чувствительности к тому или иному агенту [5]. Так, нами была продемонстрирована гетерогенность гемопоэтических клеток эмбриональной печени по чувствительности к действию хлорида никеля. Среди клеток, которые поддаются морфологической дифференциации, в первую очередь — по размеру, чувствительными к действию исследуемого агента оказались клетки диаметром 10–15 мкм. В то же время клетки с размерами 25–30 мкм, которые имеют морфологическое сходство со стволовыми гематогенными клетками, были нечувствительны

к действию хлорида никеля. Эти данные согласуются с данными других авторов об относительной устойчивости стволовых клеток к действию генотоксических факторов [10].

Полученные результаты свидетельствовали о том, что среди гетерогенной популяции гемопоэтических клеток (стволовые клетки, бластные формы, клетки эритроидного и миелоидного ряда, находящиеся на разных стадиях дифференцировки) наиболее чувствительны к действию генотоксических факторов делящиеся клетки-предшественники.

С нашей точки зрения, определение фенотипа указанных клеток с использованием моноклональных антител является одной из ключевых методических задач, принципиально важных для решения проблемы стандартизации метода тестирования генотоксического действия факторов различной природы, в том числе и солей тяжелых металлов, на уровне ДНК индивидуальных гемопоэтических клеток. Дальнейшая работа в направлении поиска наиболее чувствительных к генотоксическому действию типов клеток с применением селективного препаративного выделения соответствующей клеточной популяции позволит оптимизировать метод микроэлектрофореза ДНК.

Таким образом, нашими экспериментами с использованием люминесцентной микроскопии и соответствующей компьютерной обработки было подтверждено, что метод микроэлектрофореза ДНК гемопоэтических эмбриональных клеток человека имеет высокую чувствительность в отношении выявления повреждений ДНК отдельных клеток. Разработка стандартизованного лабораторного теста для визуальной оценки действия генотоксических агентов на уровне ДНК индивидуальных клеток позволит предложить его для широкого внедрения в гигиеническую и клиническую практику системы здравоохранения.

SUMMARY. Formation of single- and double strand breaks in DNA which may be discovered by microelectrophoresis in agarose gel is one of the criterion of genetic lesions in cells as a result of apoptosis or of genotoxic agent action. Genotoxic action of nickel chloride at the level of DNA of the individual cells in the initial culture of human embryonic haemopoietic cells was studied. It has been shown that about 2 % cells in the studied *in vitro* popu-

lations were in the apoptosis state. Nickel chloride induced increasing of the frequency of formation of electrophoretic tracks of «comet» type with destroyed DNA.

РЕЗЮМЕ. Критерієм індукції генетичних пошкоджень у клітині внаслідок апоптозу або дії генотоксичного чинника є утворення одно- та двониткових розривів ДНК, що виявляються методом мікроелектрофорезу в агарозному гелі. Нами вивчалась генотоксична дія солі важкого металу (хлорид нікелю) на рівні ДНК індивідуальних клітин в умовах первинної культури ембріональних гемопоетичних клітин людини. Показано, що біля 2 % клітин в досліджуваних популяціях *in vitro* знаходились у стані апоптозу, а хлорид нікелю спричиняв підвищення частоти формування електрофоретичних треків типу «комет», що містять пошкоджену ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jendryczko A., Drozd M. Genotoksyczność jonów metali // *Wiad. Lek.* — 1987. — **40**, № 8. — P. 549–553.
2. Тронов В.А., Гришко Е.В., Бериташвили Д.Р., Филиппович И.В. Микроэлектрофорез ДНК индивидуальных интактных и гамма-облученных тимочитов // *Цитология.* — 1991. — **33**, № 2. — С. 94–102.
3. Тронов В.А., Пелевина И.И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода // *Цитология.* — 1996. — **38**, № 4/5. — С. 427–439.
4. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1984. — **123**, № 1. — P. 291–298.
5. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.* — 1988. — **175**, № 1. — P. 184–191.
6. Сухорада Е.М., Лукаш Л.Л., Подольская С.В., Рубан Т.А. Простой способ клонирования эмбриональных клеток человека // *Биополимеры и клетка.* — 1996. — **12**, № 3. — С. 101–103.
7. Андреев І.О. Дослідження крупноблокової фрагментації ДНК в препаратах клітинних ядер: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1997. — 20 с.
8. Максимовский Л.Ф., Микичур Н.И. Методы микроманипуляции и ультрамикрoанализа в биологии и медицине. — Новосибирск: Наука, 1989. — 239 с.
9. Solovyan V.T., Andreev I.O., Kolotova T.Yu. et al. The ordered disintegration of nuclear DNA as a specific genome reaction accompanying apoptosis, stress response and differentiation // *Биополимеры и клетка.* — 1996. — **12**, № 3. — С. 67–76.
10. Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Склярченко Л.М., Надгорная В.А. Клеточные основы кроветворной и иммунной системы // *Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний.* — Киев: МОРИОН, 1998. — С. 5–89.

Поступила 15.04.03