

КАНЦЕРОГЕННІ ФАКТОРИ В АСПЕКТІ КОМУНАЛЬНОЇ ГІГІЄНИ

УДК 576.385.5:57.083.3

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ У КЛІТИНАХ ШКІРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

*Черниченко І.О., Баленко Н.В., Соверткова Л.С., Остап О.М.**ДУ «Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва НАМН України», м. Київ*

При ідентифікації та оцінці небезпеки хімічних канцерогенів за допомогою прискорених тест-систем обов'язковим компонентом є дослідження проявів генотоксичності (утворення ДНК-аддуктів, розривів ниток ДНК, мутацій) як ознаки канцерогенних властивостей [1].

Серед короткострокових методів визначення мутагенної активності ксенобіотиків все більше застосування в еколого-гігієнічних дослідженнях знаходить мікроядерний (МЯ) тест у зв'язку з його перевагами порівняно з іншими методами: відносна простота і доступність, швидкість і легкість аналізу, інформативність та економічно менша затратність [2,3]. Тест базується на реєстрації в органах і тканинах частоти клітин з мікроядрами (МЯ), що утворюються внаслідок ушкоджуючої дії генотоксикантів і свідчать про індукцію генних, хромосомних чи геномних мутацій.

Російськими фахівцями в результаті 40-річного вивчення та удосконалення цього тесту розроблено поліорганний мікроядерний метод оцінки мутагенної активності факторів [7]. Метод дозволяє одночасно досліджувати МЯ *in vivo* у клітинах широкого спектру органів (легені, різні відділи шлунково-кишкового тракту, печінка, нирки, сечовий міхур, щитоподібна залоза та сім'яники) гризунів (мишей, щурів) з визначенням органної специфічності мутагенного ефекту. Остання, як було доведено, відповідає органоспецифічності канцерогенного ефекту, що стало підґрунтям вважати мож-

ливим прогнозування потенційних канцерогенних властивостей досліджуваної речовини за МЯ тестом [2,8]. Важливою особливістю цього методу є також використання для дослідження МЯ органів тварин після фіксації їх формаліном, що забезпечує можливість проведення паралельних досліджень інших змін в організмі (патоморфологічних, імунологічних, оксидативних тощо), викликаних дією ксенобіотиків, за умов використання одних і тих же тварин в одному досліді.

Разом з тим запропонований метод не включає використання шкіри для визначення мутагенів-канцерогенів, що важливо при ідентифікації таких речовин у випадках, коли шкіра є проявом їх органоспецифічності. У доступній нам літературі не знайдено також опис суспензійного способу виготовлення препаратів ізольованих клітин із шкіри, незважаючи на те, що шкіра є органом, який захищає тіло від широкого спектру зовнішніх впливів, бере участь у диханні, терморегуляції, обмінних процесах і реагує на будь-які зміни в організмі як ендогенного, так і екзогенного характеру. Шкіра є чутливою також до дії ряду канцерогенних хімічних сполук, зокрема класу поліциклічних ароматичних вуглеводів, та продуктів, які їх містять (сажа, кам'яновугільні, нафтові та сланцеві пеки, смоли, мінеральні масла), що проявляється розвитком індукованих пухлин у експериментальних тварин та професійного раку у людей за тривалого контакту з ними на виробництві. При цьому шкіра є навіть більш чутливою, ніж інші органи (легені,

шлунок) до дії канцерогенів: пухлини виникають за дії нижчих доз та у більш короткі терміни, що значно скорочує тривалість проведення дослідів.

До того ж шкіра є зручним та наглядним об'єктом для візуального спостереження за розвитком різних стадій канцерогенезу.

У теперішній час широкого використання хімічних речовин, в тому числі нових синтезованих, у виробництві товарів побутового призначення, засобів особистої гігієни та косметики не можна виключити наявність серед них також канцерогенів – генотоксикантів, які можуть впливати на людей через шкіру та викликати в ній відповідні ушкодження.

Для прискореного тестування таких канцерогенів, приймаючи до уваги однакову органоспецифічність мутагенного ефекту за частотою клітин з МЯ і канцерогенного, найбільш адекватним та придатним може бути, на нашу думку, МЯ тест з використанням шкіри.

Наведені обставини були визначальними для поставленої в роботі мети: розробити суспензійний спосіб виготовлення препаратів ізольованих клітин із епітелію шкіри і оцінити його придатність для виявлення генотоксичності ксенобіотиків за показником частоти клітин з МЯ.

Матеріали та методи дослідження. Поставлена мета вирішувалася у процесі проведення хронічного експерименту на білих безпородних мишах-самцях (15-20 г.), яким здійснювали нашкірні аплікації еталонного канцерогена – бенз(а)пірену (БП).

В експеримент було взято 160 мишей, розподілених на 5 груп. БП у вигляді ацетонного розчину в об'ємі 0,1 мл наносили піпеткою-дозатором на попередньо вистрижену шкіру міжлопаткової ділянки спини. Разові дози БП склали: 0,21 мкг, 2,1 мкг, 10,4 мкг. Дві групи мишей були контрольними. Миші однієї групи в аналогічному об'ємі отримували аплікації розчинника (ацетон). Друга група тварини являла собою інтактний контроль. Речовини наносили на шкіру 5 разів на тиждень протягом всього досліді, що тривав 11 місяців.

Періодично на 8, 22, 90 день та 6 і 11 місяці від початку досліді, за добу після аплікації речовин мишей умертвляли шля-

хом зміщення хребців шийного відділу хребта.

З урахуванням збігу органоспецифічності мутагенного ефекту за МЯ тестом і канцерогенного ефекту [2,8] і переважно місцевого характеру дії БП для дослідження брали шкіру з місця аплікацій речовин. Шматочки шкіри у розправленому на цупкому папері стані занурювали у фіксатор – 10% забуферений нейтральний розчин формаліну. Фіксовану шкіру розрізали навпіл. Половину шматочка брали для подальшої обробки і виготовлення препаратів для аналізу МЯ, решту – для виготовлення гістологічних препаратів та вивчення динаміки поєднаних гістоморфологічних змін, індукованих канцерогеном.

Підрахунок кількості клітин з МЯ проводили за допомогою світлооптичних мікроскопів PrimoStar виробництва фірми ZEISS та БІОЛАМ при відповідних їм збільшеннях $\times 1000$ і $\times 900$ з використанням імерсійних об'єктивів. Отримані результати підрахунків виражали у ‰. Ідентифікацію МЯ проводили згідно з критеріями, описаними у літературі [9].

Результати досліджень та їх обговорення. При розробці способу виготовлення препаратів ізольованих клітин із шкіри орієнтувалися на основі положення методичних рекомендацій для поліорганного МЯ методу [7]. Найбільш складним завданням, як з'ясувалося, є процедура отримання якісної суспензії клітин. У зв'язку з цим розробка методу потребувала затрат певного часу. Початкова спроба використання для шкіри описаного способу виготовлення препаратів із передшлунка гризунів, включаючи мишей, із дотриманням рекомендованих авторами умов обробки матеріалу не дала бажаних результатів. Причиною було те, що задані параметри, а саме, температура, тривалість проведення лужної дисоціації клітин епітелію передшлунка та термін центрифугування виявилися непридатними для отримання якісної суспензії клітин із епітелію шкіри оскільки, плоскоклітинний епітелій шкіри, не дивлячись на його морфологічну подібність до епітелію передшлунка, виявився менш стійким до дії луку. Внаслідок цього була досягнута хороша дисоціація епітелію, проте спостерігалось майже тотальне руйнування

клітин з утворенням так званих «голих» ядер.

У зв'язку з цим нами було проведено випробовування декількох варіантів процедур обробки матеріалу, що включали різну тривалість обробки лугом (50% розчин КОН) та наступного витримування у дистильованій воді, температурний режим, спосіб суспензування та центрифугування, виготовлення мазків із суспензії клітин з подальшим їх фарбуванням.

В результаті було визначено наступні оптимальні параметри обробки шкіри, що забезпечують отримання якісної суспензії ізольованих клітин епітелію шкіри: тривалість лужної дисоціації становить 13-14 годин при температурі 18-19°C, витримування у дистильованій воді – 2 години при t=19-20°C, центрифугування – 9-10 хв, 1500 об/хв.

Виготовлення препаратів здійснювали з дотриманням рекомендованої послідовності процедур обробки фіксованих формаліном органів [7].

Шматочки шкіри після фіксації у розчині формаліну промивали протягом 8 годин у проточній воді. Після цього шкіру перенесли у центрифужні пробірки, заливали 1,5 мл 50% розчину КОН та витримували у ньому протягом 13-14 годин при температурі 18-19°C. Потім лужний розчин зливали і додавали у пробірку дистильовану воду. Шматочок шкіри виймали та закріплювали голками на пінопластиковому столику і обережно зіскоблювали епітелій кінчиком скальпелю у пробірку з дистильованою водою та витримували при температурі 19-20°C протягом

2 годин. Далі проводили дуже обережне піпетування та наступне центрифугування протягом 9-10 хвилин при 1500 об/хв. Видаляли надсадкову рідину та повторно заливали дистильованою водою і центрифугували. Краплю суспензії наносили на край сухого, ретельно знежиреного предметного скла. Шліфованим склом під кутом 45° робили мазок. Щільність розташування клітин контролювали під мікроскопом.

Мазки занурювали для фіксації на 10 хвилин у суміш етилового спирту та оцтової кислоти у співвідношенні 3:1, висушували у повітрі з наступним фарбуванням 2,5% розчином оцтоарсеїну при температурі 37°C протягом 1 години.

Надалі послідовно промивали 45% оцтовою кислотою 5-10 сек. та двічі дистильованою водою по 3-5 сек. Цитоплазму клітин дофарбовували 1% спиртовим розчином світлого зеленого протягом 1 хв., після чого препарат двічі промивали дистильованою водою та просушували у повітрі.

Виготовлені таким чином препарати аналізували під мікроскопом для ідентифікації та підрахунків клітин з МЯ на кожну 1000 ізольованих клітин епітелію шкіри для кожної миші.

Отже, проведені дослідження дозволили визначити оптимальні параметри процедур обробки шкіри, що забезпечують досягнення повної дисоціації епітелію з отриманням належної якості суспензії, яка містить цілі, неушкоджені ізольовані клітини (рис. 1,2), кількість яких складає 80-90% та знижує ризик їх руйнування до 10-20%.

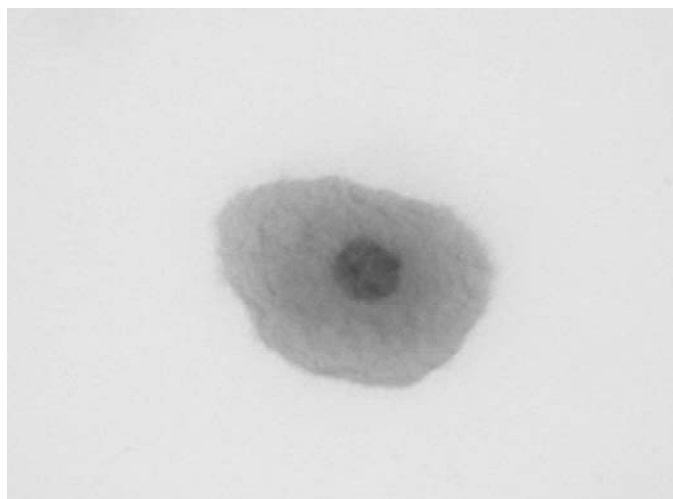


Рисунок 1. Нормальна неушкоджена клітина із епітелію шкіри.

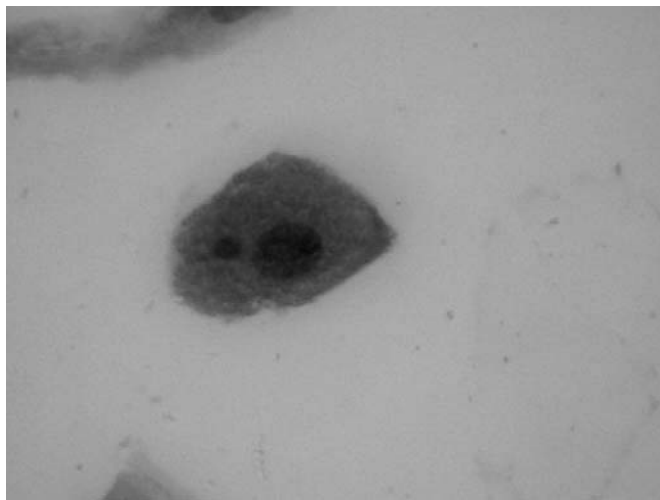


Рисунок 2. Мікроядро у клітині із епітелію шкіри миші.

Застосування розробленого способу виготовлення препаратів для дослідження шкіри мишей після аплікації різних доз БП підтвердило появу мікроядер внаслідок дії канцерогена і дозволило установити ряд закономірностей, які детально висвітлено у попередніх публікаціях [10-12]. Зокрема, виявлено ранню появу МЯ та залежність частоти клітин, що містили МЯ, від дози та тривалості впливу канцерогена, збіжність органоспецифічності та величин доз мутагенного і канцерогенного ефектів БП (розвиток пухлин шкіри зареєстровано тільки за дії БП у дозах 2,1 та 10,5 мкг, які індукували достовірне збільшення частоти стрічання МЯ у клітинах епітелію шкіри).

Отримані нами дані, з одного боку, збігаються з наведеною в інших роботах характеристикою проявів мутагенезу взагалі [13,12], а також у випадках застосування МЯ тесту [2,3,8], а з іншого – підтверджують відому мутагенну та канцерогенну активність

БП [15], що аргументує очевидну інформативність розробленого методу і його придатність для виявлення генотоксичності мутагенів і канцерогенів з генотоксичним механізмом дії. На розроблений метод отримано патент [16].

Крім того, на нашу думку, завдяки відміченим особливостям реагування шкіри на дію шкідливих факторів, зручності її як об'єкту для дослідження канцерогенезу розроблений метод може бути корисним при вирішенні питань методичного характеру в напрямку удосконалення та пошуку нових підходів до прискореної оцінки небезпеки генотоксичних канцерогенів. В наших роботах цей метод у комбінації з імунологічними та патоморфологічними дослідженнями використано для обґрунтування одного із комплексних підходів до прискореного тестування та гігієнічного нормування генотоксичних канцерогенів [10-12].

Висновки

В результаті проведених досліджень установлено, що розроблений спосіб, визначення мутагенного ефекту за показником частоти МЯ з використанням шкіри, є достатньо інформативним та придатним для оцінки генотоксичних властивостей мутагенних та канцерогенних речовин переважно місцевої дії та скорочує час на проведення таких досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. McGregor D.B. The Use of Short – and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation / D.B. McGregor, J.M. Rice, S. Venitt (ed.). – Lyon : IARC, – 1999. – 536 p.

2. Сычева Л.П. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств окружающей среды / Л.П. Сычева, В.С. Журков, Ю. А. Рахманин [и др.] // Гиг. и сан. – 2003. – №6. – С. 87-91.
3. Рахманин Ю.А. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / под ред. Л.П. Сычёва, Ю.А. Рахманин. – М.: Гениус, – 2007. – 150 с.
4. Рахманин Ю.А. Генетические исследования в гигиене окружающей среды / Ю.А. Рахманин // Гиг. и Сан. - 2011. – №5. – С. 4-9.
5. Горовая А.И. Использование цитологического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами / А.И. Горовая, И.И. Климкина // Довкілля та здоров'я. – 2002. – №1. – С. 47-50.
6. Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів: методичні рекомендації / Дніпропетровський НГУ; Міністерство освіти і науки України. – Дніпропетровськ, – 2007. – 25 с.
7. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом: методические рекомендации / Межведомственный науч. совет по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ. – Москва, – 2001. – 21 с.
8. Сычева Л.П. Обоснование необходимости оценки генетической безопасности ксенобиотиков в опытах на млекопитающих / Л.П. Сычева // Гиг. и сан. – 2011. – №5. – С.18-23.
9. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека: методические рекомендации / Научный совет Российской АМН и социального развития России по экологии человека и гигиене окружающей среды. – Москва, – 2005. – 37с.
10. Осташ О.М. Експериментальне обґрунтування методичних підходів до оцінки та прискореного нормування генотоксичних канцерогенів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. б. наук: спец. 14.02.01 "Гігієна та професійна патологія" / О.М. Осташ. – К., – 2013. – 20 с.
11. Черниченко І.О. Особливості генотоксичного ефекту та реакцій імунної системи організму за впливу бенз/а/пірену в експериментальних умовах / І.О. Черниченко, Н.В. Баленко, О.М. Осташ [и др.] // Довкілля та здоров'я. – 2012. – №1. – С. 6-13.
12. Черниченко І.О. Обґрунтування критеріальної значущості комплексу генотоксичних та імунологічних показників для експрес-оцінки канцерогенів навколишнього середовища / І.О. Черниченко, Н.В. Баленко, О.М. Осташ // Довкілля та здоров'я. – 2013. – №2. – С.4-8.
13. Бочков Н.П. Очевидное и невероятное в представлениях о мутационном процессе у человека / Н.П. Бочков, А.Д. Дурнев // Гиг. и сан. – 2011. – №5. – С. 9-10.
14. Дурнев А.Д. Генетическая токсикология / А.Д. Дурнев // Вестник Российской АМН. – 2011. – №9. – С. 35-43.
15. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food / Scientific Committee on Food. Brussels. – Belgium, –2002. –84 p.
16. Патент 54040 України, МПК G01N 1/28. Спосіб отримання ізольованих клітин з микроядрами із епітелію шкіри / І.О. Черниченко, Н.В. Баленко, О.М. Осташ, Л.С. Соверткова. – заявл. 22.04.2010; опубл. 25.10.2010, Бюл. №20.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ
В КЛЕТКАХ КОЖИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ**

Черниченко И.А., Баленко Н.В., Соверткова Л.С., Осташ О.М.

Описана процедура изготовления препаратов изолированных клеток из кожи мышей после фиксации в 10% нейтральном растворе формалина для исследования микроядер (МЯ).

Способ апробирован в эксперименте на белых беспородных мышьях-самцах (15-20 грамм), которые получали кожные аппликации бенз(а)пирена в разных дозах (0,21; 2,1; 10,5 мкг).

Полученные результаты показали пригодность разработанного метода для определения генотоксичности канцерогенов, которые индуцируют опухоли кожи, микроядерным тестом с использованием кожи лабораторных животных.

THE USING OF MICRONUCLEUS TEST FOR DETECTION OF GENOTOXIC DAMAGES IN SKIN CELLS EXPERIMENTAL ANIMALS

I.A. Chernichenko, N.V. Balenko, L.S. Sovertkova, O.M. Ostash

The procedure of preparing the isolated cell slides from mice skin after fixation in 10% neutral formalin solution to micronucleus (MN) assay is described. The experiment was conducted on white random-bred male mice (15-20 g) that were exposed to benzo(a)pyrene various doses (0,21; 2,1; 10,5µg) with skin applications.

The obtained results shown the suitability of developed method for detection of carcinogens genotoxic in vivo model with MN test using skin of laboratory animals (mice).

УДК 616.006:614.7:547.545.681:477

КАНЦЕРОГЕНИ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ, ОЦІНКА НЕБЕЗПЕКИ

Черниченко І.О., Литвиченко О.М., Соверткова Л.С.

ДУ «Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва НАМН України», м. Київ

Серед факторів навколишнього середовища та способу життя, що істотно впливають на формування захворюваності та смертності населення від злоякісних новоутворень, найбільш важливим визнається харчування, відносний вклад якого сягає 35-50%. Чисельними дослідженнями виявлено зв'язок між рівнем забруднення продуктів харчування канцерогенними сполуками і ризиком онкозахворювань [1]. У той же час питання навантаження хімічними контамінантами харчових продуктів і вплив їх на здоров'я населення вивчені недостатньо. Необхідно враховувати, що виявлені в конкретних харчових продуктах хімічні забруднювачі навіть у межах допустимих рівнів у реальному житті можуть створювати підвищене навантаження на організм людини [2]. До того ж, тривале хімічне навантаження навіть малої інтенсивності є одним з важливих факторів ризику для здоров'я, що може призводити до зниження резистентності організму, збільшення частоти і погіршення перебігу різних патологій, у т.ч. онкологічних, тощо [2,3].

Найбільш часто харчові продукти можуть забруднюватися сполуками класів поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ), нітрозамінів (НА), важких металів (ВМ), які легко циркулюють біологічними ланцюгами і тим самим діють на людину комплексно – з атмосферним повітрям, харчовими продуктами та водою. В умовах сталого забруднення повітряного середовища канцерогенними речовинами існує можливість потрапляння їх у ґрунт і, як наслідок, у харчові продукти рослинного і тваринного походження, що створює потенційний онкологічний ризик для людини.

ПАВ попадають у рослинні, м'ясні і рибні продукти із об'єктів довкілля, джерелами забруднення яких цими сполуками є димові викиди опалювальних і енергетичних систем, відпрацьовані гази транспорту, викиди та відходи промислових підприємств, що займаються високотемпературною переробкою горючих матеріалів чи використовують продукти цієї переробки, дорожній пил, застосування деяких препаратів і стічних вод для агротехнічних цілей та ін. Забруднення повітря, води і ґрунту призводить