

УДК: 577.151:661.727+661.849

О. С. ВОЙТА¹

С. М. ДИБКОВА², кандидат біологічних наук

О. В. ГОДОВСЬКИЙ¹, кандидат ветеринарних наук

В. О. ПОСТОЄНКО¹, доктор сільськогосподарських наук

В. О. УШКАЛОВ¹, доктор ветеринарних наук, професор, член-кор. НААН

¹ Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів, м. Київ

² Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка Національної Академії Наук України, м. Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ФОРМАЛЬДЕГІДУ ТА ТІОМЕРСАЛУ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

Проведено дослідження з визначення генотоксичного впливу формальдегіду та формальдегіду з тіомерсалом методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин. В дослідженні використано концентрації хімічних сполук аналогічні до вмісту у ветеринарних інактивованих вакцинах зареєстрованих на території України. Показано індекс ДНК-комет при дії формальдегіду у концентраціях 0,025 % – 0,3 %, формальдегіду у концентрації 0,05 % з тіомерсалом у концентраціях 0,005 % – 0,02 % на культуру клітин Vero.

Ключові слова: Інактивовані вакцини, формальдегід, тіомерсал, метод «ДНК-комет»

Метод лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин (метод ДНК-комет) широко застосовується в світовій науковій практиці для визначення генотоксичного впливу наночастинок металів [1, 2], радіаційного опромінення [3] різних природних та синтетичних сполук [4, 5], а особливо лікарських речовин, харчових добавок, пестицидів, парфумерних та косметологічних засобів, побутової хімії [6] тощо.

За даними літературних джерел даний метод є одним з високочутливих у сучасній генотоксикології, і дає можливість визначати первинні ДНК-пошкодження, патогенетична роль яких вірогідно встановлена [1, 6]. Вперше він запропонований Остлінгом та Йохансаном у 1984 р. для оцінки ДНК-пошкоджень, які спричинені радіацією [7]. В наступні роки дослідниками [3, 8] цей метод було модифіковано. Запропоновано його проведення в лужних умовах, що дозволило визначати лужнолабільні сайти, а не тільки односторонні розриви ДНК. Таким чином було підвищено чутливість методу.

Нещодавно метод ДНК-комет було застосовано у дослідженнях з визначення генотоксичного впливу ветеринарних вакцин, в тому числі інактивованих [9].

Відомо, що до їх складу, окрім антигену, входить багато інших компонентів, зокрема хімічні сполуки, такі як формальдегід, тіомерсал (органічна сіль ртуті), фенол, алюміній тощо [10]. Враховуючи ефективність методу ДНК-комет у визначенні генотоксичного впливу ветеринарних вакцин, нами вирішено застосувати його у визначенні генотоксичності окремих компонентів досліджуваних препаратів, а саме хімічних складових. Такі дослідження необхідно проводити за дії хімічних компонентів на ізольовані еукаріотичні клітини в концентраціях аналогічних вмісту в інактивованих вакцинах.

Тому **метою** даного експерименту було визначення генотоксичного впливу формальдегіду та тіомерсалу, як найпоширеніших хімічних компонентів інактивованих вакцин [11], на ізольовані еукаріотичні клітини методом ДНК-комет. Також експериментально встановити можливість використання даного методу в якості критерію оцінки генотоксичного впливу хімічних компонентів вакцин на еукаріотичні клітини.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися на перещеплюваних лініях клітин Vero із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ, Україна). За даними дослідників [9], вона є придатною для проведення аналізу лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин. Лінія культури клітин Vero отримана з нирки нормальної дорослої африканської зеленої мавпи у 1963 р. (Nippon Rinsho 1963; 21: 1209). Її культивування проводять при температурі 37 °С у поживному середовищі DMEM з додаванням 10 % ембріональної сироватки ВРХ, при рН 7,2-7,4. Тип росту клітин фібробластоподібний.

Дослідження методом ДНК-комет проводили на базі Інституту біоколоїдної хімії Ф. Д. Овчаренка НАН України (Київ, Україна), за методикою, описаною при дослідженні генотоксичного впливу ветеринарних вакцин [9, С. 195-197]. Для проведення досліджень накопичення клітинної маси культури клітин Vero проводили стаціонарним методом у плоских культуральних флаконах. В якості ростового середовища використовували поживні середовища Medium 199 with Earle's Salts with L-Glutamine та DMEM High Glucose (4,5 g/l) with stable Glutamine ("PAA The Cell Culture Company", Австрія) взятих у рівних співвідношеннях, з додаванням 10 % ембріональної сироватки ВРХ (Fetal Bovine Serum Gold ("PAA The Cell Culture Company", Австрія)). З метою запобігання бактеріальної контамінації в поживне середовище додавали 4 % розчин гентаміцину сульфату (Дарниця, Україна) у концентрації 1×10^{-6} . Посівна концентрація клітин складала 1×10^5 кл/см³. Культивування проводили за умови CO₂ термостату за t 37,4±0,1 °С, при концентрації CO₂ 5 % [12]. Відокремлення клітин від скла проводили за допомогою розчину Версену з додаванням трипсину за загальноприйнятою методикою.

Методика проведення лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин включала наступні етапи:

1. Отримання мікропрепарату шляхом іммобілізації ізольованих еукаріотичних клітин в агарозі.

2. Лізис еукаріотичних клітин, іммобілізованих в агарозі (при цьому відбувається випетлювання хроматину в пори агарози).

3. Лужну денатурацію ДНК при $pH > 13$ (при цьому лужно-лабільні сайти ДНК реалізуються в одониткові розриви).

4. Розділення денатурованої ДНК гель-електрофорезом.

5. Нейтралізацію/ фіксацію мікропрепарату.

6. Візуалізацію ДНК шляхом фарбування мікропрепарату флуоресцентними барвниками з послідуною мікроскопією.

7. Обробку отриманих зображень здійснювали шляхом вимірювання за допомогою мікрометричної лінійки параметрів «ДНК-комет». При візуальному аналізі «ДНК-комети» розподіляли на п'ять умовних типів з відповідним для кожного числом від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс «ДНК-комет» ($I_{\text{ДНК}}$), обчислений за формулою:

$$I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

де: $n_0 - n_4$ – число «ДНК-комет» кожного типу;

Σ – сума «ДНК-комет».

В якості позитивного контролю використовували клітини Vero, оброблені N-нітрозометилсечовиною, концентрація якої складала 1 мМ, протягом 24 годин (табл. 1). Негативним контролем слугували не оброблені культури клітин Vero.

Таблиця 1

Схема обробки зразків культури клітин Vero для визначення генотоксичного впливу формальдегіду та тіомерсалу

| № зразка | Метод обробки |
|-----------------------------------|--|
| Зразок 1 (негативний контроль) | Поживне середовище |
| Зразок 2 | Поживне середовище, 0,025 % формальдегід |
| Зразок 3 | Поживне середовище, 0,05 % формальдегід |
| Зразок 4 | Поживне середовище, 0,1 % формальдегід |
| Зразок 5 | Поживне середовище, 0,3 % формальдегід |
| Зразок 6 | Поживне середовище, 0,05 % формальдегід, 0,005 % тіомерсал |
| Зразок 7 | Поживне середовище, 0,05 % формальдегід, 0,01 % тіомерсал |
| Зразок 8 | Поживне середовище, 0,05 % формальдегід, 0,02 % тіомерсал |
| Зразок 9 (позитивний контроль) | Поживне середовище, 1 мМ N-нітрозометилсечовина |

Для визначення генотоксичного впливу формальдегіду та суміші з формальдегіду та тіомерсалу, культури клітин обробляли поживним середовищем з необхідною концентрацією даних хімічних сполук (табл. 1). Час інкубації складав 1 годину (було встановлено експериментально, оскільки інкубація протягом 18-24 годин призводить до масової загибелі клітин). Концентрація хімічних компонентів обґрунтована попередніми

дослідженнями, та залежить від меж їх вмісту у складі інактивованих вакцин, що зареєстровані на території України [11].

Дослідження проводилося при наявності не менше 70 % живих клітин після їх обробки досліджуваними препаратами, також визначали кількість живих клітин в зразках негативного та позитивного контролю за допомогою фарбування 0,3 %-м розчином трипанового синього.

Дослідження проводилися в двох повторностях, результати яких додавалися. Вираховували середнє значення.

На кожен мікропрепарат аналізували по 200 «ДНК-комет» без накладень «хвостів».

Результати досліджень. При використанні методу лужного гелелектрофорезу ізольованих клітин (ДНК-комет) були отримані електрофоретичні треки типу «комет» лише в зразках позитивного контролю (клітини культури Vero оброблені N-нітрозометилсечовиною) (рис. 1).

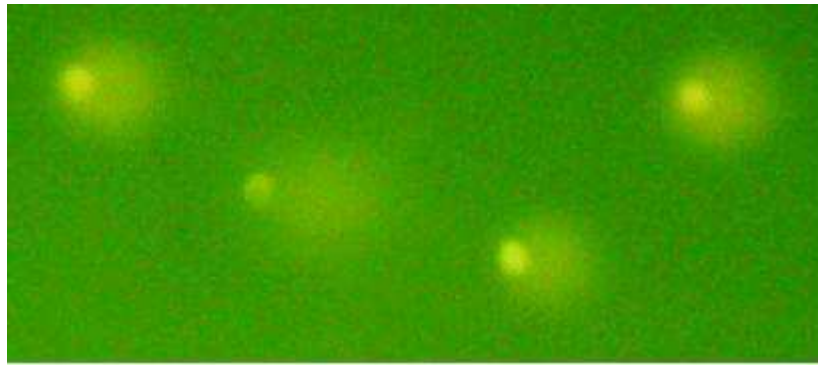


Рис.1. Позитивний контроль генотоксичного впливу на ізольовані еукаріотичні клітини. Метод «ДНК-комет».

Треки типу ДНК-комет відсутні в зразках негативного контролю (клітини культури Vero, не оброблені генотоксикантами) (рис.2).



Рис.2. Негативний контроль генотоксичного впливу на ізольовані еукаріотичні клітини. Метод «ДНК-комет».

Результати досліджень генотоксичних властивостей компонентів ветеринарних вакцин на тестових культурах еукаріотичних клітин Vero наведені в табл. 2. Отримані дані свідчать про те, що індекс ДНК-комет всіх досліджуваних зразків був вище за рівень негативного контролю. Значення негативного контролю становило $0,055 \pm 0,002$, значення досліджуваних зразків від $0,097 \pm 0,003$ (вплив найменшої концентрації формальдегіду 0,025 %) до $0,188 \pm 0,002$ (одночасний вплив формальдегіду 0,05 % та тіомерсалу

0,01 %). Проте, індекс ДНК-комет позитивного контролю був значно вище і складав $3,272 \pm 0,016$ (табл. 2).

Таблиця 2.

Генотоксичність формальдегіду та формальдегіду з тіомерсалом

| Зразок | Індекс ДНК-комет ($I_{\text{днк}}$) |
|---------------------|---------------------------------------|
| Зразок 2 | $0,097 \pm 0,003$ |
| Зразок 3 | $0,170 \pm 0,001$ |
| Зразок 4 | $0,146 \pm 0,004$ |
| Зразок 5 | $0,155 \pm 0,004$ |
| Зразок 6 | $0,162 \pm 0,005$ |
| Зразок 7 | $0,188 \pm 0,002$ |
| Зразок 8 | $0,152 \pm 0,006$ |
| Негативний контроль | $0,055 \pm 0,002$ |
| Позитивний контроль | $3,272 \pm 0,016$ |

Отже в результаті дослідження не було виявлено генотоксичного впливу формальдегіду та формальдегіду з тіомерсалом на ізольовані еукаріотичні клітини в досліджуваних концентраціях за умов стандартного проведення тестування. Всі досліджувані зразки 2-8 не проявляли генотоксичної дії на клітини культури Vero, характерні для ДНК-пошкоджень електрофоретичні треки типу «ДНК-комет» були відсутні (рис 3).

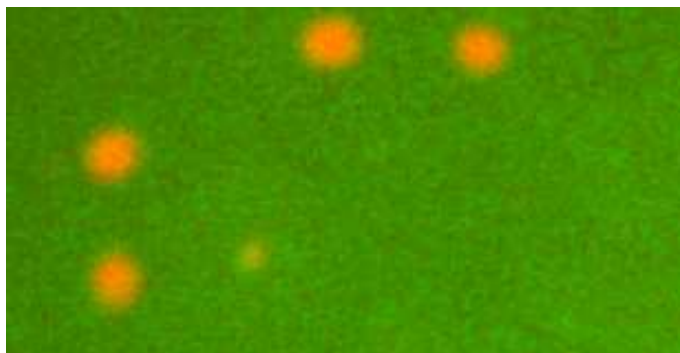


Рис.3. Генотоксичний вплив формальдегіду та формальдегіду з тіомерсалом. Метод «ДНК-комет»

Відсутність генотоксичного впливу формальдегіду та сумісного впливу формальдегіду з тіомерсалом у досліджуваних концентраціях на ізольовані еукаріотичні клітини можна пояснити впливом даних хімічних сполук на оболонку ядра. Формальдегід та тіомерсал мають здатність «консервувати» оболонку ядра, що перешкоджає потраплянню даних хімічних сполук в середину ядра і викликати генотоксичний вплив.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За умов стандартного проведення тестування формальдегід у діапазоні концентрацій від 0,0025 % до 0,3 %, а також формальдегід у концентрації 0,05 % разом із тіомерсалом в концентрації від 0,005 % до 0,02 % не проявили генотоксичної

дії на клітини культури Vero. Показник «I_{ДНК}» всіх досліджуваних зразків були майже на рівні негативного контролю і значно нижче рівня позитивного контролю.

Попередніми дослідженнями було доведено ефективність методу ДНК-комет при визначенні генотоксичного впливу ветеринарних вакцин на ізольовані еукаріотичні клітини. Проте, даним дослідженням не було виявлено генотоксичного впливу інактиванту (формальдегіду) та консерванту (тіомерсалу). Перспективним напрямком досліджень може виявитися визначення генотоксичності інших компонентів інактивованих вакцин, наприклад ад'ювантів.

Список використаної літератури

1. Аналіз генотоксичності наночастинок золота методом лужного гелелектрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин [Текст] / С. М. Дибкова, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна та ін. // Доповіді Національної академії наук України. Біологія. – 2010. – № 3. – С. 166-170.
2. Дослідження наночастинок срібла за критеріями генотоксичності, мутагенності та впливу на штами-пробіоти шлунково-кишкового тракту людини та тварин [Текст] / Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, А. О. Прискока та ін. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 3. – Том 28. – С. 40-46.
3. Cell cycle effect on the induction of DNA double-strand breaks by X-rays [Text] / S. E. Sweigert, R. Rowley, R. L. Wartens et al. // Radiation Research – 1988. – Vol. 116. – P. 228-244.
4. Сорочинская У. Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды [Текст] / У. Б. Сорочинская, В. М. Михайленко // Онкология. – 2008. – № 3. – Том 10. – С. 303-309.
5. Применение метода щелочного гелелектрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. – М., 2006. – 27 с.
6. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro [Text] // Методические рекомендации. – М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – С. 3.
7. Ostling, O., and Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.. 123: 291-298, 1984.
8. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [Text] / N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice et al. // Experimental Cell Research. – 1988. – № 175. – Vol. 1. – P. 184-191.
9. Застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин [Текст] / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна та ін. // Biopolymers and Cell. – 2010. – Vol. 26. – № 3. – С. 194-200.
10. Offit P. A. Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals? [Text] / P. A. Offit, R. K. Jew // Pediatrics. – 2003. – № 112. – P. 1394-1397.

11. *Постоєнко В. О.* Технологія виготовлення модельних зразків вакцин з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу [Текст] / В. О. Постоєнко, О. С. Войта // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 20. – С. 134-141.

12. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин : метод. рекомендації / [С. М. Дибкова, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, А. М. Головка та ін.] ; Держ. наук.-контрол. ін-т біотехнології і штамів мікроорганізмів. – К., 2009. – 23 с.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДА И ТИОМЕРСАЛА МЕТОДОМ ДНК-

КОМЕТ/ Войта О. С., Дыбкова С. М., Годовський О. В., Постоєнко В. О., Ушкалов В. О.

Проведено дослідження по визначенню генотоксичного впливу формальдегіду та тіомерсалу методом щелочного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотических клітин. В дослідженні використано концентрації даних хімічних сполучень аналогічних содержанию в составе ветеринарных инактивированных вакцин регистрація на території України. Показано индекс ДНК-комет при действии формальдегіду в концентрациях 0,025 % – 0,3 %, формальдегіду в концентрациях 0,05 % с тиомерсалом в концентрациях 0,005 % – 0,02 % на культуру клеток Vero.

Ключевые слова: инактивированные вакцины, формальдегид, тиомерсал, метод «ДНК-комет»

COMET ASSAY FOR DETERMINATION OF FORMALDEHYDE AND THIMEROSAL GENOTOXISITY/ Voita O. S., Dybkova S. M., Godovskyy O. V., Postoienko V. O., Yshkalov V. O.

Present study shows scientific researches results of formaldehyde and thimerosal genotoxic properties. Alkaline gel electrophoresis method (Comet assay) was used. Concentrations of formaldehyde and thimerosal were equal to their concentrations in veterinarian vaccines that are registered in Ukraine. It is shown DNA-comet index under formaldehyde in 0,025 % – 0,3 % concentrations, and formaldehyde in 0,05 % concentration with thimerosal in 0,005 % – 0,02 % concentrations influence on Vero cell cultures.

Key words: inactivated vaccines, formaldehyde, thimerosal, DNA assay

Рецензент – доктор ветеринарних наук В. В. Чумаченко

Рукопис надійшов 11. 07. 2013р