

УДК 57.08:575+613.1

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ В ТЕХНОЛОГИЯХ БИОМОНИТОРИНГА И ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ

Скальский С.В.¹, Ступакова Л.В.¹, Роскошная Д.В.¹, Турчанинов Д.В.¹, Полещук Е.И.¹, Охлопков В.А.¹, Говоруха Ю.С.¹

¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Омск, Россия, e-mail: farm@omsk-osma.ru

Технологии мониторинга состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения являются приоритетным направлением развития науки и техники. Чувствительной молекулярной мишенью действия средовых и производственных факторов в организме человека является ДНК. Метод ДНК-комет является методом выбора для детекции повреждений ДНК в органах и тканях живых организмов, в том числе человека. Целью исследования являлась оценка перспектив использования метода ДНК-комет как индикатора спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК у жителей города Омска. Были исследованы ядросодержащие клетки венозной крови 104 доноров крови. Установлено, что степень поврежденности ДНК в исследуемой группе не зависела от пола и возраста и зависела от статуса курения. Метод ДНК-комет является специфичным индикатором спонтанной и индуцированной генотоксичности, в связи с чем может быть использован в качестве инструмента экологического мониторинга.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, экологический мониторинг, спонтанная и индуцированная генотоксичность.

COMET ASSAY PROSPECTS IN BIOMONITORING TECHNOLOGY AND ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL

Skalsky S.V.¹, Stupakova L.V.¹, Roskoshnaya D.V.¹, Turchaninov D.V.¹, Poleshchuk E.I.¹, Okhlopov V.A.¹, Govorukha Y.S.¹

¹ Omsk state medical Academy, Omsk, Russia, e-mail: farm@omsk-osma.ru

Technology for environmental monitoring, prevention and elimination of pollution are the priority areas of science and technology. Sensitive molecular targets of environmental and occupational factors in the human body is the DNA. Comet assay is the method of choice for the detection of DNA damage in organs and tissues of living organisms, including humans. The aim of the study was to assess the prospects of using comet assay as an indicator of spontaneous and induced DNA damage among residents of Omsk city. Nucleated cells were examined venous blood of 104 blood donors. The degree of DNA damage in the study group did not depend on age and sex and dependent on smoking status. Comet assay is a specific indicator of spontaneous and induced genotoxicity, and therefore can be used as a tool for environmental monitoring.

Keywords: comet assay, environmental monitoring, spontaneous and induced genotoxicity.

Технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения являются приоритетным направлением развития науки, технологий и техники. Данное направление включено в перечень критических технологий Российской Федерации указом Президента РФ №899 от 7 июля 2011 г. Мониторинг окружающей среды (экологический мониторинг) – это комплексная система наблюдений за состоянием окружающей среды, оценки и прогноза изменений ее состояния под воздействием природных и антропогенных факторов. Биомониторинг является составной частью экологического мониторинга. Важнейшим показателем экологического благополучия признается сохранение здоровья и комфортное проживание человека. Чувствительной молекулярной мишенью действия средовых и производственных

факторов в организме человека является ДНК. Метод ДНК-комет является методом выбора для детекций повреждений ДНК в органах и тканях человека. Имеется опыт применения метода в исследованиях влияния демографических, экологических и производственных факторов на живые организмы и может обеспечить ценную информацию в области изучения опасности их воздействия [7]. Метод ДНК-комет имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с другими методами оценки поврежденности ДНК. Это высокая чувствительность, возможность регистрации повреждений в клетках любых тканей *in vitro* и *ex vivo*, минимальное количество требуемого испытуемого материала, относительно низкая стоимость, высокая «пластичность», позволяющая при незначительных модификациях использовать метод для селективной регистрации различных категорий повреждений ДНК и связанных событий [2]. Определение спонтанного уровня поврежденности ДНК служит индикатором локального экологического прессинга и является прогностически значимым показателем генетического здоровья населения. Очевидно, что данные биомониторинга методом ДНК-комет позволят судить о естественном уровне целостности генома с учетом особенностей климата, факторов окружающей среды, возрастного и полового состава; дадут теоретическую и экспериментальную базу для разработки способов фармакологической протекции клеточных и молекулярных мишеней воздействия средовых факторов.

Цель исследования: апробация метода ДНК-комет как индикатора поврежденности ДНК у жителей города Омска.

Материалы и методы

Объектом исследования явились ядродержащие клетки венозной крови здоровых доноров ГУЗ «Центр крови». Минимальное количество пациентов, необходимых для исследования, было рассчитано с помощью приложения StatCalc программы Epi Info (версия б) с учетом численности генеральной совокупности (практически здоровых людей, доноров в г. Омске) и ожидаемого уровня распространенности изучаемого явления и составило 100 чел. В исследование было включено 104 человека, в том числе 58 мужчин и 46 женщин. Отбор доноров осуществлялся согласно критериям включения: возраст старше 18, добровольное информированное согласие на участие в исследовании, заверенное личной подписью. Критериями исключения, помимо указанных в Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14 сентября 2001 г. N 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов», явились хронические заболевания в стадии обострения, применение лекарственных препаратов, диагностические и лечебные процедуры с использованием рентгеновского и других видов облучения в течение четырех недель, прием алкоголя в день исследования. Медиана возраста пациентов (P_{50}), составила 28,5 лет ($P_{0,25} = 25,0$; $P_{0,75} = 37,0$). Кровь была получена посредством вакуумных систем в общем

объеме 2 мл. Хранение и транспортировка крови осуществлялась в пробирках, покрытых раствором ЭДТА (K_2) с использованием консерванта в соотношении 1:1. Консервант готовился *ex tempore* соединением растворов RPMI-1640 и ДМСО в соотношении 8:2. Хранение консервированной крови осуществлялось при $-20^{\circ}C$, транспортировка – при $4^{\circ}C$. Проводили поэтапную обработку клеток крови: получение гель-слайдов с подложкой из агарозы и суспензии исследуемых клеток, помещение клеток в агарозный гель и нанесение на гель-слайды, лизис, щелочная денатурация, электрофорез, фиксация, окрашивание и микроскопический анализ [2]. Окрашивание проводили люминесцентным красителем SIBR Green, анализ – с помощью флуоресцентного микроскопа (ЛОМО, МИКМЕД 6, фильтр возбуждения, дихронное зеркало, запирающий фильтр, объектив 20X). Оцифровывание изображения, плани- и денситометрический анализ ДНК-комет проводили при помощи программы CASP (рис. 1).

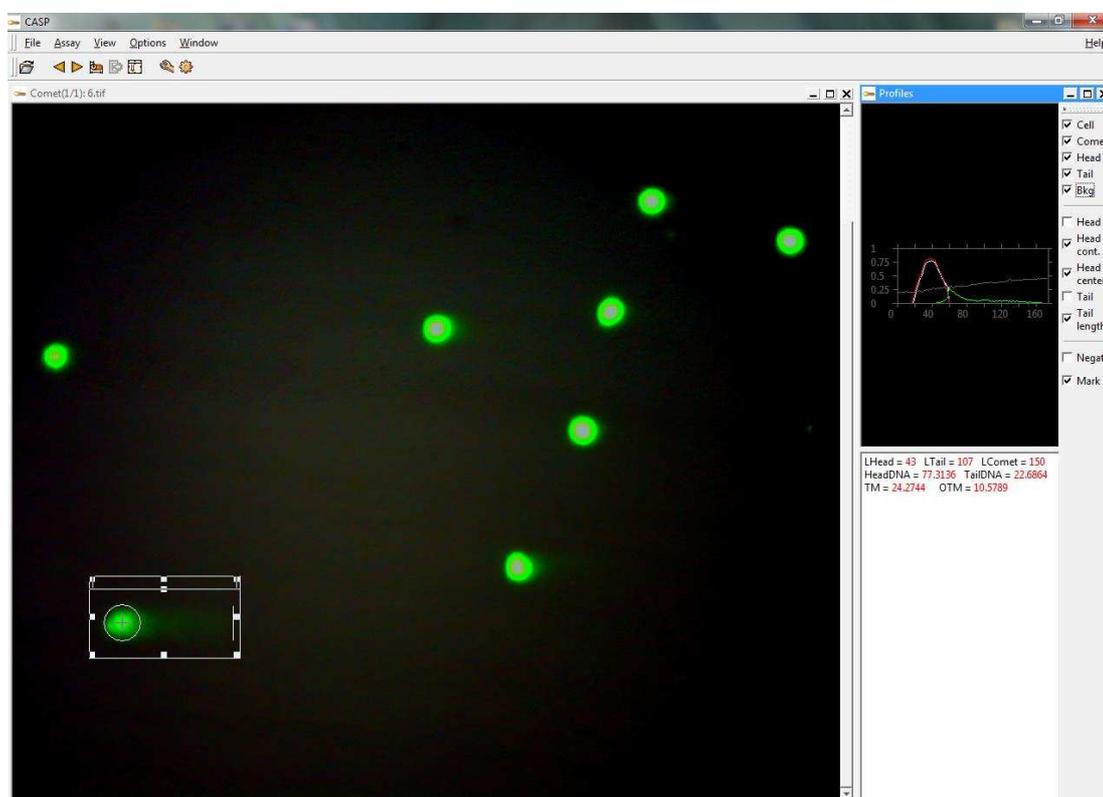


Рис. 1. Заключительный этап. Обработка результатов с помощью программы

Методы статистической обработки данных. Биометрический анализ осуществлялся с использованием пакета STATISTICA-6, возможностей Microsoft Excel. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. При этом значения p могли ранжироваться по 3 уровням достигнутых статистически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. Проверка нормальности распределения производилась с использованием критерия Шапиро-Уилки, проверка гипотез о равенстве генеральных дисперсий – с помощью F-критерия Фишера [4].

Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm SE$, где M – среднее выборочное, SE – стандартная ошибка среднего. При распределении значений в ряду, отличном от нормального, указывалась медиана ($P_{0,5}$), 25-перцентиль ($P_{0,25}$) и 75-перцентиль ($P_{0,75}$) [1].

В исследовании применялись методы анализа таблиц сопряженности, корреляционный анализ. Для оценки уровня относительного риска использовался тест медианы. При анализе таблиц сопряженности оценивались значения информационной статистики Кульбака (2I – статистика) (для оценки связи изучаемых факторов и результативных признаков), которая рассматривается как непараметрический дисперсионный анализ [3].

Полученное фактическое значение 2I сравнивали с табличным значением хи – квадрат при соответствующем числе степеней свободы. Для проверки статистических гипотез применяли непараметрические методы. Для сравнения количественных данных двух независимых групп использован U-критерий Манна-Уитни [6]. В ряде случаев использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) [5].

Результаты и их обсуждение

Анализировались следующие качественные признаки: пол (мужской, женский), курение (наличие или отсутствие признака); количественные признаки: возраст (полных лет), результативный признак (процентное содержание ДНК в хвосте кометы TailDNA%).

Количественные признаки имели распределение, отличное от нормального (для TailDNA% K-S: $d=0,101$, $p<0,20$; Lilliefors: $p<0,01$; Shapiro-Wilk $W=0,934$, $p=0,00006$), что явилось основанием для дальнейшего использования непараметрических статистических критериев (табл. 1).

Таблица 1

Параметр	Вся группа		Курильщики		Некурящие		Мужчины		Женщины	
	возраст, лет	результат, %								
M	30,65	6,17	30,03	7,13	30,91	5,78	30,29	6,45	31,11	5,82
SD	9,98	2,89	10,11	3,11	9,98	2,73	9,76	3,00	10,34	2,75
SE	0,98	0,28	1,85	0,57	1,16	0,32	1,28	0,39	1,52	0,41
Min	18,00	1,40	18,00	1,40	18,00	2,20	18,00	2,50	18,00	1,40
P16	20,00	3,30	20,64	3,66	20,00	3,20	20,00	3,42	20,00	3,14
P25	21,00	3,78	23,25	4,20	21,00	3,63	21,00	3,80	21,50	3,60

P50	28,50	5,45	27,50	7,50	30,00	5,00	28,00	5,85	29,00	5,10
P75	37,00	8,10	36,75	9,70	38,50	7,78	37,00	8,08	37,00	8,03
P84	41,00	9,45	39,08	10,14	41,96	8,90	41,00	9,89	40,80	9,04
Max	61,00	13,90	61,00	13,90	53,00	13,10	53,00	13,90	61,00	12,70
Стат. значимость различий по возрасту	U=1052,0; p=0,6773					U=1285,5; p=0,7509				
Стат. значимость различий по результату	U=809,5; p=0,0311					U=1178,5; p=0,3088				

По результатам дисперсионного анализа показатель силы влияния признака «курение» на резульативный признак составил $\eta^2 = 4,5\%$ ($p=0,002$).

По результатам корреляционного анализа установлена прямая статистически значимая корреляционная связь между признаком «курение» и резульативным признаком ($r_s=+0,22$; $p=0,03$) (рис. 2).

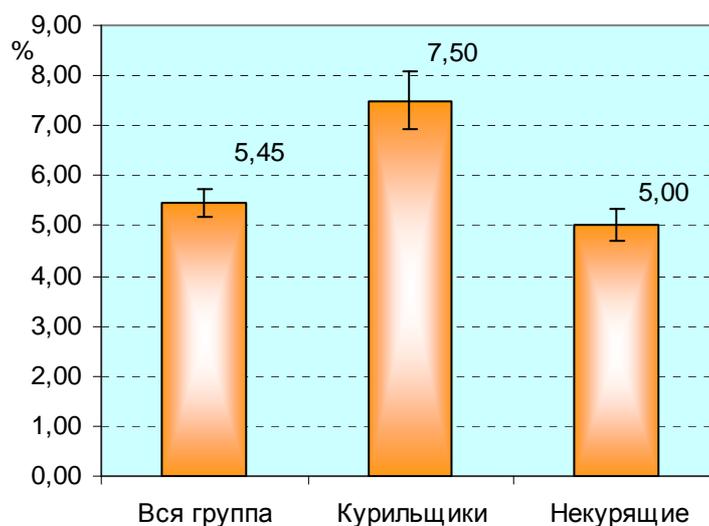


Рис. 2. Содержание ДНК в хвосте кометы (TailDNA%) в подгруппах исследования (медиана, CI=95%)

Таким образом, степень поврежденности ДНК в исследуемой группе доноров зависела от статуса курения и не зависела от пола и возраста.

Заключение

Метод ДНК-комет является специфичным индикатором спонтанной и индуцированной генотоксичности, в связи с чем может быть использован в качестве инструмента экологического мониторинга. Высокая чувствительность и доступность метода позволяют

применять его в исследованиях влияния факторов окружающей среды и производства на генетическое здоровье человека.

Коллектив авторов выражает признательность ректору Омской государственной медицинской академии, доктору медицинских наук, профессору Александру Ивановичу Новикову, доктору медицинских наук, профессору Алексею Владимировичу Кононову за поддержку научных исследований кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ОмГМА; академику РАН, доктору медицинских наук, профессору Сергею Борисовичу Середенину, доктору медицинских наук, профессору Андрею Дмитриевичу Дурневу за консультативную поддержку; коллективу лаборатории фармакологии мутагенеза НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАН за помощь в освоении метода.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
2. Жанатаев А.К., Методические аспекты оценки ДНК повреждений методом ДНК-комет / А.К. Жанатаев, В. А. Никитина, Е.С. Воронина, А.Д. Дурнев // Прикладная токсикология. – 2011. - № 2 (4). – С. 29-37.
3. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. – М.: Статистика, 1976. — 598 с.
4. Петри А. Наглядная статистика в медицине : пер. с англ. В.П. Леонова / А. Петри, К. Сэбин. – М. : ГЭОТАР МЕД, 2003. – 144 с.
5. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М.: Издательство МГУ, 1970. – 367 с.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] : монография / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2006. – 305 с.
7. Dusinska M. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions / M. Dusinska, A. R. Collins // Mutagenesis. – 2008. - № 23(3). – С. 191-205.

Рецензенты:

Брусина Е.Б., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово;

Григорьев А.И., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой экологии и природопользования ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», г. Омск.