

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ ДЛЯ СКРИНІНГУ ТА МОНІТОРИНГУ МУТАГЕНІВ. ІСТОРИЧНІ КОНТРОЛІ

Т.В.Ткачук, М.Г.Проданчук

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», м. Київ, Україна

РЕЗЮМЕ. Вступ. Аналіз мутагенної активності – обов'язковий елемент токсикологічної оцінки пестицидів при їх регламентуванні в середовищі життєдіяльності людини. Для оцінки результатів досліджень поточні дані експериментів порівнюють з даними паралельних негативних і позитивних контролів, щоб забезпечити більшу надійність в оцінці результатів, дані поточних досліджень порівнюють з даними історичних контролів.

Мета роботи. Сформувати історичний контроль на основі результатів, одержаних під час дослідження мутагенних властивостей тестових субстанцій пестицидів-генериків у тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo* та порівняти отримані результати з опублікованими літературними даними.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження мутагенної активності тестових субстанцій у тесті на індукцію мікроядер у поліхроматофілних еритроцитах кісткового мозку проводились стандартним методом у відповідності до вимог GLP на молодих статевозрілих мишах-самцях, лінії CD1 albino. Для порівняння результатів власних досліджень використали дані, опубліковані в 2000 році авторами G.Krishna і колегами.

Результати та обговорення. У лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу за період 2015–2016 років було проведено 28 експериментів для створення бази даних позитивних і негативних контролів для цього тесту. Середні значення контрольних рівнів еритроцитів з мікроядрами нашої лабораторії збігаються з даними, отриманими G.Krishna і колегами.

Висновки. У лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу валидовано і введено в практику тест на індукцію мікроядер у поліхроматофілних еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo* (OECD 474). Створено базу даних позитивних і негативних контролів за результатами досліджень для цього. Порівняння одержаних результатів досліджень з опублікованими літературними даними баз історичних контролів показали, що дані нашої лабораторії знаходяться в однакових межах розподілу. Створений історичний контроль може використовуватись для надійної оцінки результатів досліджень. Рівень негативних і позитивних контролів свідчить про належну генетичну якість тварин, отриманих з SPF розплідника Наукового центру превентивної токсикології та умов їхнього утримання для використання в тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo*.

Ключові слова: кістковий мозок мишей, поліхроматофілні еритроцити, мікроядра, історичні контролі, хімічний мутагенез.

Хімічний перелік CAS містить понад 350 тисяч сполук, в тому числі і пестицидів, що широко використовуються в сільському господарстві. За даними ФАО, якщо не застосовувати хімічний метод для захисту рослин, то в перший же рік населення планети втратить половину всього продовольства. Нині у світі використовується понад 100 тисяч пестицидів на основі тисячі хімічних сполук. Однак застосування пестицидів приховує в собі небезпеку забруднення навколишнього середовища та продуктів споживання і за певних умов може стати причиною виникнення генетичних порушень у клітинах організмів.

Здатність хімічних сполук викликати мутації відкрита ще в 1932 році В.В. Сахаровим. Чисельні експериментальні дані доводять, що деякі хімічні агенти можуть індукувати мутації як в соматичних клітинах, що ведуть до утворення злоякіс-

них пухлин, передчасного старіння, атерогенезу та цілого ряду інших патологічних процесів, так і у статевих клітинах, що спричиняє вади розвитку потомства, збільшення частоти спонтанних абортів, мертвонароджень, вроджених пороків, спадкових хвороб та інше [1]. Це обумовлює необхідність створення достатньо оперативної та економічно обґрунтованої системи тестування хімічних сполук стосовно їхньої потенційної генетичної небезпеки для людини.

У 1969 році W. Schmid із колегами був запропонований тест для дослідження хімічного мутагенезу, заснований на обліку мікроядер в еритроцитах кісткового мозку. Цей метод одержав назву „Мікроядерний тест” [3]. У 1971 році ця ж група вчених провела експерименти на китайських та сірійських хом'яках, мишах, шурах та морських свинках, а деякі експеримен-

тальні дослідження – на Rhesus макаках [4]. У 1973 р. John Heddle та колеги незалежно від W.Schmid теж запропонували мікроядерний тест для скринінгу хімічних сполук. Експерименти проводились на мишах, підрахунок мікроядер здійснювався в еритроцитах кісткового мозку [5].

Організація економічного співробітництва і розвитку (OECD) прийняла методичні рекомендації № 474 до мікроядерного тесту в еритроцитах ссавців у 1983 році [2], а в 2010 р – № 487 – мікроядерний тест у клітинах ссавців *in vitro*.

Сьогодні облік мікроядер став можливим у більшості популяцій клітин тварин і рослин. Його застосовують для поглибленого вивчення токсичності в підгострих чи хронічних експериментах, оцінки цитогенетичних ефектів хімічних сполук в основних бар'єрних системах організму, так звана органна специфічність мутагенної дії: у дихальній системі (легені), травній (стравохід, шлунок, тонка та товста кишка, печінка), видільній (сечовий міхур, нирки); для обліку мікроядер у ранніх чоловічих та жіночих статевих клітинах; клітинах печінки плода при вивченні трансплацентарної активності хімічних речовин; у клітинах букального епітелію; лімфоцитах людини та інших [6]. Також мікроядерний тест використовують для оцінки генотоксичності не тільки окремих хімічних сполук, а й різноманітних сумішей речовин, випромінюючої радіації, для оцінки ефективності лікування деяких хвороб у людей, а також для біоіндикації забруднення довкілля за різних техногенних аварій, екологічних катастроф, пов'язаних з викидами забруднюючих речовин, при обстеженні робітників, що працюють зі шкідливими речовинами [7].

Відомо, що мікроядра є патологічною структурою та їх утворення пов'язане з хромосомною нестабільністю, вони можуть спостерігатися в клітинах будь-якої проліферуючої тканини. Мікроядра – це фрагменти ядра еукаріотичної клітини, які не містять повного геному, необхідного для виживання клітини. Мікроядра – формуються з хромосомного матеріалу, який відстав на стадії анафази. В ході мітозу цей матеріал потрапляє лише до однієї з дочірніх клітин. Він може бути включеним до основного ядра або сформувавати одне,

або кілька дрібних мікроядер. Візуально мікроядра – це округлі хроматинові утворення, які спостерігаються в цитоплазмі клітин у період інтерфази, вони значно менші за розміром, ніж основне ядро. До складу мікроядра можуть входити як окремі цілі хромосоми, так і їхні фрагменти [1,8].

Проведення досліджень мутагенної активності за методом індукції мікроядер спрямоване на визначення:

- кластогенних змін, тобто структурних змін хромосом (хромосомні аберації), що виникають у результаті порушень ДНК, які призводять до розриву подвійної спіралі;

- анеугенних змін, тобто змін кількості хромосом, які є результатом порушення функції веретена поділу.

Якщо в ході мітозу фактор пошкодження більше впливає на тубулярні білки, ніж на ДНК, то до основного ядра при утворенні ядра дочірньої клітини не потрапляє ціла хромосома (рис. 1). Мікротрубочки веретена поділу кріпляться до центромери хромосоми, під час клітинного поділу рух хромосоми йде в бік того полюсу, з яким хромосому пов'язує більшість мікротрубочок. У випадку, якщо число мікротрубочок обох полюсів однакове, або волокна веретена порушені, під час анафази хромосоми залишаються на місці або відстають. Це викликає анеуплоїдію замість структурних хромосомних аберацій – це анеугенна дія. Якщо фактор пошкодження викликає структурне порушення хромосом, утворюється ацентричний фрагмент. Оскільки він безцентромірний, тому він не рухається до жодного з полюсів, отже, не потрапляє у новосформоване ядро при поділі клітин, що характеризує кластогенну дію [9].

Кластогенний фактор пошкодження, як правило, найбільш небезпечний для клітин, які знаходяться в S-фазі клітинного циклу (рис. 2) [10]. У цей час у клітині відбувається реплікація ДНК клітинного ядра, синтез РНК та білків, а також відбувається подвоєння центріолей (полюсів веретена поділу). Анеугенний фактор пошкодження найбільш небезпечний для клітин у період анафази мітозу, в цей час відбувається розходження хромосом до полюсів клітини.

Останні дані про аберації в культурі лімфоцитів людини свідчать, що фрагменти

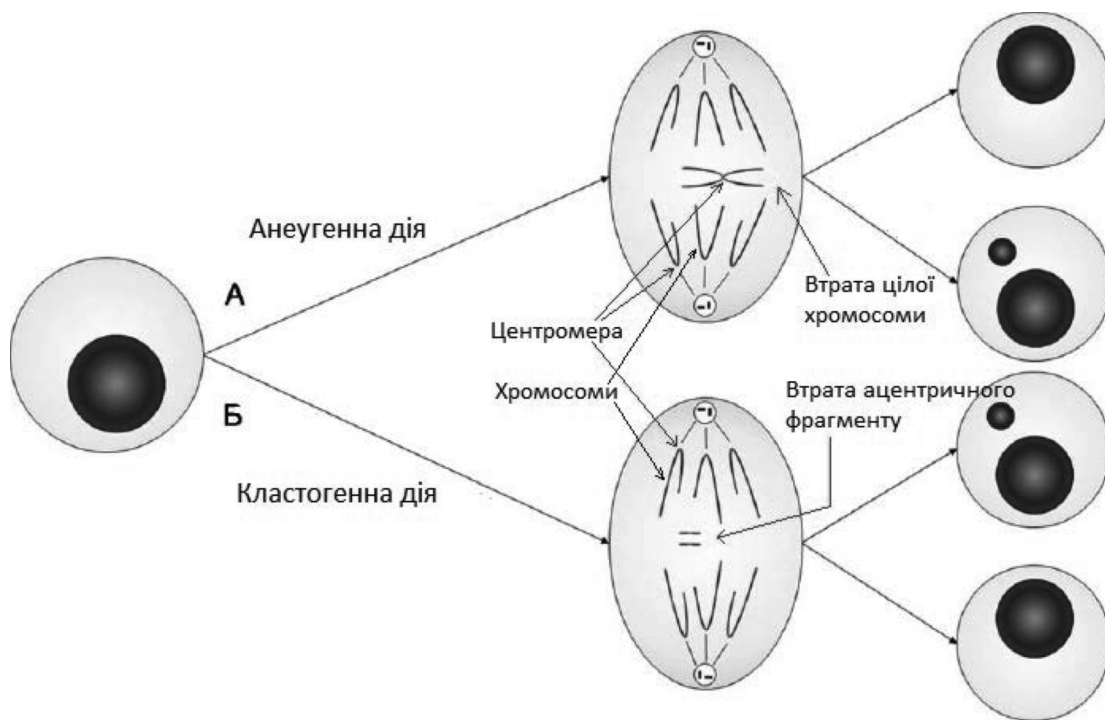


Рис. 1. Механізм утворення мікроядер (За Terradas, M., et al., 2010) [9]

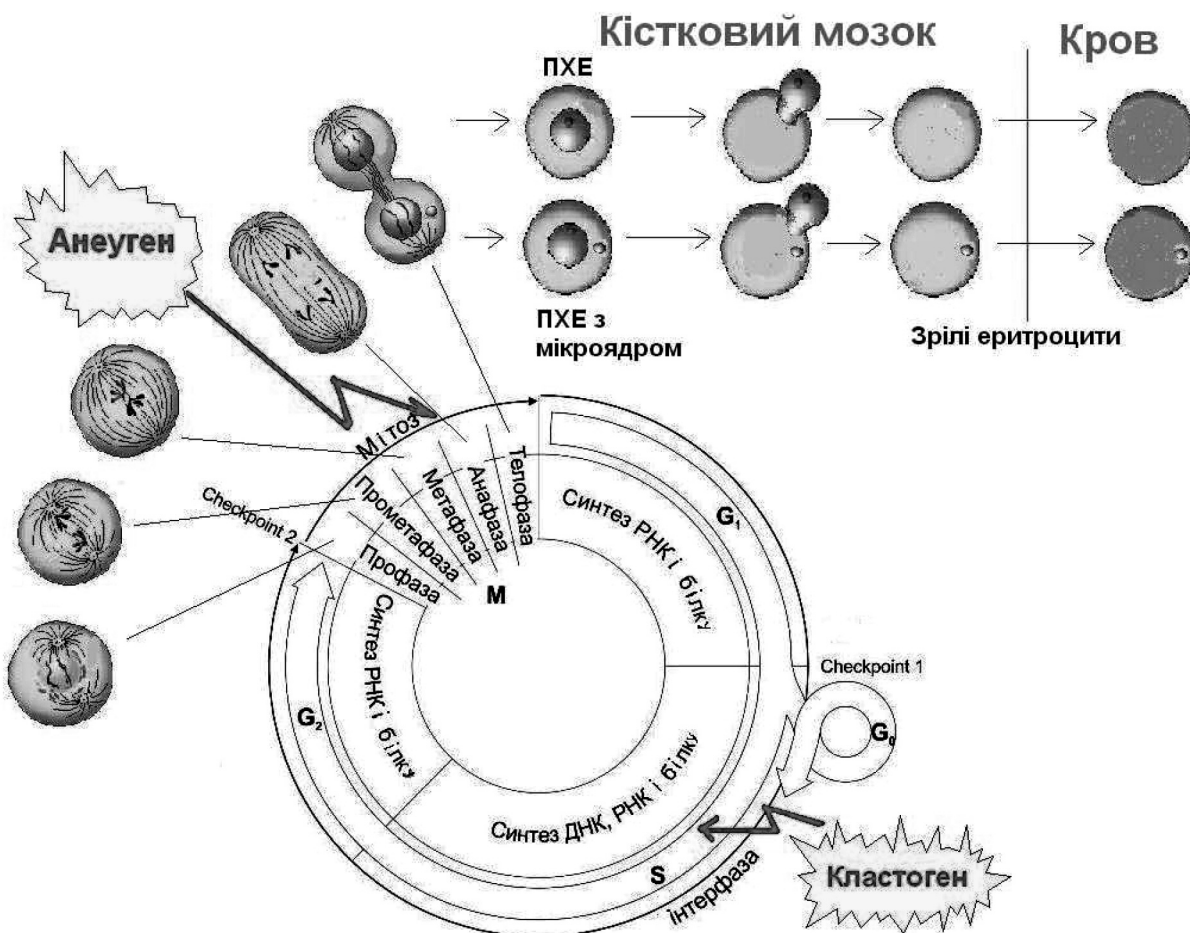


Рис. 2. Схема клітинного циклу та причини формування мікроядер на прикладі клітин червоного кісткового мозку (за Jarvis, P., et al., 2011) [10]

(імовірно, клітини, які їх містять) до наступного мітозу доживають приблизно в 30 % випадків та дицентричні хромосоми — близько 50 %. Ці оцінки зроблено без врахування проліферації нормальних клітин, якщо брати до уваги проліферацію, найвірогідніше значення виживання самого фрагменту становить приблизно 80 % (якщо враховувати обидві дочірні клітини) [11].

Анеуплоїдія — найчастіша причина генетичної патології у людей. Трисомія чи моносомія великих хромосом у статевих клітинах призводить до ранньої смерті ембріона. Однак трисомія маленьких хромосом може бути сумісна з виживанням, хоча з абнормальними функціями. Наприклад, трисомія 21 хромосоми є синдромом Дауна, 18 хромосоми — Едварда, 13 — Патау. Тільки одна моносомія знайдена серед народжених живими, це статева хромосомна моносомія (ХО), яка відома, як синдром Тернера. Анеуплоїдія в соматичних клітинах може впливати на формування і утворення пухлин. Переважна більшість пухлин людини містить анеуплоїдні клітини, а до 10 % пухлин є моносомічними або триномічними для специфічної хромосоми, як єдині видимі цитогенетичні зміни. Серед таких пухлин — трисомія 8, 9, 12 і 21 і моносомія для хромосом 7, 22 та Y є найбільш поширеними. Деякі пухлинні стани, як хронічна лімфоцитарна лейкемія, показують високу кореляцію (30 %) з додатковою однією хромосомою (в цьому випадку — трисомія 12 хромосоми) [12].

У різних дослідженнях показано, що такі порушення можуть бути пов'язані з широким спектром чинників, починаючи від впливу хімічних речовин, важких металів, дії іонізуючого випромінювання і закінчуючи вірусними інфекціями. Так само мікроядра можуть утворюватися внаслідок програмованої клітинної смерті (апоптозу) та при набутті злоякісних властивостей клітинами (малігнізації) [13]. На сьогоднішній день аналіз мутагенної активності є обов'язковим елементом токсикологічної оцінки факторів навколишнього середовища при їх регламентуванні в середовищі життєдіяльності людини. Для визнання результатів досліджень обов'язковою є валідація тесту на індукцію мікроядер у поліхроматофільних еритроцитах (ПХЕ) кісткового мозку мишей *in vivo* та сформу-

вання історичного контролю.

Матеріали та методи. Лабораторія експериментальної токсикології та мутагенезу акредитована на проведення досліджень згідно з вимогами принципів GLP (Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004) [14], про що свідчить сертифікат відповідності вимогам GLP „Statement of GLP compliance No. G-042” issued by SNAS 09.03.2015 та OECD 474 (OECD Guideline for Testing of Chemicals “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test”) [2]. Перевірку проведення досліджень здійснювали співробітники відділу контролю якості робіт. Всі маніпуляції з тваринами були погоджені з Комісією з питань етики медичних і біологічних досліджень у відповідності до положень „Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей” (Страсбург, 18 березня 1986 р.) ETS N 123 та вимог „Guide for the care and use of laboratory animals” National Academy Press, USA, 1996 [15].

Експериментальні дослідження мутагенної активності пестицидів у тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку проводились на молодих статево-зрілих мишах-самцях (*Mus Musculus* l. — CD1 albino), вагою 18-20 г, отриманих з SPF розплідника дрібних лабораторних тварин ДП «Науковий центр превентивної токсикології харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України» (Україна, Київ-03127, вул. Героїв Оборони, 6), із сертифікатом якості здоров'я тварин. Тварини оглядалися щоденно протягом акліматизації та експерименту на предмет відповідності вимогам до біологічних моделей в токсикологічному експерименті і придатності для даного дослідження відповідальним ветеринарним лікарем Центру превентивної та регуляторної токсикології (ЦПРТ). Акліматизація тварин в умовах віварію здійснювалась протягом не менше 5 днів перед початком досліджень. До піддослідних та контрольних груп входило по 5 тварин. Тварини утримувалися у клітках типу T5 (поліхлоркарбонатні, зверху накриті металевими ґратами, що знімаються), по 5 голів, протягом всього періоду дослідження. Підстилка складалась із стерилізо-

ваного нехлорованого харчового паперу. Клітки мились та знезаражувались згідно зі стандартною операційною процедурою. У віварії дотримувались суворого контролю за виконанням санітарно-гігієнічних норм чистоти: регулярні щоденні, щотижневі та генеральні прибирання. Кімната була забезпечена примусовою вентиляцією (12 об'ємів на годину) підготовленим очищеним повітрям. Температура та відносна вологість повітря реєструвалася щоденно, коливання температури – від 19° до 25 °С, вологості – 30-70%. Освітлення було штучним (12 годин світла, 12 годин темряви). Протягом всього експерименту миші отримували збалансований гранульований корм виробництва Альтромін (Германія), знезаражену, очищену, УФ-стерилізовану, деіонізовану воду зі скляних пляшок об'ємом 0,35 літра через металеві наконечники [2, 16].

Порядок проведення мікроядерного тесту в клітинах кісткового мозку мишей *in vivo*:

Тваринам групи негативного контролю внутрішньошлунково вводили по 0,4 мл очищеної, УФ-стерилізованої, деіонізованої води з додаванням емульгатора ОП-10 [17]; тваринам групи позитивного контролю вводили інтраперитонеально по 0,1 мл розчину циклофосфаміду (CAS № 50-18-0) в дозі 40 мг/кг ваги тіла тварини;

Через 24 години після введення досліджуваної речовини тварин піддавали евтаназії та відбирали кістковий мозок для аналізу. Кістковий мозок було обрано об'єктом дослідження, оскільки він має високу проліферативну активність та порівняно низький спонтанний рівень утворення мікроядер.

Приготування предметних скелець зі зразками кісткового мозку відбувалось за стандартним методом [2, 5, 18, 19, 20, 21].

Зразки кісткового мозку забарвлювали 5-6 хвилин еозин-метиленовим синім за Май-Грюнвальдом, потім дофарбовували в розчині азур-еозину за Романов-ським протягом 6 годин.

Підрахунок і аналіз мікроядер проводився на зашифрованих препаратах, мікроскопіюванням при великому 100-кратному збільшенні (масляна імерсія). Показником якості препарату є відсутність пошкоджених ядерних клітин. Придатними для аналізу вважаються препарати з

добре розправленими еритроцитами, що лежать окремо, поверхня яких не має виростів і складок. ПХЕ мають сірувато-блакитний колір цитоплазми, нормохромні – оранжево-рожевий. Мікроядра мають округлу форму, з чіткою межею, мають темне забарвлення, схоже із забарвленням ядер у препараті (рис. 3).

Статистична обробка одержаних даних та визначення результату. Використано загальноприйняті методи статистичного аналізу з розрахунком середнього значення показника і помилки середнього. Статистичну обробку даних різні автори виконують різними методами [22,23]. Ми проводили стандартним методом, з використанням t-критеріїв Стьюдента [24].

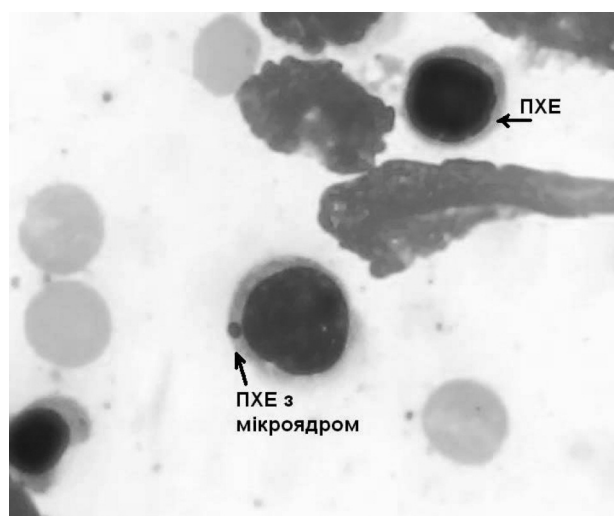


Рис. 3. ПХЕ та ПХЕ з мікроядром. Фарбування еозин-метиленовим синім (Май-Грюнвальд, Романовський x 100)

Одним з пунктів OECD 474 рекомендацій є пункт „перевірка лабораторної професійності”, де зазначається, що лабораторії слід продемонструвати здатність відтворювати очікувані результати, а при набутті лабораторією достатнього досвіду створити базу даних історичного контролю та порівняти її з даними, опублікованими в літературі [2, 25].

Мета роботи. Сформувати історичний контроль на основі результатів, отриманих під час дослідження мутагенних властивостей тестових субстанцій пестицидів-генериків у тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo* та порівняти отримані результати з опублікованими літературними даними.

Для досягнення поставленої мети визначено наступні завдання:

1. Опрацювати статистичними методами результати досліджень позитивних і негативних контролів у тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo*, проведених у ЦПРТ за період з 2015-2016 роки.

2. Опрацювати опубліковані в літературі результати баз даних історичних контролів лабораторій, які використовують мікроядерний тест у клітинах кісткового мозку мишей.

3. Порівняти отримані данні з опублікованими літературними.

Обговорення результатів роботи. За період 2015-2016 років лабораторією експериментальної токсикології та мутагенезу було проведено 28 експериментів, що дозволило нам створити базу даних історичних контролів. Для порівняння результатів власних досліджень використали дані, опубліковані в 2000 році авторами Krishna G, Urda G, Paulissen J, в Parke-Davis Pharmaceutical Research, відділ Warner-Lambert Company, США [26]. Лабораторія працює також у системі якості GLP. Умови експериментів цієї лабораторії ретельно описані в статті та близькі до наших: досліди проводили на мишах-самцях, тканина мішень – кістковий мозок. Це дозволило нам зробити порівняння результатів даних історичного контролю з даними, описаними у цій статті.

З табл. 1 видно, що G.Krishna і колеги за 12 років провели 47 експериментів на мишах-самцях лінії CD1, 6-8 тижнів, отриманих з розплідника Charles River Breeding Laboratories (Portage, MI)[26]. Період акліматизації становив 1 тиждень до проведення дослідження, тварини були обстежені, щоб переконатись, що вони здорові та придатні для даного дослідження. Протягом експерименту тварини отримували збалансований корм та воду без обмеження. В кімнатах для тварин автоматичний таймер забезпечував 12-годинну зміну світла та темряви. Використовували по 5 тварин на групу. Для негативного контролю використовували дистильовану чи деіонізовану воду, соляний розчин, манітол чи 0,5% метилцелюлозу з/без поліетиленгліколем чи Tween 80, перорально в дозі 10 мг/кг. Для позитивного контролю викори-

стовували Циклофосфамід (CAS № 50-18-0), в дозі 40 мг/кг маси тіла, інтраперитонеальне введення. Приготування предметних скелець зі зразками кісткового мозку відбувалось за стандартним методом. Аналіз робився на зашифрованих скельцях методом мікроскопіювання. У зразках негативних і позитивних контролів підраховували кількість ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ. Дані для кожного експерименту обчислювались з використанням t-критерію Фішера.

У табл. 2 представлено порівняння даних історичного контролю G.Krishna [26] і колег та досліджень лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу. З табл. 2 видно, що діапазон даних у тесті на індукцію мікроядер у клітинах кісткового мозку мишей *in vivo* нашої лабораторії як в негативному, так і в позитивному контролі, знаходиться в однакових межах розподілу даних, отриманих G.Krishna і колегами. Середні значення рівня ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу становили: в групі негативного контролю – 0,67-1,55, розбіжність даних в 2,3 раза; в групі позитивного контролю – 18,02-21,96, розбіжність даних в 1,2 раза. За даними, отриманими G.Krishna і колегами, середні значення рівня ПХЕ з мікроядрами були такими: для групи негативного контролю – 0,4-3,8, розбіжність даних у 9,5 раза; для групи позитивного контролю – 7,7-42,7, розбіжність даних у 5,5 раза [26].

На рис. 4 і 5 представлено графічні результати даних дослідження послідовності одержаних даних рівня утворення мікроядер у ПХЕ на 1000 ПХЕ. На діаграмах графіків показано хронологічний порядок отриманих середніх значень для кожної окремої групи негативних та позитивних контролів та загальний рівень середніх значень.

Як видно з рис. 4 і 5, показники значень середньої частоти ПХЕ з мікроядрами для кожного окремого дослідження негативних контролів мають дуже незначні коливання. Середнє статистичне значення досліджень негативного контролю за даними G.Krishna [26] і колег становило 1,8 ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ. Середнє статистичне значення негативно-

Порівняння умов проведення експерименту

Умови проведення експерименту	Дані Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000) [26]	Власні дані
Кількість проведених експериментів	47	28
Період проведення експериментів	12 років (1987–1998)	2 роки (2015-2016)
Тварини	Миші-самці, CD1, 6-8 тижнів, отримані з Charles River Breeding Laboratories	Миші-самці (Mus Musculus l. – CD1 albino), 6 тижнів, отримані з SPF розплідника "Наукового центру превентивної токсикології"
Кількість тварин	5 тварин на групу	5 тварин на групу
Акліматизація	1 тиждень	Не менше 5 діб
Для негативного контролю (розчинник)	Використовували дистильовану чи деіонізовану воду, соляний розчин, манітол чи 0,5% метилцелюлозу з/без поліетиленгліколем чи Tween 80, перорально.	Використовували знезаражену, очищену, УФ-стерилізовану, деіонізовану воду з емульгатором, перорально.
Для позитивного контролю	Циклофосфамід (CAS № 50-18-0), в дозі 40 мг/кг маси тіла, внутрішньобрюшинно	Циклофосфамід (CAS № 50-18-0), в дозі 40 мг/кг маси тіла, внутрішньобрюшинно
Проведення експерименту	Стандартний метод	Стандартний метод
Метод аналізу	Мікроскопіювання, з 1998 – автоматичний (за допомогою проточної цитофлуориметрії)	Мікроскопіювання
Статистичний аналіз	t-критерій Фішера	t-критерій Стьюдента

Таблиця 2

Порівняння даних історичного контролю, середні значення рівня ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ, розбіжність даних по групах контролю

	Група негативного контролю		Група позитивного контролю	
	G.Krishna et all [26]	Власні дані [26]	G.Krishna et all [26]	Власні дані [26]
Середні значення рівня ПХЕ з мікроядрами	0,4-3,8	0,67-1,55	7,7-42,7	18,02-21,96
Розбіжність даних	9,5	2,3	5,5	1,2

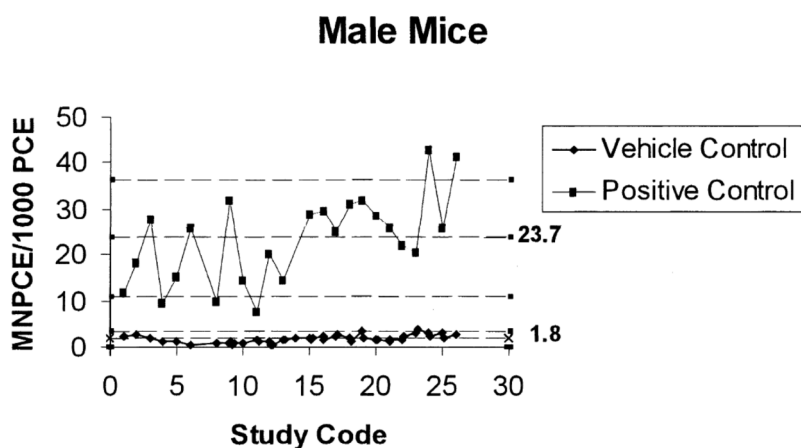


Рис. 4. Хронологічний порядок отриманих даних історичних контролів та рівень середнього значення даних середнього значення даних G.Krishna і колег [26].



Рис. 5. Хронологічний порядок отриманих даних історичних контролів та рівень середнього значення даних лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу

го контролю, одержан лабораторією експериментальної токсикології та мутагенезу, становило 1,1 ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ. Значення показників позитивних контролів, в порівнянні з негативним контролем, мають значні коливання. Середнє статистичне значення досліджень позитивного контролю, за даними G.Krishna і колег [26], було 23,7 ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ, середнє статистичне значення позитивного контролю нашої лабораторії – 19,9 ПХЕ з мікроядрами на 1000 ПХЕ.

Висновки

1. У лабораторії експериментальної токсикології та мутагенезу валідовано і введено в практику тест на індукцію мікроядер в ПХЕ кісткового мозку мишей *in vivo* (OECD 474).

2. Створено базу даних позитивних і негативних контролів за результатами досліджень для тесту на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo*.

3. Порівняння отриманих результатів досліджень з опублікованими літературни-

ми даними баз історичних контролів показали, що дані нашої лабораторії знаходяться в однакових межах розподілу.

4. Створений історичний контроль може використовуватись для надійної оцінки результатів досліджень.

5. Рівень негативних і позитивних

контролів свідчить про належну генетичну якість тварин, отриманих з SPF розплідника Наукового центру превентивної токсикології, та умови їхнього утримання для використання в тесті на індукцію мікроядер в еритроцитах кісткового мозку мишей *in vivo*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ: ВОЗ, Женева. – 1989. – 212 с.
2. OECD 474 (OECD Guideline for Testing of Chemicals "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test").
3. Boller K. "Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an *in vivo* test system. Hematological findings after treatment with trenimon / K. Boller, W. Schmid // Humangenetik, – 1969. – №11 (1). – P. 35–54.
4. Matter B. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test // B. Matter, W. Schmid. // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1971. – № 12(4). – P. 417–425.
5. Heddle J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage / J.A. Heddle // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1973. – V. 18(2). – P. 187–190.
6. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом: Методические рекомендации. – М. – 2001.
7. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека / Л.П. Сычева // Гигиена и санитария. – 2012. – №6. – С. 68–72
8. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program / K.H. Mavournin, D.H. Blakey, M.C. Cimino [et al] // Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. – 1990. – V. 239(1). – P. 29–80
9. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. Mutation Research / M. Terradas, M. Martn, L. Tusell & Genesca A. / Reviews in Mutation Research. – 2010. – № 705(1). – P. 60–67
10. An assessment of the statistical methods used to analyse toxicology studies / P. Jarvis, J. Saul, M. Aylott [et al] // Pharmaceutical statistics. – 2011. – № 10(6). – P. 477–484.
11. Carrano A.V. The fate of chromosome aberration // A.V. Carrano, J.A. Heddle Theoret.Biol. – 1973. – №38. – P.289
12. Department of Health. Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenicity, Department of Health and Social Security. Report on Health and Social Subjects. – 1989. – № 35. – London: HMSO
13. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей / [Т.С. Колмакова, С.Н. Белик, Е.В. Моргуль, А.В. Севрюков] / Методические рекомендации. – Ростов на Дону: Изд-во Рост ГМУ. – 2013. – 31 с.
14. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonization of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory and the verification of their applications for tests on chemical substances.
15. Guide for the care and use of laboratory animals, – LAR Publication, National Academy Press, USA, 1996.
16. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте // И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк – К. – 1983 – 383 с.
17. Salamone M.F. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies // M.F. Salamone, K.H. Mavournin// Environmental and Molecular Mutagenesis. – 1994. – V. 23(4). – P. 239–273.
18. Schmid W. "Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells." Inflammation Research, 1973. – P. 32, 77–85.
19. Schmid W. The micronucleus test // W.Schmid // Mutation Research, 1975. – V. 31(1). – P. 9–15.
20. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // J.A. Heddle, M. Hite, B. Kirkhart [et al]// Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. – 1983. – V. 123(1). – P. 61–118.
21. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes // J.T. MacGregor, J.A. Heddle, M. Hite [et al] // Mutation Research /Genetic Toxicology. – 1987. – V. 189(2). – P. 103–112.
22. Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay // M. Hayashi, S. Hashimoto, Y. Sakamoto [et al] // Environmental Health Perspectives. – 1994. – V. 102 (1). – P. 49–52.
23. A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control // M. Hayashi, I. Yoshimura, Sofuni T., M.Ishidate // Environmental and molecular mutagenesis. – 1989. – 13(4). – P. 347–356.
24. Плохинский М.А. Алгоритмы биометрии // М.А. Плохинский // М. – 1980. – 150 с.
25. Compilation and use of genetic toxicity historical control data // M. Hayashi, K. Dearfield, P. Kasper [et al.] // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2011. – V. 723(2). – P. 87.
26. Krishna G. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research G. Krishna // Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2000. – V. 453(1). – P. 45–50.

REFERENCES

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных у канцерогенных химических веществ: ВОЗ, Женева. – 1989. – 212 с.
2. OECD 474 (OECD Guideline for Testing of Chemicals "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test").
3. Boller K. "Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon / K. Boller, W. Schmid // Humangenetik, – 1969. – #11 (1). – R. 35–54.
4. Matter B. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test // B/Matter, W. Schmid. // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1971. – # 12(4). – R. 417–425.
5. Heddle J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage / J.A. Heddle // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1973. – V. 18(2). – R. 187–190.
6. Otsenka mutagennoy aktivnosti faktorov okruzhayushchey sredy v kletkakh raznykh orhanov mlekozhuynykh mykroyadernym metodom: Metodicheskiye rekomendatsyy. – M. – 2001.
7. Сычева Л.П. Тсytohenetychesкyy monitorynh dlya otsenky bezopasnosti sredy obytauuya cheloveka / Л.П. Сычева // Нуhyена у sanыtaryua. – 2012. – #6. – S. 68–72
8. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program / K.H. Mavournin, D.H. Blakey, M.C. Cimino [et al] // Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. – 1990. – V. 239(1). – R. 29–80
9. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. Mutation Research / M. Terradas, M. Martнn, L. Tusell & Genesca A. /Reviews in Mutation Research. – 2010. – # 705(1). – R. 60–67
10. An assessment of the statistical methods used to analyse toxicology studies / P. Jarvis, J. Saul, M. Aylott [et al] //Pharmaceutical statistics. – 2011. – # 10(6). – P. 477–484.
11. Carrano A.V. The fate of chromosome aberration // A.V. Carrano, J.A. Heddle Theoret.Biol. – 1973. – #38. – P.289
12. Department of Health. Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenicity, Department of Health and Social Security. Report on Health and Social Subjects. – 1989. – # 35. – London: HMSO
13. Yspol'zovanye mykroyadernoho testa dlya otsenky effektivnosti lechenyya allerhyu u detey / [T.S. Kolmakova, S.N. Belyk, E.V. Morhul', A.V. Sevryukov] / Metodicheskiye rekomendatsyy. – Rostov na Donu: Yzd-vo Rost HМУ. – 2013. – 31 s.
14. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonization of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory and the verification of their applications for tests on chemical substances.
15. Guide for the care and use of laboratory animals, – LAR Publication, National Acadcmny Press, USA, 1996.
16. Laboratornie zhyvotnie. Razvedenyе, sodержanye, yspol'zovanye v эkсперыmente // Y.P. Zapadnyuk, V.Y. Zapadnyuk, E.A. Zakharyya, B.V. Zapadnyuk – K. – 1983 – 383 s.
17. Salamone M.F. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies // M.F. Salamone, K.H. Mavournin// Environmental and Molecular Mutagenesis. – 1994. – V. 23(4). – R. 239–273.
18. Schmid, W. "Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells." Inflammation Research, 1973. – 32, 77-85.
19. Schmid W. The micronucleus test // W.Schmid // Mutation Research, 1975. – V. 31(1). – R. 9–15.
20. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // J.A. Heddle, M. Hite, B. Kirkhart [et al]// Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. – 1983. – V. 123(1). – P. 61–118.
21. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes // J.T. MacGregor, J.A. Heddle, M. Hite [et al] // Mutation Research /Genetic Toxicology. – 1987. – V. 189(2). – P. 103–112.
22. Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay // M. Hayashi, S. Hashimoto, Y. Sakamoto [et al] // Environmental Health Perspectives. – 1994. – V. 102 (1). - P. 49–52.
23. A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control // M. Hayashi, I. Yoshimura, Sofuni T., M.Ishidate // Environmental and molecular mutagenesis. – 1989. – 13(4). – P. 347–356.
24. Plokhynskyy M.A. Alhorytmi byometry // M.A. Plokhynskyy // M. – 1980. – 150 s.
25. Compilation and use of genetic toxicity historical control data // M. Hayashi, K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.J. Martus, V. Thybaud// Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2011. – V. 723(2). – P. 87.
26. Krishna G. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research // Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2000. – V. 453(1). – P. 45–50.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ДЛЯ СКРИНИНГА И МОНИТОРИНГА МУТАГЕНОВ. ИСТОРИЧЕСКИЕ КОНТРОЛИ

Т.В.Ткачук, Н.Г.Проданчук

ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведя МЗ Украины», г. Киев, Украина

РЕЗЮМЕ. Вступление. Анализ мутагенной активности является обязательным элементом токсикологической оценки пестицидов при их регламентировании в среде жизнедеятельности человека. Чтобы обеспечить большую надежность в оценке результатов экспериментов, данные текущих исследований сравнивают с данными исторических контролей.

Цель работы - сформировать исторический контроль на основе результатов, полученных в ходе исследования мутагенных свойств тестовых субстанций пестицидов-генериков в тесте на индукцию микроядер в эритроцитах костного мозга мышей *in vivo* и сравнить полученные результаты с опубликованными литературными данными.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования мутагенного активности тестовых субстанций в тесте на индукцию микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга проводились стандартным методом в соответствии с требованиями GLP, на молодых половозрелых мышах-самцах линии CD1 albino. Для сравнения результатов собственных исследований использовали данные, опубликованные в 2000 году авторами G. Krishna и коллегами.

Результаты и обсуждение. В лаборатории экспериментальной токсикологии и мутагенеза за период 2015–2016 годов было проведено 28 экспериментов для создания базы данных положительных и отрицательных контролей для этого теста. Средние значения контрольных уровней эритроцитов с микроядрами нашей лаборатории совпадают с данными полученными G. Krishna и коллегами.

Выводы. В лаборатории экспериментальной токсикологии и мутагенеза валидирован и введен в практику тест на индукцию микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей *in vivo* (OECD 474). Создана база данных положительных и отрицательных контролей по результатам исследований для этого теста. Сравнение полученных результатов исследований с опубликованными литературными данными баз исторических контролей показали, что данные нашей лаборатории находятся в одинаковых пределах распределения. Созданный исторический контроль может использоваться для надежной оценки результатов исследований. Уровень отрицательных и положительных контролей свидетельствует о надлежащем генетическом качестве животных, полученных из SPF питомника Научного центра превентивной токсикологии и о соответствующих условиях их содержания для использования в данном тесте.

Ключевые слова: костный мозг мышей, полихроматофильные эритроциты, микроядра, исторический контроль, химический мутагенез.

USE OF MICRONUCLEUS TEST FOR SCREENING AND MONITORING OF MUTAGENS. HISTORICAL CONTROLS

T. Tkachuk, M. Prodanchuk

L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Introduction. Analysis of mutagenic activity is a required element of toxicological assessment of pesticides. Order to provide higher reliability in assessing the results of experiments, current research data are compared with the data historical controls.

Purpose of the study

It is necessary to form a historical control data based on the results obtained during the mutagenicity investigations of generic pesticides in the micronucleus test in the bone marrow of mice *in vivo* and compare the results with the published data in literature.

Materials and Methods. Experimental studies of the mutagenic activity of the test substances in the micronucleus test in polychromatic erythrocytes in the bone marrow were performed by the standard method in compliance with requires of GLP, for young adult mouse species CD1 albino, males. To compare the results of own research we used data published in 2000 by the authors G. Krishna and colleagues.

Results and Discussion. In the Laboratory of Experimental Toxicology and Mutagenesis for the period 2015–2016 years we have conducted 28 experiments to create a database of positive and negative controls for this test. The average values of the levels of micronucleated bone marrow polychromatic erythrocytes in our laboratory coincides with the data obtained G. Krishna and colleagues.

Conclusions. In the Laboratory of Experimental Toxicology and Mutagenesis we validated and put into practice the micronucleus test in polychromatic erythrocytes in the mice bone marrow *in vivo* (OECD 474). A database of positive and negative controls was created on the research results of this test. Comparison of the levels of historical control database with the published in the literature showed that the data from our laboratory are within the same distribution. Created by us historical control can be used for reliable evaluation of research results. The levels of Historical Control database indicates the high quality of the conditions of animal housing and feeding and the high genetic quality of animals obtained from SPF nursery of Research Center of Preventive Toxicology for using in this test.

Key words: bone marrow, micronucleated polychromatic erythrocytes, historical control, mutagenicity.

Надійшла до редакції 01.11.2016 р.