

Застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин

С. М. Дибкова, М. Є. Романько¹, Т. Г. Грузіна, Л. С. Рєзніченко,
З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов², А. М. Головко²

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України
Бульв. Академіка Вернадського, 42, Київ, Україна, 03142

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН
Вул. Пушкінська, 83, Харків, Україна, 61023

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
Вул. Донецька, 30, Київ, Україна, 03151

tgruzina@mail.ru

Мета. Вивчити можливість застосування методу лужного гель-електрофорезу (методу ДНК-комет) для визначення генотоксичних властивостей ветеринарних вакцин. **Методи.** Використано метод лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотних клітин з наступною візуалізацією досліджуваних препаратів за допомогою флуоресцентної мікроскопії. **Результати.** Тестуванням ветеринарних вакцин методом ДНК-комет за лужних умов виявлено, що двом зразкам вакцин із 12 досліджених (№ 1 та № 12) притаманна генотоксична дія стосовно тестових еукаріотних клітин культур СНО-К1 і Vero. При цьому зразок № 12 демонструє генотоксичні властивості лише за умов його тестування в системі метаболічної активації. **Висновки.** Метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (ДНК-комет) є придатним для визначення генотоксичного впливу ветеринарних вакцин на тестові еукаріотні клітини СНО-К1. Перевагами пропонованого методу є його експресність, низька вартість проведення досліджень і висока прогностичність отриманих результатів. Виконаний комплекс експериментальних робіт дозволяє рекомендувати зазначений метод для характеристики біобезпеки препаратів ветеринарних вакцин.

Ключові слова: генотоксичність, ветеринарні вакцини, культури клітин, метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин, біобезпека.

Вступ. Ветеринарні вакцини – це лікарські засоби, які запобігають розвитку багатьох надзвичайно небезпечних і важких хвороб тварин, таких як лептоспіроз, сказ, чума та ін. У практичній ветеринарній медицині існує значний арсенал комерційних препаратів ветеринарних вакцин різних фірм-виробників. Враховуючи проблему збереження генофонду племінних тварин і необхідність отримання біобезпечної продукції тваринництва, назріла по-

треба в експресній оцінці генотоксичності такого роду препаратів.

Серед відомих на сьогодні способів визначення генотоксичності найпридатнішим є метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) [1–8], який має високу чутливість на рівні окремих клітин, високопрогностичний та дає змогу без урахування мутацій оцінити рівень патогенетичних первинних пошкоджень ДНК.

Даний метод передбачає використовувати як індикатор ступінь ДНК-пошкоджень тестових еукаріотних клітин. В основі методу лежить реест-

рація відмінностей у рухливості в постійному електричному полі ДНК та можливих фрагментів ДНК клітин тестової культури, оброблених досліджуваною речовиною, іммобілізованих в агарозний гель і підданих лізису. Рухаючись до аноду, ДНК формує електрофоретичний трек, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від рівня пошкодження молекули ДНК. Метод ДНК-комет у лужній модифікації дозволяє фіксувати одонитчасті розриви та лужнолабільні сайти, що значно підвищує інформативність методу.

Мета нашої роботи полягала у вивченні можливості застосування методу лужного гель-електрофорезу (методу ДНК-комет) для визначення генотоксичних властивостей ветеринарних вакцин.

Матеріали і методи. У роботі використано трис-НСІ, 0,5 та 1 %-й розчини агарози («Serva», Німеччина), акридиновий жовтогарячий, N-нітрозометилсечовина, трипановий синій («Sigma», США), а також реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «ч. д. а.».

Експерименти виконано у двох повторностях.

Застосовано також препарати вакцин різних фірм-виробників, широко відомі у ветеринарній практиці. Нижче наведено перелік досліджених препаратів ветеринарних вакцин:

- № 1 – проти лептоспірозу;
- № 2 – проти риновірусу птахів;
- № 3 – проти чуми м'ясоїдних, аденовірусних інфекцій, парвовірусного та коронавірусного ентеритів собак;
- № 4 – проти лептоспірозу та сказу собак;
- № 5 – жива ліофілізована проти інфекційного бронхіту птахів;
- № 6 – інактивована проти сказу тварин;
- № 7 – інактивована проти сказу та лептоспірозу собак;
- № 8 – жива ліофілізована проти панлейкопенії, герпесвірусної та каліцивірусної інфекцій котів;
- № 9 – проти чуми м'ясоїдних, аденовірозу, парвовірозу, парагрипу та лептоспірозу собак;
- № 10 – жива проти герпесвірусної та каліцивірусної інфекцій котів;
- № 11 – жива ліофілізована проти пневмовірусної інфекції курей;
- № 12 – інактивована проти мікроспорії котів.

Як тестові використано такі культури клітин із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Украї-

на): СНО-К1 – культура клітин яєчника китайського хом'ячка; Vero – культура клітин нирки африканської зеленої мавпи.

Клітини культур СНО-К1 та Vero вирощували на середовищі F10 («Sigma», США), яке містить 5 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Gibco», США), в атмосфері з 5 % CO₂ за температури 37 °С до титру 5 · 10⁵ кл/мл.

Кількість живих клітин знаходили за допомогою фарбування 0,3 %-м розчином трипанового синього і подальші дослідження здійснювали при кількості живих клітин не менше 90 %.

Для визначення біобезпеки аналізованих вакцин актуальною є оцінка їхніх генотоксичних властивостей в імунізуючих дозах, тому вміст препарату в зразку для дослідження виявляли з урахуванням рекомендованої виробником дози в розрахунку на 1 кг маси тіла тварини, забезпечуючи такий же вміст в 1 л інкубаційного середовища при обробці клітин тестової культури.

Вивчали комплексні препарати ветеринарних вакцин у товарних формах, пакувальні одиниці яких містять по одній дозі.

Позитивним контролем слугували клітини культур СНО-К1 і Vero, оброблені N-нітрозометилсечовиною у концентрації 1 мМ протягом 48 год.

Як негативний контроль застосовано інтактні (не оброблені) клітини культур СНО-К1 і Vero, вирощені за температури 37 °С протягом 24 год до титру 5 · 10⁵ кл/мл. Клітини негативного контролю вносили в агарозний гель для іммобілізації у вигляді суспензії в поживному середовищі в об'ємі, аналогічному позитивному контролю.

Кількість живих клітин у позитивному та негативному контролях визначали за допомогою фарбування 0,3 %-м розчином трипанового синього.

Для виявлення генотоксичного впливу препаратів ветеринарних вакцин суспензію клітин в інкубаційному середовищі змішували із зразком певного препарату в концентрації, яка забезпечує імунізуючу дозу, та інкубували впродовж 24 год за температури 37 °С.

У дослідях з метаболічною активацією використовували мікросомну фракцію S9 печінки шурів, вміст якої в інкубаційній суміші становить 5 %. Час інкубації дорівнює 3–24 год за температури 37 °С.

Генотоксичні властивості ветеринарних вакцин визначали за наступною схемою: отримання гель-слайда, формування мікропрепарату, лізис, лужна

ДНК-руйнуюча активність зразків ветеринарних вакцин

Еукаріотні клітини, оброблені зразком препарату ветеринарної вакцини №	Тестова культура клітин	Кількість життєздатних клітин, %	Показник ДНК-руйнуючої активності («% ДНК у хвості»)*	Показник ДНК-руйнуючої активності («% ДНК у хвості») при використанні системи метаболічної активації S9*
–	Негативний контроль СНО-К1	96	0,5	0,5
–	Позитивний контроль СНО-К1	93	29,8	42
–	Негативний контроль Vero	90	2,8	2,9
–	Позитивний контроль Vero	87	58,2	72
1	Vero	88	76,7	79
2	Vero	80	2,2	2,3
3	СНО-К1	97	2,3	2,4
3	Vero	90	1,1	1,0
4	СНО-К1	98	1,3	1,4
4	Vero	91	2,3	2,6
5	СНО-К1	90	1,1	1,1
6	СНО-К1	90	1,2	1,2
7	СНО-К1	91	1,1	1,2
8	СНО-К1	92	1,1	1,3
9	СНО-К1	89	2,9	3,1
10	СНО-К1	96	0,5	0,7
11	СНО-К1	95	0,8	0,9
12	СНО-К1	92	3,6	14,3

*Результати вірогідні при $p < 0,05$.

денатурація, проведення електрофорезу, нейтралізація/фіксація, фарбування препарату акридиновим жовтогарячим, мікроскопічний аналіз.

Мікроскопію мікропрепаратів здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа («ЛЮ-МАМ Р8», РФ). Для кожного мікропрепарату аналізували не менше 100 «ДНК-комет».

Комп'ютерну обробку отриманих цифрових зображень проводили, використовуючи програму «CASP»-Comet Assay Software Project <http://www.casp.of.pl> (freeware)». При цьому визначали такі параметри «комет»: «довжина хвоста», «% ДНК у хвості», «момент хвоста» і т. п.

Статистичну обробку результатів виконували по кожній експериментальній точці, порівнюючи показники ушкодження ДНК з використанням критерію Даннета в дослідній та контрольній групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворюваний ефект.

Результати і обговорення. Проведені дослідження генотоксичних властивостей ветеринарних вакцин на тестових культурах еукаріотних клітин СНО-К1 і Vero дозволяють засвідчити наступне.

У таблиці наведено показники ДНК-руйнуючої активності ветеринарних вакцин і контрольних зразків, отримані в результаті застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичних властивостей ветеринарних вакцин.

При використанні методу лужного гелі-електрофорезу ізольованих клітин (ДНК-комет) одержано електрофоретичні треки типу «комет» у зразках позитивного контролю (культури клітин СНО-К1 і Vero, оброблені N-нітрозометилсечовиною) (рис. 1). Такі треки відсутні в зразках негативного контролю (клітини культури СНО-К1 і Vero, не оброблені генотоксикантами, рис. 2).

Як свідчать дані таблиці, показник пошкодження ДНК – «% ДНК у хвості» – для клітин лінії СНО-

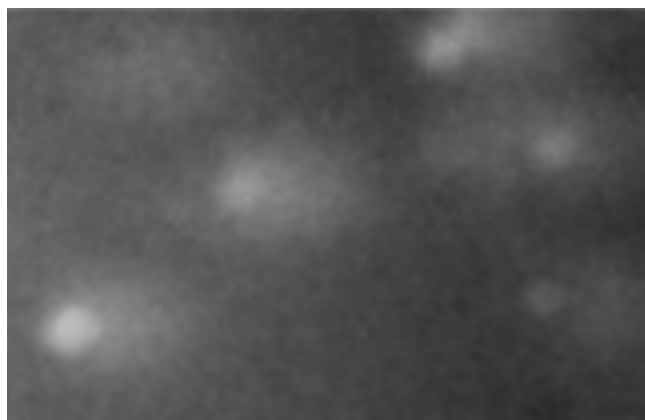


Рис. 1. Електрофоретичні зображення треків ДНК-комет позитивного контролю – клітини CHO-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною

K1 становить для позитивного контролю 29,8 %, для негативного – 0,5 %. У разі використання контрольних зразків клітин культури Vero спостерігається аналогічна електрофоретична картина, і показник «% ДНК у хвості» дорівнює 58,2 % у позитивному та 2,8 % у негативному контролях.

У результаті визначення генотоксичних властивостей ветеринарних вакцин методом ДНК-комет встановлено, що два зразки проявляють генотоксичну дію. Так, ДНК-комети присутні на електрофоретичних зображеннях ДНК клітин культури Vero, оброблених зразком № 1 (вакцина проти лептоспірозу). При цьому показник «% ДНК у хвості» становить 76,7 %, що значно перевищує значення аналогічного показника позитивного контролю (рис. 3, таблиця).

Зразок № 12 (інактивована вакцина проти мікроспорії котів) не проявляє генотоксичних властивостей щодо клітин культури CHO-K1 за стандартних умов проведення тесту (показник «% ДНК у хвості» становить 3,6 %, що майже збігається з рівнем негативного контролю).

Відомо [6], що метаболіти, які утворюються в живому організмі як продукти біотрансформації потенційних генотоксикантів, можуть самі проявляти генотоксичну дію. Тому видається доцільним тестування ветеринарних вакцин у системі метаболічної активації з використанням мікосомної фракції печінки щурів – фракції S9.

Так, електрофоретичні зображення ДНК клітин культури CHO-K1, оброблених зразком № 12 (інактивованою вакциною проти мікроспорії котів), за умов метаболічної активації містять електрофоре-

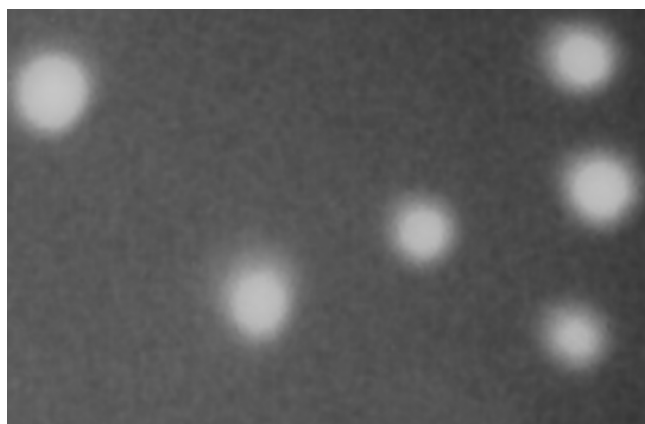


Рис. 2. Електрофоретичні зображення ДНК клітин негативного контролю – клітини CHO-K1, не оброблені генотоксикантами

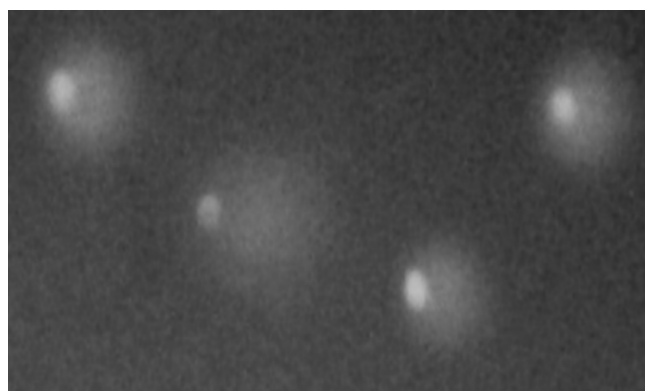


Рис. 3. Електрофоретичні зображення ДНК клітин культури Vero, оброблених зразком № 1 (ветеринарною вакциною проти лептоспірозу)

тичні треки типу «комет». Показник «% ДНК у хвості» при цьому становить 14,3 %, що значно перевищує значення негативного контролю (0,5 %) та аналогічного показника, отриманого при тестуванні за стандартних умов (3,6 %). Однак значення цього показника виявилось нижчим рівня позитивного контролю (29,8 %). Оскільки умови метаболічної активації з фракцією S9 моделюють метаболічні процеси, які можуть протікати в організмі за участі ймовірних промутагенів, одержані нами дані свідчать про наявність у зразку № 12 компонентів, що є потенційно генотоксичними.

Зразки №№ 2–11 не проявляють генотоксичної дії на клітини культур CHO-K1 і Vero як за умов стандартного проведення тестування, так і в умовах системи метаболічної активації. Показник «% ДНК в хвості» для всіх вищеперахованих препаратів ветеринарних вакцин є на рівні значень негативних контролів (таблиця).

Висновки. Метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (ДНК-комет) є придатним для визначення генотоксичного впливу ветеринарних вакцин на тестові еукаріотні клітин CHO-K1.

Перевагами пропонованого методу є його експресність, низька вартість проведення досліджень, а також висока прогностичність отриманих результатів.

Виконаний комплекс експериментальних робіт з вивчення генотоксичності ветеринарних вакцин методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотних клітин дозволяє рекомендувати цей метод для характеристики біобезпеки подібних препаратів.

S. M. Dybkova, M. E. Roman'ko, T. G. Gruzina, L. S. Rieznichenko, Z. R. Ulberg, V. O. Ushkalov, A. M. Golovko

Comet assay application for determining genotoxicity of veterinary vaccines preparations

Summary

Aim. To study a possibility of usage of the alkaline gel electrophoresis method (Comet assay) for determination of genotoxic properties of veterinary vaccines preparations. **Methods.** The alkaline gel electrophoresis of isolated eukaryotic cells has been used with further visualization of the samples by fluorescent microscopy. **Results.** Veterinary vaccines testing by the Comet assay method under alkaline conditions revealed that the samples No.1 and No.12 from twelve investigated vaccine preparations had genotoxic influence on eukaryotic cells of CHO-K1 and Vero test cultures, No. 12 sample being genotoxic only at metabolic activation. **Conclusions.** The method of alkaline gel electrophoresis of single cells (Comet assay) is suitable for determination of veterinary vaccines genotoxic influence on the test eukaryotic cells CHO-K1. The method proposed in this paper is express, inexpensive and predictive. The accomplished experimental work allows us to recommend this method for characterization of biosafety of veterinary vaccines preparations.

Keywords: genotoxicity, veterinary vaccines, cells culture, method of alkaline single cells gel electrophoresis, biosafety.

С. Н. Дыбкова, М. Е. Романько, Т. Г. Грузина, Л. С. Резниченко, З. Р. Ульберг, В. А. Ушкалов, А. М. Головка

Применение метода ДНК-комет для определения генотоксичности препаратов ветеринарных вакцин

Резюме

Цель. Изучить возможность использования метода щелочного гель-электрофореза (метода ДНК-комет) для определения

генотоксических свойств ветеринарных вакцин. **Методы.** Использован метод щелочного гель-электрофореза изолированных эукаріотных клеток с последующей визуализацией исследуемых препаратов с помощью флуоресцентной микроскопии. **Результаты.** Тестированием ветеринарных вакцин методом ДНК-комет в щелочных условиях выявлено, что препараты вакцин № 1 и № 12 из 12 исследованных обладают генотоксическим действием на тестовые эукаріотные клетки культур CHO-K1 и Vero, причем препарат № 12 демонстрирует генотоксическое свойство только при тестировании в системе метаболической активации. **Выводы.** Метод щелочного гель-электрофореза изолированных эукаріотных клеток (ДНК-комет) пригоден для определения генотоксического влияния ветеринарных вакцин на тестовые эукаріотные клетки CHO-K1. Преимуществами предлагаемого метода является его экспресность, низкая стоимость выполнения исследований и высокая прогностичность полученных результатов. Выполненный комплекс экспериментальных работ позволяет рекомендовать этот метод для характеристики биобезопасности препаратов ветеринарных вакцин.

Ключевые слова: генотоксичность, ветеринарные вакцины, культура клеток, метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток, биобезопасность.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Collins A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations // Mol. Biotechnol.–2004.–26, N 3.–P. 249–261.
2. Methods in molecular biology. *In situ* detection of DNA damage. Methods and protocols / Ed. V. V. Didenko.–Totowa: Humana press, 2002.–Vol. 203.–279 p.
3. Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins // Mutagenesis.–1998.–13, N 1.–P. 89–94.
4. Tice R. R., Aquarell E., Anderson D. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing // Environmen. and Mol. Mutagen.–2000.–35, N 3.–P. 206–221.
5. Olive P. L. The comet assay: An overview of techniques // Meth. Mol. Biol.–2002.–203.–P. 179–194.
6. Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds: Methodical recommendations.–Moscow, 2006.–27 p.
7. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneide E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Exp. Cell Res.–1988.–175, N 1.–P. 184–191
8. Lakin G. F. Biometrics: Appliances for biol. special. institute / 4th ed.–Moscow: High school, 1990.–352 p.

УДК. 577.151:579.864.1
Надійшла до редакції 30.10.09