

Биология

УДК 612.014.4.083.36

Г. Г. ОГАНЕСЯН, А. Л. АВАГЯН, Г. Л. ТАДЕВОСЯН, Р. М. АРУТЮНЯН

ОЦЕНКА ИНДУЦИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С ПОВРЕЖДЕНИЙ  
X-ХРОМОСОМЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ MN-FISH

Микроядерный тест в комбинации с методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (с использованием специфичных проб для окраски целых хромосом) был применен для сравнительной оценки уровня повреждений X-хромосомы в лейкоцитах у представителей обоих полов. В качестве агента, повреждающего хромосомы, был использован митомицин С. Было проанализировано по 916 микроядер в клетках каждого пола. Полученные данные показали, что X-хромосома в женских и мужских микроядрах встречается с частотой 4,25 и 1,05% соответственно. Предполагается, что женская инактивная X-хромосома повреждается и включается в микроядра значительно чаще, чем ее функционирующий гомолог.

**Введение.** Микроядерный тест широко применяется для оценки генотоксичности химических и физических факторов окружающей среды. Микроядра (МЯ) – внеядерные тельца, которые формируются в делящихся клетках из ацентрических хромосомных фрагментов или целых хромосом, которые не были включены в дочерние ядра. Они покрываются ядерной мембраной, приобретая морфологию интерфазного ядра с той разницей, что основное ядро значительно превышает МЯ в размерах [1]. В последние годы применяется микроядерный тест с цитокинетическим блоком за счет присутствия цитохалазина В, который блокирует деление цитоплазмы и приводит к образованию двуядерных, а в дальнейшем и полиядерных клеток [1]. Данная версия микроядерного теста позволяет анализировать наличие микроядер в двуядерных клетках, прошедших один цикл деления.

В настоящее время, несмотря на широкое применение микроядерного теста, вероятность миграции разных хромосом и их фрагментов в МЯ не до конца изучена. Более детальное исследование механизмов образования МЯ поможет в дальнейшем точнее интерпретировать получаемые данные. Визуализация отдельных хромосом возможна за счет методов молекулярной цитогенетики, в частности флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Комби-

нация микроядерного теста с методом FISH позволяет идентифицировать наличие тех или иных хромосом или их фрагментов в составе микроядер.

В данной работе закономерности миграции X-хромосомы в МЯ были изучены в лейкоцитах, полученных от доноров обоих полов после их обработки митомицином С, с применением комбинации микроядерного теста (с цитокинетическим блоком) и метода FISH (с пробой для целой X-хромосомы).

**Материалы и методы.** В исследовании были использованы периферические лейкоциты двух здоровых доноров – женщины и мужчины. Инкубация МЯ митомицином С проводилась по стандартному протоколу [1, 2]. Гепаринизированная цельная кровь культивировалась в питательной среде RPMI 1640 (1:10) с добавлением 10%-ой эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мкг/мл ФГА, 1%-го раствора пеницилина/стрептомицина при температуре 37°C. Митомицин С в концентрации 0,1 мкг/мл был добавлен через 22 ч после начала культивирования. Через 44 ч деление клеток было приостановлено добавлением цитохалазина В в концентрации 3 мкг/мл. Инкубация длилась в целом 72 ч. По окончании инкубации клетки подвергались гипотонической обработке холодным раствором КС1 (0,075 М) при температуре 4°C в течение 3 минут, а затем фиксировались дважды в растворе этанол–уксусная кислота (3:1). Суспензии клеток раскапывались на предметные стекла. Готовые препараты хранились при температуре 20°C для последующей гибридизации *in situ*.

FISH-анализ проводился в соответствии со стандартной методикой [3]. Препараты обрабатывались 5 минут раствором 0,01 N HCl/10%-го пепсина (Sigma, USA) при 37°C. Затем хромосомы денатурировались в 70%-ом растворе формамида при 73°C в течение 3 мин, а также последовательно подвергались обезвоживанию в 70, 85, 100%-ых растворах этанола, по 5 минут в каждом. Денатурированный зонд для X-хромосомы наносился на препараты. Продолжительность гибридизации составляла 42 ч. После отмывки препараты окрашивались DAPI для визуализации ядер и МЯ.

МЯ анализировались как в двуядерных, так и в одноядерных клетках.

**Результаты и обсуждение.** На основе анализа 916 МЯ в клетках каждого пола обнаружено, что X-хромосома встречалась с частотой 4,25 и 1,05% в женских и мужских клетках соответственно.

В большинстве X-позитивных МЯ отмечалось наличие сигнала X-хромосомы как в МЯ, так и в основном ядре, что свидетельствует о том, что МЯ, индуцированные митомицином С, преимущественно включают фрагменты X-хромосомы и изредка X-хромосому целиком [4–8]. Полученные результаты не противоречат данным литературы, согласно которым митомицин С вызывает повреждения главным образом в околоцентромерных участках хромосом [9].

Если предположить, что образование МЯ каждой хромосомой человека является случайным процессом, каждая парная хромосома может появиться в МЯ с частотой 1/23 (4,34%). Присутствующие в единственном числе Y- и X-хромосомы в мужских клетках могут включаться в МЯ с вероятностью 1/46 (2,17%). Таким образом, полученная частота встречаемости X-хромосомы в

МЯ, индуцированных митомицином *C*, соответствует теоретически ожидаемой в женских клетках и ниже ожидаемой в мужских. По данным литературы, идентификация хромосомного материала, присутствующего как в спонтанных, так и в индуцированных МЯ, показывает, что вероятность повреждения *X*-хромосомы в женских клетках, как правило, выше ожидаемой и увеличивается с возрастом [10–14]. Повышенный уровень повреждаемости *X*-хромосомы выявлен также в мужских клетках [13, 14]. Однако большинство представленных в литературе данных в основном касается спонтанной или индуцированной анеугенами анеуплоидии по *X*-хромосоме. Митомицин *C* является классическим кластогеном, вызывающим разрывы хромосом, и индуцированные при его действии эффекты могут описываться другими закономерностями. При изучении миграции хромосом в МЯ при действии разных генотоксикантов показано, что нерасхождения хромосом являются случайными событиями, зависящими как от хромосомы, так и от действующего вещества и его дозы [15].

Согласно полученным результатам, *X*-хромосома встречается в женских МЯ в 4 раза чаще, чем в мужских, что объясняется, в частности, наличием двух *X*-хромосом. Известно также, что в женских соматических клетках одна из *X*-хромосом находится в сверхконденсированном инактивном состоянии, из-за чего она повреждается чаще и преимущественно включается в состав МЯ [13, 16, 17].

Таким образом, результаты анализа МЯ свидетельствуют о том, что вероятность повреждения *X*-хромосом при действии митомицина *C* в женских клетках значительно выше, чем в мужских.

*Кафедра генетики и цитологии*

*Поступило 02.03.2009*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Fenech M.** Mutation Research, 2000, v. 455, p. 81–95.
2. **Rosefort C., Fauth E., Zankl H.** Mutagenesis, 2004, v. 19, p. 277–284.
3. **Liehr T., Thoma K., Kammler K., Gehring C., Ekici A., Bathke K.D., Grehl H., Rautenstrauss B.** Appl. Cytogenet., 1995, v. 21, p. 185–188.
4. **Cardoso R.S., Takahashi-Hyodo S., Peitl Jr.P., Ghilardi-Neto T., Sakamoto-Hojo E.T.** Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 2001, v. 21, p. 431–439.
5. **Catalán J., Autio K., Kuosma E., Norppa H.** Am. J. Hum. Genet., 1998, v. 63, p. 1464–1472.
6. **Murg M.N., Schuler M., Eastmond D.A.** Mutation Research, 1999, v. 446, p. 193–203.
7. **Migliore L., Cocchi L., Nesti C., Sabbioni E.** Environ. Mol. Mutagen., 1999, v. 34, p. 279–284.
8. **Surralles J., Hande M.P., Marcos R., Lansdorp P.M.** Am. J. Hum. Genet., 1999, v. 65, p. 1617–1622.
9. **Schaap T., Sagi M., Cohen M.M.** Cytogenet. Cell Genet., 1980, v. 28, p. 240–250.
10. **Bakou K., Stephanou G., Andrianopoulos C., Demopoulos NA.** Mutagenesis, 2002, v. 17, p. 233–239.
11. **Falck G.C., Catalán J., Norppa H.** Mutagenesis, 2002, v. 17, p. 111–117.
12. **Leach N.T., Jackson-Cook C.** Mutat. Res., 2001, v. 495, p. 11–19.
13. **Catalán J., Falck G.C., Norppa H.** Am. J. Hum. Genet., 2000, v. 66, p. 687–691.
14. **Zijno A., Leopardi P., Marcon F., Crebelli R.** Chromosoma, 1996, v. 104, p. 461–467.
15. **Migliore L., Zotti-Martelli L., Scarpato R.** Environ. Mol. Mutagen., 1999, v. 34, p. 64–68.

16. Tucker J.D., Nath J., Hando J.C. Hum. Genet., 1996, v. 97, p. 471–475.
17. Surrallés J., Jeppesen P., Morrison H., Natarajan A.T. Am. J. Hum. Genet., 1996, v. 59, p. 1091–1096.

Գ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Լ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Գ. Լ. ԹԱԴԵՎՈՍՅԱՆ,  
Ռ. Մ. ԱՐՄԻՅԱՆ

ՍԱՐԳՈՒՄ ԼԵՅԿՈՑԻՏՆԵՐՈՒՄ ՄԻՏՈՄԻՑԻՆ C-ՈՎ ԱՎԱԳՎԱԾ  
X ԶԵՆՈՍՈՍՈՒՄ ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ MN-FISH ՄԵԹՈԴՈՎ

Ամփոփում

Երկու սեռերի լեյկոցիտներում X քրոմոսոմի համեմատական վնասման աստիճանը գնահատելու համար կիրառվել է միկրոկորիզային տեսող ֆլուորեսցենտային *in situ* հիբրիդացման (FISH) մեթոդի հետ համակցված, որի ժամանակ օգտագործվել է X քրոմոսոմի ամբողջական ներկման զոնդ: Որպես քրոմոսոմների վնասման գործոն կիրառվել է դասական կլաստոգեն միտոմիցին C-ն: Յուրաքանչյուր սեռի բջիջներում վերլուծվել է 916 միկրոկորիզ: Ստացված տվյալները ցույց տվեցին, որ X քրոմոսոմը իգական և արական միկրոկորիզներում հանդիպում է համապատասխանաբար 4,25 և 1,05% հաճախականությամբ: Ենթադրվում է, որ իգական ինակտիվ X քրոմոսոմը վնասվում է և թափանցում է միկրոկորիզներ ավելի հաճախ, քան նրա ֆունկցիոնալ հոմոլոգը:

G. G. HOVHANNISYAN, A. L. AVAGYAN, G. L. TADEVOSYAN, R. M. ARUTYUNYAN

ESTIMATION OF CHROMOSOME X DAMAGE INDUCED WITH  
MITOMYCIN C IN HUMAN LEUKOCYTES BY MN-FISH METHOD

Summary

Combination of micronuclei test with fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with application of whole chromosome probes was applied to compare chromosome X damage in leukocytes of male and female. Mitomycin C was selected as typical clastogene agent. 916 micronuclei in cells of both genders were studied. The data obtained showed that frequency of distribution of X-chromosome in women's and men's micronuclei was 4,25 and 1,05% consequently. Higher probability of damage of female inactive X-chromosome in micronuclei compared with its functioning homolog is demonstrated and discussed.