Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
(Минздравсоцразвития России)

**Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Оценка степени повреждения ядерной ДНК в клетках периферической крови человека с помощью щелочного электрофореза единичных клеток при медицинских осмотрах работников, профессионально связанных с воздействием токсичных металлов

Методические рекомендации

ФМБА России Р.12.37-2011

Москва 2011

Предисловие

1. Разработаны Федеральным государственным учреждением науки «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства.

Директор – д.м.н., профессор С. П. Нечипоренко,

заместитель директора – д.м.н. Е. Ю. Бонитенко.

2. Исполнители: д.м.н., профессор А. Н. Петров, к.б.н. Н. В. Томилин, к.б.н. О. А. Филько., к.б.н. А. В. Храброва, к.б.н. Н. Е. Соловьева, к.м.н. Т. М. Иванова, д.м.н. Г. В. Шестова, к.б.н. К. В. Сизова, Т. Ф. Черняк, д.х.н. Г. В. Рутковский, к.х.н. Р. К. Глушков, к.х.н. А. А. Иваненко, Н. Д. Соловьев.

3. В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:

– Федеральный закон «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.1993 г., ФЗ № 5487-1 с изменениями, внесенными Указом Президента РФ от 24.12.1993 № 2288 (ред. от 01.12.2004).

– Федеральный закон «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера» от 21.12.1994 № 68-ФЗ (ред. от 30.10.2007).

– Федеральный закон «Об охране окружающей среды» от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ (ред. от 27.12.2009).

– Федеральный закон «О промышленной безопасности опасных производственных объектов» от 21.07.1997 № 116-ФЗ (ред. от 09.05.2005).

4. Методические рекомендации утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «___»_____2011 г.

5. Введены впервые.

Содержание

Предисловие....2

Введение....4

1. Область применения....7

2. Нормативные ссылки....8

3. Обозначения и сокращения....8

4. Описание метода....8

4.1. Материально-техническое обеспечение....8

4.1.1. Химические реактивы....8

4.1.2. Растворы....9

4.1.3. Материалы....10

4.1.4. Приборы....10

4.2. Основные этапы выполнения метода ЭЕК....11

4.2.1. Подбор групп....11

4.2.2. Забор крови....11

4.2.3. Электрофорез единичных клеток цельной крови....12

4.2.4. Оценка степени повреждения ДНК....15

4.2.5 Статистическая оценка результатов....19

5. Эффективность использования метода....20

6. Пример использования метода ЭЕК для оценки генотоксического действия сварочных аэрозолей....20

Приложение А (обязательное)....24

Приложение Б (рекомендуемое)....26

Библиография....28

Введение

1. *Актуальность*. Известно, что многие химические вещества, используемые в промышленности, могут представлять опасность для здоровья человека. Состояние генома людей, профессионально связанных с действием вредных химических факторов, является важным индикатором влияния производственных условий на здоровье работников.

В настоящее время для оценки воздействия вредных факторов (химических, биологических или физических) производственной деятельности на здоровье людей широко используется метод щелочного электрофореза единичных клеток (ЭЕК), который позволяет прямо оценивать степень повреждения ДНК. По данным литературы за последнее десятилетие было выполнено не менее 98 исследований с использованием метода ЭЕК по этой тематике. Из них в 54 % исследований определялось генотоксическое воздействие летучих органических соединений, полициклических ароматических углеводородов и асбеста, в 16% – влияние производства антинеопластических препаратов, анестетиков или воздействие радиации, в 13% – генотоксическое действие токсичных металлов, а в 16% – при производстве пестицидов. В 81% исследований с помощью метода ЭЕК было выявлено генотоксическое действие вышеперечисленных вредных факторов [1], что свидетельствует об актуальности использования метода ЭЕК при оценке здоровья людей, чья производственная деятельность связана с действием вредных химических факторов.

По данным доступной авторам литературы при мониторинге состояния здоровья работников предприятий, в рабочей зоне которых отмечается повышенная концентрация вредных химических факторов, а также населения в зонах экологического неблагополучия, метод ЭЕК в Российской Федерации не используется. В 2006 г. были созданы методические рекомендации для выполнения метода ЭЕК на изолированных клетках различных тканей животных и в клеточных культурах [2].

2. *Типы повреждений ядерной ДНК*. К основным типам повреждения ДНК, выявляемых с помощью метода (ЭЕК), относят:

– апуриновые и апиримидиновые сайты (АП-сайты), т. е. участки молекулы ДНК, в которых отсутствуют азотистые основания;

– одиночные и двойные разрывы молекулы ДНК;

– ДНК–ДНК и белок–ДНК сшивки.

3. *Принципы выполнения метода ЭЕК*. Для оценки степени повреждения ядерной ДНК клетки смешивают с агарозой и монтируют в виде тонкого слоя на предметное стекло. Далее препарат подвергают лизису раствором с высокой концентрацией соли (NaCl, 2,5 моль/л) и 10%-ным тритоном X-100 для удаления содержимого клеток и освобождения ДНК и помещают в горизонтальную камеру для электрофореза, заполняемую щелочным раствором (PH > 13). На этом этапе двуспиральные молекулы ДНК денатурируют, превращаясь в односпиральные нити, причем ранее фрагментированные участки высвобождаются. Одновременно щелочнолабильные АП-сайты трансформируются в одиночные разрывы. В ходе последующего электрофореза фрагменты ДНК мигрируют к аноду с разной скоростью, которая зависит от величины фрагмента, и образуют структуру, напоминающую хвост кометы, что регистрируется с помощью флуоресцентной микроскопии.

Препараты окрашивают бромистым этидием и исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа. Нуклеоиды клеток представляют собой ярко светящиеся округлые образования, от которых в сторону анода вытягивается хвост, состоящий из фрагментированной ДНК. Интенсивность свечения хвоста по отношению к суммарной интенсивности свечения нуклеоида и хвоста определяет степень повреждения ДНК клетки (% ДНК в хвосте). Значения данного параметра определяют на цифровых изображениях с помощью специальной компьютерной программы.

Для выполнения исследований оценки состояния ядерной ДНК у людей, профессионально связанных с действием вредных химических факторов, с помощью метода ЭЕК необходимо сформировать контрольную и испытуемую группы, которые не должны отличаться по числу участников и основным сопутствующим факторам (по полу, возрасту и соотношению курящих/некурящих). Количество участников в каждой группе должно быть не менее шести человек, а для обеспечения оптимальной чувствительности исследований каждая группа должна содержать 15–30 участников.

Наличие в контрольной группе не менее тридцати человек позволяет рассчитывать референтные интервалы спонтанного повреждения ядерной ДНК. Эти данные не абсолютны, и при каждом новом воспроизведении метода нужно получать новые значения референтных интервалов.

4. *Статистический анализ результатов*. Сравнение рядов данных, полученных от объектов в разных группах, осуществляют с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney *U*-test). Различия считаются достоверными, если полученный уровень значимости меньше 0,05. Положительный результат позволяет сделать заключение, что испытуемая группа достоверно отличается от контрольной, т. е. действие вредного химического фактора увеличивает степень повреждения ДНК по сравнению со спонтанным уровнем в контрольной группе. Это означает, что данный химический фактор обладает генотоксическим действием.

5. *Преимущества метода ЭЕК*. Основное достоинство данного метода – возможность прямой оценки степени повреждения ДНК в клетках непролиферирующих тканей, что позволяет использовать в качестве объекта исследования клетки разных тканей млекопитающих, в том числе лейкоциты периферической крови. Это открывает широкие возможности для использования данного метода при биомониторинге состояния ядерной ДНК человека.

Несмотря на то, что повреждения ядерной ДНК, выявляемые с помощью метода ЭЕК, могут быть частично репарированы специальными системами клетки, увеличение их частоты приводит к повышению риска формирования заболеваний различной природы, в том числе канцерогенных [2].

6. *Недостатки метода ЭЕК*. С помощью метода ЭЕК нельзя выявить анеуплоидные мутации (численные нарушения кариотипа), поэтому исследования полезно проводить в сочетании с микроядерным тестом.

В настоящем методическом руководстве подробно изложен порядок выполнения метода ЭЕК для оценки степени повреждения ДНК на лейкоцитах периферической крови человека при биомониторинге состояния здоровья людей, профессионально связанных с повышенным действием токсичных металлов, с целью контроля за влиянием производственных условий на геном человека.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического
агентства

_____М. Ф. Киселев

«29» 09 2011 г.

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Оценка степени повреждения ядерной ДНК в клетках периферической крови человека с помощью щелочного электрофореза единичных клеток при медицинских осмотрах работников, профессионально связанных с воздействием токсичных металлов

Методические рекомендации

ФМБА России Р.12.37-2011

---

1. Область применения

Разработанные методические рекомендации по оценке генотоксического действия токсичных металлов на ядерную ДНК лейкоцитов периферической крови могут быть использованы при мониторинге состояния здоровья работников предприятий, в рабочей зоне которых отмечается повышенная концентрация токсичных металлов. Данные методические рекомендации предназначены для сотрудников клинических отделов НИИ ФМБА, для сотрудников центров индикации и диагностики инфекционных болезней и опасных отравлений химическими веществами, создаваемых в соответствии с ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

2. Нормативные ссылки

– Постановление Правительства РФ от 27 октября 2008 г. № 791 о федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»

3. Обозначения и сокращения

АОТ – агароза с температурой плавления = 37° С

АНТ – агароза с низкой точкой плавления ($t_{пл}$ < 30° С)

ЭЕК – электрофорез единичных клеток

АП-сайты – апуриновые и апиримидиновые сайты

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

CASP 1.2.2 – программа анализа изображений комет (Comet Assay Software Project)

4. Описание метода

4.1. Материально-техническое обеспечение

4.1.1. Химические реактивы

Натрий хлористый	хч/чда
Натрий гидроксид	хч/чда
Натрий фосфорнокислый двузамещенный x12 H_2O	хч/чда
Калий фосфорнокислый однозамещенный	хч/чда
Калий хлористый	хч/чда
Соляная кислота	хч/чда
Трилон Б	хч/чда
Трис	хч/чда
Диметилсульфоксид	≥ 99,5 %
Тритон X-100	для молекулярной биологии
Агароза	$t_{пл}$ = 37° С

Агароза с низкой температурой плавления	$t_{пл} < 30°$ С A4018, Sigma
Бромистый этидий	≥ 95%
Гепарин (натриевая соль)	202 ед./мг
Акридин оранжевый	для микроскопии, ≥ 98%
Этиловый спирт	ректифицированный

4.1.2. Растворы

– Фосфатно-солевой раствор Дюльбекко без кальция и магния 137 ммоль/л NaCl, 2,7 ммоль/л KCl, 3,2 ммоль/л Na $H_2PO_4 \times 12H_2O$, 1,5 ммоль KH_2PO_4; pH 7,4: для получения 1 л раствора в 600 мл дистиллированной воды растворить 8,0 г хлористого натрия; 0,2 г хлористого калия; 1,15 г двузамещенного фосфата натрия х $12H_2O$; 0,2 г однозамещенного фосфата калия, pH довести до 7,4 с помощью 0,1 н. гидроксида натрия, а объем раствора до 1 л.

– Раствор для лизиса 2,5 моль/л NaCl, 100 ммоль/л Na_2-EDTA, 10 ммоль/л Трис-HCl, 10% ДМСО, 1% Тритон X-100; pH 10,0–10,5: для получения 1 л раствора в 600 мл дистиллированной воды растворить 146,1 г натрия хлористого; 37,2 г двунатриевой соли ЭДТА; 1,2 г триса; 4 г натрия гидроксида, pH довести до 10–10,5 с помощью 1 н. гидроксида натрия, затем объем раствора довести до 890 мл. Приготовленный раствор хранится в течение одного месяца при +4° С. В день эксперимента добавить 10 мл тритона X-100 и 100 мл ДМСО и перемешать раствор на магнитной мешалке в течение 15 мин. После перемешивания охладить до + 4° С. Если для эксперимента требуется меньший объем лизисного раствора, нужно рассчитать необходимый объем тритона X-100 и ДМСО для получения конечной концентрации 1% и 10% соответственно.

– Раствор для денатурации ДНК и электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 10 ммоль/л Na_2-EDTA; pH > 13,0: для получения 1 л раствора в 600 мл дистиллированной воды растворить 12 г натрия гидроксида; 0,372 г двунатриевой соли ЭДТА объем раствора довести до 1000 мл, pH > 13,0. Раствор готовится за день до эксперимента и используется охлажденным до +4° С.

– Буфер для нейтрализации предметных стекол после электрофореза: для получения 1 л раствора в 600 мл дистиллированной воды растворить 48 г триса –

0,4 моль/л, довести pH до 7,5 с помощью 10 моль/л раствора соляной кислоты. Объем раствора довести до 1000 мл.

– Растворы бромистого этидия: растворить 10 мг бромистого этидия в 50 мл дистиллированной воды, сохранять в темноте при комнатной температуре в течение двух месяцев.

Для приготовления рабочего раствора флуоресцентного красителя к 1 мл концентрированного раствора добавить 9 мл дистиллированной воды.

4.1.3. Материалы

Предметные стекла Menzel AA102E (76 x 26 x 1,1 мм)

Покровные стекла 24 x 32 мм

Автоматические пипетки на 1000 и 100 мкл

Пробирки Эппендорфа 1,5 мл

Штативы для пробирок Эппендорфа

Сосуды Коплина для окраски стекол

Планшеты для хранения микроскопических препаратов

Вакуумные пробирки для взятия венозной крови Vacutest Kima № 123100 4 мл

4.1.4. Приборы

Флуоресцентный микроскоп, укомплектованный черно-белой или цветной цифровой камерой с чувствительностью, достаточной для флуоресценции

Камера для горизонтального электрофореза на 20 или 40 предметных стекол

Источник напряжения для электрофореза

Аналитические весы

pH-метр

Водяная баня

Магнитная мешалка

Вортекс

Кварцевая лампа ДБ-15 или аналогичная, способная излучать УФ *С* (220–280 нм)

Компьютер

4.2. Основные этапы выполнения метода ЭЕК

4.2.1. Подбор групп

Для проведения обследований по оценке состояния ядерной ДНК людей, чья профессиональная деятельность связана с воздействием вредных химических факторов, необходимо сформировать две группы:

1) группа испытуемых – люди, профессиональная деятельность которых сопряжена с постоянным токсическим воздействием вредных химических факторов;

2) контрольная группа – люди, не имевшие постоянного контакта в быту и на работе с действием вредных химических факторов.

Участники обеих групп должны быть в устной форме протестированы по ранее разработанной анкете (приложение А). При заполнении анкеты учитываются следующие аспекты: производственный (профессия, наличие вредных факторов, стаж, физические нагрузки), медико-биологический (возраст, отягощенность анамнеза, наличие хронических заболеваний) и социальный (образ жизни, условия проживания, наличие вредных привычек). Каждый вопрос и ответ на него имеют свое диагностическое значение и информативность. В группу для обследования не включают пациентов, которые в течение месяца перед исследованием проходили флюорографическое обследование, имели подъем температуры выше 37º С, а также принимали лекарства с известным мутагенным, токсическим или наркотическим действием. Группы (контрольная группа и группа испытуемых) должны быть составлены таким образом, чтобы статистически не отличаться по следующим параметрам: пол, возраст, вредные привычки (курение, алкоголь), интенсивность физических нагрузок.

Все пациенты, у которых берут кровь для проведения обследования, должны быть проинформированы о проведении исследований и выразить добровольное согласие на участие в них.

4.2.2. Забор крови

Забор крови и ее доставку в лабораторию следует проводить в соответствии со стандартами проведения этих мероприятий. Венозную кровь собирают в специальные вакуумные пробирки Vacutest объемом 4–6 мл с гепарином натрия в качестве

антикоагулянта. Сразу после наполнения пробирки ее медленно переворачивают не менее 10 раз для ускорения растворения антикоагулянта. Конечная концентрация гепарина натрия составляет 25 ед./мл. Взятая кровь должна быть использована в течение четырех часов. Транспортировку проб крови необходимо осуществлять при температуре +4° С без значительной вибрации в защищенном от прямого попадания света футляре.

4.2.3. Электрофорез единичных клеток цельной крови

4.2.3.1. Подготовка стекол

Готовят 0,75 %-ный раствор АОТ (агароза с точкой плавления – 37° С, 188 мг в 25 мл дистиллированной воды). Навеску агарозы помещают в коническую полиэтиленовую пробирку (объем 50 мл) с завинчивающейся пробкой и наливают 25 мл дистиллированной воды. Полученную суспензию растворяют на водяной бане при 100° С (в течение 15 мин). Периодически пробирку аккуратно встряхивают, добиваясь равномерного прогрева агарозы. Нельзя допускать кипения раствора, чтобы не появились пузыри.

Перед нанесением агарозы стекла маркируют, затем на короткое время (3 с) погружают в раствор агарозы. Стекло медленно извлекают из раствора с помощью пинцета, удаляют агарозу с нижней стороны стекла и укладывают в горизонтальном положении в специальный планшет. Подготовка стекол осуществляется не позже чем за день до эксперимента. Покрытые агарозой стекла могут храниться при комнатной температуре в течение одного-двух месяцев.

Перед началом исследования стекла шифруют (3 стекла на одного человека), чтобы исключить субъективность анализа.

4.2.3.2. Заключение клеток в агарозу и монтирование на предметном стекле

Готовят 0,5 %-ный раствор АНТ (агароза с низкой точкой плавления < 30 °С): делают навеску 25 мг, помещают ее в коническую пробирку (объем 15 мл) с завинчивающейся пробкой и добавляют 5 мл раствора Дюльбекко. Полученную суспензию растворяют на водяной бане при 100° С (в течение 15 мин).

После растворения агарозы помещают ее аликвоты по 150 мкл в предварительно нагретые на водяной бане (+37° С) пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл. Пробирки с агарозой должны быть постоянно погружены на половину высоты в воду на водяной бане при +37° С, где их выдерживают в течение 30 мин до добавления аликвоты крови для выравнивания температуры.

В каждую пробирку добавляют 10 мкл цельной крови и тщательно перемешивают с АНТ медленным пипетированием автоматической пипеткой.

Из гомогенной суспензии клеток крови отбирают аликвоту объемом 30 мкл и помещают ее в центр покрытой агарозой части предметного стекла, затем быстро закрывают покровным стеклом (24х32 мм) таким образом, чтобы один край покровного стекла выступал за край предметного стекла на 1–2 мм. Приготовленные препараты помещают в холодильник. Через 15 мин с помощью пинцета осторожно удаляют покровные стекла. Из каждой пробы необходимо изготовить не менее трех препаратов.

4.2.3.3. Лизис клеток для высвобождения ДНК

Освобожденные от покровных стекол препараты помещают в сосуды Коплина. В каждый сосуд необходимо осторожно добавить 40 мл охлажденного лизисного раствора. С этого момента и до окончания электрофореза препараты нельзя подвергать действию прямого яркого света. Все манипуляции необходимо выполнять при тусклом желтом свете. Лизис проводят в темноте при +4° С, процедура занимает не менее двух часов, в случае необходимости пробы можно оставлять на ночь.

4.2.3.4. Денатурация (разворачивание) ДНК

После окончания лизиса стекла на короткое время погружают в сосуд Коплина, заполненный раствором для электрофореза, и укладывают плотно друг к другу в камеру для электрофореза. Концы, покрытые агарозой, должны быть обращены к середине центральной площадки камеры. Затем камеру осторожно заполняют раствором для электрофореза так, чтобы над стеклами образовался тонкий (не менее 3–4 мм толщиной) слой раствора. Камеру закрывают крышкой, денатурацию ДНК проводят в течение 30 мин. Все эти процедуры выполняют при слабом желтом свете.

Камера для электрофореза должна быть изготовлена из светонепроницаемого материала.

Важным параметром электрофореза является температура. Перед заполнением камеры ее охлаждают до 9–11° С, чтобы сразу после электрофореза температура раствора составляла 13,5–14,5° С. Для поддержания постоянных температурных условий во время денатурации и электрофореза мы предлагаем перед заполнением закрывать камеру коробкой из пенопласта и охлаждать специальными элементами (предварительно замороженными до –20° С), обычно используемыми для доставки антител. Для эффективного охлаждения обычно достаточно двух элементов, помещенных в эмалированную ванночку, которая используется в качестве охлаждающего экрана. После 60 мин охлаждения камера заполняется препаратами и заливается раствором для электрофореза. Затем ванночка с элементами укладывается на крышку камеры. Необходимо следить, чтобы ванночка не касалась электродов.

4.2.3.5. Горизонтальный электрофорез в щелочных условиях

Электрофорез следует проводить при напряженности электрического поля 1,0 В/см и силе тока 350 мА в течение 30 мин. Если напряженность поля электрофореза ниже, необходимо уменьшить объем раствора, чтобы получить правильное значение. И наоборот, если напряженность поля выше, объем раствора для электрофореза в камере нужно увеличить. Температура раствора после электрофореза должна быть 13,5–14,5° С.

4.2.3.6. Обработка стекол после электрофореза

После окончания электрофореза раствор необходимо частично удалить, чтобы обнажить стекла. Предметные стекла извлекают, укладывают их в горизонтальном положении на специальный штатив над кюветой свободным от агарозы концом стекла к себе (дальний край кюветы должен быть приподнят на ~ 15°) и дважды промывают каждое стекло раствором для нейтрализации. Затем стекла слегка подсушивают и трижды промывают холодным 70%-ным этиловым спиртом, снова подсушивают и промывают холодным 96%-ным спиртом. Избыток влаги удаляют фильтровальной бумагой или пипеткой с ближнего края стекла, свободного от агарозы. Все растворы наносят аккуратно в виде капель прямо на агарозу в начале стекла, во вре-

мя промывок горизонтальное положение стекол не должно меняться до частичного высыхания после обработки 96%-ным спиртом. В этот момент удобно протереть нижнюю часть стекол.

4.2.3.7. Окрашивание ДНК

Внимание! Окраску бромистым этидием нужно проводить только в тяге и обязательно в перчатках!

На следующий день стекла погружают на пять минут в сосуд Коплина с охлажденной дистиллированной водой, подсушивают и окрашивают бромистым этидием в течение 10 мин. Для этого наносят тонкий слой раствора бромистого этидия только на поверхность агарозы. Затем споласкивают дважды холодной дистиллированной водой и наносят на агарозу 70%-ный спирт на одну минуту, споласкивают стекла свежей порцией 70%-ного спирта, избыток спирта удаляют фильтровальной бумагой (прикоснуться к торцу стекла) и высушивают препараты. Перед анализом на центр агарозы наносят каплю дистиллированной воды и закрывают покровным стеклом (24х24 мм). Окрашенный препарат исследуют под флуоресцентным микроскопом (515–560 нм – возбуждающий свет, 580 нм – эмиссия) при увеличении ~ 300х.

4.2.4. Оценка степени повреждения ДНК

4.2.4.1. Анализ препаратов

Степень повреждения ядерной ДНК определяют на полученных цифровых изображениях с помощью компьютерной программы CASP 1.2.2 (Comet Assay Software Project, Польша; рисунок 1, http://casplab.com/index.php?link=download), находящейся в свободном доступе. В качестве определяемого параметра используют процент содержания ДНК в хвосте кометы. Такой параметр наименее зависит от качества изображений и удобен для сравнения с данными, полученными в других лабораториях.

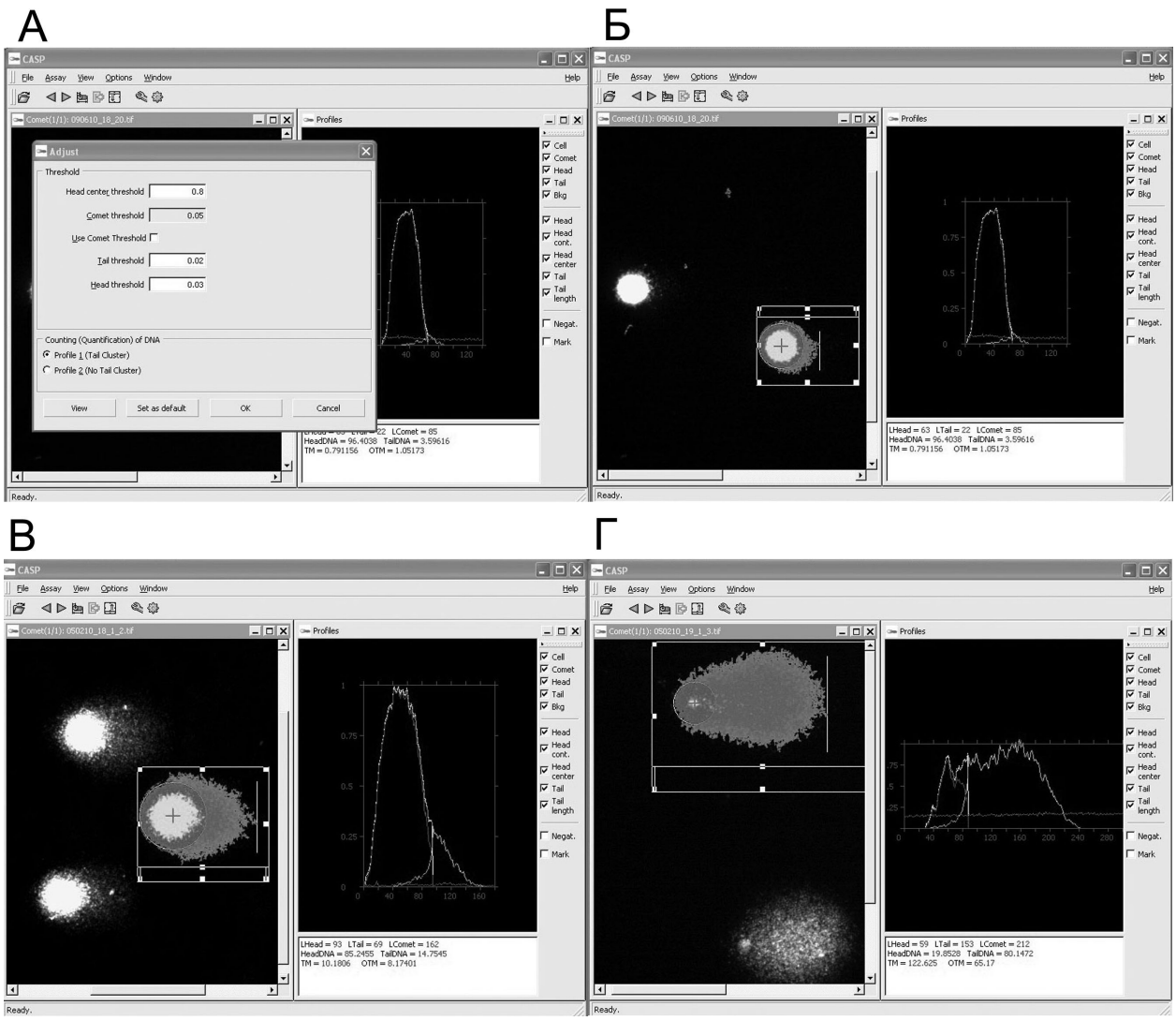

Рисунок 1 – Анализ степени повреждения ДНК в лейкоцитах периферической крови человека с помощью программы CASP 1.2.2:

А – установки программы для анализа комет Options/Ajust; Б − пример анализа кометы из контроля; В − кометы после облучения препарата ультрафиолетом УФ-*С* в течение 5 мин; Г − кометы после воздействия перекиси водорода, 100 мкмоль/л, в течение 15 мин, внизу комета с полностью фрагментированной ДНК

На рисунке 1, А показаны установки программы, которые позволяют оценивать изображения комет с наибольшей чувствительностью. При таких установках полученные значения совпадали с таковыми, определенными с помощью программы Image J (NIH, США).

С помощью программы CASP можно последовательно анализировать препараты, сохранять результаты в текстовом формате, а затем импортировать их для обработки в программу Excel (приложение Б).

С каждого препарата случайным образом с помощью высокочувствительной черно-белой камеры при постоянных установках получают не менее 50 изображений нуклеоидов. Для каждого человека оценивают состояние 150 нуклеоидов с трех препаратов. В каждом препарате вычисляют среднюю величину степени повреждения ДНК (% ДНК в хвосте) на одну клетку. Из трех полученных значений вычисляют среднюю, определяющую степень повреждения ядерной ДНК у испытуемого.

В процессе анализа могут встречаться нуклеоиды с высокой степенью повреждения (нуклеоида практически нет), так называемые «ежики» (hedgehog). Программа выделяет их как отдельную диффузную структуру (рисунок 1, Г, внизу). Это означает, что ядерная ДНК фрагментирована практически на 100%. Для сравнения показана комета с высокой степенью фрагментации ДНК, но с определяемым нуклеоидом (рисунок 1, Г, вверху) после действия перекиси водорода (в хвосте 80,15% ДНК). Случаи с полной фрагментацией нужно фотографировать, но если они редки (два-три) и их количество не превышает количества подобных клеток в контрольных препаратах, они не учитываются в анализе. Если их количество велико во всех препаратах, необходимо проверить пробы крови на выживаемость клеток. В случае увеличения частоты встречаемости таких комет в крови у людей только из испытуемой группы количество комет сравнивают с контрольными данными, и результат может служить дополнительным параметром для оценки повреждения ядерной ДНК.

4.2.4.2. Калибровка метода ЭЕК

Для получения воспроизводимых результатов процедуры метода ЭЕК необходимо выполнять, строго следуя протоколу. Для проверки правильности выполнения процедур необходимы негативный (контрольная группа) и позитивный контроль. Негативный контроль должен определяться в каждом выполняемом исследовании. Для проведения биомониторинга состояния ядерной ДНК у людей, чья профессиональная деятельность связана с действием вредных химических факторов, контроль-

ная и испытуемая группы должны содержать не менее шести участников и статистически достоверно не различаться по основным сопутствующим факторам (по полу, возрасту и соотношению курящих/некурящих).

В качестве позитивного контроля, который в данном случае определяет стабильность пробоподготовки и эффективность электрофореза, мы предлагаем использовать облучение препаратов ультрафиолетовым светом (УФ *С*, кварцевая лампа ДБ-15, максимум излучения 253,7 нм, мощность 15 Вт). Препараты – залитые в агарозу клетки крови людей из контрольной группы – облучали перед лизисом. Для этого их помещали на лед на расстоянии 35 см от источника ультрафиолета, длительность облучения – 5 мин. Степень повреждения ядерной ДНК составила 13,74 ± 0,30, референтные интервалы 11,98 ÷ 15,69 (n = 11, рисунок 1, В). В качестве положительного контроля необходимо использовать не менее двух препаратов, облученных УФ *С*, от одного из объектов контрольной группы. Позитивный контроль необязательно использовать в каждом электрофорезе. Его необходимо получать в первом и последнем электрофорезе проводимого исследования. Полученные данные считаются достоверными, если данные негативного контроля и позитивного контроля укладываются в ранее определенные референтные интервалы.

Величины референтных интервалов желательно определять при каждом новом воспроизведении метода ЭЕК (если предполагается систематический контроль за состоянием ядерной ДНК данной группы людей) или в случае, если полученные данные в контрольной группе не укладываются в ранее определенные референтные интервалы. Спонтанная величина повреждений ДНК зависит от технических характеристик камеры для горизонтального электрофореза, свойств агарозы и температурных условий проведения электрофореза. Нельзя исключать также различий по величине этого параметра между группами людей, проживающих в других регионах, и влияние сезонности.

4.2.4.3. Оценка выживаемости клеток крови

Для оценки состояния проб периферической венозной крови предлагается использовать метод двойной окраски с помощью флуоресцентных красителей: бромистого этидия и акридинового оранжевого. Проверку состояния проб необходимо вы-

полнять один раз перед исследованием, чтобы убедиться в соблюдении правил забора крови и транспортировки проб в лабораторию.

В пробирку Эппендорфа добавляют 50 мкл цельной крови, по 50 мкл раствора бромистого этидия (100 мкг/мл) и акридинового оранжевого (100 мкг/мл) в фосфатном буфере, 0,1 моль/л, pH 7,4. Суспензию перемешивают медленным пипетированием. Затем 20 мкл суспензии помещают на предметное стекло, закрывают покровным стеклом 24 х 24 мм и немедленно исследуют под флуоресцентным микроскопом в голубом свете (450–490 нм). Живые лейкоциты имеют яркую зеленую окраску, а мертвые – оранжевую или красную, ретикулоциты окрашиваются в неяркий красный цвет, зрелые, нормохромные эритроциты не окрашиваются. Случайным образом оценивают состояние 100 клеток с ядром, затем вычисляют процент погибших клеток. Метод ЭЕК можно использовать для оценки состояния ядерной ДНК в лейкоцитах периферической крови, если жизнеспособных клеток в пробе не менее 95%.

4.2.5 Статистическая оценка результатов

Сравнение рядов данных, полученных от объектов в разных группах, осуществляют с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney *U*-test). Различия считаются достоверными, если полученный уровень значимости меньше 0,05. Положительный результат позволяет сделать заключение, что испытуемая группа достоверно отличается от контрольной, т. е. действие вредного химического фактора увеличивает степень повреждения ДНК по сравнению со спонтанным уровнем в контрольной группе. Это означает, что данный химический фактор обладает генотоксическим действием.

Референтные интервалы рассчитывают как 95%-ный центральный диапазон данных в контрольной группе ($n \geq 30$) с использованием в качестве пределов 2,5-й и 97,5-й процентили.

Дополнительной характеристикой интенсивности генотоксического действия химического фактора является рассчитанная доля объектов из испытуемой группы, у которых степень повреждения ДНК выходит за границы референтных интервалов.

5. Эффективность использования метода

5.1. Метод щелочного ЭЕК является уникальным методом, который позволяет прямо оценивать степень повреждения структуры ядерной ДНК в клетках периферической крови в масштабных медицинских обследованиях людей, чья профессиональная деятельность связана с действием вредных химических факторов, в том числе и токсичных металлов. Несмотря на то, что регистрируемые повреждения ядерной ДНК частично способны репарироваться с помощью специализированной системы репарации клеток, статистически достоверное увеличение этого параметра в испытуемой группе свидетельствует о генотоксическом действии химического фактора и увеличении риска формирования заболеваний различной природы, в том числе канцерогенных.

5.2. Производительность метода регламентируется техническими характеристиками камеры для проведения электрофореза и возможностями компьютерной программы для анализа изображений. В предлагаемом варианте с использованием камеры для горизонтального электрофореза на 20 стекол и некоммерческой программы CASP 1.2.2 исследование двух групп по шесть человек в каждой занимает около 10 дней. Использование коммерческих программ для анализа, способных оценивать степень повреждения ДНК прямо с препарата, без предварительного получения цифровых изображений, позволит сократить время анализа более чем в два раза.

6. Пример использования метода ЭЕК для оценки генотоксического действия сварочных аэрозолей

Для апробации метода ЭЕК в клинико-диагностической поликлинике при Институте токсикологии ФМБА России были проведены исследования по оценке состояния ядерной ДНК лейкоцитов периферической крови пациентов, чья профессиональная деятельность связана с воздействием повышенных концентраций токсичных металлов. Группа испытуемых формировалась из профессиональных сварщиков, имеющих длительный стаж работы, или людей, работавших в сварочном цеху и подвергавшихся действию сварочных аэрозолей.

Параллельно с оценкой степени повреждения ДНК в лейкоцитах (процент ДНК в хвостах комет) определяли общую концентрацию марганца в периферической крови людей. Степень повреждения ДНК оценивали с помощью метода ЭЕК, описанного в данном руководстве. Общую концентрацию марганца в крови определяли атомно-абсорбционным методом [3].

Сначала были сформированы две равные по количественному составу группы: контроля (контроль 1) и испытуемых, которые достоверно не отличались по полу пациентов, их возрасту и соотношению курящих/некурящих (таблица 1).

Таблица 1 – Состояние ядерной ДНК в лейкоцитах и содержание марганца в крови пациентов

Условия	Концентрация марганца, мкг/л	Степень повреждения ДНК, % ДНК в хвосте	Пол: муж./жен.	Возраст, лет	Некурящие/ курящие
Контроль 1, $n = 17$	9,0 ± 1,0	2,16 ± 0,27	8/9	49,9	12/5
Контроль 2, $n = 30$	9,9 ± 1,0	2,28 ± 0,18	8/22	48,5	24/6
Испытуемые, $n = 17$	20,1 ± 2,0 $p = 0,000039$	3,58 ± 0,31 $p = 0,0019$	14/3	52,8	8/9
Примечание – сравнение данных между контрольной группой и группой испытуемых выполняли с помощью непараметрического критерия Манн–Уитни					

Из полученных результатов следует, что в группе испытуемых по сравнению с контрольной группой концентрация марганца в цельной крови и степень повреждения ядерной ДНК в лейкоцитах увеличивались (таблица 1, рисунок 2). Несмотря на значительное увеличение значений того и другого параметра корреляции между ними установить не удалось (таблица 2).

На основании результатов исследований контрольной группы 2 ($n = 30$), сформированной из людей без профессиональных контактов с вредными химическими факторами, были определены референтные интервалы спонтанных повреждений ядерной ДНК в лейкоцитах: 0,78 ÷ 4,14 %, и общего содержания марганца в крови: 1,6 ÷ 27,0 мкг/л (таблица 1).

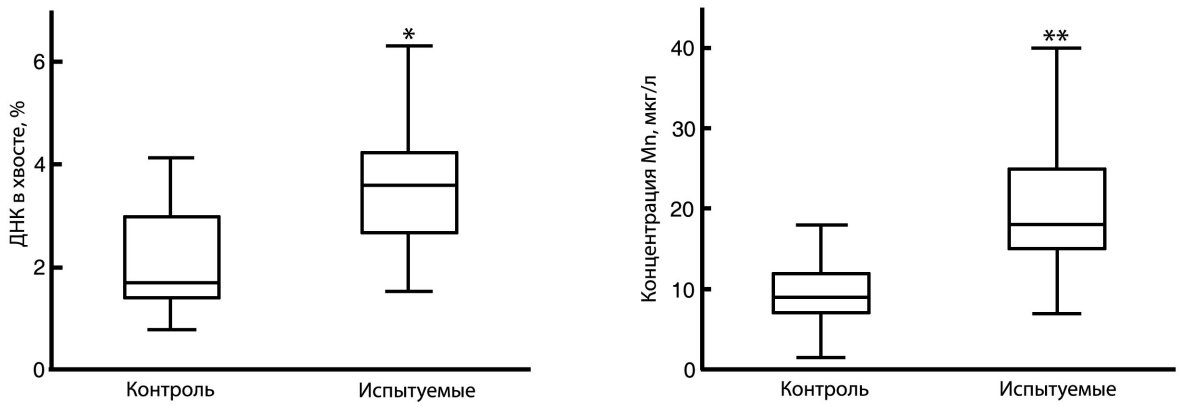

Рисунок 2 – Степень повреждения ДНК (слева) и концентрация марганца в крови (справа) у пациентов двух групп:
прямоугольники – 25-й и 75-й процентили, вертикальные отрезки – 2,5-й и 97,5-й процентили.
* – $p < 0{,}01$; ** – $p < 0{,}0001$ (критерий Манн–Уитни)

Таблица 2 – Ранговые коэффициенты Спирмена по оценке корреляции между основными параметрами в испытуемой группе

Параметр	Пол	Возраст	Концентрация марганца, мкг/л	ДНК в хвосте,%	Курящие/ некурящие
Пол	1,00	0,25	0,25	–0,13	0,13
Возраст	0,25	1,00	–0,07	–0,39	–0,06
Mn, мкг/л	0,25	–0,07	1,00	–0,44	0,28
Содержание ДНК в хвосте, %	–0,12	–0,39	–0,44	1,00	0,05
Курящие/ некурящие	0,13	–0,06	0,28	0,05	1,00

Затем объем контрольной группы был увеличен до 30 человек, чтобы рассчитать референтные интервалы.

У 17,6 % пациентов испытуемой группы отмечены показатели, превышавшие максимум референтного интервала по концентрации в крови марганца, у 23,5% – по степени повреждения ядерной ДНК лейкоцитов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о генотоксическом действии сварочных аэрозолей. Известно, что в состав аэрозолей, выделяемых при сварочных

и газорезательных работах, кроме марганца входят другие тяжелые металлы: хром, никель, кадмий, кобальт, свинец, молибден и железо. Сочетанное действие этих металлов может понижать их критическую концентрацию, способную вызывать повреждение ядерной ДНК. Корреляция между степенью повреждения ДНК и содержанием ионов марганца в крови у людей, входящих в группу испытуемых, не выявлена, что свидетельствует об отсутствии генотоксического действия ионов марганца при данных концентрациях. По-видимому, генотоксическое действие сварочных аэрозолей определяют ионы других металлов.

Приложение А
(обязательное)

Анкета обследуемого пациента

1	***Ф.И.О.***	
1.1	***ДАТА РОЖДЕНИЯ***	
2	***АДРЕС***	
3	***ДАННЫЕ АНАМНЕЗА, УСЛОВИЯ И ОБРАЗ ЖИЗНИ***	
3.1	Наличие наследственных заболеваний	
3.1.1	Психоневрологические (нет – 0, есть – 1)	
3.1.2	Онкологические (нет – 0, есть – 1)	
3.1.3	Нарушения обмена (нет – 0, есть – 1)	
3.2	Перенесенные заболевания:	
3.2.1	Гепатит (нет – 0, есть – 1)	
3.2.2	Туберкулез (нет – 0, есть – 1)	
3.3	Наличие хронических заболеваний (по системам):	
3.3.1	Психоневрологическая (нет – 0, есть – 1)	
3.3.2	Сердечно-сосудистая (нет – 0, есть – 1)	
3.3.3	Дыхательная (нет – 0, есть – 1)	
3.3.4	Пищеварительная (нет – 0, есть – 1)	
3.3.5	Костно-мышечная (нет – 0, есть – 1)	
3.3.6	Мочевыделительная (нет – 0, есть – 1)	
3.3.7	Половая (нет – 0, есть – 1)	
3.3.8	Выкидыши (нет – 0, есть – 1)	
3.4	Состоит ли на диспансерном учете (нет – 0), если да, то у:	
	Психиатра – 1, невропатолога – 2, кардиолога – 3, аллерголога – 4, дерматолога – 5, онколога – 6, отоларинголога – 7, хирурга – 8, офтальмолога – 9, эндокринолога – 10, гастроэнтеролога – 11, пульмонолога – 12, нефролога – 13.	
3.4.1	Дата последнего флюорографического исследования	
3.4.2	Какие лекарства принимает в настоящее время (мутагенное действие: нет – 0, есть – 1)	
3.4.3	Был ли подъем температуры на предыдущей неделе.	
3.5	Есть ли инвалидность: нет – 0, группа инвалидности (1, 2, 3)	
3.5.1	Инвалидность (не связана с действием токсических веществ – 0, связана с профессиональной вредностью – 1, связана с действием токсических веществ в других условиях – 2)	
3.6	Семейное положение (женат – 1, холост – 2, разведен – 3)	
3.7	Образование (ниже среднего – 1, среднее – 2, высшее – 3)	
3.8	Профессиональная занятость (работает – 1, не работает – 2, учится – 3)	
3.8.1.	Интенсивность физических нагрузок	
3.9	Курение (нет – 0, да – 1, количество сигарет в день, бросил – 2)	
3.10	Потребление алкоголя (нет – 0, иногда – 1, часто – 2)	
3.10.1	Потребление наркотических веществ (нет – 0, иногда – 1, постоянно – 2)	
3.11	Жилищные условия (квартира отдельная – 1, коммунальная – 2, общежитие – 3)	
3.12	Сколько человек проживает __, сколько комнат занимают __	

3.13	Год постройки дома (до 1960 – 1, после 1960 – 2, после 1992 – 3)		
3.14	Этаж (этаж _, подвальное помещение – 0)		
3.15	Используются ли в квартире пахучие, ядовитые вещества (нет – 0, лаки – 1, краски – 2, лужение – 3, зарядка аккумулятора – 4)		
	ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАМНЕЗ		
4.1	Связана ли работа с токсическими веществами (нет – 0, да – 1)		
4.2	Если да, то: свинец, кадмий, висмут, таллий, медь, цинк, ртуть, марганец, другое _____ (нет – 0, есть – 1)		
4.3	Стаж работы во вредных условиях (недели – 1, месяцы – 2, годы (1–5) – 3, больше 5 – 4)		
4.4	Последний контакт с профессиональной вредностью (дни – 1, недели – 2, месяцы – 3, годы – 4, по настоящее время – 5)		
4.5	Название вещества, с которым был контакт в других условиях ____		
4.5.1	Место этого контакта (работа – 1, дом – 2, улица – 3)		
4.5.2	Причина, вызвавшая контакт (неправильное хранение – 1, авария – 2, криминал – 3)		
4.5.3	Время между контактом и обращением (дни – 1, недели – 2, месяцы – 3, годы – 4)		
4.5.4	Частота контакта (однократно – 1, многократно – 2, постоянно – 3)		
4.5.5	Длительность одноразового контакта (минуты – 1, часы – 2)		
4.5.6	Пути поступления вещества (дыхательный – 1, алиментарный – 2, кожа – 3)		
4.5.6.1	Был ли контакт с повышенной радиацией (работа – , или проживание –)		
4.6	Содержание тяжелых металлов в биосредах:		
	В крови	В моче	
	свинец медь кадмий цинк висмут таллий марганец другие	свинец медь кадмий цинк висмут таллий марганец другие	

Приложение Б
(рекомендуемое)

Анализ изображений в программе CASP 1.2.2

Для инсталляции программы запустить инсталлятор и следовать инструкциям. После инсталляции поместите ярлык casp.exe из Program Files/Casp на рабочий стол, а ярлык автоматически созданный программой при инсталляции удалить.

Для анализа в программе CASP используют цветные или серые цифровые изображения в формате TIF 800x600 пикселей (8 или 16 бит). Мы использовали для получения цифровых изображений черно-белую охлаждаемую камеру DS-2MBWc (Nikon, Япония). Серые цифровые изображения получали в формате 12 бит, при сохранении их конвертировали в TIF 16 бит (NIS Elements for basic research).

Полученные цифровые изображения анализировали в программе CASP 1.2.2 следующим образом:

– После запуска программы CASP установить параметры для анализа Options/Adjust (рисунок А.1, А). После установки показанных на рисунке параметров необходимо нажать кнопку Set as default, что позволяет сохранить установленные параметры как параметры по умолчанию, т. е. они будут использоваться при каждом последующем открытии программы.

– Для загрузки файла File/Select files (Ctrl-F) выбрать файл для анализа.

– Развернуть окно всей программы, сдвинуть окно Profiles в правый край экрана. Окно Comet с загруженным изображением увеличить до полного размера изображения.

– Удерживая левую кнопку мыши в нажатом состоянии, развернуть рамку для анализа до размера, необходимого для анализа всех изображений в данном препарате. Можно немного уменьшить площадь фонового прямоугольника, чтобы увеличить полезную площадь прямоугольника для анализа комет. Все кометы должны быть развернуты в горизонтальном положении так, чтобы хвост был с правой стороны. Удобнее учитывать это при съемке.

– Активировать Assay/Set measurements (Ctrl-M), после этого размеры рамки изменить нельзя. Остается доступной возможность переворачивать рамку определения фона, если это необходимо.

– Рамку последовательно помещают над каждым изображением кометы, пригодным для анализа. Следует выбирать отдельно лежащие кометы, имеющие округлый нуклеоид. Рамка должна размещаться таким образом, чтобы в область узкого прямоугольника для оценки фона не попадали инородные частицы. После кратковременного нажатия правой кнопки мыши появляется меню, в котором нужно кликнуть по Assay (Ctrl-A). Для проверки качества выделения составных частей кометы справа от экрана Profiles пометить в среднем меню опции Head и Tail. Кометы, у которых программа выделяет хвост, начинающийся раньше середины нуклеоида (рисунок А.1, Б), в анализе не учитываются. Эти случаи связаны с ярким артефактным сиянием вокруг нуклеоида кометы (halo). Если на выделенном изображении нет артефактов, которые могут возникать из-за близости соседних комет или остатков лизированного содержимого клетки, необходимо правой кнопкой кликнуть в появившемся меню по Store (Ctrl-S). Это сохраняет результаты анализа в памяти программы. После этого рамку передвигают на следующую комету и повторяют перечисленные операции.

– После анализа всех изображений можно сохранить результаты в специальном файле программы (File/Save results или нажать Ctrl-V), а затем в текстовом файле (Export results или Ctrl-P) для последующего импорта в Excel.

– Для загрузки текстового файла в Excel нужно открыть в нем Данные/Импорт внешних данных/Импортировать данные. Найти необходимый файл и нажать на кнопку Открыть, в открывшемся меню оставить По разделителям, в поле формат файла выбрать Windows ANSI и нажать Далее. В следующем меню снять метку По Табуляции, выделить Пробел и нажать Готово. В последнем меню, определяющем место вставки таблицы (A1), нажать ОК.

Библиография

[1] Valverde M., Rojas E. Comet assay in human biomonitoring // Issues of Toxicology – 2010. – № 5 – P. 227–266.

[2] Дурнев А. Д., Жанатаев А. К., Анисина Е. А., Сидневой Е. С., Оганесянц Л. А., Середин С. Б., Бекиш В. Я., Чернуха И. М. Применение метода щелочного электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений // Методические рекомендации. М. – 2006. – 27 с.

[3] Глушков Р. К., Иваненко А. А., Иваненко Н. Б, Рутковский Г. В. Методика выполнения измерений массовой концентрации марганца, алюминия, хрома и титана в крови и плазме крови человека атомно-абсорбционным методом // Методические указания по методам контроля, МУК 4.1.046-08. М. – 2008. – 15 с.

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное учреждение науки

«ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ»

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Оценка степени повреждения ядерной ДНК в клетках периферической крови человека с помощью щелочного электрофореза единичных клеток при медицинских осмотрах работников, профессионально связанных с воздействием токсичных металлов

Методические рекомендации

ФМБА России Р.12. -2011

Директор Института, д.м.н., профессор	С. П. Нечипоренко
Заместитель директора Института, д.м.н.	Е. Ю. Бонитенко
Заведующий лабораторией №7, д.м.н., профессор	А. Н. Петров
Главный метролог	И. В. Александрова

Исполнители:

Научный руководитель – заведующий лабораторией, д.м.н, профессор	А. Н. Петров
Ответственный исполнитель – ведущий научный сотрудник, к.б.н., старший научный сотрудник	Н. В. Томилин