

ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЯ УШКОДЖЕННЯ ДНК КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ДОВГОТРИВАЛОМУ ВЖИВАННІ НИМИ МАЛИХ ДОЗ КАДМІЮ

У Сі, А. Плотніков, І. Пиріна, К. Кот, Ю. Кот, Є. Перський

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, кафедра біохімії
майдан Свободи, 4, Харків 61022, Україна
e-mail: kot.juriy@gmail.com*

Багато досліджень довели генотоксичність іонів кадмію, в тому числі їхню здатність викликати ушкодження ДНК і хромосомні аберації. Значна частина робіт описує токсичний ефект великих доз кадмію при одноразовому потрапленні до організму. Водночас робіт, у яких досліджувався цито- і генотоксичний вплив малих доз іонів кадмію на клітини кісткового мозку ссавців за умов довгострокового вживання цього металу з питною водою, практично немає. Методами аналізу мікроядер і ДНК-комет досліджено ступінь ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при вживанні з питною водою іонів кадмію у дозі 1 мкг/кг на добу протягом 15 і 36 діб. У роботі використовували безпородних білих щурів-самців віком 3 місяці та масою 190-220 г. Клітинний матеріал кісткового мозку отримували з губчастої речовини стегнової кістки. Виявлено, що довготривале вживання з питною водою іонів кадмію призводить до збільшення кількості клітин з мікроядрами та фрагментованої ДНК. Рівень ушкодження ДНК збільшується зі зростанням строків споживання солей кадмію.

Ключові слова: клітини кісткового мозку, мікроядра, комет-аналіз, ДНК, кадмій.

Багато досліджень довели генотоксичність іонів кадмію, в тому числі їхню здатність викликати ушкодження ДНК і хромосомні аберації [3, 5, 7, 10-12, 15]. Значна частина робіт відображає токсичний ефект великих доз кадмію при одноразовому їх потрапленні до організму. В той же час робіт, у яких досліджувався цито- і генотоксичний вплив малих доз іонів кадмію на клітини кісткового мозку ссавців за умов довгострокового вживання ними цього металу з питною водою, практично немає. У даній роботі досліджено ступінь ушкодження ДНК клітин кісткового мозку щурів при довготривалому вживанні ними з питною водою малої дози іонів кадмію. Згідно з [6, 13, 14], малою дозою є така доза токсиканта, яка перевищує поріг MRL (0,5 мкг/кг/добу, рівень щодобового впливу кадмію на організм протягом 15-365 діб без ризику виникнення побічних ефектів), проте є нижчою ніж доза мінімального цитотоксичного ефекту за умов одноразового введення кадмію (5-8 мкг/кг/добу).

Матеріали та методи

У роботі використовували безпородних білих щурів-самців віком 3 місяці та масою 190-220 г, яких утримували у стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. За два тижні до експерименту вибірка тварин переводилася на питну воду, протестовану на відсутність іонів кадмію (вода «Малютко», в-во «Еконія»). Харчовий раціон не змінювався.

Тварини отримували *per os* воду, що містила іони кадмію, через стальний зонд ($l=15\text{cm}$, $D_{\text{внешн.}}=1\text{mm}$) протягом 15 і 36 діб. Через кожну добу перед введенням тварин зва-

жували натщесерце та проводили індивідуальний розрахунок розчину так, щоб концентрація іонів кадмію на одиницю маси тіла тварини щодоби була однаковою, а саме 1 мкг Cd^{2+} /кг/добу. Для приготування розчину, що містив іони кадмію, використовували $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$.

Експериментальні тварини були розділені на такі групи:

1. Тварини, що отримували воду без іонів кадмію протягом 36 діб.
2. Тварини, що отримували з водою 1 мкг Cd^{2+} /кг/добу протягом 15 діб.
3. Тварини, що отримували з водою 1 мкг Cd^{2+} /кг/добу протягом 36 діб.
4. Тварини, що отримували протягом 35 діб воду без іонів кадмію, а на 36 добу отримували одноразово токсичну дозу кадмію – 10 мкг/кг/добу.

На 15-ту і 36-ту добу тварин виводили з експерименту, дотримуючись етичних норм згідно з Законом України [1].

Клітинний матеріал кісткового мозку отримували з речовини стегнової кістки методом [4]. Отримані клітини використовували для оцінки ступеня ушкодження ДНК двома методами – методом аналізу мікроядер і методом ДНК-комет. Перший метод дає змогу виявити в ядрах клітин мікроядра, що утворюються при структурних хромосомних абераціях або унаслідок апоптозу. Другий метод допомагає кількісно оцінити ступінь фрагментації ядерної ДНК у клітинах.

Для аналізу мікроядер одну частину отриманих клітин фіксували на скляних слайдах і фарбували флуоресцентним барвником акридиновий помаранчевий [9]. Препарати аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus IMT2 за довжини хвилі збудження 488 нм, використовуючи бар'єрний фільтр 605 nm. Проводили детекцію та підрахунок клітин із ядрами, в яких спостерігалися мікроядра. Загальна кількість проаналізованих клітин для кожної групи тварин становила не менше 2000.

Щоб оцінити ступінь фрагментації ядерної ДНК, отримані клітини іммобілізували в шарі агарозного гелю на поверхні скляного слайда для комет-аналізу CometSlides™, після чого проводили лізис клітин, відмивання внутріклітинних білків і електрофоретичне розділення ядерної ДНК [2]. За наявності фрагментації ДНК її фрагменти в електричному полі формують треки, довжина і площа яких будуть залежати від ступеня ушкодження ДНК. Для візуалізації результату розділення препарати оброблювали ДНК-специфічним флуоресцентним барвником пропідій йодидом і аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus IMT2 за довжини хвилі збудження 535 нм, використовуючи бар'єрний фільтр 635 нм. Доріжки ДНК фотографували й аналізували, використовуючи програмне забезпечення CASPlab [8]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету програми Origin 7.5 pro. Результати представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартне відхилення. Достовірними вважали результати з $p \leq 0,05$.

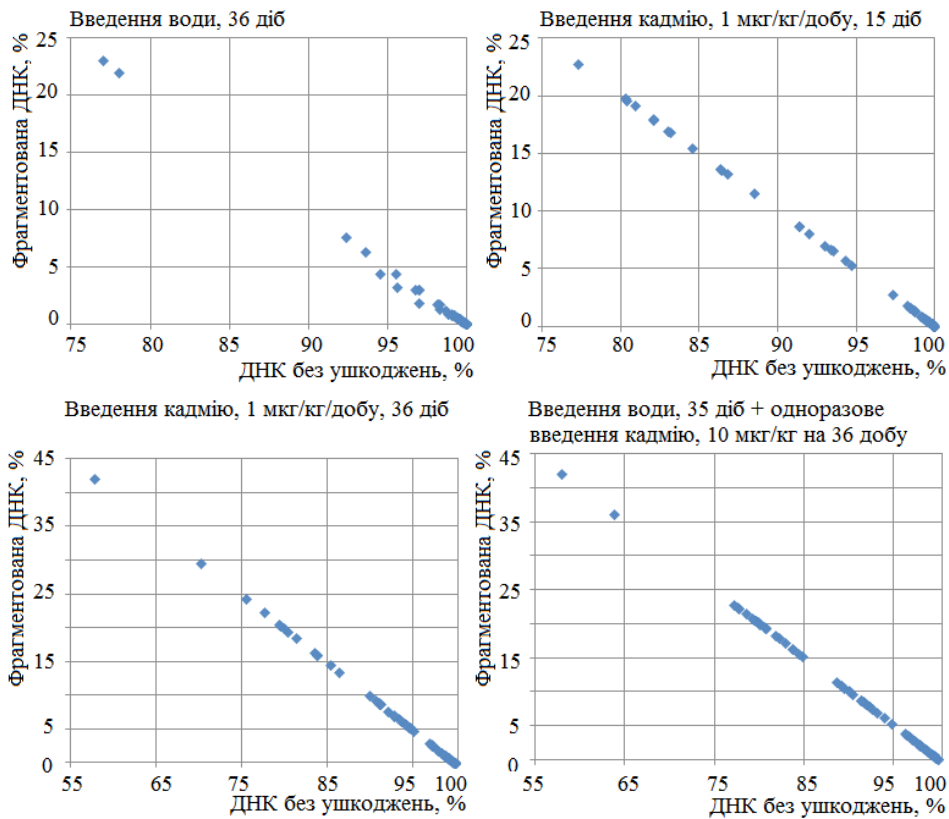
Результати і їхнє обговорення

Результати проведених досліджень вказують на те, що довготривале вживання з питною водою іонів кадмію протягом 36 діб у дозі 1 мкг/кг на добу має цитотоксичний ефект на рівні ушкодження ДНК – кількість клітин кісткового мозку з мікроядрами збільшується майже у 3,5 разу, а відсоток клітин із фрагментованою ДНК – у 2,2 разу. Крім того, кількість мікроядер (див. таблицю) та ступінь фрагментації ДНК (див. рисунок) у клітинах кісткового мозку залежать від тривалості споживання кадмію з питною водою – токсична дія цього іона на 36-ту добу більша, ніж на 15-ту добу.

Вплив довготривалого вживання іонів кадмію з питною водою на кількість клітин кісткового мозку щурів з мікроядрами (од.; $M \pm m$; $n = 6$)

Експериментальна група тварин	Кількість клітин, од.
Введення води без кадмію, 36 діб (контроль)	53,00± 8,79
Введення води з кадмієм, 1 мкг/кг/добу, 15 діб	151,33±12,25*
Введення води з кадмієм, 1 мкг/кг/добу, 36 діб	192,33±18,47*
Введення води без кадмію, 35 діб + одноразове введення кадмію в дозі 10 мкг/кг на 36-ту добу	138,17± 15,76#

Примітки: * – зміни вірогідні ($p < 0,05$) від контролю та 15 діб введення кадмію; # – зміни вірогідні ($p < 0,05$) від контролю і 36 діб введення кадмію.



Розподіл фрагментованої та неушкодженої ядерної ДНК у клітинах кісткового мозку щурів за умов довгострокового вживання ними іонів кадмію, %

Показано, що тривале введення іонів кадмію в дозі 1 мкг/кг/добу має більший токсичний ефект ніж одноразове введення значно більшої дози (10 мкг/кг), що, можливо, пов'язано з кумулятивною дією цього іона.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». К., 2008. Електронний документ. Режим доступу: <http://www.uapravo.net/data/base12/ukr12108.htm>
2. Dhawan A., Bajpayee M., Pandey A. K., Parmar D. Protocol for the single cell gel electrophoresis / Comet assay for rapid genotoxicity assessment. Електронний документ. Режим доступу: <http://www.cometassayindia.org/protocol%20for%20comet%20assay.pdf>

3. Patar A., Giri A., Boro F. et al. Cadmium pollution and amphibians. Studies in tadpoles of *Rana limnocharis*// Chemosphere. 2016. Vol.144. P.1043-1049.
4. Benton C. B. Bone marrow isolation, crushing technique. Millipore Bone Marrow Harvesting and Hematopoietic Stem Cell Isolation Kit protocol. 2009. Електронний документ. Режим доступу: <http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/Isolation-of-Bone-Marrow-by-Bone-Crushing.pdf>
5. Bork U., Lee W. K., Kuchler A. et al. Cadmium-induced DNA damage triggers G(2)/M arrest via chk1/2 and cdc2 in p53-deficient kidney proximal tubule cells// Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2010. Vol. 298, N 2. P. 255-265.
6. Cadmium in Drinking-water. Background document for development of World Health Organization Guidelines for Drinking-water Quality, 2011. Електронний документ. Режим доступу: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf
7. Jindal R., Verma S. *In vivo* genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton)// Ecotoxicol. Environ. Saf. 2015. Vol. 118. P. 1-10.
8. Końca K., Lankoff A., Banasik A. et al. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay// Mutation Research. 2003. Vol. 534. P.15-20.
9. Oliveira-Martins C. R., Grisolia C. K. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide// Genet. Mol. Res. 2007. Vol. 6 (3). P. 566-574.
10. Rozgaj R., V., Fucic A. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests // Journ. Trace Elem. in Med. and Biol. 2002. Vol. 16, N 3. P. 187-92.
11. Anthony S., Sims J. N., Yedjou C. G., Tchounwou P. B. Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress// Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016. Vol.13. P. 88.
12. Slebos R. J., Li M., Eyjen A. N. et al. Mutagenic effect of cadmium on the tetranucleotide repeats in human cells// Mutat. Res. 2006. Vol. 602. P. 92-99.
13. Toxicological profile for cadmium. U.S. department of health and human services. September 2012. Електронний документ. Режим доступу: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>
14. Verordnung (EU) Nr. 488/2014 der Kommission vom 12. Mai 2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 bezüglich der Höchstgehalte für Cadmium in Lebensmitteln. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit. Електронний документ. Режим доступу: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0488&from=DE>
15. Yuan Ya, Bian J. C., Liu X. Z. et al. Oxidative Stress and Apoptotic Changes of Rat Cerebral Cortical Neurons Exposed to Cadmium *in Vitro* // Biomed. Environ. Sci. 2012. Vol. 25, N 2. P.172-181.

Стаття: надійшла до редакції 22.07.16
доопрацьована 31.08.16
прийнята до друку 5.09.16

**THE INVESTIGATION OF DAMAGE EXTENT OF DNA
FROM RAT BONE MARROW CELLS UNDER THE LONG-TERM
CONSUMPTION OF LOW DOSES OF CADMIUM**

Wu Si, A. Plotnikov, I. Pyrina, K. Kot, Yu. Kot*, Ye. Persky

*V. N. Karazin Kharkiv National University, Biochemistry Department
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine
e-mail: kot.juriy@gmail.com*

Many studies have shown the genotoxicity of cadmium ions including their ability to induce DNA damage and chromosomal aberrations. Considerable amount of works shows the toxic effect of high doses of cadmium under their onetime entering the organism. At the same time studies, that investigate the cyto- and genotoxic effect of cadmium ions low-doses on mammalian bone marrow cells under long-term uptake with drinking water, are almost completely absent. By using the methods of micronuclei and DNA comet analysis, the damage extent of DNA from rat bone marrow cells under the consumption by rats of cadmium ions at a dose of 1 µg/kg per day with drinking water for 15 or 36 days was investigated. White outbred male rats of age 3 month and 190-220 g body weight were used in the work. Cellular bone marrow material was obtained from the cancellous tissue of thighbone. The experiments showed that the long-term consumption of cadmium ions with drinking water leads to DNA damage, and the extent of these damages rises with increasing of cadmium consumption terms.

Keywords: bone marrow cells, micronuclei, comet analysis, DNA, cadmium.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК КЛЕТОК КОСТНОГО
МОЗГА КРЫС ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОМ УПОТРЕБЛЕНИИ ИМИ МАЛЫХ
ДОЗ КАДМИЯ**

У Си, А. Плотников, И. Пырина, Е. Кот, Ю. Кот, Е. Перский

*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, кафедра
биохимии
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина
e-mail: kot.juriy@gmail.com*

Многие исследования показали генотоксичность ионов кадмия, в том числе их способность вызывать повреждения ДНК и хромосомные aberrации. Значительная часть работ отражает токсический эффект высоких доз кадмия при однократном их попадании в организм. В то же время работы, в которых было бы исследовано цито- и генотоксическое влияние малых доз ионов кадмия на клетки костного мозга млекопитающих в условиях длительного потребления ими этого металла с питьевой водой, практически отсутствуют. Используя методы анализа микроядер и ДНК-комет исследована степень повреждения ДНК клеток костного мозга крыс при употреблении ими с питьевой водой ионов кадмия в дозе 1 мкг/кг массы тела в сутки на протяжении 15 и 36 суток. В работе были использованы беспородные белые крысы-самцы возрастом 3 месяца и массой 190-220 г. Клеточный материал костного мозга получали из губчатого вещества бедренной кости. Показано, что длительное употребление с питьевой водой малой дозы кадмия приводит к повреждению ДНК, степень которого повышается с увеличением сроков употребления кадмия.

Ключевые слова: клетки костного мозга, кадмий, ДНК, микроядра, метод ДНК-комет.