

Лабораторная р а б о т а 2. ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

Установлено, что под влиянием различных факторов внешней среды (физических, химических, физиологических) в клетках возникают изменения хромосом, которые называются хромосомные aberrации или хромосомные мутации. Выявление хромосомных aberrаций является дополнением к биохимическим, физиологическим и морфологическим тестам, позволяющим оценить реакцию организма на влияние различных факторов. В отличие от других методов учет хромосомных aberrаций в клетках позволяет судить о последствиях действия вредных факторов не только на данный организм, но и в некоторой мере прогнозировать наследственные изменения в будущих поколениях. Кроме этого, повреждение генетического аппарата клетки лежит в основе регистрируемых нарушений биологических реакций организма и, следовательно, оно является первым индикатором вредного влияния внешних факторов, в том числе и ионизирующих излучений, на организм задолго до развития патологических процессов, приводящих к изменениям в организме и гибели организма.

В лабораторной работе используется метод учета хромосомных aberrаций на стадии анафазы соматических клеток крови млекопитающих.

Основной причиной гибели клеток при облучении являются структурные повреждения молекулы ДНК, которые обнаруживаются цитологическим методом в виде хромосомных перестроек или aberrаций хромосом. К концу 1940 года были классифицированы все виды хромосомных aberrаций, и началось изучение связи возникновения хромосомных aberrаций с дозой облучения. Хромосомы состоят из ДНК и белков-гистонов. Они хорошо видны при делении клеток. При облучении клеток высокими дозами с хромосомами происходит два основных процесса: 1) разрыв хромосом и хроматид. Хроматиды образуются в анафазе при разделении хромосом центромерами. 2) соединение их разорванных концов с образованием различных структур.

Выделяют структурные и количественные хромосомные aberrации. При структурных aberrациях количество хромосом не изменяется, а при количественных – уменьшается или увеличивается (полиплоидия, гаплоидия и анеуплоидия). Хромосомные aberrации разделяются на внутривхромосомные (делеции, инверсии, инсерции и дубликации) и межхромосомные (обмены участками или транслокации). В зависимости от времени возникновения в митотическом цикле клетки aberrации разделяются на хромосомные и хроматидные. Хромосомные aberrации возникают в G_1 -периоде, а хроматидные в конце S -периода и в конце G_2 -периода. В репродуктивной гибели клеток основную роль играют такие хромосомные aberrации, как делеции (образование фрагментов хромосом) и транслокации (межхромосомные обмены).

Делеции бывают концевые и внутренние. При концевых делециях образуются ацентрические фрагменты (т.е. части хромосом без центромеры) в результате повреждения одного или двух плечей хромосомы и кольцевая хромосома, которая образуется при замыкании двух поврежденных плечей в кольцо. Кольцевые хромосомы могут делиться в анафазе, распрямляться, переплетаться и образовывать петли и различные конфигурации в виде цепочек и петель. Они регистрируются только во время первого пострадиационного митоза, затем теряются с частотой 50% на деление. При внутренних делециях в результате двойного разрыва хромосомы выпадает её фрагмент. Оставшиеся части хромосомы соединяются и формируют укороченную хромосому. Фрагменты хромосом остаются в цитоплазме и образуют микроядра в одной из дочерних клеток. В клетке одновременно может повреждаться не одна, а несколько хромосом. Образование фрагментов приводит к потере генетической информации клеток. Потеря фрагментов не всегда приводит к гибели клеток в первых митозах. Гибель происходит в более поздних митозах (после 5-го митоза). Фрагментация хромосом при облучении

клеток является одной из основных хромосомных aberrаций при хроническом облучении малыми дозами клеток растений, животных и человека, находящихся в зонах радиоактивного загрязнения.

Межхромосомные обмены могут быть симметричные (между гомологичными участками хромосом) и асимметричные (между негомологичными участками хромосом). Завершенные симметричные обмены не вызывают потерь генетического материала, не препятствуют делению клеток. В результате асимметричных обменов образуются: 1) дицентрические мосты, представляющие собой тяж (фрагмент) из хромосомного материала в области экватора между двумя дочерними клетками при делении материнской клетки; 2) кольцевые хромосомы; 3) микроядра из фрагментов. Мосты препятствуют нормальному расхождению хромосомного материала к полюсам клетки в анафазе и делению клеток, что приводит к гибели клетки. Завершенные асимметричные обмены, или реципрокные транслокации, являются источниками генетических нарушений, которые накапливаются в клетках и передаются из поколения в поколение, создавая “генетический груз” популяции и способствуя появлению мутаций.

При хроническом облучении растений, произрастающих в зоне отчуждения и отселения, типичными хромосомными aberrациями являются фрагментация хромосом, кольцевые хромосомы и реципрокные транслокации.

Структурные aberrации хроматидного типа возникают во время удвоения и после удвоения хромосом. Хроматидные aberrации могут захватывать одну хроматиду, обе хроматиды или часть её поперечного сечения. Для хроматидных aberrаций характерны разнообразные межхроматидные обмены и более высокая степень незавершенности обменов.

Для изучения действия ионизирующих излучений на клетки с использованием метода учета хромосомных aberrаций в качестве объектов используют лимфоциты периферической крови, костный мозг, кожу, эмбриональную ткань, селезенку, лимфатические узлы, почки, а также клетки любых тканей, обладающих высокой митотической активностью.

При изучении действия ионизирующего излучения на клетки в условиях *in vitro* чаще используется культура лимфоцитов периферической крови. Это определяется следующими преимуществами лимфоцитов:

- простая процедура получения материала;
- большая часть клеток лимфоцитов циркулирует в периферической крови на предсентетической стадии интерфазы, поэтому анализируется высоко синхронизированная популяция клеток;
- широкая изменчивость биологических процессов на всех стадиях интерфазы лимфоцитов в культуре;
- хорошо изучен спонтанный (или естественный) мутационный процесс, что является необходимым условием при исследовании мутаций, вызванных другими факторами.

Культура эмбриональных фибробластов также используется для качественной оценки радиобиологической реакции на действие ионизирующих излучений. Однако, более сложная техника культивирования культуры эмбриональных тканей ограничивает применение ее в качестве тест-объекта.

Анализ эффекта мутагенных факторов, действующих в условиях *in vivo*, можно проводить на основе учета хромосомных aberrаций лимфоцитов периферической крови или костном мозге у лиц, которые находились в контакте с ионизирующим излучением или с другим мутагенным фактором.

При изучении хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови небольшое количество крови для мазков у животных берут из сосудов ушной вены, у кур – из гребня, у уток и гусей – из мякоти ступней ног, у мышей – из хвоста. Большое количество крови у крупного рогатого скота и лошадей берут из яремной вены, у свиней – из вены, кончика хвоста, у собак – из бедренной вены, у кроликов – из ушной вены.

Взятую для исследования кровь стабилизируют, для этого перед взятием крови в пробирки вносят один из стабилизаторов в сухом виде из расчета на 10 мл крови лимоннокислого натрия – 0,02 г, щавелевокислого натрия – 0,01-0,02 г, фтористого натрия – 0,01 г. Кровь можно хранить не более 1 суток. Для стабилизации крови применяют также гепарин из расчета 5 единиц на 1 мл крови и динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) 1-2 капли 10 % раствора на 5 мл крови.

Клетки костного мозга являются удобным объектом для анализа *in vivo*, так как в организме они находятся на разных стадиях деления. Поэтому эти клетки можно использовать в качестве тест-объекта для оценки эффекта различных факторов, с учетом того обстоятельства, что мутагенный эффект проявляется наиболее эффективно на отдельных стадиях интерфазы. Однако, процедура получения клеток костного мозга может ограничивать проведение анализа хромосомных aberrаций. Поэтому основным тест-объектом при изучении действия ионизирующих излучений в условиях *in vivo* являются лимфоциты периферической крови. Они длительное время циркулируют в периферическом кровотоке, аккумулируя мутагенное действие повреждающего фактора. При сходных условиях (величина дозы облучения, цикл клеточного развития и др.) можно проверить и сравнить радиобиологический эффект *in vivo* и *in vitro*. Вместе с тем следует указать на существенный недостаток при использовании лимфоцитов периферической крови в качестве тест-объектов – поражающий эффект излучения проявляется и регистрируется не на всех клетках лимфоцитов. Среди клеток лимфоцитов имеются радиоустойчивые клетки (G_0), которые находятся в стадии покоя, поэтому эти клетки не анализируются, а анализируются только клетки, находящиеся в стадиях клеточного цикла.

Методика забора лимфоцитов из костного мозга. Пункцию грудной кости у коров, лошадей производят без повала, привязав животных, а свиньи, овцы, козы и собаки фиксируются в лежащем боковом положении. Проколы иглой кожи, мышц и надкостницы производят стерильной иглой без анестезии. Пункцию берут из грудной кости в области 1, 2 и 3-го сегментов. В этой области грудной клетки шерсть выстригают, протирают кожу спиртом, проколочную иглу вводят под углом 35–60 градусов, с расчетом попадания ее в центральную часть губчатого вещества кости. Взятие пункции проводят медленно, постепенно погружая иглу в костную ткань. Убедившись, что игла находится в губчатой части грудной кости, пунктат осторожно насасывают из проколочной иглы в шприц в объеме 0,2–0,3 мл. Место укола после пункции смазывают 5 % настойкой йода.

Из взятого пунктата первые 2 капли используют для бактериального посева, остальной пунктат выпускают из шприца на небольшое часовое стекло, покрытое парафином, затем прибавляют к нему 2–3 капли 2,1 % раствора лимоннокислого натрия (для предохранения препарата от свертывания). Осторожным покачиванием стекла перемешивают жидкость и при помощи стеклянной палочки наносят небольшие капли пунктата на предметное стекло для приготовления тонких мазков. Для предотвращения свертывания пунктата и уменьшения деформации клеток мазки следует делать на слегка подогретых предметных стеклах. Мазки пунктата костного мозга окрашивают по методу Романовского-Гемзы.

Приготовление и окрашивание мазков крови заключается в следующем. Мазки крови готовят на чистых предметных стеклах, которые хранят в смеси спирта и эфира (в равных соотношениях) в банке с притертой крышкой. Перед использованием стекло извлекают пинцетом и просушивают. На предметное стекло наносят каплю крови и делают тонкий, равномерный по густоте, без размывов мазок, занимающий не менее 2/3 длины предметного стекла и уже предметного стекла. Мазки высушивают на воздухе. На высушенном мазке отмечают дату и номер. Подсушенные мазки подлежат обязательной дальнейшей фиксации. Для чего фиксатор наливают на мазок, однако лучше мазок помещать полностью в фиксатор налитый в банку с притертой крышкой. Лучшим фиксатором является химически чистый метиловый спирт нейтральной реакции, в котором мазки выдерживают 5 минут. В качестве фиксаторов используют также абсолютный этиловый спирт (время фиксации 20-30 мин); ацетон (5 мин); смесь спирта и

эфира в равных количествах (10-20 мин); смесь ацетона и метилового спирта в равных количествах (5 мин).

После фиксации производят окрашивание мазков. Для получения хорошего окрашивания необходимо, чтобы вода, используемая для разведения красителей, имела нейтральную реакцию. При использовании воды кислой реакции мазки окрашиваются в интенсивно красный цвет, а щелочной реакции – в темно-синий цвет. Правильно окрашенные мазки имеют розовато-фиолетовый цвет. При окрашивании мазков по методу Романовского-Гемзы обычно используют готовые красители Романовского-Гемзы следующего состава: азор – 0,8 г; эозин – 3 г; глицерин химически чистый – 250 мл; метиловый спирт химически чистый нейтральной реакции – 250 мл. Перед использованием краситель разводят дистиллированной водой нейтральной реакции, для чего на 1 мл воды берут 1-2 капли красителя. Предварительно фиксированный препарат кладут на подкладки (обычно используют спички без серы) в чашку-Петри мазком вниз и наливают под мазок раствор красителя, чтобы краситель не покрывал полностью стекло. В зависимости от температуры окружающей среды окрашивание продолжается 15-30 минут (чем выше температура, тем быстрее происходит окрашивание). Затем препарат отмывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. На высушенный препарат наносят каплю бальзам, покрывают тонким покровным стеклом и производят учет хромосомных aberrаций в клетках крови с использованием микроскопа.

Цель работы: ознакомление с методическими основами учета хромосомных aberrаций и приобретении навыков в выявлении хромосомных aberrаций на временных и постоянных препаратах.

Материал и оборудование: препараты клеток костного мозга крысы (облученных и необлученных животных), микроскоп, атлас хромосомных aberrаций, схема набора хромосом крысы, схема учета хромосомных aberrаций при метафазном методе анализа, схема жизненного цикла клетки, где показано расположение хромосом в клетке по фазам клеточного цикла, протокол цитогенетического анализа, калькулятор.

Выполнение работы: 1. Подготовить микроскоп к работе согласно инструкции. 2. Произвести цитогенетический анализ препаратов крови костного мозга облученных и необлученных животных. 3. Пользуясь микроскопом на препаратах выбрать все клетки, находящиеся в анафазе (обычно просматривается до 100 клеток). В соматических клетках крысы содержится 42 хромосомы в том числе 26 ацентрических хромосом, 14 метацентрических хромосом и 2 субметацентрические хромосомы. При облучении это соотношение хромосом может нарушаться. В каждой просматриваемой клетке произвести подсчет ацентрических и метацентрических хромосом, обнаруженных хромосомных aberrаций и записать в протокол цитогенетического анализа. Форма протокола выдается преподавателем при выполнении лабораторной работы. 4. Пользуясь данными протокола цитогенетического анализа выбрать клетки, имеющие соотношение ацентрических хромосом к метацентрическим как 26/14; 24/16; 28/12. Количество клеток с таким соотношением хромосом записать в отчет по работе и рассчитать их процентное соотношение, приняв количество всех анализируемых клеток за 100 %.

5. На основании данных протокола цитогенетического анализа подсчитать количество клеток с нарушением хромосом и рассчитать их процентное соотношение, приняв количество всех анализируемых клеток за 100 %. Подсчитать количество клеток с одинаковыми хромосомными aberrациями (например, с одиночными фрагментами, с парными фрагментами, с кольцевыми хромосомами и т.д.) и определить их процент от общего количества клеток и от клеток с хромосомными нарушениями. Полученный результат записать в тетрадь.

При отсутствии препаратов крови работа может быть выполнена при использовании заполненных ранее протоколов цитогенетического анализа, бланки которых выдаются преподавателем. На основании этих протоколов выполняются пункты 4-5 работы.

Контрольные вопросы

1. Назовите причины возникновения хромосомных aberrаций.
2. Какой метод используется для выявления хромосомных aberrаций?
3. Что является основной причиной гибели клеток?
4. Из чего состоят хромосомы?
5. Назовите основные процессы происходящие с хромосомами при облучении.
6. Какие хромосомные aberrации Вы знаете?
7. Как образуются концевые и внутренние делеции?
8. Какие обмены между участками хромосом Вы знаете?
9. Какие межхромосомные обмены приводят к гибели клеток?
10. Какие межхромосомные обмены приводят к накоплению изменений в популяции?
11. Как возникают хроматидные aberrации?
12. На каких объектах используется для оценки радиобиологических эффектов метод учета хромосомных aberrаций?
13. Какие объекты чаще используют в методе учета хромосомных aberrаций?
14. Назовите преимущества использования лимфоцитов.
15. Где производится забор крови для изучения хромосомных aberrаций лимфоцитов периферической крови и костного мозга?
16. Назовите недостаток при использовании метода учета хромосомных aberrаций у лимфоцитов.
17. Расскажите методику подготовки препаратов (мазков).
18. Какие показатели анализируются при выполнении лабораторных работ?
19. Назовите частоту хромосомных aberrаций в лимфоцитах костного мозга у облученных и необлученных животных.
20. Какие хромосомные aberrации встречались в клетках лимфоцитов костного мозга крысы наиболее часто?