ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՏԻԳՐԱՆ ԱՇՈՏԻ

ՄԻԿՈՏՈՔՍԻՆՆԵՐԻ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՀԱՄԱԿՑՈՒԹՅԱՆ ԳԵՆԱԹՈՒՆԱՅԻՆ, ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ-ԲՋՋԱԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԵՎ ԷՊԻԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԷՖԵԿՏՆԵՐԸ *IN VIVO* ԵՎ *IN VITRO*

Գ.00.15 - «Գենետիկա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2015

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АРУТЮНЯН ТИГРАН АШОТОВИЧ

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИКОТОКСИНОВ И ИХ КОМБИНАЦИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.15- «Генетика»

ЕРЕВАН – 2015

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կ.գ.դ, պրոֆ. Ռ.Մ. Հարությունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Պ.Հ. Վարդևանյան
կ.գ.թ., Դ.Թ.Բաբիկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. հունիսի 23-ին, ժամը 14^{00}-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փողոց 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2015թ. մայիսի 22-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,

կ.գ.թ., դոցենտ Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: член-корр. НАН РА,
д.б.н., проф. Р.М. Арутюнян

Официальные оппоненты: д.б.н., проф. П.О. Вардеванян
к.б.н. Д.Т. Бабикян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 23 июня 2015г. в 14^{00} часов на заседании специализированного совета 051 при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 22 мая 2015г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051

к.б.н., доцент М.А. Парсаданян

© National Library of Armenia

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным ВОЗ, ежегодно загрязнению микотоксинами подвергается не менее 25% всех продовольственных ресурсов (WHO, 1999; Choudhary and Kumari, 2010). Продуцентами микотоксинов являются многочисленные виды грибов, среди которых доминируют представители родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. На сегодняшний день выявлено около 400 микотоксинов, более 20 из которых обнаруживаются в пищевых продуктах в концентрациях, достаточных для негативного воздействия на человека и животных (Atanda et al., 2012). Проблема контаминирования продуктов питания микотоксинами является особенно острой для развивающихся стран, где условия сбора и хранения урожая нередко нарушаются (Binder et al., 2007).

Микотоксины вызывают как острые алиментарные отравления, так и тяжелые хронические заболевания у животных и людей в зависимости от концентрации и периода воздействия (Wu et al., 2010). На сегодняшний день не разработаны эффективные подходы для выявления и/или лечения микотоксикозов (Bennett и Klich, 2003; Brewer et al., 2013; Hope, 2013). Отчасти причиной этого является неполное знание молекулярных механизмов действия микотоксинов.

В литературе приводятся данные о гено- и цитотоксичности микотоксинов, полученные *in vitro* и *in vivo* с применением стандартных методов (Meki et al., 2001; Minervini et al., 2004; Corcuera et al., 2011; El-Hady et al., 2011). Прогресс молекулярных методов генетики и цитогенетики позволяет провести более детальную оценку структурных и эпигенетических нарушений стабильности генома. Наиболее активно изучаемыми структурными изменениями генома являются вариации числа повторов ДНК (copy number variations, CNV), которые встречаются как у клинически здоровых, так и у больных индивидов (Mkrtchyan et al., 2010). Показана значимость этих вариаций в метаболизации и детоксикации различных ксенобиотиков, а также в регуляции экспрессии генов (Butler et al., 2011). Весьма актуальной стала и оценка способности факторов окружающей среды индуцировать CNV (Arlt et al., 2014). В настоящее время также активно изучаются эпигенетические эффекты действия ксенобиотиков, заключающиеся в изменении профиля метилирования ДНК (Szyf, 2011; Dogan et al., 2014; Li et al., 2014).

Литературные данные о влиянии микотоксинов на метилирование ДНК и CNV практически отсутствуют.

Эффекты отдельных микотоксинов, обладающих генотоксическими и канцерогенными свойствами, подробно изучены в экспериментальных моделях *in vivo* (Kang et al., 2013; Kuroda et al., 2014). Однако данные о комбинированном хроническом воздействии микотоксинов *in vivo* ограничены, хотя на контаминированных субстратах чаще всего обнаруживается более одного типа микотоксинов (Atanda et al., 2012; de Lourdes et al., 2013).

Изучение CNV и метилирования ДНК при действии микотоксинов, наряду с анализом гено- и цитотоксичности их раздельных и комбинированных эффектов на уровне клеток и организма, позволит расширить понимание механизмов их действия и потенциальной генетической опасности.

Целью исследования явилось изучение генотоксических, цитотоксических, молекулярно-цитогенетических и эпигенетических свойств наиболее распространенных микотоксинов: афлатоксина B1 (АФВ1), охратоксина А (ОТА), зеараленона (ЗЕА) и их комбинации на разных уровнях: *in vivo* (клетки костного мозга, лейкоциты периферической крови и гепатоциты крыс) и *in vitro* (лейкоциты периферической крови человека и линия клеток К-562).

© National Library of Armenia

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценка уровня повреждений ДНК при действии микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА и их комбинации в лейкоцитах крови и клетках костного мозга крыс методом ДНК-комет *in vivo*.
2. Анализ зависимости генотоксических эффектов исследованных микотоксинов и их комбинации от концентрации в лейкоцитах крови и клетках костного мозга крыс *in vivo*.
3. Анализ зависимости генотоксических эффектов исследованных микотоксинов и их комбинации от типа клеток.
4. Оценка цитотоксической активности исследованных микотоксинов и их комбинации в гепатоцитах крыс методом анализа путей клеточной гибели (апоптоз, некроз) *in vivo.*
5. Анализ молекулярно-цитогенетических эффектов АФВ1 методом изучения CNV в клетках крови человека *in vitro*.
6. Изучение влияния АФВ1 на уровни повреждений ДНК в клеточной линии К-562 методом ДНК-комет *in vitro*.
7. Оценка влияния АФВ1 на профиль глобального метилирования ДНК в клеточной линии К-562 методом ДНК-комет *in vitro*.

Научная новизна

- Выявлено, что комбинация микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА повышает уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах периферической крови у крыс при хроническом воздействии *in vivo*. Установлена зависимость уровня повреждений ДНК от концентрации микотоксинов *in vivo*.
- Показано, что комбинация микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА проявляет цитотоксическую активность в печени крыс *in vivo*, повышая уровень апоптозных и некротических клеток.
- Выявлено, что АФВ1 вызывает изменения числа копий ДНК (CNV) за счет делеций в участках на хромосомах 8p21.2 и 15q11.2 *in vitro* в клетках крови человека.
- Показано влияние АФВ1 на эпигеном за счет снижения уровня глобального метилировани ДНК *in vitro* в клеточной линии К-562.

Практическая ценность работы. Результаты изучения хронического действия микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА и их комбинации позволяют заключить, что данные соединения индуцируют повреждения ДНК, а также апоптотическую и некротическую гибель клеток *in vivo*. Выявленная нами повышенная чувствительность клеток костного мозга крыс к действию комбинации микотоксинов по сравнению с клетками крови позволяет рекомендовать данные клетки для тестирования генотоксичности микотоксинов и их комбинаций.

Данные о АФВ1-индуцированных изменениях CNV свидетельствуют о необходимости учитывать этот параметр при изучении механизмов генотоксичности микотоксинов. Результаты оценки эффекта АФВ1 на метилирование ДНК углубляют понимание механизмов влияния этого микотоксина на уровне эпигенома человека.

Полученные результаты расширяют наши представления о раздельном и комбинированном действии исследованных микотоксинов *in vivo* и *in vitro,* а также свидетельствуют о том, что применение методов оценки вариаций повторов ДНК и эпигенетических эффектов является необходимым условием для объективной оценки механизмов токсичности микотоксинов.

© National Library of Armenia

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были представлены и доложены на Международной конференции молодых ученых "Perspectives for development of molecular and cellular biology-3" (Ереван, Армения, 26-29 сентября, 2012г.), на V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, Россия, 3-5 октября 2013г.), на IX Международной научно-практической конференции «Современные достижения в науке-2013» (Прага, Чехия, 27 января-5 февраля, 2013г.), на конференции ‹‹Актуальные проблемы общей и космической радиобиологии и астробиологии››, (Дубна, Россия, 28-29 октября, 2014г.), и в Институте генетики человека (Йена, Германия, 5 мая, 2014г.). По теме диссертации опубликовано 4 статьи и 3 тезиса.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 40 рисунков и 19 таблиц.

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н., доц. А.Ф. Карапетян и д.б.н., проф. К.А.Дживанян, доктору Т. Лиру, сотрудникам лаборатории Молекулярной цитогенетики Института генетики человека (Йена, Германия) и коллективу кафедры генетики и цитологии биологического факультета ЕГУ.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, показаны ее научная новизна и практическая ценность исследований.

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы включает подробный анализ генотоксических, цитотоксических и цитогенетических свойств микотоксинов, а также механизмов и роли метилирования ДНК в регуляции стабильности генома в клетках животных и человека. Представлены методы изучения влияния микотоксинов на ДНК и хромосомы клеток животных и человека, критически обсуждены работы по тестированию токсических эффектов микотоксинов и обоснована необходимость проведенных исследований.

Глава 2. Материалы и методы

Животные и их содержание. Исследования проводили на крысах линии Вистар весом 200±20 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария; они получали соответствующие эксперименту рационы с микотоксинами, а также воду без ограничений. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 животных.

Клеточные культуры и условия их культивирования. Лейкоциты периферической крови человека и клетки линии К-562 культивировали в питательной среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% раствор пенициллина/стрептомицина при +37ºС в течение 72 ч.

Варианты обработки микотоксинами *in vivo* и *in vitro*. Отдельные микотоксины АФВ1, ОТА и ЗЕА и их комбинации вводили крысам орально с кормом в течение 15, 30 и 60 дней. Комбинация А включала АФВ1, ОТА и ЗЕА в концентрациях 0.19, 0.29 и 0.31 мкг/кг/день соответственно. Комбинация Б включала АФВ1, ОТА и ЗЕА в концентрациях 0.57, 0.87 и 0.95 мкг/кг/день соответственно. Генотоксичность комбинаций А и В изучали в клетках костного мозга и лейкоцитах. Генотоксичность

© National Library of Armenia

АФВ1 (0.34 мкг/кг/день), ОТА (0.52 мкг/кг/день) и ЗЕА (0.57 мкг/кг/день) при раздельной обработке изучали в клетках костного мозга и лейкоцитах. Цитотоксичность комбинации Б изучали на гепатоцитах. Цитогенетические эффекты АФВ1 в дозах 3, 6 и 12 мкг/мл были изучены при 24- и 48-часовой обработке в культуре лейкоцитов периферической крови человека. Для оценки CNV культуру лейкоцитов периферической крови трех доноров обрабатывали АФВ1 в дозе 3 мкг/мл в течение 24 и 48 ч. Эпигенетические эффекты АФВ1 в дозах 2, 3, и 4 мкг/мл при 24-часовой обработке были изучены в клетках К-562 (хроническая миелоидная лейкемия человека).

Методом ДНК-комет (гель-электрофорез одиночных клеток) (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000; Дурнев и др., 2006) оценивали генотоксичность микотоксинов и их комбинаций. На предметные стекла, предварительно покрытые 1% раствором агарозы (Normal Melting Poing Agarose), наносили смесь 20 мкл клеточной суспензии с 80 мкл 0.5%-ого раствора агарозы, имеющей низкую температуру плавления (Low Melting Point Agarose). После образования геля клетки лизировали в течение 1 ч при 4˚С в смеси (10 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 100 мМ Na_2EDTA, 2.5 М NaCl, 1% Triton X-100, pH 10). По окончании лизиса препараты оставляли на 20 мин. при $+4^0$С в растворе для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ Na_2EDTA, pH > 13.0) для раскручивания цепей ДНК и выявления однонитевых разрывов и щелочно-лабильных сайтов. Электрофорез проводили в течение 25 мин. при напряжении поля 25 В/см и силе тока 300 мА. После электрофореза препараты промывали 15 мин. нейтрализационным буфером (0.4 М Tris; pH 7.4), окрашивали раствором бромистого этидия (20мкг/мл, Sigma) и хранили во влажной камере при $+4^0$С до проведения анализа.

Анализ глобального метилирования ДНК проводили с применением модифицированной версии метода ДНК-комет (Wentzel et al., 2010), включающей обработку клеток К-562 ферментами рестрикции HpaII и MspI в течение 1 часа при $+37^0$С.

Изображения комет регистрировали с помощью видеокамеры с повышенной чувствительностью (Variocam, PCO, Germany) и обрабатывали на компьютере с помощью программ ISIS и Comet Assay IV (Version 4.3) (рис. 2). Статистический анализ проводили с применением теста Манн-Уитни.

Методом двойной окраски аннексином V и 6-карбоксифлуоресцеин диацетатом (6-CFDA) оценивали цитотоксичность микотоксинов (Farinacci, 2007). После фазы дезагрегации и фильтрования суспензию клеток наносили на специальные стекла (poly-prep slides, Sigma) на 15 мин. Стекла промывали буфером (binding buffer) и окрашивали в темноте в течение 15 мин. раствором аннексина V и 6-CFDA. Аннексин V, связываясь с фосфатидилсерином (маркер апоптоза) на поверхности апоптозных и некротических клеток, флуоресцирует в красном спектре. В живых клетках 6-CFDA в присутствии эстераз гидролизируется до 6-карбоксифлуоресцеина (6-CF) и флуоресцирует в зеленом спектре. Таким образом, жизнеспособные клетки окрашиваются только 6-карбоксифлуоресцеином (зеленый), некротические клетки – только аннексином (красный), а апоптотические красятся одновременно аннексином V и 6-CF (рис. 3). Статистический анализ проводили с применением метода хи-квадрат.

Методом анализа хромосомных аберраций (ХА) изучали цитогенетические эффекты АФВ1 (Evans and O'Riordan, 1975). Для получения метафаз культуру цельной крови обрабатывали колцемидом (0.1 мкг/мл) за 2 часа до окончания культивирования. Затем, клетки осаждали центрифугированием (1500 об./мин., 7 мин.), удаляли надосадок и обрабатывали гипотоническим раствором (0.075М KCl) в течении 15 мин. при +37ºС. Клетки фиксировали фиксатором Карнуа. Клеточную суспензию раскапывали на предметные стекла и окрашивали красителем Гимза. ХА анализировали в 100 метафазных

© National Library of Armenia

пластинках с числом хромосом 2n±2. Статистический анализ проводили с применением t-теста.

Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) изучали молекулярно-цитогенетические эффекты АФВ1 на уровне CNV (Iourov et al., 2005). Для анализа CNV в хромосомных регионах 8p21.2 и 15q11.2 были использованы соотвественно BAC RP11-115K10 (SpectrumGreen) и BAC RP11-79C23 (SpectrumGreen) в комбинации с центромерным зондом CEP15 SpectrumAqua (Vysis).

Анализ и регистрацию изображений проводили с применением автоматической системы ISIS (MetaSystems). Интенсивности сигналов измеряли в 50-60 метафазных пластинках с применением программы SCION (рис. 6). Результаты проверяли на нормальность распределения с помощью параметров Standardized skewness (ассиметрия распределения данных) и Standardized kurtosis (эксцесс распределения данных). Статистический анализ проводили с применением теста Манн-Уитни.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Анализ комбинированного генотоксического эффекта микотоксинов *in vivo* методом ДНК-комет. Генотоксичность двух комбинаций (А и Б) микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА, была изучена в клетках костного мозга и лейкоцитах крови крыс при 15-, 30- и 60-дневной обработке. Концентрация всех трех микотоксинов в комбинации Б была в 3 раза выше, чем в комбинации А.

Было показано, что комбинация А микотоксинов повышает уровни повреждений ДНК как в лейкоцитах крови, так и в клетках костного мозга крыс (табл. 1).

Таблица 1.

Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах крыс, обработанных комбинацией А микотоксинов *in vivo*.

Обработка	**Длина хвоста кометы** (среднее ± SE)	**% ДНК в хвосте** (среднее ± SE)	**Момент хвоста Оливе** (среднее ± SE)
	Костный мозг		
Контроль	48.55 ± 0.70	6.25 ± 0.60	1.31 ± 0.80
15 дней	46.87 ± 1.01	14.4 ± 1.72*	3.12 ± 0.50
30 дней	64.5 ± 1.34[a] *	15.77 ± 0.88 [a]*	4.34 ± 0.25*
60 дней	68.9 ± 1.66 [a] *	13.41 ± 1.25*	4.37 ± 0.50*
	Лейкоциты		
Контроль	45.8 ± 3.7	8.6 ± 0.8	1.6 ± 0.1
15 дней	44.1 ± 0.5	7.4 ± 0.6	1.4 ± 0.1
30 дней	52.4 ± 1.0*	11.5 ± 1.0*	2.6 ± 0.3*
60 дней	58.9± 1.6*	15.8 ± 2.0*	5.1 ± 0.9*

*p<0.05 - достоверная разница с контролем, [a]p<0.05 - достоверная разница по сравнению с лейкоцитами, SE - стандартная ошибка.

В клетках костного мозга % ДНК в хвосте достоверно повышается по сравнению с контролем во всех вариантах обработки микотоксинами. Повышение момента хвоста и длины хвоста наблюдается только после 30- и 60-дневной обработки. В лейкоцитах крови повышение уровня % ДНК в хвосте и момента хвоста наблюдается после 30- и 60-дневного воздействия, длина хвоста повышается после 60-дневной обработки.

© National Library of Armenia

Обработка комбинацией Б микотоксинов вызывает повышение уровней повреждений ДНК как в клетках костного мозга, так и в лейкоцитах крови (табл. 2). В клетках костного мозга генотоксический эффект по всем параметрам комет проявляется уже после 15 дней обработки; после 60-дневного воздействия повышаются только % ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе по сравнению с контролем. В лейкоцитах комбинация Б повышает % ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе после 15-дневного воздействия.

Таблица 2.

Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах крови крыс, обработанных комбинацией Б микотоксинов *in vivo*.

Обработка	**Длина хвоста кометы** (среднее ± SE)	**% ДНК в хвосте** (среднее ± SE)	**Момент хвоста Оливе** (среднее ± SE)
	Костный мозг		
Контроль	57.11 ± 1.32	15.71 ± 1.12	4.04 ± 0.93
15 дней	112.25 ± 3.16 [a] *	43.87 ± 1.80 [a] *	18.01 ± 1.01 [a] *
60 дней	92.84 ± 2.92	35.61 ± 2.0*	11.90 ± 0.90*
	Лейкоциты		
Контроль	51.46 ± 0.72	10.85 ± 0.93	2.54 ± 0.25
15 дней	71.62 ± 1.82	24.67 ± 1.39*	6.68 ± 0.43*

*$p<0.05$ - достоверная разница с контролем, [a]$p<0.05$ - достоверная разница с лейкоцитами, SE - стандартная ошибка.

При обработке обеими комбинациями микотоксинов (А и Б) уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга были достоверно выше, чем в лейкоцитах. Таким образом, клетки костного мозга более чувствительны к генотоксическому воздействию по сравнению с лейкоцитами, что позволяет рекомендовать применение именно этих клеток при анализе генотоксичности комбинаций микотоксинов.

Сравнительный анализ повреждений ДНК, индуцированных комбинациями микотоксинов А и Б, выявил, что комбинация Б индуцирует более высокие уровни повреждений ДНК, а генотоксические эффекты проявляются при более кратковременном воздействии (при 15-дневной обработке), чем комбинация А (табл. 1 и 2, рис. 1). При увеличении продолжительности обработки микотоксинами в обеих комбинациях до 60 дней наблюдается тенденция к снижению уровня повреждений ДНК, что может быть обусловлено их репарацией (Collins et al., 2008). Данный эффект также может быть обусловлен тем, что исследованные микотоксины в комбинациях могут проявлять антагонистические или аддитивные свойства в зависимости от концентрации и от комбинации. Так, антагонистический эффект комбинации ОТА и АФВ1 был показан в клетках почек у свиней (Grenier and Oswald, 2011). В клетках печени крыс АФВ1 и его метаболиты не выявлялись в плазме крови и тканях в течении 24 ч, и предполагалось, что ОТА ускоряет процесс метаболизации и экскреции АФВ1, в то время, как уровень ОТА не изменялся (Corcuera et al., 2012).

© National Library of Armenia

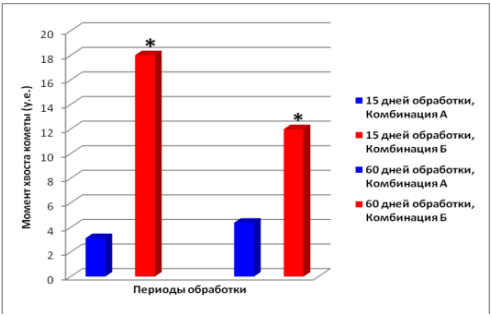

Рисунок 1. Сравнение уровней повреждений ДНК клеток костного мозга крыс при 15- и 60-дневной обработке комбинациями микотоксинов А и Б по параметру момента хвоста Олива. *p<0.05 - достоверная разница с комбинацией А.

3.2. Анализ генотоксического эффекта отдельных микотоксинов *in vivo* методом ДНК-комет. Генотоксичность ЗЕА (0.57 мкг/кг/день), ОТА (0.52 мкг/кг/день) и АФВ1 (0.34 мкг/кг/день) была изучена методом ДНК-комет в клетках костного мозга и лейкоцитах крови крыс при 15-, 30- и 60-дневной обработке (табл. 3).

Таблица 3.
Уровни повреждений ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах крыс, обработанных ЗЕА, ОТА и АФВ1 *in vivo*.

Обработка		**Длина хвоста кометы**	**% ДНК в хвосте**	**Момент хвоста Оливе**
		Среднее ± SE	Среднее ± SE	Среднее ± SE
		Костный мозг		
Контроль		57.10 ± 1.32	15.70 ± 1.12	4.04 ± 0.31
15 дней	ЗЕА	84.3 ± 3.84	33.1 ± 2.08*	11.70 ± 1.14*
	ОТА	97.4 ± 2.89 [a] *	42.7 ± 2.09 [a] *	15.33 ± 0.98 [a] *
	АФВ1	64.3 ± 2.74	26.1 ± 2.02*	8.70 ± 1.08*
30 дней	ОТА	50.9 ± 1.69	22.3 ± 2.06 *	5.40 ± 0.60 *
	АФВ1	49.2 ± 1.15	16.4 ± 1.47	3.96 ± 0.5
60 дней	ЗЕА	120.2 ± 4.97*	42.0 ± 1.97*	18.2 ± 1.34*
	ОТА	90.6 ± 3.40	37.1 ± 1.83 *	11.7 ± 0.75 *
		Лейкоциты		
Контроль		51.4 ± 0.72	10.8 ± 0.93	2.5 ± 0.24
15 дней	ОТА	68.0 ± 1.85	26.0 ± 1.58 *	6.6 ± 0.48 *
	АФВ1	62.5 ± 2.45	22.8 ± 1.84*	7.1 ± 0.77*
30 дней	ОТА	60.5 ± 1.74 [b]	27.2 ± 2.29 [b] *	6.7 ± 0.66 [b] *

*p<0.05 - достоверная разница с контролем, [a]p<0.05 - достоверная разница с лейкоцитами, [b]p<0.05 - достоверная разница с клетками костного мозга, SE - стандартная ошибка.

В клетках костного мозга ЗЕА и ОТА достоверно (p<0.05) повышают уровень % ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе по сравнению с контролем во всех вариантах обработки

© National Library of Armenia

(табл. 3). Только при 15-дневном действии ОТА и при 60-дневной обработке ЗЕА повышается длина хвоста комет. Изученные микотоксины демонстрируют разную зависимость действия на ДНК клеток костного мозга крыс от продолжительности обработки. При действии ЗЕА наблюдается тенденция к повышению уровня повреждений ДНК при увеличении продолжительности воздействия. Эффекты ОТА и АФВ1 на ДНК при более длительном воздействии ослабевают.

Сравнение генотоксической активности исследованных микотоксинов показывает, что в клетках костного мозга ОТА индуцирует наиболее высокие уровни повреждений ДНК по большинству представленных параметров, а ЗЕА обладает более слабой активностью. АФВ1 оказался негенотоксичным в данной тест-системе. Причиной обнаруженных различий могут быть разные механизмы действия исследованных микотоксинов. ОТА вызывает образование ДНК-аддуктов и индуцирует одно- и двунитевые разрывы ДНК (Creppy et al., 1985; Kuroda et al., 2014). ЗЕА повреждает ДНК преимущественно посредством индукции окислительного стресса (Kang et al., 2013). С другой стороны, АФВ1 также может формировать ДНК-аддукты, однако достоверного повышения повреждений ДНК при его действии на клетки костного мозга не было выявлено. Это может быть обусловлено тем, что главным органом-мишенью для афлатоксинов является печень (Bedard et al., 2005).

В лейкоцитах крови крыс ОТА и АФВ1 вызывают повышение уровня повреждений ДНК по параметрам % ДНК в хвосте и момент хвоста Оливе после 15- и 30-дневного воздействия по сравнению с контролем. Длина хвоста комет при всех вариантах обработки не отличается от контроля. При действии ОТА не наблюдается повышения уровня гентоксических эффектов с увеличением продолжительности обработки от 15 до 30 дней. ОТА и АФВ1 проявляют одинаковый уровень генотоксической активности в лейкоцитах крыс.

Сравнительная оценка действия микотоксинов показала, что клетки костного мозга более чувствительны, чем лейкоциты, к действию ОТА при 15-дневной обработке. В то же время лейкоциты более чувствительны, чем клетки костного мозга, к действию ОТА при 30-девной обработке и к АФВ1 при 15-девной обработке.

Таким образом, на основе результатов оценки повреждений ДНК методом ДНК-комет нами показано, что микотоксины ЗЕА, ОТА и АФВ1 как при раздельном действии, так и в комбинации являются генотоксичными для клеток костного мозга и лейкоцитов крови крыс. Также выявлено, что клетки костного мозга более чувствительны к комбинации микотоксинов по сравнению с лейкоцитами крови. При раздельном действии микотоксинов клетки костного мозга более чувствительны к ОТА, а лейкоциты - к АФВ1.

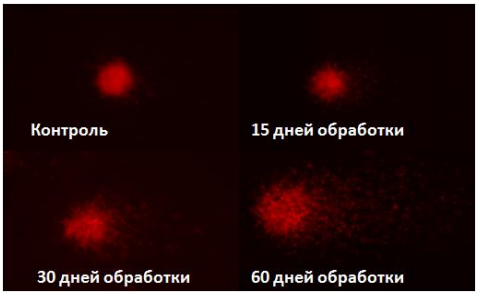

Рисунок 2. Образцы изображений ДНК-комет с различными уровнями повреждений в контрольном варианте и при различных сроках обработки крыс микотоксинами.

© National Library of Armenia

3.3. Анализ цитотоксического эффекта микотоксинов *in vivo* методом двойной окраски аннексином V и 6-карбоксифлуоресцеин диацетатом. Пути клеточной гибели и жизнеспособность клеток при действии микотоксинов АФВ1 (0.34 мкг/кг/день), ОТА (0.52 мкг/кг/день) и ЗЕА (0.57 мкг/кг/день) и их комбинации (АФВ1 - 0.57 мкг/кг/день, ОТА - 0.87 мкг/кг/день и ЗЕА - 0.95 мкг/кг/день) оценивали в гепатоцитах крыс (табл. 4). Результаты исследования показывают, что микотоксины и их комбинация обладают различной цитотоксической активностью. Комбинация микотоксинов на всех сроках обработки проявляет высокую цитотоксичность, уровень которой снижается с увеличением продолжительности обработки. АФВ1, ОТА и ЗЕА при раздельном действии проявляют более высокую цитотоксичность по сравнению с комбинированным действием.

Микотоксины и их комбинации индуцируют перимущественно апоптотическую гибель клеток. Некротические клетки появляются только при 30-дневной обработке АФВ1 и комбинацией микотоксинов.

Таблица 4.

Оценка цитотоксического эффекта АФВ1, ОТА, ЗЕА и их комбинации в клетках печени крыс *in vivo*.

Микотоксины	15 дней обработки			30 дней обработки			60 дней обработки		
	Ж	А	Н	Ж	А	Н	Ж	А	Н
АФВ1	-	-	-	8.6*	71*	20.4*	-	-	-
ОТА	-	-	-	-	-	-	52*	48*	0
ЗЕА	-	-	-	-	-	-	53.5*	46.5*	0
Комбинация	45.8*	54.2*	0	50*	45*	5*	60*	40*	0
Контроль	98	2	0	98	2	0	98	2	0

*p<0.05 - достоверная разница с контролем. Данные по уровню жизнеспособных клеток (Ж), апоптотических клеток (А) и некротических клеток (Н) представлены в %.

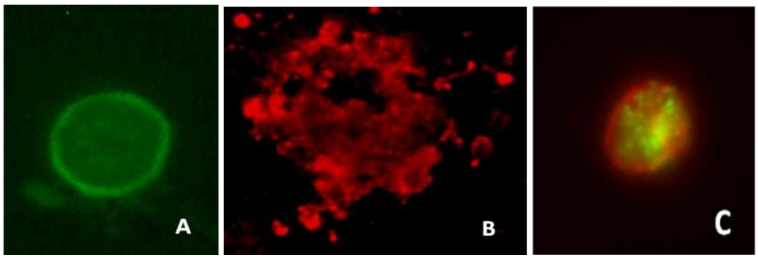

Рисунок 3. Гепатоциты крыс, обработанные микотоксинами. А- жизнеспособная клетка, окрашенная только 6-карбоксифлуоресцеин диацетатом; В - некротическая клетка, окрашенная только аннексином; С - апоптотическая клетка, окрашенная 6-карбоксифлуоресцеин диацетатом и аннексином.

© National Library of Armenia

3.4. Цитогенетические эффекты в лейкоцитах крови человека после воздействия АФВ1. Цитогенетические эффекты АФВ1 (3, 6 и 12 мкг/мл) изучали в культуре лейкоцитов периферической крови человека при 24- и 48-часовой обработке. Количество цитогенетических изменений (одиночные фрагменты и гэпы) анализировали в 100 метафазах для каждого варианта обработки (табл. 5). АФВ1 достоверно повышает количество одиночных фрагментов хромосом во всех изученных концентрациях при 24- и 48-часовой обработке по сравнению с контролем ($p<0.05$). Количество гэпов повышается во всех вариантах за исключением 48-часовой обработки АФВ1 в концентрации 3 мкг/мл (таблица 5). С увеличением продолжительности обработки наблюдается тенденция к снижению уровня как гэпов, так и фрагментов.

Таблица 5.

Цитогенетические эффекты АФВ1 в лейкоцитах периферической крови человека.

Варианты обработки		**Гэпы**	**Одиночные фрагменты**
24 ч	3 мкг/мл	36*	12*
	6 мкг/мл	124*	34*
	12 мкг/мл	82*	40*
48 ч	3 мкг/мл	30	10*
	6 мкг/мл	80*	22*
	12 мкг/мл	80*	22*
	Контроль	18	2

*$p<0.05$ - достоверная разница с контролем. Количество одиночных фрагментов и гэпов представлены на 100 метафаз.

Таким образом, нами было показано, что АФВ1 в отсутствии метаболической активации достоверно повышает уровни одиночных фрагментов и гэпов в культуре лейкоцитов периферической крови человека. Исследования Ferguson et al., (1986) также показывают, что малые дозы АФВ1 (0.6-3 мкг/мл) в культуре лимфоцитов человека главным образом индуцируют гэпы и делеции. Предполагается, что гэпы образуются в так называемых фрагильных (ломких) участках хромосом в условиях частичного репликационного стресса (Schwartz et al., 2006). Таким образом, основываясь на полученных нами результатах об индукции гэпов при действии АФВ1 и на данных литературы, мы запланировали оценить возможное влияние АФВ1 на CNV в клетках человека. Отметим, что уже после выполнения нашего исследования было подтверждено, что *de novo* CNVs и фрагильные сайты в фибробластах человека образуются в одних и тех же хромосомных локусах (Wilson et al., 2015).

3.5. Анализ влияния АФВ1 на CNV в лейкоцитах периферической крови человека *in vitro* методом FISH. Действие АФВ1 на CNV в хромосомных локусах 8p21.2 и 15q11.2 изучали на лейкоцитах периферической крови трех доноров после 24- и 48-часовой обработки. Размеры локусов CNV и их изменения оценивали на основе интенсивности свечения флуоресцентных ДНК-проб, комплементарных исследуемым участкам. У доноров 1 и 3 обнаружено статистически достоверное повышение процента метафаз с различными интенсивностями сигналов на гомологичных хромосомах в локусе 15q11.2 после 24 ч (48.75%) и 48 ч (58.90%) инкубации с АФВ1 по сравнению с контролем (33.45%). В локусе 8p21.2 была обнаружена тенденция к нестабильности после инкубации с АФВ1 в течении 48 ч (51.3%) (рис. 4).

© National Library of Armenia

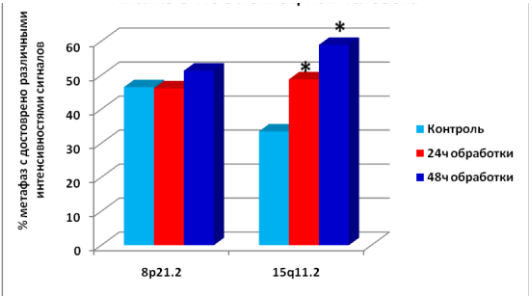

Рисунок 4. Средние уровни метафаз с достоверно различными интенсивностями сигналов CNV в хромосомных регионах 8p21.2 и 15q11.2 лейкоцитов периферической крови человека после инкубации с АФВ1 в течении 24 ч и 48 ч. Показаны достоверные различия между вариантами обработанными АФВ1 в течении 24 ч и 48 ч и контролем в локусе 15q11.2. *p<0.05 - достоверная разница с контролем.

Нами показано, что АФВ1 индуцирует достоверное снижение интенсивностей флуоресценции сигналов в исследованных локусах у доноров 1 и 3 по сравнению с контролем (p<0.05). В частности, у донора 1 уровень CNV снижался в локусе 8p21.2 после 24 ч и 48 ч инкубации с АФВ1 и в локусе 15q11.2 после 24 ч инкубации с АФВ1 (p<0.05). В хромосомном локусе 8p21.2 донора 3 достоверное снижение уровня CNV было выявлено после 48 ч инкубации с AFB1 по сравнению с контролем (p<0.05) (рис. 5).

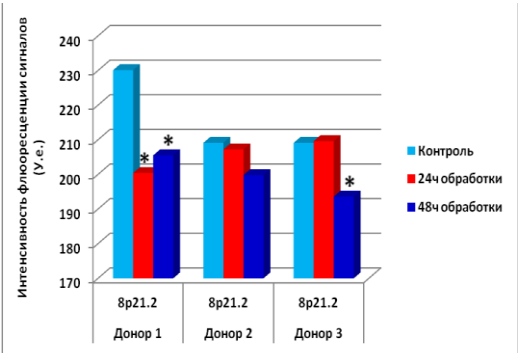

Рисунок 5. Эффект АФВ1 на CNV в хромосомном локусе 8p21.2 лейкоцитов периферической крови трех доноров после 24 ч и 48 ч инкубации. *p<0.05 - достоверная разница с контролем.

Таким образом, анализ влияния АФВ1 на CNV локализованных в хромосомных локусах 8p21.2 и 15q11.2 позволяет предположить, что микотоксин индуцирует делеции в ДНК.

© National Library of Armenia

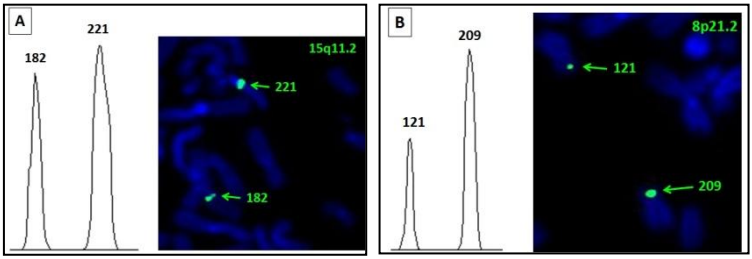

Рисунок 6. Образец измерения интенсивности сигналов с помощью программы Scion Image. Интенсивности сигналов на гомологичных хромосомах 15q11.2 донора 1 (A) и 8p21.2 донора 3 (B) после 24 ч и 48 ч инкубации с AFB1, соответственно.

Выявленная нами индукция нестабильности в локусах CNV при действии AFB1 может послужить стимулом к дальнейшим исследованиям, так как способность микотоксинов индуцировать *de novo* CNV ранее не была изучена. Более того, данные о влиянии экологических факторов на уровень *de novo* CNV весьма ограничены, и на сегодняшний день выявлено лишь несколько факторов (низкие дозы ионизирующего облучения, афидиколин, гидроксимочевина), которые индуцируют CNV в клетках человека (Arlt et al., 2009; 2011).

3.6. Анализ влияния АФВ1 на глобальное метилирование ДНК в клеточной линии К-562 методом ДНК-комет *in vitro*. Метилирование ДНК оценивали в клеточной линии К-562 с применением модифицированной версии метода ДНК-комет в комбинации с рестрикционными ферментами MspI и HpaII. Эндонулеазы MspI и HpaII проявляют различную чувствительность к метилированным сайтам ДНК. MspI разрезает последовательность $C^{m}CGG$, если второй цитозин метилирован, в то время как HpaII разрезает неметилированные CCGG участки. Трансформация метилированных и неметилированных сайтов ДНК в разрывы позволяет определять уровень метилирования ДНК на основе анализа % ДНК в хвосте кометы.

Нашей первичной задачей было выявление концентрации АФВ1, оказывющей минимальное повреждающее действие на ДНК. АФВ1 в концентрациях 0.5, 1 и 3 мкг/мл при 24-часовой обработке вызывает умеренное повышение повреждений ДНК по сравнению с контролем (табл. 6), а в концентрации 6 мкг/мл проявляет высокую цитотоксичность.

Таблица 6.

Оценка уровней повреждений ДНК, индуцированных АФВ1 в клеточной линии К-562 методом ДНК-комет.

Варианты обработки АФВ1 (мкг/мл)	**Длина хвоста кометы**		**% ДНК в хвосте**		**Момент хвоста Оливе**	
	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана
0.5	53.2 ± 2.47	50.05*	17.07 ± 2.37	11.54	3.64 ± 0.51	2.81*
1.0	50.8 ± 2.05	48.06	15.08 ± 2.00	11.97	3.18 ± 0.42	2.60*
3.0	50.4 ± 2.26	45.08	12.61 ± 1.97	8.03	2.68 ± 0.45	1.55
Контроль	46.3 ± 2.06	42.09	13.44 ± 2.01	8.78	2.66 ± 0.41	1.71

*$p<0.05$ - достоверная разница с контролем, SE - стандартная ошибка.

© National Library of Armenia

На следующем этапе был проанализирован генотоксический эффект АФВ1 в концентрациях 2, 3 и 4 мкг/мл при 24-часовой обработке клеток К-562. АФВ1 достоверно повышает длину хвоста и момент хвоста Оливе при обработке в концентрации 2 мкг/мл по сравнению с контролем (табл. 7). С повышением дозы АФВ1 уровни повреждений ДНК имеют тенденцию к снижению (табл. 6 и 7), что согласуется с эффектами, полученными при обработке *in vivo*.

Таблица 7.

Оценка уровней повреждений ДНК, индуцированных АФВ1 в клеточной линии К-562 методом ДНК-комет.

Варианты обработки АФВ1 (мкг/мл)	**Длина хвоста кометы**		**% ДНК в хвосте**		**Момент хвоста Оливе**	
	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана	Среднее ± SE	Медиана
2	169.1 ± 3.4	172.0*	67.0 ± 1.5	70.9	41.9 ± 1.21	42.5*
3	100.8 ± 2.5	97.45	49.6 ± 1.7	50.3	22.4 ± 1.07	20.1
4	89.03± 2.3	81.9	52.6 ± 2.08	60.9	19.6 ± 0.90	19.1
Контроль	100.8 ± 2.3	96.8	47.1 ± 1.7	50.9	22.4 ± 0.90	21.8

*p<0.05 - достоверная разница с контролем, SE - стандартная ошибка.

Средний % ДНК в хвосте комет в клетках, обработанных ферментами MspI и HpaII, представлен в табл. 8. Процент метилированной ДНК определяли с помощью формулы 100 – HpaII/MspI x 100, где HpaII и MspI - средний % ДНК в хвосте комет при обработке ферментами HpaII и MspI (Wentzel et al., 2010). Полученные результаты показывают, что АФВ1 во всех изученных концентрациях индуцирует достоверное снижение уровня метилирования по сравнению с контролем (табл. 9).

Таблица 8.

Средний % ДНК в хвосте комет индуцированный ферментами рестрикции MspI и HpaII.

Варианты обработки АФВ1 (мкг/мл)	**MspI %**	**HpaII %**
2	74.27	68.38
3	66.53	62.66
4	63.48	54.53
Контроль	70.06	49.57

Таблица 9.

Оценка влияния АФВ1 на уровень метилирования ДНК в клетках К-562 методом ДНК-комет с применением ферментов рестрикции HpaII и MspI.

Варианты обработки **АФВ1 (мкг/мл)**	**% метилированной ДНК**
2	8*
3	6*
4	15*
Контроль	30

*p<0.05 - достоверная разница с контролем.

© National Library of Armenia

Таким образом, показана генотоксичность и цитотоксичность комбинации микотоксинов АФВ1, ОТА и ЗЕА классическими методами генетической токсикологии. Результаты молекулярно-генетических исследований продемонстрировали ранее неизвестные цитогенетические эффекты АФВ1 на уровне CNV. АФВ1 вызывает гипометилирование ДНК, таким образом оказывая влияние на эпигеном в клетках человека. Полученные результаты углубляют понимание механизмов токсических эффектов микотоксинов.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование генотоксических, цитогенетических и эпигенетических эффектов афлатоксина В1 (АФВ1), охратоксина А (ОТА) и зеараленона (ЗЕА) *in vivo* и *in vitro* позволяет сформулировать следующие выводы:

1. АФВ1, ОТА и ЗЕА при совместном действии вызывают зависимые от концентрации повреждения ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах периферической крови крыс *in vivo*. Показано, что клетки костного мозга более чувствительны к действию комбинации микотоксинов, чем лейкоциты.

2. АФВ1, ОТА и ЗЕА при раздельном действии индуцируют повреждения ДНК в клетках крыс *in vivo*: ОТА повреждал ДНК в клетках костного мозга и лейкоцитах, ЗЕА был генотоксичен только для клеток костного мозга, АФВ1 проявлял генотоксическую активность только в лейкоцитах.

3. Сравнение генотоксического потенциала микотоксинов в клетках костного мозга и лейкоцитах крыс *in vivo* по большинству параметров комет позволяет расположить их по убыванию генотоксической активности в следующий ряд: ОТА>ЗЕА>АФВ1.

4. Цитотоксический эффект АФВ1, ОТА, ЗЕА и их комбинации в гепатоцитах крыс in vivo проявляется преимущественно по пути апоптоза. АФВ1 обладал наиболее выраженным цитотоксическим эффектом по сравнению с ОТА, ЗЕА и комбинацией микотоксинов.

5. В связи с тем, что АФВ1, являясь известным канцерогеном, проявил слабую генотоксичность, возникла необходимость изучения других механизмов его действия на геном и эпигеном. Оценка действия АФВ1 на хромосомы показала дозо-зависимую индукцию гэпов и одиночных фрагментов хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека. Индукция гэпов подтверждает данные литературы о принадлежности АФВ1 к группе ингибиторов репликации, способных индуцировать вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV).

6. Молекулярно-цитогенетические исследования с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации показали что АФВ1 индуцирует нестабильность CNV в локусах 8p21.2 и 15q11.2. Выявлены локус-специфические различия чувствительности к микотоксину.

7. Обнаружена способность АФВ1 влиять на метилирование ДНК в клеточной линии К-562, что свидетельствует об эпигенетической активности микотоксина.

© National Library of Armenia

8. На основании исследования совместного и раздельного генотоксического и цитотоксического действия микотоксинов *in vivo*, а также молекулярно-цитогенетических и эпигенетических механизмов действия АФВ1 сделано заключение, что классические методы оценки генотоксичности и цитотоксичности микотоксинов следует дополнить анализом изменения числа копий ДНК и эпигенетических эффектов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Harutyunyan T.**, Aroutiounian R., Karapetyan A. Investigation of genotoxic effects of mycotoxins in vivo. Perspectives for development of molecular and cellular biology-3, Proceedings of international conference, Yerevan, September 26-29. 2012; 110-114.
2. **Арутюнян Т.А.,** Арутюнян Р.М., Оганесян Г.Г., Карапетян А.Ф. Комбинированное генотоксическое воздействие афлатоксина В1, охратоксина А и зеараленона в лейкоцитах крови и клетках костного мозга. Материалы международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 3–5 октября. 2013; 334-336.
3. Карапетян А.Ф., **Арутюнян Т.А.** К вопросу о влиянии микотоксинов на клетки печени крыс при раздельном и комбинированном поступлении в организм с пищей. Материалы международной конференции «Современные достижения в науке - 2013», Раздел 59, Естественные науки, Прага, 27 января-5 февраля. 2013; 8-10.
4. **Арутюнян Т.А.**, Арутюнян Р.М., Оганесян Г.Г., Карапетян А.Ф. Оценка генотоксических эффектов группы микотоксинов in vivo методом ДНК-комет. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2013; №2: 63-66.
5. **Harutyunyan T.**, Karapetyan A., Hovhannisyan G., Aroutiounian R. Combined Genotoxic Effects of Aflatoxin B1, Ochratoxin A and Zearalenone in Rat Bone Marrow and Blood Leukocytes. Korean J. Environ. Biol. 2013; 31(3):189-191.
6. **Harutyunyan T.** Apoptosis-inducing effect of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone combination in rat hepatocytes. Proc.of the Yerevan State University. Chemistry and Biology. 2015; 1:50–52.
7. **Harutyunyan T.**, Hovhannisyan G., Babayan N., Othman M. A.K., Liehr T., Aroutiounian R. Influence of aflatoxin B1 on copy number variants in human leukocytes in vitro. Molecular Cytogenetics. 2015; 8:25.

© National Library of Armenia

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՏԻԳՐԱՆ ԱՇՈՏԻ

ՄԻԿՈՏՈՔՍԻՆՆԵՐԻ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՀԱՄԱԿՑՈՒԹՅԱՆ ԳԵՆԱԹՈՒՆԱՅԻՆ, ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ-ԲՋՋԱԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԵՎ ԷՊԻԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԷՖԵԿՏՆԵՐԸ *IN VIVO* ԵՎ *IN VITRO*

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ապոպտոզ, ԴՆԹ-ի կրկնողությունների թվի փոփոխություն, ԴՆԹ-կոմետ մեթոդ, ԴՆԹ-ի մեթիլացում, միկոտոքսիններ, ֆլուորեսցենտ *in situ* հիբրիդացում

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է աֆլատոքսին B1-ի (ԱՖB1), օխրատոքսին A-ի (OSA), զեարալենոնի (ԶԵԱ) և դրանց համակցության գենաթունային ազդեցության ուսումնասիրմանն առնետների ոսկրածուծի բջիջներում և արյան լեյկոցիտներում, և բջջաթունային հատկությունների ուսումնասիրմանն առնետների հեպատոցիտներում *in vivo*: ԱՖB1-ի ազդեցության մոլեկուլային-բջջագենետիկական մեխանիզմներն ուսումնասիրվել են մարդու ծայրամասային արյան լեյկոցիտներում, իսկ էպիգենետիկական մեխանիզմները՝ մարդու լեյկոզի K-562 բջջային գծում *in vitro*: Բացահայտվել է առնետների ոսկրածուծի բջիջների և լեյկոցիտների միջև ինչպես առանձին միկոտոքսինների, այնպես էլ միկոտոքսինների համակցության նկատմամբ զգայունության տարբերություն: Ցույց է տրվել նաև ԱՖB1-ի ունակությունը մակածելու անկայունություն ԴՆԹ-ի կրկնողությունների թվի 8p21.2 և 15q11.2 քրոմոսոմային տեղամասերում: ԴՆԹ-ի գլոբալ մեթիլացման մակարդակի ուսումնասիրությունը բացահայտեց ԱՖB1-ի էպիգենետիկական ակտիվությունը:

Միկոտոքսինների գենաթունային ազդեցության գնահատումը ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Առնետների կերակրումն ԱՖB1-ի, OSA-ի և ԶԵԱ-ի համակցությամբ աղտահարված կերով 15, 30 և 60 օր շարունակ մակածում է ԴՆԹ-ի տարբեր աստիճանի վնասվածքներ ոսկրածուծի բջիջներում և արյան լեյկոցիտներում՝ կախված կոնցենտրացիայից (խտությունից) *in vivo*: Ցույց է տրված, որ ոսկրածուծի բջիջներն ավելի զգայուն են միկոտոքսինների համակցության գենաթունային ազդեցության նկատմամբ համեմատած լեյկոցիտների հետ:

Առնետների կերակրումն առանձին միկոտոքսիններով (ԱՖB1, OSA և ԶԵԱ) աղտահարված կերով 15, 30 և 60 օր շարունակ մակածում է ԴՆԹ-ի տարբեր աստիճանի վնասվածքներ. OSA-ն մակածում է ԴՆԹ-ի վնասվածքներ ոսկրածուծի բջիջներում և լեյկոցիտներում, ԶԵԱ-ը դրսևորում է գենաթունային ակտիվություն ոսկրածուծի բջիջներում, իսկ ԱՖB1-ի գենաթունային ակտիվությունը դրսևորվում է արյան լեյկոցիտներում: Միկոտոքսինների գենաթունային ակտիվության համեմատումն առնետների ոսկրածուծի և արյան բջիջներում ԴՆԹ-կոմետների չափորոշիչներից մեծամասնության հիման վրա հնարավորություն տվեց բաշխելու միկոտոքսիններն ըստ գենաթունայնության հետևյալ կերպ՝ OSA> ԶԵԱ> ԱՖB1:

© National Library of Armenia

Միկոտոքսինների բջջաթունային ազդեցության գնահատումն անեքսինի և 6-կարբօքսիֆլուորեսցեինի կիրառմամբ: Առնետների կերակրումն ԱՖԲ1-ի, OSA-ի, ԶԵԱ-ի և դրանց համակցությամբ աղտահարված կերով 15, 30 և 60 օր շարունակ, մականում է հեպատոցիտների ապոպտոզ: Նեկրոզային բջիջների փոքր տոկոս է դիտվում միայն ԱՖԲ1-ի և միկոտոքսինների համակցությամբ 30 օր մշակման պայմաններում: ԱՖԲ1-ը ցուցաբերում է առավել բարձր բջջաթունային ակտիվություն միկոտոքսինների համակցության հետ համեմատած, մինչդեռ միկոտոքսինների համակցությամբ 15, 30 և 60 օր ազդելու պայմաններում դիտվում է ապոպտոզային բջիջների մակարդակի անկում: Ցույց է տրվել, որ միկոտոքսինների համակցությամբ մականված ապոպտոզային բջիջների մակարդակը մշակման տևողությանը զուգընթաց նվազում է:

ԱՖԲ1-ի բջջագենետիկական ազդեցության գնահատումը քրոմոսոմային խաթարումների վերլուծության մեթոդով: Հայտնի քաղցկեղածին ԱՖԲ1-ով մականված ԴՆԹ-ի վնասվածքների ցածր մակարդակն առաջ բերեց գենոմի և էպիգենոմի վրա դրա ազդեցության այլ մեխանիզմների ուսումնասիրության անհրաժեշտություն: ԱՖԲ1-ը մարդու ծայրամասային արյան լեյկոցիտներում մականում է գէպերի և քրոմոսոմային խզվածքների մակարդակի բարձրացում՝ կախված խտությունից: Գէպերի մականումը հաստատում է գրականության տվյալներն այն մասին, որ ԱՖԲ1-ը հանդիսանում է ռեպլիկացիայի արգելակիչ: Ցույց է տրված, որ ռեպլիկացիայի արգելակիրներն ունակ են առաջացնելու ԴՆԹ-ի կրկնողությունների թվի փոփոխություններ (copy number variation, CNV):

Մարդու ծայրամասային արյան լեյկոցիտներում **ԱՖԲ1-ի մոլեկուլային-բջջագենետիկական ազդեցության** ուսումնասիրությունը ֆլուորեսցենտ *in situ* հիբրիդացման կիրառմամբ բացահայտեց, որ ԱՖԲ1-ն առաջացնում է CNV լոկուսների անկայունություն՝ մականելով դելեցիաներ 8p21.2 և 15q11.2 քրոմոսոմային տեղամասերում: Բացահայտվել է նաև ԱՖԲ1-ի նկատմամբ լոկուս-սպեցիֆիկ զգայունություն: ԱՖԲ1-ի դելեցիաներ մականելու հատկությունն առանց ԴՆԹ-ադուկտների առաջացման վկայում է այս միկոտոքսինի մոտ գենաթունային այլ մեխանիզմների առկայության մասին:

ԱՖԲ1-ի էպիգենետիկական հատկությունների գնահատումը մոդիֆիկացված ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով ցույց տվեց ԴՆԹ-ի հիպոմեթիլացման մականում մարդու լեյկոզի K-562 բջջային գծում՝ դրսևորելով էպիգենետիկական ակտիվություն:

Այսպիսով, առանձին միկոտոքսինների և դրանց համակցության գենաթունային և բջջաթունային ակտիվության գնահատումը *in vivo*, ինչպես նաև ԱՖԲ1-ի մոլեկուլային-բջջագենետիկական և էպիգենետիկական ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությունը բերում է այն եզրահանգմանը, որ միկոտոքսինների գենա- և բջջաթունային հատկությունների գնահատման դասական մեթոդները պետք է զուգակցվեն նաև ԴՆԹ-ի կրկնողությունների թվի փոփոխության և էպիգենետիկական էֆեկտների գնահատմամբ:

© National Library of Armenia

HARUTYUNYAN TIGRAN

GENOTOXIC, MOLECULAR-CYTOGENETIC AND EPIGENETIC EFFECTS OF MYCOTOXINS AND THEIR COMBINATION *IN VIVO* AND *IN VITRO*

SUMMARY

Key words: apoptosis, comet assay, DNA copy number variation, DNA methylation, FISH, mycotoxins

The aim of our research was the investigation of genotoxic effects of several micotoxins (aflatoxin B1 (AFB1), ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEA) and their combinations) in rat bone marrow cells and blood leukocytes, and cytotoxic effects in rat hepatocytes *in vivo*. Molecular-cytogenetic mechanisms of AFB1 were analyzed in cultured human peripheral blood leukocytes; epigenetic mechanisms of AFB1 were studied in human leukemia cell line K-562 *in vitro*. The difference in sensitivity of rat bone marrow cells and blood leukocytes to individual mycotoxins and their combinations was demonstrated. The molecular-cytogenetic analysis of influence of AFB1 has revealed the induction of instability in chromosome regions with copy number variations. The analysis of global DNA methylation has demonstrated the epigenetic activity of AFB1.

Analysis of genotoxicity of mycotoxins by Comet assay. The obtained results has revealed that the treatment of rats with combinations of mycotoxins AFB1, OTA, and ZEA during 15, 30 and 60 days can induce different levels of DNA damage in bone marrow cells and peripheral blood leukocytes *in vivo* depending on their concentration. It was shown that bone marrow cells are more sensitive to mycotoxins combinations, than leukocytes.

The treatment of rats with AFB1, OTA, and ZEA during 15, 30 and 60 days induces DNA damage in rat cells *in vivo*: OTA induces DNA damage in bone marrow cells and blood leukocytes, ZEA was genotoxic only in bone marrow cells, and AFB1 demonstrated genotoxic activity only in blood leukocytes.

Comparison of genotoxic potential of mycotoxins in rat bone marrow cells and blood leukocytes *in vivo* allows to distribute them in the following descending order according to changes in the majority of comet parameters: OTA> ZEA> AFB1.

© National Library of Armenia

Analysis of cytotoxicity of AFB1, OTA, ZEA and their combination **by annexinV and 6-carboxyfluorescein** staining in rat hepatocytes treated during 15, 30 and 60 days has revealed the ability of mycotoxins and their combination to induce cell death mainly through apoptotic pathway. Only small percentage of necrotic cells was detected after treatment with AFB1 and combination of mycotoxins during 30 days. The cytotoxicity of individual mycotoxins was higher in comparison to their combination, and AFB1 had shown the highest cytotoxic activity in comparison to combination of mycotoxins. It was also demonstrated that prolonged exposure to mycotoxins led to the decrease in apoptotic cell number.

Analysis of cytogenetic effects of AFB1 by chromosomal aberrations test. With regard to low levels of DNA breaks, induced by known carcinogen AFB1, the necessity to analyze the other mechanisms of its influence on the genome and epigenome has emerged. Evaluation of cytogenetic effects of AFB1 in human peripheral blood leukocytes *in vitro* has revealed the induction of chromosome gaps and breaks in a dose-dependent manner. The ability of AFB1 to induce gaps in chromosomes has confirmed the literature data classifying AFB1 as replication inhibitor, inducing DNA copy number variations (CNV).

Analysis of molecular-cytogenetic effects of AFB1 using fluorescence *in situ* hybridization has shown the ability of AFB1 to promote instability of CNVs inducing deletions in chromosome regions 8p21.2 and 15q11.2. Locus specific sensitivity to AFB1 was also revealed. The ability of AFB1 to induce deletions in CNV loci without metabolic activation indicated the existence of other mechanisms of genotoxicity of AFB1 beside DNA-adduct formation.

Analysis of epigenetic effects of AFB1 by modified Comet assay. The ability of AFB1 to induce hypomethylation in human myeloid leukemia cell line K-562 was demonstrated indicating the epigenetic activity of this mycotoxin.

On the base of the investigation of combined and individual genotoxicity and cytotoxicity of mycotoxins action *in vivo*, as well as analysis of molecular-cytogenetic and epigenetic mechanisms of AFB1, it was concluded that classical methods of evaluation of geno- and cytotoxicity of mycotoxins are reasonably to complement with analysis of copy number variations and DNA methylation profile.

© National Library of Armenia