

# Оценка генотоксических эффектов в одно- и двухклеточных зародышах мышей *in vivo* и *in vitro* методом ДНК-комет

Плигина К.Л., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Даугель-Дауге Н.О., Дурнев А.Д.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»  
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.

Разработана методология оценки первичных повреждений ДНК в одно- и двухклеточных зародышах мышей методом ДНК-комет. Применимость разработанной методологии для оценки генотоксичности в зародышевых клетках *in vivo* и *in vitro* подтверждена в экспериментах с модельными генотоксикантами метилметансульфонатом, диоксидином, этопозидом и митомycin C.

**Ключевые слова:** метод ДНК-комет, одноклеточные зародыши, двухклеточные зародыши, метилметансульфонат, диоксидин, этопозид, циклофосфамид, митомycin C

**Для цитирования:** Плигина К.Л., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Даугель-Дауге Н.О., Дурнев А.Д. Оценка генотоксических эффектов в одно- и двухклеточных зародышах мышей *in vivo* и *in vitro* методом ДНК-комет. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 77-78.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.09.77-78

**Автор для корреспонденции:** Плигина К.Л.; e-mail: kirapligina@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 20.05.2020

## Assessment of genotoxic effects in one-and two-cell mouse embryos *in vivo* and *in vitro* using comet assay

Pligina K.L., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Dauge-Dauge N.O., Durnev A.D.

Zakusov Institute of Pharmacology  
Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia

A methodology for evaluating DNA damage in one- and two-cell mouse embryos using the comet assay has been developed. The applicability of the developed methodology for assessing genotoxicity *in vivo* and *in vitro* was confirmed in experiments with model genotoxicants - methyl methanesulfonate, dioxidine, etoposide and mitomycin C.

**Keywords:** comet assay, one-cell embryos, two-cell embryos, methylmethanesulfonate, etoposide, dioxidine, mitomycin C, cyclophosphamide

**For citation:** Pligina K.L., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Dauge-Dauge N.O., Durnev A.D. Assessment of genotoxic effects in one-and two-cell mouse embryos *in vivo* and *in vitro* using comet assay. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 77-78. (In Rus).

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.09.77-78

**Corresponding author:** Pligina K.L.; e-mail: kirapligina@yandex.ru

**Funding.** There is no financial grant at the paper preparation.

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Accepted:** 20.05.2020

Оценка уровней первичных повреждений ДНК в качестве биомаркера в медико-биологических и генотоксикологических исследованиях получила методическое решение с разработкой и внедрением в практику метода гель-электрофореза отдельных клеток или ДНК-комет [1]. Высокая чувствительность, малое количество материала, необходимого для проведения исследования, оценка на уровне отдельных клеток обусловили широкое экспериментальное

применение метода. На сегодня метод успешно адаптирован к различным типам эукариотических клеток. Возможность приложения метода ДНК-комет к зародышевым клеткам млекопитающих показана в ряде исследований с использованием зародышей, полученных оплодотворением *in vitro* [2,3]. Целью настоящего исследования явилась разработка методологии оценки повреждений ДНК методом ДНК-комет *in vivo* и *in vitro* в одно- и двухклеточных зародышах, получен-

ных от экспонированных животных, и ее апробация с использованием модельных генотоксикантов.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на самках и самцах мышей F1 (СВАхС57Вl/6) («Столбовая», Россия). Для индукции суперовуляции был использован метод гормональной стимуляции, после чего проводили естественное оплодотворение. В экспериментах *in vitro* интактные одно- и двухклеточные зародыши вымывали через 21 и 44 часа после введения второго гормонального препарата, соответственно, освобождали от кумулюсных клеток, обрабатывая гиалуронидазой (150 МЕ/мл, 20 мин) и инкубировали с генотоксикантами диоксидином 1 мг/мл или митомицином С 0,25 мг/мл (1,5 часа, 37°C). В экспериментах с удалением зоны пеллюцида (ЗП), перед проведением ДНК-комет зародыши обрабатывали коллагеназой (0,04 мг/мл, 15 мин).

В экспериментах *in vivo* метилметансульфонат 10, 20 и 30 мг/кг; этопозид 10 и 20 мг/кг и циклофосфамид 40 мг/кг вводили одновременно с инъекцией гормонального препарата. Одноклеточные зародыши вымывали через 21 час после введения генотоксикантов и использовали далее для исследования методом ДНК-комет в щелочной версии. Для отработки метода были использованы различные протоколы, включающие интактную или удаленную ЗП, 2 или 3 слоя агарозы, варианты лизирующего буфера с анионными поверхностно-активными веществами (лаурилсаркозинат натрия, додецилсульфат натрия). В качестве показателя поврежденности ДНК использовали показатель длины хвоста ДНК-кометы.

## Результаты

Использование протокола с дополнительным 3 слоем агарозы позволило снизить количественные потери зародышей при приготовлении микропрепаратов с 60 до 10%. Добавление анионных поверхностно-активных веществ в состав лизирующего буфера не оказывало влияния на миграцию ДНК. Сохранение/удаление ЗП зародышей приводило к различиям в спонтанном уровне повреждений ДНК: показатель длины хвоста кометы составил 14,16 и 0,29 мкм, соответственно.

Диоксидин *in vitro* в одноклеточных зародышах с сохраненной или удаленной ЗП индуцировал сход-

ный уровень поврежденности ДНК. В двухклеточных зародышах с сохраненной или удаленной ЗП после воздействия диоксидина не наблюдалось увеличения показателя по сравнению с контролем, однако наблюдались клетки с деградированной ДНК. Показатель длины хвоста кометы в двухклеточных зародышах с удаленной ЗП после воздействия митомицина С составил 12,72 мкм ( $p < 0,0001$ ).

В экспериментах *in vivo* показатель длины хвоста в одноклеточных зародышах от интактных животных составил 0,87 мкм. В зародышах, полученных от мышей, обработанных метилметансульфонатом в дозах 20 и 30 мг/кг, показатель зарегистрирован на уровне 6,49 ( $p < 0,001$ ) и 33,10 мкм ( $p < 0,0001$ ), соответственно. В экспериментах с введением этопозид в дозах 10 и 20 мг/кг, показатель составил 13,01 ( $p < 0,01$ ) и 40,78 мкм ( $p < 0,0001$ ), соответственно. Введение циклофосфамида приводило к повышению показателя длины хвоста комет, однако статистически значимых различий с показателем в контрольной группе выявлено не было.

Таким образом, нами разработана методология оценки первичных повреждений ДНК в одно- и двухклеточных зародышах мышей методом ДНК-комет. Определены методические особенности проведения метода ДНК-комет в зародышевых клетках, включающие использование 3 слоев агарозы для предотвращения потерь клеток при получении препаратов и необходимость удаления ЗП для снижения спонтанного уровня поврежденности. Применимость разработанной методологии для оценки генотоксичности в зародышевых клетках *in vivo* и *in vitro* подтверждена в экспериментах с модельными генотоксикантами метилметансульфонатом, диоксидином, этопозидом и митомицином С.

## Литература/ References

1. Harrouk W., Codrington A., Vinson R., Robaire B., Hales B.F., Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutation Research Repair* 2000; (461): 229–241.
2. Berthelot-Ricou A., Perrin J., Di Giorgio C., De Meo M., Botta A., Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. *Fertility and Sterility* 2011; (95): 1452–1457.
3. Rolland L., Courbiere B., Tassistro V., Sansoni A., Orsiere T., Liu, W., Giorgio Di C., Perrin J. Comet assay on thawed embryos: An optimized technique to evaluate DNA damage in mouse embryos. *Toxicology in vitro* 2017; (44): 266–272.