

Оценка повреждения ДНК методом ДНК-комет в криоконсервированных образцах лейкоцитов человека и фибробластах легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104

Волобаев В.П., Ларионов А.В., Щетникова Е.А., Росинский А.Ю., Бах С.Н.

ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет
650000 г. Кемерово, ул. Красная, 6

Представлены результаты оценки повреждения ДНК в щелочной модификации метода комет в образцах свежих и криоконсервированных клеток при температуре -80С и -196С.

Ключевые слова: ДНК-кометы, криоконсервация, лейкоциты крови, ФЛЭЧ-104

Для цитирования: Волобаев В.П., Ларионов А.В., Щетникова Е.А., Росинский А.Ю., Бах С.Н. Оценка повреждения ДНК методом ДНК-комет в криоконсервированных образцах лейкоцитов человека и фибробластах легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 94-95.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.94-95

Автор для корреспонденции: Волобаев Валентин Павлович; **e-mail:** volobaev.vp@gmail.com

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-5011.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Assessment of DNA damage by the method of DNA comets in cryopreserved samples of human leukocytes and fibroblasts of the human lung embryo FLECh-104

Volobaev V.P., Larionov A.V., Shchetnikova E.A., Rosinsky A.Yu., Bach S.N.

Kemerovo State University
Krasnaya str. 6, Kemerovo, 650000, Russia

The results of the assessment of DNA damage using an alkaline modification of the comet method in samples of fresh and cryopreserved cells at -80 °C and -196 °C are presented.

Keywords: DNA-comet assay, cryopreservation, white blood cells, Human embryonic lung cells

For citation: Volobaev V.P., Larionov A.V., Shchetnikova E.A., Rosinsky A.Yu., Bach S.N. Assessment of DNA damage by the method of DNA comets in cryopreserved samples of human leukocytes and fibroblasts of the human lung embryo FLECh-104. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 94-95. (In Rus).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.09.94-95

Corresponding author: Volobaev Valentin Pavlovich. **e-mail:** volobaev.vp@gmail.com

Funding: The study was supported by RFBR in the framework of the research project № 19-05-5011.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Accepted: 20.05.2020

Метод гель-электрофореза одиночных клеток получил широкое распространение для оценки повреждений ДНК, включая скрытые щелочлабильные сайты, которые реализуются в разрывы при выполнении щелочной модификации метода. Доступность метода позволяет выполнять его как на образцах свежих клеток, так и на пробах, подвергавшихся заморозке. Замораживание образцов может проводиться в малых объемах проб в малых объемах как с использованием криопротекторов, так и без них. В исследованиях *in vitro* использование криоконсервации позволяет обрабатывать большое число проб в стандартных условиях, учитывая большие затраты времени на выполнение методики. Выполнение метода с использованием только свежих клеток неизбежно приведет к

большой временной разнице (12-24 часов между крайними образцами), что может существенно исказить картину повреждений ДНК. В то же время существуют основания полагать, что процедура криоконсервации способна вызвать артефакты в виде дополнительных повреждений ДНК. Особенности подготовки предметных стекол, их отмывки и воздействие кислорода могут вызывать дополнительные повреждения ДНК. В ряде работ показана возможность длительного хранения клеток в малом объеме, с заморозкой без криопротектора, не приводящая к возникновению существенных повреждений ДНК [1], в то же время существуют данные о возможности существенных различий фрагментации ДНК, особенно в условиях окислительной нагрузки [2]. Очевидные перспективы применения метода на крио-

консервированных образцах требуют оценки в экспериментах с различными типами клеток.

Целью данной работы была оценка применимости процедуры криоконсервирования для выполнения метода ДНК-комет в условиях эксперимента *in vitro* для снижения вариабельности между пробами.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили лейкоциты крови 7 добровольцев в возрасте от 25 до 35 лет и клеточная линия фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ-104) (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), эксперимент с которой повторялся трижды. Клеточную культуру ФЛЭЧ-104 выращивали в культуральных флаконах в атмосфере 5% CO₂, с использованием в качестве ростовой среды 90% DMEM (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Панэко», Москва). Нарощенную культуру снимали с монослоя раствором трипсин-версена (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) (1:1), с дальнейшей остановкой реакции и делением пробы на порции. Во все пробы биоматериала добавляли 10% DMSO (AppliChem). Контрольные пробы подвергали незамедлительной пробоподготовке, экспериментальные пробы замораживали до -80°C, используя криоштатив с изопропиловым спиртом при градиенте 1°C/мин и с дальнейшим переносом части проб в жидкий азот. Хранили пробы в течение 1 или 4 недель. По истечении срока хранения образцы быстро размораживали при 37°C и подвергали пробоподготовке для ДНК-комет.

Методику ДНК-комет проводили в модификации с щелочным электрофорезом. Клетки помещались в 1% агарозный гель с дальнейшим проведением лизиса (pH=13) и щелочного электрофореза. Пробы окрашивали интеркалирующим красителем SYBR Green (ООО «Люмипроб», Москва), проводили фотофиксацию на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss и анализ параметров ДНК-комет с помощью программного обеспечения «CASP» (Casplab). Сформированную в результате анализа базу данных обрабатывали инструментами Statistica 10 (StatSoft). Для параметров «%ДНК в хвосте кометы» и «Момент хвоста Оливе» рассчитывали среднее значение и 95% доверительный интервал среднего. Сравнение параметров между группами образцов проводили с помощью U теста Манна-Уитни.

Результаты

При анализе ДНК-комет в лейкоцитах крови, отмечено значимое увеличение параметров в образцах подвергшихся криоконсервации при -80°C по сравнению с контрольными пробами на всех сроках хранения. Параметры «% ДНК в хвосте кометы» и «Момент хвоста Оливе» в контроле (1,10 [0,96–1,24] и 0,23 [0,20–0,26] соответственно) были значимо ($p<0,001$) меньше чем в пробах хранившихся в течение 1 недели (2,18 [1,92–2,44] и 0,54 [0,47–0,61]) и 4 недель (1,97 [1,73–2,20] и 0,45 [0,39–0,51]). Для образцов, хранившихся при -196°C в течение недели значимых различий по сравнению с контролем отмечено не было. В то же время наблюдались значительные различия ($p<0,001$) между контролем и пробами, хранившимися в течение месяца (1,56 [1,42–1,70] и 0,30 [0,28–0,33]).

При анализе данных, полученных в ходе оценки параметров ДНК-комет ФЛЭЧ-104, отмечено значимое ($p<0,001$) увеличение параметров ДНК-комет в образцах, подвергшихся криоконсервации при -80°C (1,39 [0,97–1,81] и 0,30 [0,21–0,39] в течение 1 недели; 1,30 [0,92–1,68] и 0,28 [0,20–0,36] в течение 4 недель) по сравнению с контрольными пробами (0,46 [0,35–0,56] и 0,10 [0,08–0,12]) на всех сроках хранения. Отмечено отсутствие значимых различий между криоконсервированными при -196°C образцами (0,91 [0,37–1,62] и 0,19 [0,08–0,42] в течение 1 недели; 0,44 [0,25–0,63] и 0,10 [0,06–0,15] в течение 4 недель) и контролем (0,46 [0,35–0,56] и 0,10 [0,08–0,12]) на всех сроках хранения.

Краткосрочное хранение (от 1 до 4 недель) при -196°C в жидком азоте с использованием 10% ДМСО принципиально применимо для клеток цельной крови и клеточных культур, в то же время хранение при -80°C, возможно, способствует появлению дополнительных повреждений ДНК.

Литература/References

1. Milić M., Ožvald I., Vinković Vrček I., et al. Alkaline comet assay results on fresh and one-year frozen whole blood in small volume without cryo-protection in a group of people with different health status. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019; (843): 3–10.
2. Del Bo' C., Fracassetti D., Lanti C., Porrini M., Riso P. Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis*. 2015; 30(1): 29–35.