



DOI: <https://doi.org/10.15688/jvolsu11.2018.1.7>

UDC 576.08

LBC 28c

**ESTIMATION OF THE GENOTOXICITY OF HYDROGEN PEROXIDE
AND ANTIOXIDANT ACTION OF HALO ACID
BY THE METHOD OF DNA-COMET WITH THE USE OF THE MODEL
OF TRANSPLANTABLE CELL CULTURES**

Olga V. Verle

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Oleg V. Ostrovskiy

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Valerian E. Verovskiy

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Galina P. Dudchenko

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. In the framework of the study, the degree of defragmentation of DNA by the DNA-comet method is evaluated when exposed to the cell culture of hydrogen peroxide (H₂O₂), and an *in vitro* model is developed to evaluate the antioxidant activity of new pharmacological agents. The results of working with cell lines show that the percentage of damage to the genetic material of cells of intact samples does not greatly vary from the method of removing the cellular monolayer from the culture plastic. Concerning the effect of H₂O₂ as an inducer of oxidative stress on DNA cell damage, the optimal level of DNA defragmentation has been modeled for subsequent studies of the protective action of antioxidants.

Key words: antioxidants, oxidative stress, genotoxicity, hydrogen peroxide, antioxidant effect, gallic acid, DNA-comet method, model of transplantable cell cultures.

УДК 576.08

ББК 28c

**ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА
И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ
МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИ
ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

Ольга Владимировна Верле

Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Олег Владимирович Островский

Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Валериан Евгеньевич Веровский

Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Галина Петровна Дудченко

Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. В рамках исследования оценивалась степень дефрагментации ДНК методом ДНК-комет при воздействии на клеточную культуру перекиси водорода (H_2O_2) и была разработана *in vitro* модель для оценки антиоксидантной активности новых фармакологических препаратов. Результаты работы с клеточными линиями показали, что процент повреждения генетического материала клеток интактных образцов не сильно варьирует от способа снятия клеточного монослоя с культурального пластика. Относительно влияния H_2O_2 как индуктора окислительного стресса на повреждение ДНК клетки был смоделирован оптимальный уровень дефрагментации ДНК для последующих исследований защитного действия антиоксидантов.

Ключевые слова: антиоксиданты, окислительный стресс, генотоксичность, перекись водорода, антиоксидантное действие, галловая кислота, метод днк-комет, модель перевиваемых клеточных культур.

Введение. Изучение повреждений ДНК в условиях окислительного стресса (ОС), индуцированного *in vitro*, позволяет с достаточной долей вероятности исключить прочие эндогенные и экзогенные факторы как возможную причину разрывов нитей нуклеиновой кислоты (НК). Преимуществом использования *in vitro* моделей является возможность культивирования широкого спектра клеточных линий, а при использовании клеток человека минимизируются проблемы межвидовой экстраполяции. В настоящее время наиболее привлекательным для оценки генотоксичности представляется метод ДНК-комет (Comet assay), впервые описанный Ostling и Johansson в 1984 г. [3]. Существует большое количество протоколов и методических рекомендаций, регламентирующих порядок проведения анализа, но зачастую перед исследователями стоит проблема стандартизации, поскольку не существует унифицированных подходов к оценке антиоксидантов (АО) в отношении защиты НК от ОС. Однако на основе использования метода ДНК-комет при различных условиях индукции ОС появляется возможность разработать биологическую модель для изучения действия АО.

Цель работы. Оценить степень дефрагментации ДНК методом ДНК-комет при воздействии на клеточную культуру перекиси водорода (H_2O_2) и разработать *in vitro* модель, пригодную для оценки антиоксидантной активности новых фармакологических препаратов.

Материалы и методы

Культуры клеток. Исследование проводилось на 2 монослойных клеточных ли-

ниях: Hela и Vero. Последние культивировались на питательной среде DMEM, а HeLa – на питательной среде Игла. Полную питательную среду получали путем добавления 10 %-й эмбриональной сыворотки, глутамина и смеси антибиотиков пенициллин-стрептомицин. Культуральные флаконы и планшеты инкубировали в CO_2 – инкубаторе при концентрации CO_2 – 5 % и относительной влажности не менее 90 %. Для проведения эксперимента использовались клетки через 24 часа после посева.

Метод ДНК-комет. Метод ДНК-комет использовали в соответствии с валидированным протоколом и методическими рекомендациями [1; 2]. 20 мкл клеточной суспензии вносили в пробирки с 180 мкл 0,5 % раствора легкоплавкой агарозы в фосфатно-солевом буфере. Затем 100 мкл полученной смеси наносили на предметные стекла и помещали на лед. Все последующие операции проводили в затемненном помещении при желтом свете. После затвердевания агарозы микропрепараты помещали в предварительно охлажденный до 4 °С лизирующий буфер (10 mM Tris-HCl (pH=10), 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1 % TritonX-100, 10 % ДМСО) и инкубировали 1 час. Затем микропрепараты переносили в охлажденный до 4 °С буфер для электрофореза (300 mM NaOH, 1mM EDTA-Na₂ (pH>13)) и инкубировали в течение 20 минут для щелочной денатурации ДНК, после чего переносили в камеру для электрофореза со свежей порцией охлажденного буфера. Электрофорез проводили в течение 20 минут при напряженности поля 1 V/см и силе тока ~300 мА. По окончании электрофореза микропрепараты фиксировали 10 минут в 70 % этиловом спирте,

а затем окрашивали в темноте красителем SYBR GreenI (1:10000 в ТЕ-буфере (pH=8,5)) в течение 30 минут. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе при длине волны 530 нм. С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 ДНК-комет. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). Обработку изображений производили в программе CaspLab 1.2.2. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью пакетов программ: Excel из пакета Office XP («Microsoft», США), Statistica 6.0. Оценку результатов проводили по каждой клеточной линии путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах. Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК при одном и том же сроке экспозиции, а также статистически достоверный, воспроизводимый эффект в нескольких аналитических сериях.

Полученные результаты. Одна из целей исследования – достичь уровня повреждения ДНК 40 % и более для возможности использования полученной модели для тестирования новых фармакологических препаратов, влияющих на репарацию, и препаратов с антиоксидантной активностью.

Перед началом моделирования окислительного повреждения ДНК было необходимо оценить степень дефрагментации ДНК интактных клеток. Используя различные техники снятия клеточного монослоя, был установлен уровень повреждения ДНК в клеточных линиях HeLa и Vero – менее 1 %. Это является допустимым для интактных клеток и дает возможность выявления генотоксических свойств веществ.

В дальнейшем эксперименте использовали схему с однократным воздействием H_2O_2 на исследуемые клеточные культуры. Для индукции окислительного повреждения ДНК использовали H_2O_2 в конечной концентрации 100, 200, 400, 700, 1000 и 1300 мкМ в бессывороточной среде. В результате проведенных исследований было получено достоверное увеличение % ДНК в хвосте в исследуемом диапазоне концентраций. При исполь-

зовании H_2O_2 от 400 мкМ степень повреждения выходит на плато, а прирост повреждений составляет в среднем 5 %. Наибольший скачок в повреждении ДНК наблюдается между 100 и 200 мкМ. При подсчете % ДНК в хвосте были обнаружены клетки с уровнем повреждения ДНК 85 % и выше. Клетки с таким уровнем повреждения имеют небольшое ядро-голову и большой диффузный хвост и представляют собой апоптотические клетки, в которых процессы репарации невозможны. Такие изображения получили название кометы-«ежики» («hedgehog» comets). После проведения регрессионного анализа была обнаружена зависимость между возрастанием концентрации перекиси водорода и количеством клеток «ежиков», что является весьма логичным.

После разработки модели повреждения ДНК было решено проверить, как будет изменяться степень дефрагментации ДНК в присутствии веществ с АО активностью. В качестве вещества с АО активностью была выбрана ГК. Галловую кислоту добавляли в концентрации 25 мкМ, так как эта концентрация не проявляет цитотоксических свойств на опухолевые и нормальные клетки. ГК добавляли непосредственно перед индукцией ОС в качестве ингибитора образования свободных радикалов. В присутствии ГК значительно снижался уровень повреждения ДНК в обеих клеточных линиях. Так, процент повреждения ДНК в клетках HeLa при воздействии максимальной концентрации H_2O_2 составляет более 70 %, а в присутствии ГК – 23 %. Аналогичные изменения наблюдаются и в клеточной линии Vero.

Заключение. Основное преимущество метода ДНК-комет заключается в возможности детекции повреждений на уровне отдельных клеток эукариотов практически любого происхождения. На первом этапе работы с клеточными линиями было выяснено, что процент повреждения генетического материала клеток интактных образцов мало отличается от способа снятия клеточного монослоя с культурального пластика. Далее было проанализировано влияние H_2O_2 как индуктора ОС на повреждение ДНК клетки. В своих экспериментах мы смоделировали оптимальный уровень дефрагментации ДНК для последующих исследований защитного действия АО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дурнев, А. Д. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях / А. Д. Дурнев, А. К. Жанатаев, Е. А. Анисина. – М. : Медицина, 2012. – С. 115–130.
2. JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for

detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results / Y. Uno [et al.] // Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2015. – Т. 786. – С. 45–76.

3. Ostling, O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells / O. Ostling, K. J. Johanson // BiochemBiophys Res Commun. – 1984. – Vol. 123. – С. 291.

Information about the Authors

Olga V. Verle, Postgraduate Student, Department of Theoretical Biochemistry with Profile in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, 400131 Volgograd, Russian Federation, Verle_olga@mail.ru.

Oleg V. Ostrovskiy, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head of Department of Theoretical Biochemistry with Profile in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, 400131 Volgograd, Russian Federation, biochemistry.volggmu@gmail.com.

Valerian E. Verovskiy, Candidate of Sciences (Chemistry), Associate Professor, Department of Theoretical Biochemistry with Profile in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, 400131 Volgograd, Russian Federation, biochemistry.volggmu@gmail.com.

Galina P. Dudchenko, Doctor of Sciences (Biology), Professor, Department of Theoretical Biochemistry with Profile in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq., 1, 400131 Volgograd, Russian Federation, biochemistry.volggmu@gmail.com.

Информация об авторах

Ольга Владимировна Верле, аспирант кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, пл. Павших Борцов, 1, 400131 г. Волгоград, Российская Федерация, Verle_olga@mail.ru.

Олег Владимирович Островский, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, пл. Павших Борцов, 1, 400131 г. Волгоград, Российская Федерация, biochemistry.volggmu@gmail.com.

Валериан Евгеньевич Веровский, кандидат химических наук, доцент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, пл. Павших Борцов, 1, 400131 г. Волгоград, Российская Федерация, biochemistry.volggmu@gmail.com.

Галина Петровна Дудченко, доктор биологических наук, профессор кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, пл. Павших Борцов, 1, 400131 г. Волгоград, Российская Федерация, biochemistry.volggmu@gmail.com.