

## ИНДУКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА, ГЕНЕРИРУЕМОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗОЙ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В АГАРОЗНЫЕ СЛАЙДЫ

© 2017 г. Н.П. Сирота, С.И. Глухов, Т.В. Сирота,  
И.Ю. Митрошина, Е.А. Кузнецова

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: [sirota@iteb.ru](mailto:sirota@iteb.ru)

Поступила в редакцию 02.02.17 г.

Разработана новая модельная система для изучения действия активных форм кислорода на изолированные клетки млекопитающих в сочетании с методом «комета-тест». Источником перекиси водорода являлась система «глюкоза–глюкозооксидаза». Методом «комета-тест» (щелочная версия) регистрировали уровень повреждений ДНК в клетках селезенки и костного мозга мыши, лейкоцитах крови человека в норме и после воздействия генерируемой глюкозооксидазой перекисью водорода *in vitro*. Изучены различные варианты расположения фермента в слайдах: в слое с клетками, в слое над клетками или в виде раствора на поверхности слайдов. Оптимальным был вариант, когда глюкозооксидаза находилась в верхнем слое 0,5%-й агарозы, над слоем с клетками, чем достигалось отделение фермента от клеток, но не было препятствий для воздействия перекиси водорода. В случае работы с цельной кровью необходимо учитывать содержание эндогенной глюкозы. Данный подход может использоваться как для изучения индуцированного *in vitro* уровня повреждений ДНК, так и для выявления репарации ДНК, при этом расширяются возможности метода, а эксперименты проводятся в контролируемых условиях.

*Ключевые слова:* метод «комета-тест», повреждения ДНК, перекись водорода, глюкозооксидаза.

Изучение механизмов резистентности/чувствительности клеток к окислительному стрессу остается актуальным в настоящее время. В исследованиях по изучению действия активных форм кислорода обычно используется острое воздействие перекиси водорода в условиях *in vitro* на клеточном уровне. Известно, что цитотоксическое действие  $H_2O_2$  связано с образованием ОН-радикалов в присутствии ионов металлов переменной валентности, не только свободных, но и связанных, которые находятся в среде культивирования клеток или крови [1]. Ввиду того что в живых организмах происходит постоянная генерация активных форм кислорода, представляют интерес исследования эффектов пролонгированного воздействия  $H_2O_2$  наряду с острым. В ряде исследований для этих целей использовалась система глюкоза–глюкозооксидаза [2–6]. Фермент добавляли к клеткам в среду культивирования, а для выявления повреждений клеточной ДНК использовали метод

«комета-тест» (метод ДНК-комет, Comet assay). Использовали либо клетки, выделенные из тканей, либо культивируемые клеточные линии. В таких случаях приготовление препаратов для проведения Comet assay требует определенного времени, в течение которого происходит репарация повреждений ДНК. К тому же известно, что при выделении клеток из тканей наблюдается искусственное завышение уровня повреждений ДНК [7]. Для того чтобы преодолеть эти проблемы в экспериментах с индукцией повреждений ДНК перекисью водорода, мы предлагаем иммобилизовать глюкозооксидазу (ГОК) в агарозные слайды наряду с исследуемыми клетками, что позволяет минимизировать время после окончания воздействия и началом лизиса клеток.

Цель этой работы – создание новой модельной системы, которая позволит исключить возникновение дополнительных повреждений ДНК в ходе экспериментальных манипуляций, а также создать возможность исследователям

Сокращение: ГОК – глюкозооксидаза.

более тонко варьировать условия генерации перекиси водорода в экспериментах *in vitro*.

Мы показали, что предложенная модельная система позволяет индуцировать повреждения ДНК *in vitro* в гемопоэтических клетках мыши и лейкоцитах человека, выявляемые методом «комета-тест». Иммобилизацией клеток и ГОК в разные слои агарозы достигается отделение фермента от клеток, но нет препятствий для воздействия генерируемой  $H_2O_2$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клетки.** Спленоциты и клетки костного мозга двухмесячных мышей-самцов неинбредной линии SHK, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН, получали, как указано [8]. Аликвоты капиллярной крови доноров-добровольцев в возрасте 22–72 лет отбирались в пробирки, содержащие фосфатно-солевой буфер (136,7 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ  $Na_2HPO_4$ , 1,5 мМ  $KH_2PO_4$ , pH 7,2) с 1 мМ ЭДТА (ФБ-ЭДТА). Для приготовления агарозных слайдов использовали кровь, разведенную в шесть раз ФБ-ЭДТА, суспензии спленоцитов и клеток костного мозга разводили ФБ-ЭДТА до  $2 \times 10^6$  кл/мл.

**Метод «комета-тест».** Вначале предметные стекла погружали в раствор 1%-й агарозы и высушивали. На эти стекла наносили слой 1%-й агарозы и инкубировали в холодильнике до ее затвердевания (5–7 мин). Разведенную ФБ-ЭДТА кровь или суспензию клеток смешивали с равным объемом 1%-й легкоплавкой агарозы (Sigma Chem. Co., США), расплавленной при 70°C в ФБ-ЭДТА и инкубируемой при 37°C (конечная температура получаемой смеси 20–22°C). Смесь (15 мкл) наносили на приготовленный агарозный слой. После охлаждения и застывания содержащей клетки агарозы на ее поверхность наносили новый слой 0,5%-й легкоплавкой агарозы. Слайды после воздействия  $H_2O_2$ , генерируемой системой «глюкоза–глюкозооксидаза», помещали в лизирующий раствор (2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 10, 1% тритон X-100) при 4°C не менее чем на 1 ч. Затем слайды перемещали на 20 мин в щелочной раствор «А» (0,3 М NaOH, 0,001 М ЭДТА, pH > 13), далее переносили в электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «Хеликон», Москва) и подвергали электрофорезу в свежей порции раствора «А» в течение 20 мин при 4°C, объем буфера 250 мл, напряжение 27 В, сила тока 260–270 мА (напряженность электрического поля 2 В/см). После электрофореза слайды промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 1 ч в фосфатно-

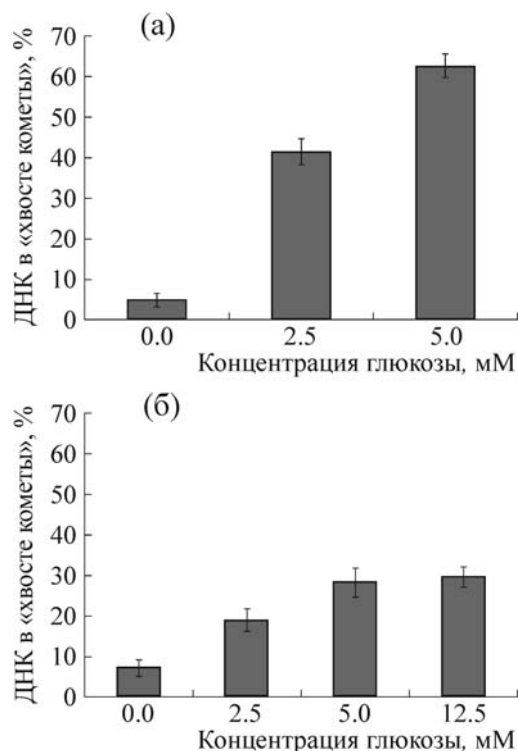
солевом буфере, содержащем 2,0 мкг/мл этидиум бромид. Слайды анализировали под флуоресцентным микроскопом ЛЮАМ И-3 («ЛОМО», Санкт-Петербург). Захват изображений проводили цифровым фотоаппаратом CoolPix 99» (Nikon, Япония) с последующей передачей изображений в компьютер. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, где реализованы алгоритмы расчета стандартных параметров «комет» [9]. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали параметр – процент ДНК в хвосте «кометы» (%TDNA). Для каждой экспериментальной точки анализировали по три слайда, фотографируя не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно [10].

**Обработка слайдов перекисью водорода, генерируемой в системе «глюкоза–глюкозооксидаза».** Клетки находились в среднем слое агарозы на слайдах. Верхний слой 0,5%-й агарозы (15 мкл) содержал ГОК (Sigma Chem. Co., США), как правило, 0,02 Ед/мкл. Раствор глюкозы добавляли на слайды сверху и инкубировали при 20–22°C в течение 5 мин, затем промывали в холодном фосфатно-солевом буфере, переносили в лизирующий раствор, далее следовали процедуры по протоколу метода.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

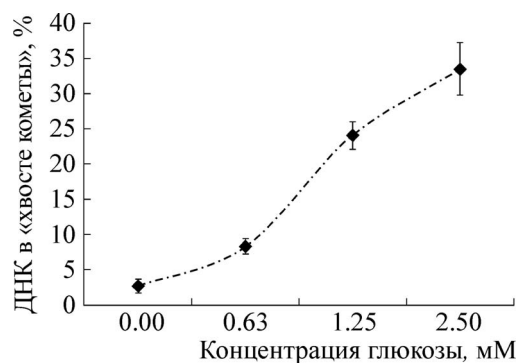
В экспериментах на спленоцитах было протестировано влияние расположения фермента в агарозных слоях на уровень индуцируемых ДНК-повреждений. ГОК вносили либо совместно со спленоцитами, либо в верхний слой агарозы, находящийся над слоем с клетками. Инкубацию слайдов проводили в течение 1 мин при 20°C с разной концентрацией глюкозы. Полученные результаты представлены на рис. 1. Видно, что в обоих вариантах с ростом концентрации глюкозы наблюдалось увеличение уровня повреждений ДНК спленоцитов. В то же время видно, что уровень повреждений ДНК, индуцированный воздействием генерируемой ГОК перекиси водорода, зависит от расположения фермента в агарозных слоях. В случае, когда ГОК расположена над слоем с клетками, уровень повреждений ДНК почти в два раза выше, чем в случае расположения вместе с клетками. Мы предполагаем, что наблюдаемые различия в уровнях повреждения ДНК можно объяснить различной скоростью диффузии глюкозы и перекиси водорода в агарозные слои (коэффициенты диффузии различаются на несколько порядков), т.е. различиями во времени



**Рис. 1.** Уровень повреждений ДНК спленоцитов мыши при добавлении ГОК (0,1 Ед/мкл) в разные слои агарозы на слайдах: (а) – в верхний слой 0,5%-й агарозы; (б) – в средний слой 1%-й агарозы, содержащий клетки ( $M \pm SEM$ ).

начала генерации перекиси водорода. В случае генерации перекиси водорода в верхнем слое агарозы образующаяся перекись достигает клеток быстрее, чем в случае, когда глюкоза должна пройти через верхний слой в средний и там начнется образование  $H_2O_2$ .

В экспериментах с цельной кровью варьирующие количества глюкозы будут присутствовать в слое агарозы, содержащем клетки и плазму. Для оценки вклада этой глюкозы в индукцию ДНК-повреждений, генерируемой  $H_2O_2$ , мы провели эксперименты в следующих вариантах. Фермент наносили на поверхность агарозного слоя, содержащего клетки костного мозга в среде RPMI 1640 с разными концентрациями глюкозы, раствор ГОК (0,02 Ед/мкл) добавляли сверху на слайды и инкубировали при 20°C в течение 5 мин (рис. 2). Как и для спленоцитов, в клетках костного мозга с ростом концентрации глюкозы наблюдалось увеличение уровня повреждений ДНК. При концентрации ГОК 0,02 Ед/мкл и 2,5 мМ глюкозы величина %TDNA в этих экспериментах составляет  $33,4 \pm 3,7\%$ , а для 0, 625 мМ равнялась  $8,3 \pm 1,1\%$ . Последняя концентрация глюкозы сопоставима с той, что может быть в экспери-



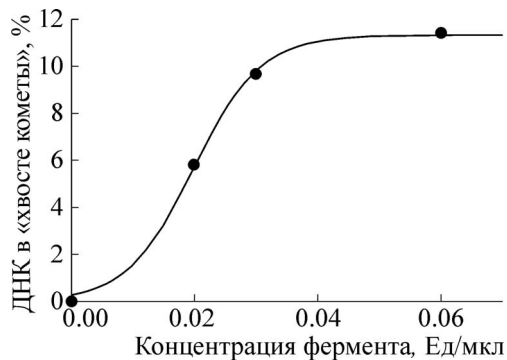
**Рис. 2.** Зависимость уровня повреждений ДНК клеток костного мозга мыши от концентрации глюкозы; ГОК – 0,02 Ед/мкл ( $n = 5$ ;  $M \pm SEM$ ).

ментах с цельной кровью (при приготовлении препаратов конечное разведение крови – в 12 раз), т.е. концентрация эндогенной глюкозы может находиться в диапазоне 0,33–0,58 мМ, исходя из нормального уровня сахара в крови. Следовательно, вклад эндогенной глюкозы плазмы крови в уровень поврежденности ДНК может составлять порядка 4–8% TDNA.

На основании представленных результатов мы пришли к заключению, что оптимальным вариантом является иммобилизация ГОК в верхний слой 0,5%-й агарозы, находящийся над слоем с клетками, а добавление глюкозы следует проводить на агарозный слой сверху. При таком способе иммобилизации фермента в слайды исключался прямой контакт ГОК с клеточной суспензией. Следует контролировать наличие глюкозы в исследуемой клеточной суспензии, поскольку ее присутствие может приводить к варируемости результатов.

Разработанный нами подход мы протестировали на образцах цельной крови условно здоровых доноров. Результаты экспериментов с цельной кровью при добавлении экзогенной глюкозы (2,5 мМ) на слайды с иммобилизованными клетками и разными количествами ГОК представлены на рис. 3. Аппроксимация экспериментальных данных показала наличие сигмоидальной зависимости между уровнем индуцируемых повреждений и количеством фермента, иммобилизованного в агарозу. Уровень повреждений ДНК возрастал также с увеличением времени инкубации (таблица).

Интересно было оценить возможность использования такого подхода для изучения процессов репарации ДНК в условиях *in vitro*. Для этого были определены базальный и индуцированный уровни повреждений ДНК лейкоцитов капиллярной крови доноров сразу и через 30 мин после воздействия (рис. 4). С этой целью



**Рис. 3.** Влияние концентрации ГОК на уровень повреждений ДНК лейкоцитов человека: прирост средних величин %TDNA при вычете базального (контрольного) уровня. Время инкубации с глюкозой (2,5 мМ) – 1 мин.

через 5 мин инкубации в системе «глюкоза–глюкозооксидаза» часть слайдов быстро промывали большим количеством холодного фосфатно-солевого буфера и сразу же помещали в лизирующий раствор (проба «глюкоза–глюкозооксидаза»), а другую часть слайдов инкубировали в свежей порции буфера при 37°C в течение 30 мин (проба «репарация ДНК»). Такой же инкубации подвергали и часть контрольных слайдов.

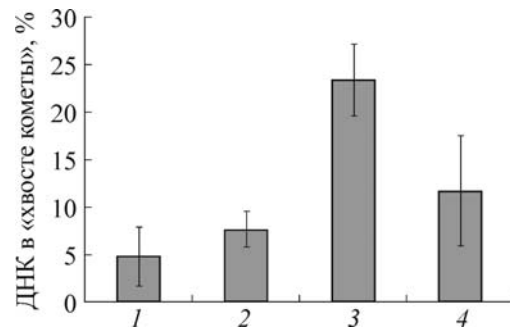
В результате инкубации агарозных слайдов с ГОК и глюкозой уровень повреждений ДНК лейкоцитов достоверно возрастал по сравнению со слайдами без фермента (проба «контроль»). Уровень повреждений ДНК в контрольных слайдах, инкубированных 35 мин в фосфатном буфере, достоверно не отличался от исходного. Значения %TDNA лейкоцитов в пробе «репарация ДНК» были достоверно ниже, чем в пробе «глюкоза–глюкозооксидаза», что свидетельствует о репарации ДНК.

Здесь необходимо подчеркнуть, что в ранее опубликованных работах перекисью водорода,

зависимость уровня повреждений ДНК лейкоцитов человека от времени инкубации в системе «глюкоза–глюкозооксидаза» (фермент – 0,02 Ед/мкл, субстрат – 2,5 мМ) ( $M \pm SD$ ).

Время и условия инкубации	Количество доноров	%TDNA
Без глюкозы, без ГОК, 1 мин	29	5,3 ± 4,3
Глюкоза–ГОК, 1 мин	6	10,7 ± 1,8
Глюкоза–ГОК, 5 мин	13	23,9 ± 10,5*

Примечание. \* –  $P < 0,05$  по сравнению с пробой «глюкоза–глюкозооксидаза, 1 мин».



**Рис. 4.** Уровни повреждений ДНК лейкоцитов капиллярной крови человека через 30 мин после инкубации в системе «глюкоза–глюкозооксидаза» ( $M \pm SD$ ): 1 – контроль; 2 – контроль, инкубированный в фосфатном буфере 35 мин; 3 – глюкоза–глюкозооксидаза; 4 – репарация ДНК.

генерируемой ГОК с добавлением глюкозы, обрабатывали не слайды, а клеточную суспензию, добавляя фермент в культуральную среду [2–6,11–14]. При этом варьировали как время обработки (добавляется время, необходимое для отмывки клеток и приготовления слайдов), так и температуру, при которой клеточную суспензию смешивали с расплавленной агарозой (37–40°C. Если для приготовления слайдов использовать клетки, не отмывые от среды и ГОК, то возможно формирование дополнительных повреждений ДНК в процессе смешивания с агарозой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При иммобилизации клеток и ГОК в разные слои агарозы достигается отделение фермента от клеток с элементами клеточной среды, но нет препятствий для воздействия генерируемой  $H_2O_2$  на клетки. Такой подход позволяет варьировать как концентрации фермента и/или субстрата, так и длительность воздействия. Показано успешное использование слайдов с ГОК не только для оценки индуцированного воздействием  $H_2O_2$  уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови человека, но и для репарации ДНК. При иммобилизации ГОК в агарозные слайды расширяются возможности метода «комета-тест», и эксперименты проводятся в более контролируемых условиях.

Оценку состояния внутриклеточной антиоксидантной системы также можно проводить с помощью предложенного подхода по изменению уровня повреждений ДНК в клетках, например, в лейкоцитах цельной крови человека.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты* (Слово, Москва, 2006).
2. A. Barbouti, P.-T. Doulias, L. Nouis, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **33** (5), 691 (2002).
3. Y.-O. Son, S.-H. Kook, Y.-S. Jang, et al., *J. Cell. Biochem.* **108**, 989 (2009).
4. A. Dhanasekaran, S. Kotamraju, C. Karunakaran, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 567 (2005).
5. A. Bacsi, S. Kannan, M.-S. Lee, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1650 (2005).
6. P. Kaczara, T. Sarna, and J. M. Burke, *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1064 (2010).
7. L. Giovannelli, V. Pitozzi, S. Riolo, and P. Dolara, *Mutat. Res.* **538**, 71 (2003).
8. И. А. Кондратьева, Н. В. Воробьева, О. В. Буракова и др., *Практикум по иммунологии*, под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова (Изд-во МГУ, Москва, 2001).
9. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558** (1–2), 27 (2004).
10. D. P. Lovell and T. Omori, *Mutagenesis* **23** (3), 171 (2008).
11. A. Dhanasekaran, S. Kotamraju, S. V. Kalivendi, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (36), 37575 (2004).
12. M. Tenopoulou, P.-T. Doulias, A. Barbouti, et al., *Biochem. J.* **387**, 703 (2005).
13. N. Signorini-Allibe, B. Gonthier, F. Lamarche, et al., *Alcohol and Alcoholism* **40** (3), 163 (2005).

## Induction of DNA Damage in Mammalian Cells by Hydrogen Peroxide Generated by Glucose Oxidase Immobilized in Agarose Slides

N.P. Sirota, S.I. Glukhov, T.V. Sirota, I.Yu. Mitroshina, and E.A. Kuznetsova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

A new model system was developed to study the influence of reactive oxygen species on isolated mammalian cells together with application of Comet assay. The enzyme-based system of glucose/glucose oxidase was applied as a hydrogen peroxide-generating source. The level of DNA damage of cells treated *in vitro* with hydrogen peroxide and untreated cells was measured using the alkaline Comet assay. The experiments were performed using mouse splenocytes, bone marrow cells, and human leukocytes. Different architectures of the model system were compared: glucose oxidase with mammalian cells were mounted in the same agarose layer of slides; mammalian cells and glucose oxidase were immobilized in separate but neighboring agarose layers: glucose oxidase was immobilized in the upper layer of agarose; and glucose oxidase in PBS was added onto the top of agarose slides with mammalian cells immobilized in them. The most optimal results were observed using the second type of architecture, where mammalian cells and glucose oxidase were immobilized in separate neighboring layers. The close localization of cells and the enzyme in separate layers facilitated the peroxide diffusion to target cells. The application of the system for whole blood analysis needs the internal glucose control. The approach proposed can be used for studying the DNA damage induced *in vitro* and the detection of DNA repair. The approach extends the potentiality of the method, and the experiments are conducted under more stringent control.

*Keywords: Comet assay, DNA damage, hydrogen peroxide, glucose oxidase*