

М.М. Винокуров, В.В. Савельев, Т.В. Ялынская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА «ДНК-КОМЕТ» ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ, ВЫЗВАННЫХ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

УДК 577.323:576.385(591+581)

Метод анализа поврежденности ДНК (ДНК-комет, DNA-comet assay, метод гель-электрофореза ДНК отдельных клеток) нашел свое применение в клинической практике как метод контроля эффективности лечения и выраженности генотоксикологического эффекта при развитии эндогенной интоксикации. Данные обзора литературы позволяют сделать вывод о возможном клиническом применении метода при определении уровня эндогенной интоксикации у больных острым деструктивным панкреатитом.

Ключевые слова: повреждения ДНК, мутации, репарация, апоптоз, генотоксичность.

The method of analysis of DNA damage («DNA comet», DNA-comet assay, method of gel electrophoresis of individual cells DNA) found its application in clinical practice as a method of monitoring the effectiveness of treatment and the severity of genotoxicologic effect in the development of endogenous intoxication. The literature review data suggest a possible clinical application of the method in determining the level of endogenous intoxication in patients with acute destructive pancreatitis.

Keywords: DNA damage, mutations, repair, apoptosis, genotoxicity.

Многие исследователи, занимающиеся проблемами адаптации человека на Крайнем Севере, отмечают, что для большинства жителей Республики Саха (Якутия) характерны снижение или искажение большей части биохимических процессов и нарушение гомеостаза организма, выражающиеся изменениями углеводного, белкового и липидного обменов, иммунологической реактивности [1–5], баланса прооксидантных и антиоксидантных систем, активности ферментов, участвующих в протективных и дезинтоксикационных процессах организма [1,3, 4, 7]. Не вызывает сомнений, что все эти патологические изменения гомеостаза влияют на течение любого заболевания и требуют учета и анализа для принятия решения их коррекции в комплексной программе лечения [2, 5, 10, 11]. Стоит отметить, что именно про- и антиоксидантные системы организма являются наиболее значимыми в патогенезе воспалительного процесса, а также играют существенную роль в прогрессировании и развитии различных осложнений [5, 10]. По этой причине исследования, направленные на изучение патогенетически значимых нарушений гомеостаза, их динамики с целью контроля эффективности и сво-

временной коррекции проводимого комплекса лечебных мероприятий, имеют значительную ценность.

Воздействие неблагоприятных факторов на любую биологическую систему (в том числе на организм человека) сопровождается накоплением повреждений ДНК и изменением активности систем репарации, что может привести к возникновению мутаций, патологических изменений клетки и всего организма. В представленном обзоре проведена оценка эффективности метода «ДНК-комет» для детекции повреждений ДНК, вызванных эндогенной интоксикацией (в том числе и той, которую обуславливает и острый деструктивный панкреатит), что и явилось причиной выбора данной методики. Метод обладает чувствительностью, необходимой для регистрации повреждений ДНК на уровне отдельной клетки, и может быть применен для оценки интегральной целостности генома. Области применения метода «ДНК-комет»: любая биологическая система [9].

Принцип метода основан на регистрации различной скорости передвижения в постоянном электрическом поле целой и фрагментированной ДНК изолированных клеток, заключенных в агарозный гель. Молекулы целой ДНК изолированной клетки компактно продвигаются в электрическом поле. При наличии ДНК с нарушенной структурой скорость продвижения в электрическом поле будет отличаться от скорости неизменной молекулы ДНК.

Структура «хвоста ДНК-кометы» обусловлена естественными процессами репликации и транскрипции ДНК, связанными с делением клетки и процессами синтеза белка [8, 12].

Ход определения. Образцы крови (2 мл) смешивали с равным объемом среды RPMI-1640, содержащей 10% диметилсульфоксида, замораживали или хранили до анализа при -20°C. Затем для анализа образцы крови в объеме 50 мкл вносили в пробирки с 500 мкл 1%-ного раствора агарозы, ресуспендировали и наносили на предварительно покрытые агарозой предметные стекла. После затвердения агарозы микропрепараты лизировали охлажденным буфером (10 mM Tris HCl [pH 10], 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% Triton X-100, 10% DMSO) не менее 1 ч. После окончания лизиса микропрепараты инкубировали в буфере для электрофореза (300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂, pH>13) в течение 20 мин для реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК. Проводили электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1/ V см и силе тока – 300 мА. После проведения электрофореза микропрепараты фиксировали в 70%-ном растворе этилового спирта, высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре [5, 8].

Непосредственно перед микроскопированием необходимые препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1:10000 в ТЕ-буфере) в течение 30 мин. Анализ

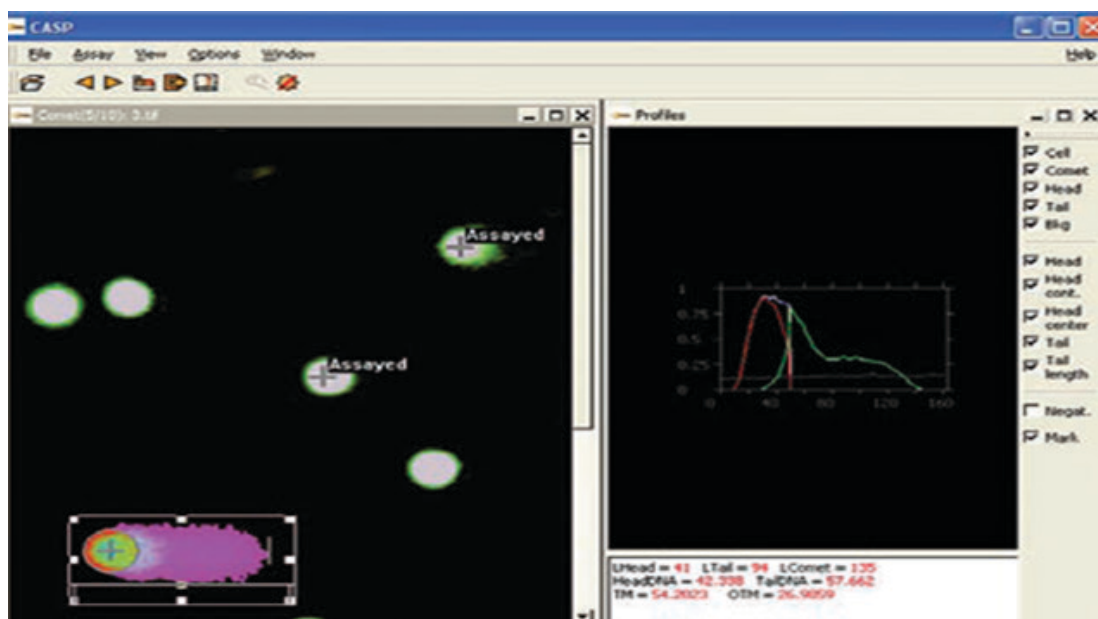


Рис. 1. Анализ цифровых изображений ДНК-комет в программной среде CASP 2.2.1. (CaspLab, USA).

проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия), при увеличении $\times 400$. Полученные с микропрепаратов изображения «ДНК-комет» анализировали с использованием программного обеспечения CASP 2.2.1. (CaspLab, USA) (рис. 1).

Программно-аппаратный комплекс состоит из совмещенной с микроскопом высокочувствительной CCD-камеры и специализированного программного обеспечения, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров «ДНК-комет»,

характеризующих целостность структуры ДНК: длину «ДНК-комет», длину «хвоста», диаметр «головы», процентное содержание ДНК в голове или хвосте (% ДНК) и т. д. (рис. 2, а).

В качестве показателя поврежденности ДНК чаще всего используют длину хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте или их произведение – так называемый «момент хвоста» (tail moment) [13,14]. Апоптотические ДНК-кометы идентифицировали как специфичные «ДНК-кометы» с диффузным хвостом и практически отсутствующей головой, а некротические – как широкие диффузные «ДНК-кометы» неправильной формы (рис.2, в, г). Выявле-

ние таких атипичных ДНК-комет можно рассматривать как косвенный показатель соответственно апоптотической или некротической гибели клеток. В микропрепаратах ДНК-комет часто выявляют атипичные (цитотоксические) ДНК-кометы с отсутствующей или практически отсутствующей головой и широким диффузным хвостом, получившие название ghost cells или hedgehogs [9], их выделяют в отдельную категорию и рассматривают отдельно. Поскольку ДНК в хвосте таких комет представлена в виде коротких дискретных фрагментов (рис. 2, б), предполагается, что эти ДНК-кометы могут формировать апоптотические клетки, находящиеся на стадии фрагментации хроматина [6].

Метод «ДНК-комет» имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с другими методами оценки поврежденности ДНК. Это – высокая чувствительность, возможность регистрации повреждений ДНК в клетках любых тканей *in vivo*, минимальное количество требуемого экспериментального материала, относительно низкая стоимость, высокая «пластичность», позволяющая при незначительных модификациях использовать метод для селективной регистрации различных категорий повреждений ДНК и связанных событий. Привлекает быстрота проведения экспериментов и относительная простота лабораторного протокола. Сегодня имеется единое мнение о необходимости включения метода «ДНК-комет» в качестве индикаторного теста в систему экспертной оценки генотоксичности *in vitro* и *in vivo*. В России данный метод входит в

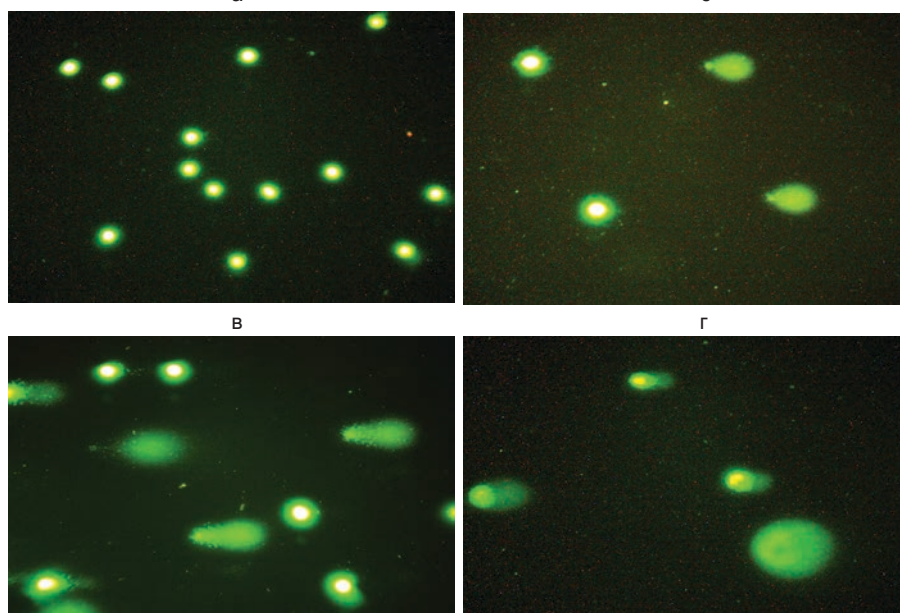


Рис. 2. ДНК-кометы клеток с различной степенью поврежденности ДНК: а) мононуклеарные клетки здорового человека, б) ДНК-кометы ghost cells, в) ДНК-кометы апоптотических клеток, г) ДНК-кометы некротических клеток

ряд методических рекомендаций и указаний [9, 12].

Дополнительно следует указать на перспективу применения метода «ДНК-комет» в качестве индикаторного теста в эпидемиологических, различного рода экспериментальных и клинических исследованиях, при изучении этиопатогенетической роли первичных повреждений ДНК, а также для оценки «качества жизни» биологической системы в тех или иных экологических условиях среды обитания.

Литература

1. Влияние нарушений экологических равновесий на здоровье населения Севера на примере Республики Саха (Якутия) / П.Г. Петрова, Б.М. Кершенгольц, О.Н. Колосова, И.М. Мельцер // Дальневосточный медицинский журнал. – 2001. – №4. – С. 5-10.
2. Influence of ecological imbalance in the population of the North Health on the example of the Republic Sakha (Yakutia) / P.G. Petrova, B.M. Kerdhengolts, O.N. Kolosova, I.M. Meltzer // Far East Medical Journal. – 2001. №4. – P. 5-10.
3. Интенсивность процессов перекисидации и состояние антиоксидантной защиты у больных с инфицированными формами панкреонекроза / М.М. Винокуров, В.В. Савельев, Е.С. Хлебный, Б.М. Кершенгольц // Дальневосточный медицинский журнал. – 2010. – №2. – С. 19.
4. The intensity of the processes of peroxidation and antioxidant defense in patients with infected pancreatic necrosis forms / M.M. Vinokurov, V.V. Savelev, E.S. Hlebnii, B.M. Kerdhengolts // Far East Medical Journal. – 2010. - №2. – P. 19.
5. Иванов А.И. Комплексное лечение гнойных осложнений в абдоминальной хирургии / А.И. Иванов, А.С. Григорьев, В.А. Петрова // Актуальные вопросы здоровья населения Республики Саха (Якутия): мат-лы респ. науч.-практич. конф. – Якутск, 1997. – С. 74-75.
6. Ivanov A.I. Complex treatment of suppurative complications in abdominal surgery / A.I. Ivanov, A.S. Grigor'ev, V.A. Petrova // Actual problems of public health in the Republic Sakha (Yakutia): mat. of the rep. scientific-practical conf. - Yakutsk, 1997. - P. 74-75.
7. Кривошапкин В.Г. Очерки внутренних болезней на Севере / В.Г. Кривошапкин. – Якутск, 2001. – 128 с.
8. Krivoschapkin V.G. Sketches of internal medicine in the North / V.G. Krivoschapkin. - Yakutsk, 2001. – 128 p.
9. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет / Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. // Прикладная токсикология. - Т.2 №2 (4) – 2011, с. 28-37.
10. Methodical aspects of assessment of DNA damage by DNA - comet method / A.K. Gantaev, V.A. Nikitina, E.S. Voronina, A.D. Durnev // Applied toxicology. - V.2. - №2 (4). – 2011. - P.28-37.
11. Миронова Г.Е. Состояние антиоксидантной защиты при развитии хронического обструктивного бронхита и применение антиоксидантов в комплексной терапии больных в условиях Крайнего Севера: автореф. дисс... д-ра биол. наук / Г.Е. Миронова. – М., 2000. – 50 с.
12. Mironova E.G. Status of antioxidant protection in the development of chronic obstructive bronchitis and the use of antioxidants in the treatment of patients in the Far North: dissertation of the doctor of biological sciences/ G.E. Mironova. – M., 2000. – 50 p.
13. Потапов А.Ф. Комплексная оценка интенсивной терапии хирургической абдоминальной инфекции в специализированном Центре экстренной медицинской помощи Республики Саха (Якутия): дисс. ... д-ра мед. наук / А.Ф. Потапов. – М., 2004. – 237 с.
14. Potapov A.F. Comprehensive assessment of intensive care surgical abdominal infections in a specialized Center for Emergency Medical Aid of the Republic Sakha (Yakutia): dissertation of the doctor of medical sciences / A.F. Potapov. – M., 2004. – 237 p.
15. Применение метода щелочного гелеэлектрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: методич. рекомендации / Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А. [и др.]. М., 2006. – 28 с.
16. Application of the alkaline gel electrophoresis to assess isolated cells genotoxic properties of natural and synthetic compounds: guidelines / Durnev A.D., Gantaev A.K., Anisina E.A. [et al.]. - M., 2006. - 28 p.
17. Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. – 2008. – Т.10, №3. – С. 303-309.
18. Sorochinskaya U.B. Application of the comet assay to assess DNA damage caused by various environmental agents / U.B. Sorochinskaya, V.M. Mikhailenko // Oncology. - P.10. - №3. – 2008. - p. 303-309.
19. Тяп-тиргянова Т.М. Дооперационная диагностика механической желтухи / Т.М. Тяп-тиргянова, В.Г. Игнатьев // Актуальные проблемы экстренной медицинской помощи: мат-лы респ. науч.-практич. конф. – Якутск, 2000. – Вып. 1. – С. 49-51.
20. Tyaptiganova T.M. Preoperative diagnosis of obstructive jaundice / T.M. Tyaptiganova, V.G. Ignatev // Materials of the Republican scientific-practical conference «Actual problems of emergency medical care. – Yakutsk, 2000. – № 1. – P. 49-51.
21. Эколого-иммунологические проблемы адаптации человека на Севере / П.Г. Петрова, О.Н. Иванова, Ф.А. Захарова, В.В. Васильева // Достижения и перспективы медицинской науки в Республике Саха (Якутия): мат-лы респ. науч.-практич. конф. – Якутск. – 2001. – С. 135-137.
22. Environmental and human adaptation immunological problems in the North/ P.G. Petrova, O.N. Ivanova, F.A. Zaharov, V.V. Vadileva// Materials of the Republican scientific-practical conference «Achievements and perspectives of medical science in the Republic of Sakha (Yakutia) ». – Yakutsk. – 2001. – p. 135-137.
23. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды / Э.В. Филиппов // Наука и образование. – Якутск, 2014. – №2. – С. 72-78.
24. Filippov E.V. The use of the «comet assay» to detect and assess the extent of DNA damage cells of organisms of plants, animals and humans, caused by environmental factors // Science and education. - Yakutsk. - 2014. - №2. - P. 72-78.
25. Chaubey RC. Computerized image analysis software for the comet assay / RC. Chaubey // Methods Mol Biol 2005; 291: 97-106.
26. Francesconi A. Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells /A. Francesconi, E. Del Terra, A. Meli, F.S. Ambesi-Impimbatto // Phys Med 2001; 17(1): 232-4.