

Биология

УДК 612.014.4.083.36

Г.Г. ОГАНЕСЯН

**МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ОЦЕНКЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ И РЕПАРАЦИИ ДНК
1. ОЦЕНКА ЭНДОГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК**

Метод ДНК-комет (гель-электрофорез отдельных клеток) позволяет эффективно оценивать генетические эффекты эндогенных факторов. В клетках больных периодической болезнью, в отличие от здоровых, не выявлено повышения уровней спонтанных и индуцированных эндонуклеазой III повреждений ДНК.

Измерение уровней повреждений и репарации ДНК – одна из основополагающих задач в исследованиях по генетической токсикологии и генетическому мониторингу популяций человека.

В настоящее время в научных исследованиях широко применяется метод комет (МК) – гель-электрофорез единичных клеток, позволяющий быстро и точно определять уровни как повреждений, так и репарации ДНК практически в любой популяции клеток эукариотических организмов.

МК впервые был разработан в 1984 г. [1], впоследствии он подвергался различным модификациям. Сущность метода заключается в том, что при наличии разрывов нитей в молекуле ДНК вследствие перераспределения зарядов разорванные края заряжаются отрицательно. При электрофорезе заряженная ДНК может двигаться из ядра по направлению к аноду. При этом возникает структура, похожая на комету: ядро напоминает головку, а вышедшая из ядра ДНК – ее хвост, длина и интенсивность окраски которого прямо пропорциональны количеству повреждений ДНК в данной клетке. На предметные стекла в агарозный слой помещается небольшое количество клеток. Клетки лизируются детергентами. После электрофореза препараты окрашиваются бромистым этидием и анализируются на флюоресцентном микроскопе либо визуально, либо с использованием специальных компьютерных программ [2].

В настоящее время применяются три основные модификации МК – в нейтральных и щелочных условиях лизиса, а также с использованием эндонуклеаз для оценки уровней окисленных азотистых оснований в ДНК. При нейтральных условиях лизиса [1] определяются только двуцепочечные разрывы ДНК, при щелочных ($pH > 13$) – оценивается уровень одноцепочечных разрывов, так как при этом происходит раскручивание двойной спирали ДНК, благодаря которому освобождаются и отрываются от ДНК также и

одноцепочечные фрагменты. Метод позволяет обнаруживать не только открытые разрывы, но и щелочно-лабильные сайты, шивки ДНК и сайты неполной эксцизионной репарации. Эта разновидность метода используется наиболее широко [3]. Разновидность МК с использованием эндонуклеазных ферментов, вызывающих разрывы в местах окисленных пуринов и пиримидинов, позволяет оценивать уровень окислительного стресса в клетках [4].

Применение МК позволяет, в частности, изучать уровень эндогенных повреждений и репарации ДНК в клетках при изменениях физиологических параметров, а также при различных заболеваниях.

Показано, что изменение миграции ДНК в клетках крови в тесте комет может быть вызвано физической активностью [5]. С возрастом повышается уровень повреждений ДНК, индуцированных *in vitro* рентгеновским облучением [6].

В связи с дефектом инцизионной репарации в клетках больных пигментной ксеродермой, в отличие от здоровых, наблюдается индукция достоверно более низкого уровня опосредованных репарацией разрывов ДНК после облучения *in vitro* УФ-лучами. Авторы [7] предлагают использовать МК для диагностики пигментной ксеродермы. Оценка разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским излучением, показала, что уровень репарации в опухолевых клетках достоверно ниже, чем в лейкоцитах периферической крови тех же пациентов [8]. В клетках больных анемией Фанкони и синдромом Дауна методом комет показан повышенный уровень разрывов ДНК [9]. Обнаружено, что уровень миграции ДНК в лимфоцитах при острых инфекциях увеличивается почти в 5 раз. Уровень комет повышается после курса лечения острых инфекционных заболеваний, а также при неполноценном питании [10].

Из ряда исследований семейной средиземноморской лихорадки или периодической болезни (ПБ), встречающейся с высокой частотой в армянской популяции, известно, что для данного заболевания характерна активация свободно-радикальных процессов в клетках и, в частности, повышенная продукция активных форм кислорода [11–13].

В связи с этим целью данной работы стало сравнительное изучение уровней окислительных повреждений ДНК в лейкоцитах 10 больных ПБ и 10 здоровых доноров.

В исследовании применялась разработанная Коллинзом [4] модификация МК с использованием эндонуклеазы III, вызывающей разрывы в области окисленных пиримидинов. Повреждения ДНК оценивались визуально под флуоресцентным микроскопом и выражались в условных единицах (у.е.). Статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA из пакета STATGRAPHICS Plus.

При сравнении вариантов с ферментом и без фермента в клетках больных ПБ (150,1 и 36,3 у.е.) и здоровых доноров (146,5 и 35,9 у.е.) выявлено достоверное повышение уровней повреждений ДНК при действии эндонуклеазы III ($p < 0,001$ в обоих случаях).

При сравнении уровней спонтанных и окислительных повреждений ДНК в клетках больных ПБ и здоровых лиц достоверных различий между двумя изученными группами не обнаружено ($p > 0,05$). В то же время данные лите-

ратуры свидетельствуют о высоком уровне оксидативного стресса в клетках больных ПБ. Из полученных нами результатов следует, что оксидативный стресс, затрагивающий ряд клеточных компонентов, не обязательно коррелирует с повышением уровней оксидативных повреждений ДНК. Таким образом, высокочувствительный МК позволил нам выявить повышение уровней разрывов ДНК, обусловленных окислением пиримидинов, которое, очевидно, не связано с общим уровнем окислительного стресса в клетках.

Кафедра генетики и цитологии

Поступило 18.06.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Ostling P.L., Johanson K.J. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, v. 123, p. 291–298.
2. Muller W.-U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F., Bocker W. – Int. J. Radiat. Biol., 1994, v. 65, № 3, p. 315–319.
3. Singh P.N., McCoy T.M., Tice R.R., Schneider E.L. – Exp. Cell Res., – 1988, № 175, p. 184–191.
4. Collins A.R., Duthie S.J., Dobson V.L. – Carcinogenesis, 1993, v. 14, p. 1733–1735.
5. Hartman A., Plappert U., Raddatz K., Grunert-Fuchs M., Speit G. – Mutagenesis, 1994, v. 9, № 3, p. 269–272.
6. Singh N.P., Danner D.V., Tice R.R., Brant L., Schneider E.L. – Mutat. Res., 1990, v. 232, p. 123–130.
7. Green M.H.L., Lowe J.E., Harcourt S.A., Akinluyi P., Rowe T., Cole J., Anstey A.V., Arlett C.F. – Mutat. Res., 1992, № 273, p. 137–144.
8. Neubauer S., Liehr T., Birkenhake S., Gebhart E., Fietkau R., Sauer R. – Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 1998, № 14, p. 121–124.
9. Maluf S.W., Erdtmann B. – Cancer Genet Cytogenet., 2001, v. 124, № 1, p. 71–75.
10. Betancourt M., Ortiz R., Gonzales C., Perez P., Cortes L., Rodrigues L., Villasenor L. – Mutat. Res., 1995, v. 331, p. 65–77.
11. Арутюнян В.М., Симонян М.Б., Чакарян М.Б., Акопян Г.С., Симонян Р.М. – Медицинская наука Армении, 1997, № 1–2, с. 95–100.
12. Саркисян Т.Ф., Арутюнян Р.М., Эмери И., Межлумян А.С., Геворкян А.Л., Арцруни И.Г. – Медицинская наука Армении, 1997, т. 37, № 3–4, с. 131–139.
13. Karaguezuyan K.G., Haroutjunian V.M., Mamiconyan R.S., Hakobian G.S., Nazaretian E.E., Hovsepyan L.M., Hoveyan G.A., Gevorkian E.M., Hovakimyan S.S., Zakarian A.E., Quinn P.J. – J. Clin. Pathol., 1996, v. 49, p. 453–455.

Գ.Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԴՆԹ-ԳԻՍԱՍՏՂԵՐԻ ՄԵԹՈԴԸ ԴՆԹ-Ի Վ ՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԵՎ
ՌԵՊԱՐԱՑԻԱՅԻ ԳՆԱՀԱՏՄԱՆ ՀԱՄԱՐ
1. ԴՆԹ-Ի ԷՆԴՈԳԵՆ ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄ

Ամփոփում

ԴՆԹ-գիսաստղերի մեթոդը առանձին բջիջների գել-էլեկտրաֆորեզ է, որը թույլ է տալիս էֆեկտիվ գնահատել էնդոգեն գերծոնների գենետիկական էֆեկտները: Ի տարբերություն առողջ մարդկանց բջիջների՝ պարբերական հիվանդությամբ տառապող հիվանդների բջիջներում չի հայտնաբերվել ինչպես սպոնտան, այնպես էլ էնդոնուկլեազ III-ով ինդուկտված ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի աճ:

THE COMET ASSAY APPLICATION FOR ESTIMATION OF DNA DAMAGE
AND REPAIR

1. ESTIMATION OF ENDOGENOUS DNA DAMAGE

Summary

Comet assay (CA) – single cells gel-electrophoresis can be used for effective estimate of DNA damage induced by endogenous agents. In cells of patients with periodic disease the increase of spontaneous and induced by endonuclease III levels of DNA damage compared with healthy subjects has not been revealed.