

УДК 577

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА DNA-COMET ASSAY ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa,
ВЫЗВАННЫХ ОСНОВАНИЯМИ ШИФФА
И ИХ КОМПЛЕКСАМИ С ИОНАМИ МЕДИ(II)**

DZEIKALA Aliaksandr, *MSc. (in Biology) PhD student,*
NOWAK Adriana, *PhD (in Biology), Adiunct;*
SYKUŁA Anna, *PhD (in Chemistry), Adiunct;*
ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA Elżbieta, *Prof. (in Chemistry)*
Poland, Lodz University of Technology

Введение. Попытки, направленные на изучение ядерных структур клетки и количественное определение нитевых повреждений ДНК в одиночных клетках организмов, были предприняты еще в 1978г. такими учеными, как Cook и Brazell [1]. Однако лишь в 1984г. шведские исследователи Ostling и Johanson разработали новый метод определения повреждений ДНК [2].

Именно они, в публикации 1984г., заметили, что изображения фрагментов ДНК, мигрировавших в электрическом поле, напоминали астрономические кометы. «Кометы», полученные учеными из Швеции, обладали главными характеристиками космических комет: они имели «голову» и «хвост» [3]. Отсюда и пошло название – метод ДНК-комет (DNA-comet assay).

«Голова» кометы состоит из клубка ДНК, а «хвост» из мигрировавшей ДНК [1], для визуализации генетического материала препараты окрашивают флуоресцентными красителями (бромистый этидий, акридиновый оранжевый и др.), а затем визуализируют с помощью флуоресцентного микроскопа [3]. Впоследствии метод неоднократно модифицировался и совершенствовался с целью его упрощения и повышения чувствительности выявления повреждений клеточной ДНК.

Надо четко представлять, что «комета» образуется не из клетки живого организма, а именно из ее ДНК. Помещенная в агарозный слой суспензия клеток образует полости, которые в процессе лизиса занимает ДНК этих клеток. Все дальнейшие манипуляции в методе ДНК-комет осуществляются именно с ДНК.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе представлены результаты оценки уровня повреждений ДНК раковых клеток линии HeLa, вызванных основаниями Шиффа на основе гесперетина (hesperetin) и их комплексов с ионами меди(II), структуры исследуемых соединений представлены на рисунке 1. Гесперетиновые основания Шиффа синтезированы в результате реакции флавоноида с *N*-бензоил гидразином (*N*-benzoyl hydrazine) – HHSB и иониазидом (isoniazid) – HIN. Получение основания Шиффа являлись основой для синтеза их комплексов с ионами меди(II). Структура и физико-химические свойства лигандов и их комплексов охарактеризованы с помощью, спектроскопии ядерного магнитного резонанса ядер ^1H и ^{13}C , инфракрасной спектроскопии, абсорбционной спектрофотометрии, элементного анализа (Lodyga-Chruscinska et al. 2015).

Культура клеток. Клеточная линия аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) использовалась в качестве модельной клеточной линии в исследовании. Клетки культивировали в течение 7 дней при 37°C в атмосфере 5% CO_2 с использованием модифицированной Дульбекко среды (DEME, Sigma), дополненной 10% фетальной сывороткой телят (FBS, Gibco), 4 mM GlutaMAXTM (Gibco), 25 mM HEPES (Sigma), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ стрептомицина и 100 IU/mL пенициллина (Sigma).

Метод ДНК-комет (comet assay). Конечную концентрацию клеток HeLa в каждом образце доводили до 10^5 клеток/mL. 900 μL клеток инкубировали с 100 μL каждого соединения при 37°C в течение 1 часа. Все концентрации тестируемых соединений были свежеприготовлены непосредственно перед добавлением в культуру клеток линии HeLa. Конечные концентрации соединений: 1, 10 и 50 μM .

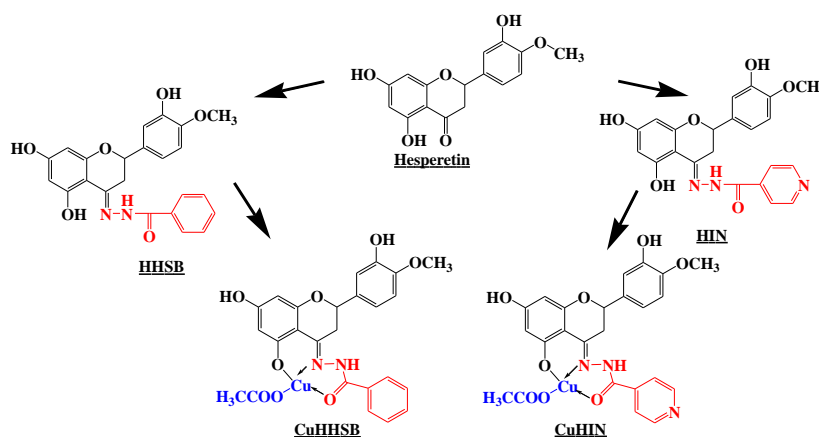


Рисунок – Химическая структура гесперетиновых производных оснований Шиффа HHSB, HIN и комплексов меди (II) CuHHSB, CuHIN.

Анализ комет проводили в щелочных условиях ($\text{pH} > 13$) в соответствии с процедурой Singh et al. 1988 с некоторыми изменениями (Klaude et al. 1996; Błasiak & Kowalik 2000). После инкубации клетки центрифугировали (182×g, 15 мин), декантировали, суспендировали в 0,75% LMP (низкая температура плавления агарозы), по истечению 10 мин наносили на слайды, предварительно покрытые 0,5% NMP (нормальная температура плавления агарозы) и лизировали. После часовой обработки в лизирующем буфере [2,5 M NaCl, 1% Triton X-100, 0,1 M EDTA и 10 mM Tris

(рН 10)] при 4⁰С, препараты помещены в электрофорезную камеру на 20 мин при 4⁰С в щелочной буфер [300 μМ NaOH и 1 μМ EDTA], а затем подвергнуты электрофорезу в течение 20 мин при напряженности электрического поля 0,73 В/см (300 мА) при той же температуре. После электрофореза проводили нейтрализацию дистиллированной водой. После чего слайды слегка подсушили и фиксировали.

Для окраски ДНК использовали 2,5 μg/mL пропидиевый йодид (propidium iodide). Визуализацию ДНК-комет проводили с помощью флюоресцентного микроскопа с использованием объектива × 200 (Nikon, Япония) и видеосистемы на основе цифровой камеры с программой анализа изображений – Lucia-Comet v. 7.0 (Laboratory Imaging, Прага, Чешская Республика). В качестве критерия поврежденности ДНК использовали % ДНК в хвосте комет.

Результаты и обсуждение. генотоксическую активность лигандов ННСВ и НИН, а также комплексов CuННСВ и CuНИН тестировали на опухолевых клетках линии HeLa в трех концентрациях: 1, 10 и 50 μМ, результаты исследований представлены в таблице. Положительным контролем в данной серии экспериментов были клетки линии HeLa, инкубировавшиеся в течение 1 часа в присутствии цисплатины (cisplatinum) при 37⁰С.

Таблица – Повреждение ДНК (± S.E.M.) в клетках линии HeLa после электрофореза для исследуемых соединений, выраженных в % ДНК в хвосте кометы. Количество клеток, проанализированных в каждом повторении, составляло не менее 50 ДНК-комет для каждого соединения.

Соединение	Концентрации соединений		
	50 μМ	10 μМ	1 μМ
	% ДНК в хвосте кометы (± S.E.M.)		
Cisplatin	66.1 ± 4.2	43.1 ± 5.1	21.9 ± 4.4
ННСВ	68.8 ± 4.1	43.8 ± 2.4	28.8 ± 4.1
CuННСВ	47.8 ± 3.8	27.1 ± 3.5	30.3 ± 4.6
НИН	46.7 ± 3.3	35.5 ± 4.7	28.9 ± 3.5
CuНИН	33.2 ± 4.0	17.4 ± 2.9	15.6 ± 1.8

Из таблицы следует, что генотоксичность цисплатина и ННСВ была самой высокой в сравнении с исследуемыми соединениями: от 21,9%±4,4% до 66,1%±4,2% и от 28,8%±4,1% до 68,8±4,1% для цисплатина и ННСВ, соответственно. Как ННСВ, так и его комплекс с медью показали генотоксическую активность, однако лиганд ННСВ показал большую генотоксическую активность, чем его комплекс CuННСВ, что было лучше продемонстрировано в случае более высоких концентраций – 10 и 50 μМ. В случае 1 μМ различия не были заметны, 28,8±4,1% и 30,3%±4,6% для ННСВ и CuННСВ, соответственно. Более низкую генотоксичность к клеткам линии HeLa, проявлял комплекс CuНИН, чем НИН. % повреждения ДНК в хвосте кометы, вызванный при концентрации 1 μМ CuНИН, был почти в два раза ниже (15,6±1,8%), чем в присутствии НИН (28,9±3,5%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что гесперетиновые производные оснований Шиффа и комплексов с ионами металлов являются перспективным классом органических соединений, которые могут использоваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Список использованных источников

1. Cook, P. R. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA / P. R. Cook., I. A. Brazell // J. Cell Sci. – 1976. – V. 22. – P. 303-324.
2. Ostling, O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / O. Ostling, K. J. Johanson // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 123. – P. 291-298.
3. Liao, W. *The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells* / W. Liao, M. A. McNutt, W.-G. Zhu // Methods. – 2009. – V. 48. –P. 46-53.