

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
Институт биологии, экологии и природных ресурсов
Кафедра физиологии и генетики

Бах Себастиан Николаевич

**Исследование влияния процедуры криоконсервирования на показатели
фрагментации ДНК клетки человека на модели *in vitro***

Выпускная квалификационная работа
(дипломная работа)

По направлению подготовки 06.03.01 Биология
Направленность (профиль) подготовки «Генетика»

Научный руководитель:
к.б.н., доцент Ларионов А.В.

Работа защищена с оценкой:

Протокол ГЭК № _____

от « ____ » _____ 2020 г.

Секретарь ГЭК _____

Кемерово 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Криоконсервации биологических материалов и витрификации.....	7
1.2. Криопротекторы.....	18
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1. Материалы исследования.....	22
2.2. Методы криоконсервирования	22
2.3. Методы детекции уровня фрагментации ДНК	23
2.4. Методы микроскопирования	28
2.5. Методы оценки комет.....	28
2.6. Статистические методы.....	28
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	29
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	42

Список сокращений

БМ – биологические материалы

ВФ – витрификация

КК – криоконсервация

КП – криопротекторы

КПВ – криоповреждения

КС – криостазис или анабиоз

МК — метод ДНК-комет

МКК – медленная криоконсервация

ОТМ – Olive Tail Moment – момент хвоста по Оливу

СВЧ – сверхвысокочастотное

СХ – срок хранения

ЭГ – экологическая генетика

ВВЕДЕНИЕ

Экологическая генетика (ЭГ) занимается изучением генетического аспекта взаимодействия организмов, а также изучает любые формы изменения организмов под влиянием экологических факторов (ЭФ). Главный вопрос исследований в ЭГ – изучение генотоксического влияния факторов внешней среды на геном организма, а также приведение результирующих данных, полученных в ходе исследований, в виде статистической базы данных. В ходе экогенетических исследований используются исключительно свежие биоматериалы (БМ) для определения токсических свойств экологических факторов (например, уровень естественной и искусственной радиации, концентрации тяжелых металлов, концентрации фторидов и т. д.) на клетку. Причина необходимости использования исключительно свежих биоматериалов заключается в следующем: 1) уязвимость молекулы ДНК к длительной экспозиции факторами фрагментации; 2) накопление точечных мутации и иные формы нарушения структуры ДНК; 3) лимит возможности и сбой системы репарации ДНК как фактора, поддерживающего целостность ДНК в интактном состоянии.

Чем дольше клетка находится в неблагоприятной среде, тем больше вероятность количественного увеличения показателя фрагментации и ошибочности в структуре ДНК, результирующая в отклонении полученных данных при детекции фрагментации молекулы ДНК. Короткий срок хранения (СХ) БМ ограничивает возможности проведения исследования генетического материала. В связи с данной проблемой, ряд научных коллективов осуществляет поиск различных возможностей продления СХ клеток, взятых из организмов.

Несколько методов было разработано в ходе решения данного вопроса. Одним из наиболее эффективных методов продления сроков хранения биоматериалов оказалась медленная криоконсервация (МКК) БМ и витрификации (ВФ). Данные методы основаны на «теории о

криоконсервации», где предполагается, что понижение температуры способствует замедлению метаболических процессов, протекающие в клетке, до очень низких значений.

Но имеется ряд особенностей метода, ограничивающих возможности применения в исследовательских экспериментах. Первым фактором, ограничивающим использование метода криоконсервирования, является образование кристаллов льда вне и внутри клетки, что служит фактором разрушения клеточной стенки. Вторым фактором является обезвоживание клетки при заморозке. Клетки, потерявшие 60 % и более влаги, не сохраняют свою способность к восстановлению и погибают из-за обезвоживания. В целях повышения результативности КК и ВФ используют криопротекторы (КП), которые работают как антифриз, и позволяют защищать клетку от криповреждения (КПВ), причиной которого является образование льда. Помимо данных факторов гибели клеток, имеется ряд дополнительных факторов риска клеточной гибели при МКК и ВФ, которые до конца не изучены.

Актуальность проблемы определяется следующими недостатками метода: 1) низкая степень изученности механизмов, работающих при КК и ВФ объектов различных уровней организации, с КП и без КП (Щеглова, 2005); 2) неизвестно влияние КП на клетки, что затрудняет их использование при замораживании; 3) отсутствие оптимального протокола по КК и ВФ; и 4) опубликовано ограниченное количество статей и литературы, посвященных данной проблеме.

Результаты данной научной работы могут послужить материалом для дальнейших исследований проблемы продления сроков хранения БМ, с использованием метода КК для расширения возможности проведения научно-исследовательских работ в области генетики, медицины, криобиологии и других областях.

Цель и задачи исследования

Цель: оценить влияние процесса медленной криоконсервации на уровень фрагментации ДНК в лейкоцитах человека.

Для реализации цели определены следующие задачи:

1. изучить проблему криоконсервации клеток, включая сопоставимость результатов экспериментов с нативными и криоконсервированными клетками по данным литературы;
2. исследовать влияние криоконсервации на уровень повреждений ДНК в образцах лейкоцитах периферической крови человека методом ДНК комет;
3. сделать вывод об уровне фрагментации криоконсервированных и нативных лейкоцитов в обследованной группе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Криоконсервации биологических материалов и витрификации

КК – способ хранения отдельных клеток, ткани, органов и эмбрионов (живые биологические системы) при низкотемпературном режиме, с сохранением возможности восстановления биологических функций объекта консервации. Витрификация является альтернативой обычной криоконсервации (Катков, Болух, Сухих , 2017) . Данные методы основаны на процессах, протекающих при анабиозе у животных и обеспечивающих повышенную холодостойкость у растений (Бильданова, Салина, 2012; Конов, 2016). Данные способы могут быть применены и для продления жизнеспособности БМ, для дальнейшего хранения в условиях криостазиса (КС). КК, как и ВФ, позволяет продлевать срок хранения биоматериалов от нескольких часов до нескольких лет, что одновременно позволяет проводить повторные исследования биоматериала после долгого промежутка времени. Механизмы, работающие при ВФ и МКК, отличаются, также есть отличие в применении их в отношении разных типов клеток.

При изучении механизмов КС и холодостойкости было выявлено, что клетки большинства животных и растений предохранены от гибели от холода в зимнее время за счет синтеза «антифризов» и прочих молекул, повышающих устойчивость к холоду (Белоус, Грищенко, 1994).

Ярким примером является род настоящих лягушек (*Rana*). Представители рода настоящих лягушек относятся к классу земноводных и обитают в разных климатах и ландшафтах. Некоторые представители данного рода имеют способность переживать зиму в состоянии анабиоза без ущерба клеткам и ткани после размораживания, за счёт образования антифриза, который синтезируется клетками, и увеличения в клетках и кровеносных сосудах концентрации данного антифриза. В состав этого

антифриза входят комбинации сахаров – глюкозы и фруктозы. Лесная лягушка, обитающая в Северной Америке, где температуры могут падать ниже $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, эволюционно выработала механизм, позволяющий во время падения температуры заживо замораживаться, без ущерба для организма (рис. 1).



Рис. 1. Лесная лягушка или *Rana sylvatica* (LeConte, 1825) – представитель, которая эволюционно выработала стратегии выживания в замороженном состоянии (криостазис). В зимний период часть внутренней влаги (35-45 %) кристаллизуется и превращается в лед, сама лягушка становится твёрдой как лед. Фотографии были сняты Tom Benson (слева) и Janet Storey (справа).

Многие живые организмы, обитающие на территории Сибири, способны претерпевать низкие температуры вплоть до $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Дальнейшие исследования показывали, что при анабиозе все метаболические процессы и функции клетки полностью сохраняются, но протекают в замедленном режиме вплоть до полного отсутствия активности клеточных процессов. Для повышения возможности восстановления биологических функций после размораживания, необходимо проводить заморозку с использованием растворов веществ, обладающих антифризными свойствами – криопротекторов. КП, по своим свойствам, схожи с антифризами, но отличаются обилием классов химических соединений. Как правило, КП представляют собой высокомолекулярные соединения либо органическими соединения. Ряд КП нарушают клеточные функции и имеют также как цитотоксические, так и генотоксические свойства, прямо или косвенно

влияющие на ДНК, что приводит к фрагментации ДНК и генетическим изменениям. Также было выявлено, что не все криопротекторы (из-за размеров молекул) способны проникать внутрь клетки и менять препятствовать образованию кристаллической решетке льда во внутриклеточной среде. Связи с этим, в криобиологии исследуется влияние отдельных криоконсервантов на клетки, клеточные линии, ткани, органы и эмбрионы.

Кооперация длительного воздействия льда, который в ходе криоконсервации образуется во внутри- и внеклеточной среде из жидкой фазы воды, и влияние цитотоксичных и генотоксичных свойств криопротекторов на клетку, приводит к генетическим изменениям.

В ходе применения метода криоконсервации клеточных культур, получаемых от организма, клетки замораживают до очень низких температурных значений, что теоретически замедляет метаболические процессы клетки до минимума и продлевает продолжительность жизни клетки в несколько раз, по сравнению с нормальными условиями. Биологические эффекты заморозки основываются на образовании кристаллов льда, в результате чего концентрируются растворенные во внутриклеточной жидкости вещества. Незащищенная КК клетка при нормальных условиях погибает, т. к. негативный эффект вызывается также замерзанием окружающего водного раствора, что сопровождается обезвоживанием клеток за счёт осмотического перепада, и изменением свойств клеточной мембраны. Теория, противоположная теории криоконсервации клеточных культур или отдельных групп клеток, основана на двухфакторной гипотезе криоповреждений. В основе данной теории лежит предположение, что урон клеточной мембране наносят кристаллы льда, которые образуются из водной фазы внутриклеточной среды при заморозке. Лёд повреждает клеточную стенку, разрывая либо пробивая клетку, либо наносят непоправимый урон за счёт изменения состав жидкой фазы внутриклеточной среды. Некоторые научные исследования показали отрицательный эффект внутриклеточной

заморозки, в то время как внеклеточная заморозка воды показало менее вредоносное влияние на клетку. Если заранее известна водопроницательная способность клеточной мембраны, можно рассчитать влияние скорости охлаждения на выживание клеток. Оптимальная скорость заморозки будет являться компромиссом между воздействием концентрации растворённых в внутриклеточной жидкости криопротективных веществ и риском внутриклеточного замораживания. Внеклеточный лёд в определённых условиях теряет свою безопасную характеристику: повреждение механическим напряжением в мембранных каналах установлены для плотно размещённых клеток; в случае со сложными многоклеточными системами необходимо обеспечивать не только выживание клеток в сложно-клеточных структурах, но и предотвращать повреждения внеклеточными белковыми структурами.

В процессе криоконсервирования, после образования внеклеточного льда, концентрация растворённого вещества во внеклеточной среде увеличивается. Это приводит к оттоку воды из клетки в окружающую среду, в связи с увеличением осмотического давления. При дальнейшем охлаждении увеличивается концентрация внутриклеточного растворённого вещества препарата, а водная фаза уменьшается. В условиях чрезмерно быстрого охлаждения клетки замерзают до момента выравнивания и стабилизации перепадов осмотического давления. В результате образуется внутриклеточный лёд (рис. 2).

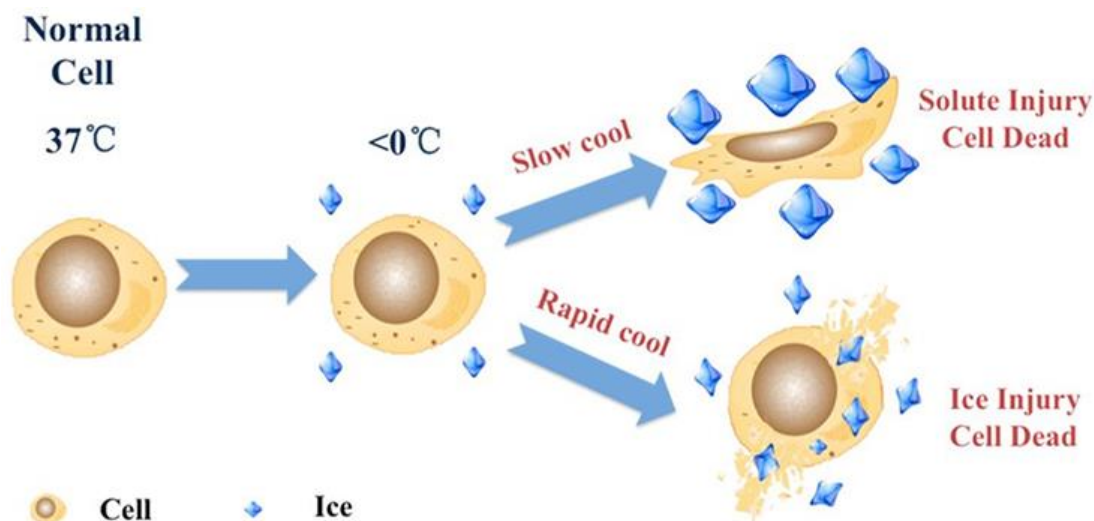


Рис. 2. Двухфакторная гипотеза криоповреждения. Клеточная гибель от обезвоживания клетки (сверху). Клеточная гибель от механического повреждения льдом клеточную стенку (снизу). (www.sigmaaldrich.com)

Для безопасной КК, без образования внутриклеточного и внеклеточного льда и сохранения целостности клеточной системы и её жизнеспособности после размораживания, используются химические вещества, меняющие характеристики заморозки и образования кристаллов льда, так называемые криопротекторы. Влияние криопротекторов на живые объекты тщательно исследуется, не только из-за возможности продления сроков хранения биоматериала, но и в связи с возможными цитотоксическими или генотоксическими эффектами на объект криоконсервации, сопровождающимися массовым апоптозом клеток, отмиранием ткани и повреждением органов. При криоконсервировании половина молекул проникающих криоконсервантов заменяют внутреннюю жидкость клетки. Данные криоконсерванты при смене температурного режима и нормализации клеточного метаболизма могут оказать токсический эффект. Например, пропиленгликоль в комнатной температуре нетоксичен, но этиленгликоль при тех же условиях метаболизируется в вещества, обладающими токсическим эффектом.

Дополнительные факторы, препятствующие криоконсервации:

1) **Перегрев клетки в моменте переход от жидкой фазы в твёрдую фазу** – при переходе фазы неклеточной воды в лёд выделяется избыточное тепло, в связи с тем, что лёд обладает меньшей энтропией. Последствиями перегрева является необратимое повреждение клеток, вплоть до гибели. Для предотвращения гибели от перегрева, раствор с биоматериалом охлаждают быстро до значения, при котором запускается начало кристаллизации раствора и формирования льда.

2) **Переход фаз липидного бислоя клеточной мембраны.** Происходят значимые изменения в проницаемости мембран, в связи с переходом фазы структуры плазматической мембраны – резкое уменьшение текучести, повышение вязкости. Увеличение проницаемости приводит к сдвигу рН, прекращению работы Na-каналов, задержке натрия и воды внутри клетки и в результате – к лизису клетки.

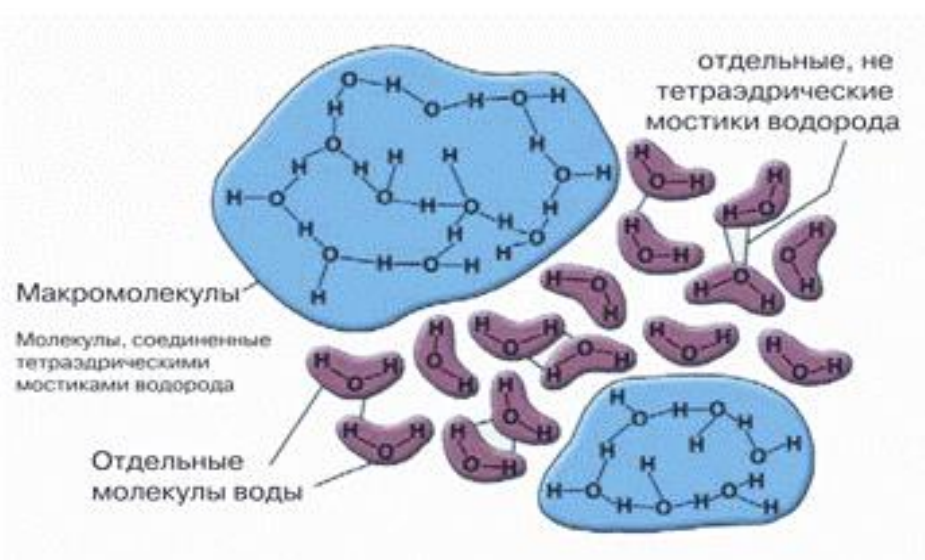
3) **Холодовой шок** – по каким-либо причинам происходит внезапная гибель клеток при снижении температуры.

Однако массовая клеточная гибель, как правило, является результатом не замораживания, а процесса размораживания. Предполагается, что данное явление связано с формированием внутриклеточных кристаллов льда, которые при перекристаллизации повреждают клеточную стенку. Процесс кристаллизации включает в себе два процесса, механизмы которых важно учитывать при витрификации или криоконсервации: 1) формирование в водной среде центров кристаллизации и 2) активный рост кристаллов льда. В процессе замораживания раствор проходит несколько критических состояний, при которых начинается спонтанная кристаллизация воды и рост льда. Кристаллы льда размером меньше критического, необходимого для спонтанного старта кристаллизации, в данных условиях не могут расти и будут растворяться в растворе. Таким образом, для смены фаз вода/лед необходимо формирование кристаллов льда определенных размеров, значение которых входит в критический диапазон. Для кристаллизации воды был установлен размер кристаллов, который составляет 460-470 молекул с

объемом $15,7 \text{ нм}^3$, что соответствует сфере радиусом $1,56 \text{ нм}$. В кластерной модели структуры воды, предложенной Х. Фрэнком и В. Уеном в 1957 г., описывается образование и рост кристаллов льда. Согласно данной модели, Х. Фрэнк и В. Уен предлагали, что в жидкой воде постоянно образуются и распадаются кластеры молекул воды. Чем ниже температура воды, тем больше молекул воды входят в состав образования одного кластера. Таким образом, еще до формирования структуры кристаллической решетки льда в составе воды существуют образования, похожие по структуре на лёд, которые, при условиях достижения критического размера, запускают рост

кристаллов

(рис. 3)
2017).



3) (Пучков,

Рис. 3. Модель кластеров структуры воды, предложенная Х. Фрэнком и В. Уеном в 1957 г. Автор рисунка: Сергей Сергеев, статья «Витрификация – контролируемая пуза развития в стеклоподобном состоянии» на конкурса «био/мол/текст».

Для того, чтобы образовались крупные кластеры льда, необходим центр кристаллизации, который представляет собой любой очаг неоднородности в структуре воды или микроскопический объект, например

пузырьки, пыль, кристаллы других веществ и т. п. При отсутствии такого центра кристаллизации вода неспособна замерзнуть, переходя в твёрдую фазу. При образовании центра кристаллизации вода сразу переходит в твёрдую фазу. Активное формирование центров кристаллизации происходит при температурах, близких к $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Данный температурный режим наиболее благоприятен для кристаллизации воды. Но активный прирост кристаллов льда протекает в более высоком температурном диапазоне: от -2 до $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Скорость кристаллизации и активный прирост кристаллов льда очень малы при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Проводя медленное замораживание и постепенно охлаждая образцы биоматериала ниже $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, мы вначале имеем мало центров для начала кристаллизации и при этом благоприятные условия для роста кристаллов льда. Увеличение скорости охлаждения позволяет преодолевать температурный диапазон, оптимальный для роста кристаллов, без повреждения клеток. Продолжение процесса охлаждения приводит к тому, что условия, при котором рост кристаллов льда был бы благоприятным, становится неблагоприятным, следовательно, кристаллические структуры в клетке и за её пределами не образуются. Одновременно возникают множество центров кристаллизации, которые никак не влияют на жизнеспособность клетки (Пучков, 2017).

Ситуация меняется в условиях размораживания раствора, подвергнувшегося криоконсервации. Причиной этого является то, что при нагреве раствор заново проходит благоприятный для формирования центров кристаллизации температурный режим ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), а затем, при дальнейшем нагреве, раствор приближается к оптимальному температурному режиму роста кристаллов (от -10 до $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$). В результате кристаллы льда образуются в больших количествах и, в процессе интенсивного роста во внутриклеточной среде, наносят механические повреждения клеточной стенке. Это приводит к гибели клеток. В связи с этим, для разморозки криоконсервированного биоматериала требуется максимально быстрое повышение температуры, что снижает вероятность кристаллизации жидких фаз внутриклеточной и

внеклеточной среды. Часто применяемые методы размораживания – погружение в теплую водяную баню и СВЧ – электромагнитное нагревание раствора. Однако, при плавлении внеклеточного льда происходит гипотонический шок клеток. Связано данное явление с тем, что нагрев внеклеточного льда освобождает большое количество свободных молекул воды – возникает избыток влаги и, как следствие, понижается осмолярность раствора. Таким образом, успешность процессов замораживания и размораживания клеток зависит от наличия факторов риска. Чем больше удастся минимизировать влияние этих факторов, тем эффективнее протекает замораживание и размораживание. Для предупреждения воздействия кристаллов льда на клетку, используются вещества с низкими температурами замерзания – криопротекторы (рис. 4) (Пучков, 2017).

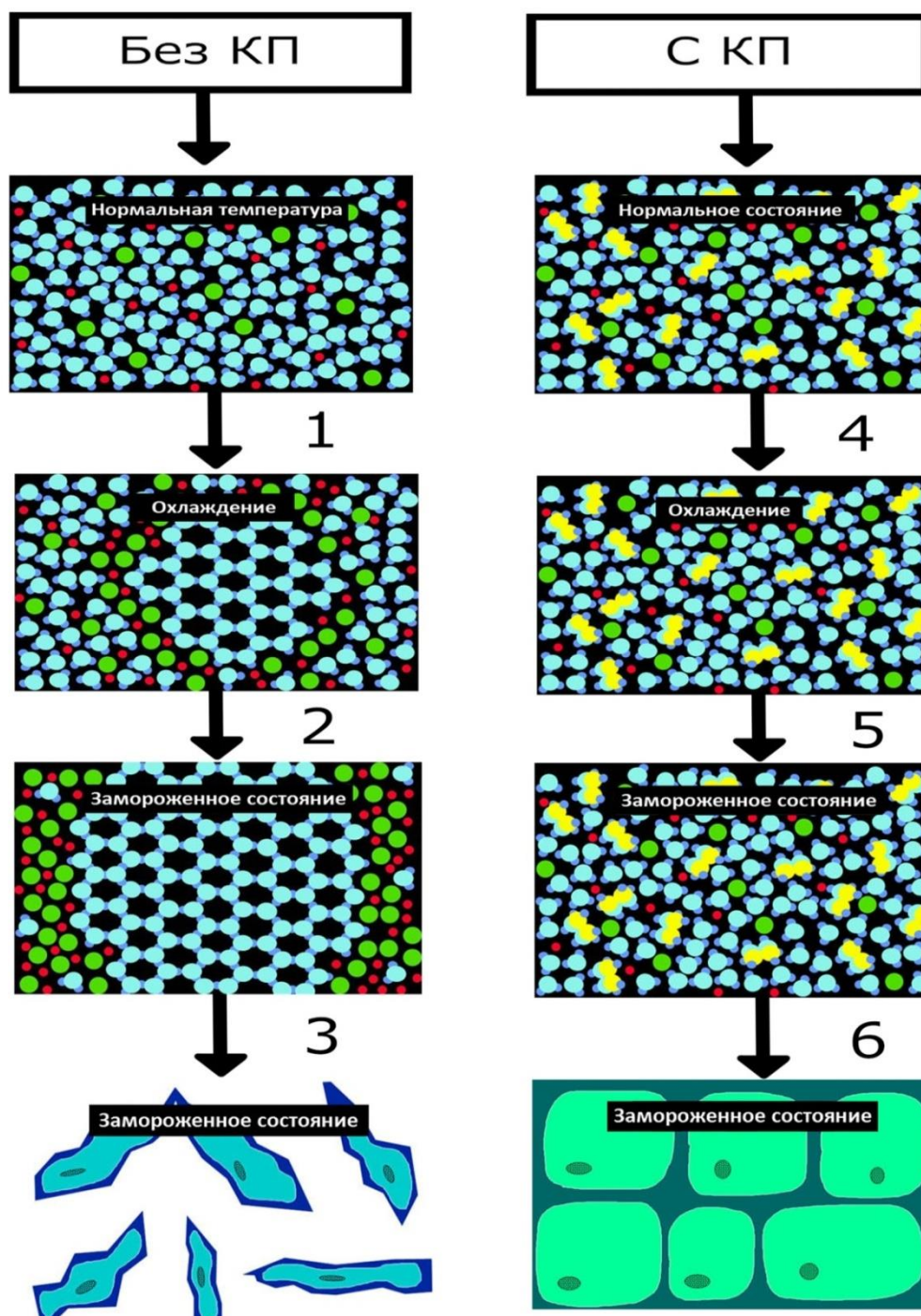


Рис. 4. Схема замораживание клеток с КП и без КП: 1) охлаждение приводит к образованию центров кристаллизации; 2) дальнейшее охлаждение приводит к росту кристаллов льда; 3) образование крупных кристаллов льда приводит к гибели клеток; 4) охлаждение с криопротектором мешает формированию центров кристаллизации; 5) снижение температуры не приводит к образованию льда; 6) лед не повреждает клеточную мембрану. Автор рисунка: Вдовина Евгения Дмитриевна.



Рис. 5. Приложение к рисунку 4. Автор рисунка: Вдовина Евгения Дмитриевна.

Однако, до конца не изучено, как протекают механизмы кластерной кристаллизации при наличии КП. Согласно последним исследованиям (Давыдова, Осецкий, 2011) использование глицерина как КП в растворе препятствует формированию центров кристаллизации и замедляет скорость роста кристаллов при понижении температуры. Это способствует эффективному сохранению БМ в криогенной среде. Но в процессе размораживания наблюдалось активное формирование центров кристаллизации и быстрый рост кристаллов льда, что доказывает теорию образования кластеров молекул воды в результате криоконсервирования. Опыт Кристиана Дел Бо и коллег (2015) показал, что клетки людей, придерживающихся определенной диеты, могут получить больше повреждений при криоконсервации, чем клетки тех, кто не придерживается

никакой диеты. Следовательно, при криоконсервировании биоматериала нужно учитывать питание людей, которое может влиять на степень уязвимости ДНК к повреждениям.

1.2. Криопротекторы

Криопротекторы – химические вещества, обладающими антифризными свойствами, которые применяются в МКК и ВФ, в целях КК клеток. Использование КП в КК основано на возможности образования водородных связей между молекулами КП и молекулами жидкой фазы воды внутри и вне клеточной среды (рис. 6.) При дальнейшем понижении температуры, из-за кристаллизации, образуются структуры, напоминающие кристаллы, но с отсутствием оформленной кристаллической решетки – стеклообразное состояние (рис. 7).

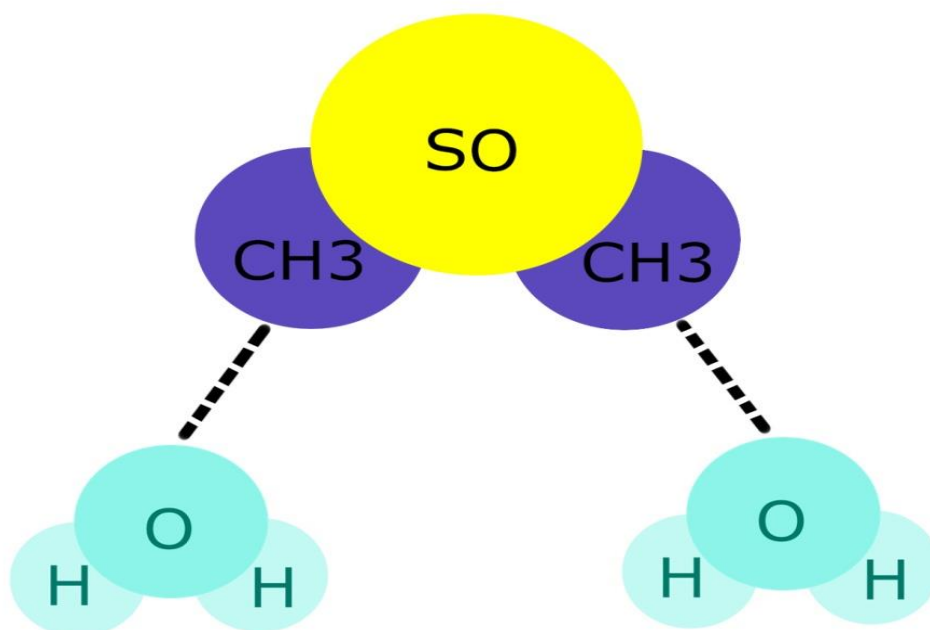


Рис. 6. Схема образование водородных связей между молекулами.

Автор рисунка: Вдовина Евгения Дмитриевна.

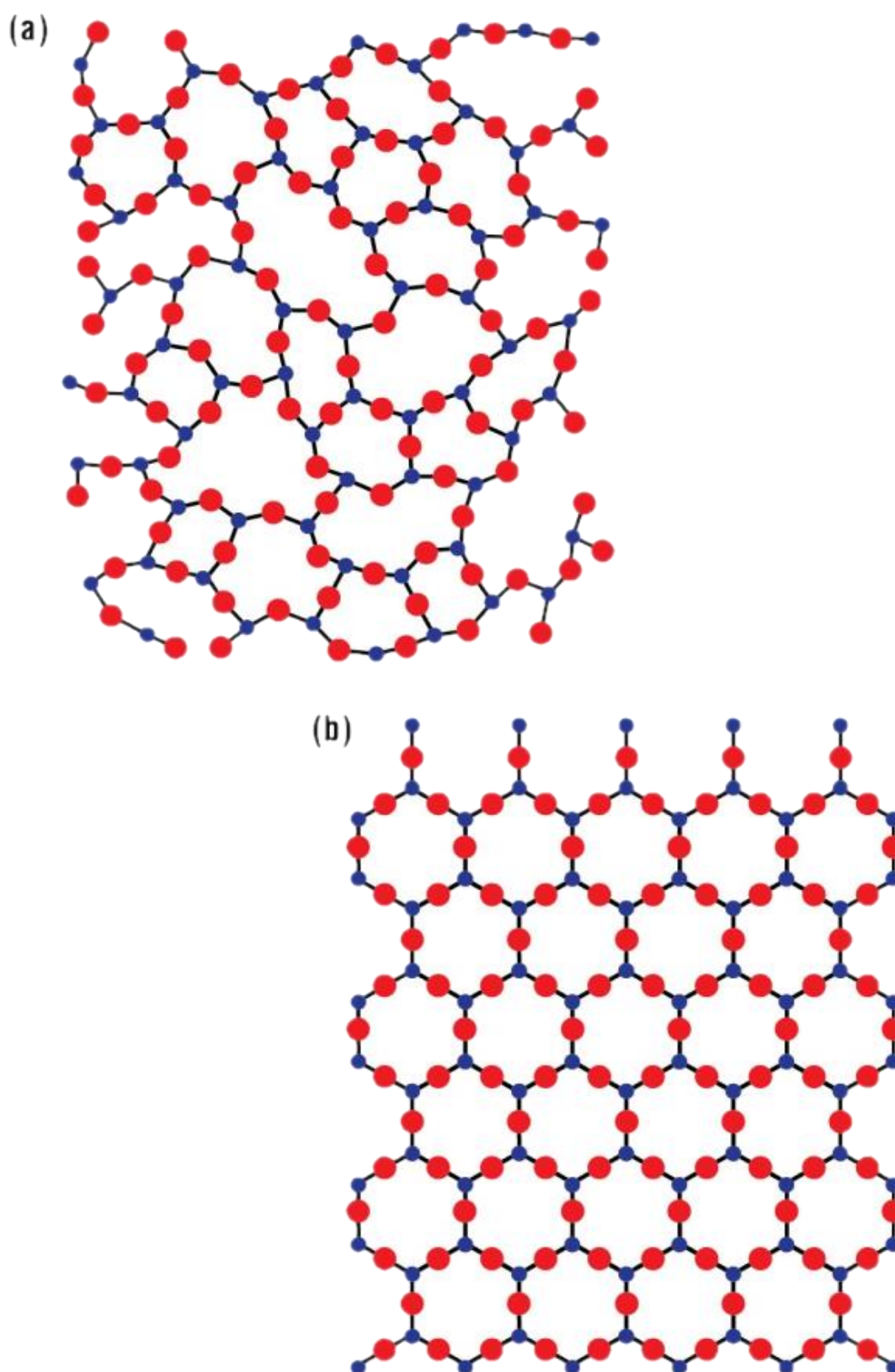


Рис. 7. Образование кристаллической решетки льда из водной фазы внутриклеточной среде, при: а) замораживании с криопротектором; б) замораживании без криопротекторов (<https://biomolecula.ru/>).

Криопротекторы подразделяются на 2 группы: 1) проникающие КП и 2) непроникающие КП.

Проникающие КП – это химические вещества, которые способны проникать во внутриклеточную среду. Принцип их действия заключается в образовании водородных связей с молекулами воды внутри клетки, что препятствует образованию кристаллической решётки, и, следовательно, предотвращает формирование кристаллов льда во внутриклеточной среде. Также следует отметить возможность стабилизации внутриклеточного осмотического давления, как одного из факторов, играющих роль в сохранении целостности объекта криоконсервации. Недостатком применения проникающих КП заключается в том, что происходит замена внутриклеточной жидкости криопротекторами, поэтому перед последующими действиями с клеткой они должны быть удалены из внутриклеточной среды. Кроме того, проникающие КП являются хорошими растворителями, что обеспечивает снижение концентрации солей внутри и вне клеток. Это способствует защите клеток от обезвоживания, и снижению степени повреждения белковых мембранных структур клеток. Также молекулы КП образуют химические связи с компонентами мембраны. Это также приводит к снижению степени повреждения при КК. (Левин, 1976; Белоус, Бондаренко, 1982; Белоус, Грищенко, 1994; Худяков, 2010). К криопротекторам данного типа относятся такие вещества как: глицерин, этиленгликоль, полиэтиленоксид (полиэтиленгликоль), диметилсульфоксид (ДМСО).

Непроникающие КП – это химические вещества, которые чаще представлены макромолекулами, не проникающими во внутриклеточную среду. Принцип их действия на процесс криоконсервации не изучен, но предполагается, что играют роль два фактора – это замедление роста кристаллов льда во внеклеточной среде и стабилизация внеклеточного осмотического давления, способствующего защите клетки от осмотических перепадов. Два класса химических соединений относятся к непроникающим

КП – это сахараиды, например, сахароза, глюкоза или микога (трегалоза), и высокомолекулярные соединения, такие как поливинилпирролидон и альбумины. Недостаток использования непроницающих криопротекторов (внеклеточные криопротекторы) заключается в неэффективности их использования без проникающих криоконсервантов, т. к. данный тип криоконсерваторов защищает клетку снаружи, но не изнутри.

Недавние исследования показали, что дестабилизация клеточной мембраны связана с проникновением огромное количества криопротекторов, обладающих липофильными свойствами. Сильные внутриклеточные водородные связи между молекулами КК и молекулами воды нарушают гидрофильную оболочку макромолекул, также имеют токсический эффект в плане влияния на целостность клеточной системы. Электрические свойства криопротектного раствора обладает мембранной токсичностью. ДМСО является одним из самых токсичных веществ, обладающих криопротектными свойствами по сравнению с другими КК. Было выявлено, что ДМСО при ВФ действует более эффективно на заморозку клеток, хотя снижения цитотоксичных свойств не отмечено (Мартусевич, Андреев, Костяев, 2016).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Материалом для исследования послужили образцы венозной крови, взятые у людей разных возрастов, обучающихся в ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». Исследование проводили в соответствии с требованиями Комиссии по этике Кемеровского государственного университета, протокол исследования утвержден на заседании Комиссии № 4 от 10.10.2016 г. Каждый участник подписывал форму информированного согласия, содержащую информацию о целях исследования.

Никто из участников исследования в период в течение предшествующих 5-6 месяцев не подвергался значительному радиационному облучению или изотопным исследованиям. Всего в исследованной группе находится 1 курильщик. Образцы венозной крови собирались в вакуумные пробирки, содержащие натрий-ЭДТА и обрабатывались в течение 4 часов.

2.2. Методы криоконсервирования

В ходе исследования проблемы КК применялся метод МКК клеток. С помощью дозатора отбирали 500 мкл крови, которая ранее была взята из вены и собрана в вакуумную пробирку, и разливали в пробирку Эппендорфа. Для осаждения клеточных компонентов крови пробирку Эппендорфа с кровью центрифугировали. После этого удаляли 300-400 мкл жидкой фракции из надосадка, не затрагивая осадок. Фракция клеток дозатором вынималась и помещалась в криопробирки. Далее добавляли 500 мкл 10% раствора ДМСО с сывороткой крови эмбриональной телячьей, для получения раствора, который подвергался замораживанию. В целях обеспечения достоверности результатов, полученных в ходе КК, для каждого донора было подготовлено по 6 криопробирок с раствором крови и ПК, которые были заморожены при разных температурных режимах (при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), на

разные периоды КК: 1 неделя, 2 недели и 4 недели. Для непосредственного осуществления метода МКК использовались криоштативы, куда заранее заливали изопропиловый спирт комнатной температуры. В углубление клали криопробирки и помещали в морозильную камеру холодильника для охлаждения до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Пробирки для заморозки методом МКК при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ необходимо было при достижении температуры в $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ вынимать из криоштатива и погружать в жидкий азот в сосуд Дьюара (Cryopreservation of mammalian ..., 2018).

2.3. Методы детекции уровня фрагментации ДНК

Заготовка рабочих растворов для метода ДНК-комет

1) Основной лизирующий раствор (ОЛР) на 1000 мл:

Вначале плоскодонные колбы с 900 мл дистиллированной воды помещали на столик электромагнитной мешалки с подогревом и включали её. Сначала добавляли 37,2 г натрий-EDTA, так как при насыщенности раствора щелочь тяжело растворяется. Далее добавляли 146,12 г хлористого натрия и 1,2 г трис-базы в колбу. После растворения всех компонентов ОЛР добавляли 100 мл для получения 1 л раствора и измеряли рН раствора. В случае, если рН не равно 10, добавляли концентрированную серную кислоту до значения 10. Полученный раствор переливали в тёмную посуду для хранения (таб.1).

Таблица 1

ОЛР

NaCl	146,12 г
EDTA-Na ₂	37,2 г
Tris-base	1,2 г
H ₂ O	1000 мл

2) Фосфатно-солевой буфер / 10x PBS (на 100 мл):

В колбу с 100 мл дистиллированной воды добавляли 0,2 г KH_2PO_4 , 2,2 г Na_2HPO_4 , 0,2 г KCl и 8 г NaCl и перемешивали (таб. 2).

Таблица 2

Фосфатно-солевой буфер

KH_2PO_4	0,2 г
Na_2HPO_4	2,2 г
KCl	0,2 г
NaCl	8,0 г
H_2O	100 мл

3) Буфер А:

В колбу с 250/500 мл добавляется, в зависимости от объема, 60 г NaOH при 250 мл и 120 г NaOH при объеме 500 мл. Данный раствор готовили на магнитной мешалке. Данный буфер затем переливали в сосуд с крышкой для хранения (таб. 3).

Таблица 3

Буфер А

	На 250 мл	На 500 мл
NaOH	60,0 г	120,0 г
H_2O	250 мл	500 мл

4) Буфер Б:

Буфер Б готовили на магнитной мешалке с подогревом. В колбу с 100/200 мл добавлялось 7,4 г натрий-EDTA при объеме 100 мл и 14,8 г натрий-EDTA при объеме 200 мл для получения рабочего раствора. Данный буфер переливали в сосуд с крышкой для хранения (таб. 4)

Таблица 4

Буфер Б

	На 100 мл	На 200 мл
EDTA-Na ₂	7,4 г	14,8 г
H ₂ O	100 мл	200 мл

Подготовка стёкол для метода ДНК-комет

В пробирку с объемом 50 мл добавляли 500 мг тугоплавкой агарозы I типа и 50 мл дистиллированной воды. Затем пробирку помещали в водяную баню с нагревом до 96 °С до полного расплавления агарозы в дистиллированной воде и отсутствия тяжей. После расплавления пробирку оставляли в водяной бане при температуре +60 °С. В дозатор набирали 150 мкл агарозного геля и наносили на стекло. После чего, захватывая наконечником, шероховатый слой стекла равномерно распределяли по стеклу (однократным движением). Полученные стекла сушили на чистой поверхности до полного застывания агарозного геля (таб. 5)

Таблица 5

Агарозный гель для стекол

	На 275 стекол
Тугоплавкая агароза I типа	500 мг
H ₂ O	50 мл

Подготовка агарозного геля для препаратов

Отмеряли 50 мл рабочего раствора PBS в пробирку с объемом 50 мл и добавляли 500 мг легкоплавкой агарозы 4-го типа. Раствор ставили на разогрев на водяную баню при температуре 96 °С. При отсутствии тяжей в

агарозном геле, в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл дозатором вносили по 500 мкл агарозного геля. Эппендорфы ставились на остывание (таб. 6).

Таблица 6

Агарозный гель для препаратов

На 75 препаратов	
500 мг	Легкоплавкая агароза IV типа
50 мл	PBS для агарозы

Метод ДНК-комет по этапам

Приготовление препаратов:

В термостате помещали пробирки Эппендорфа с агарозным гелем на разогрев до 91 °С. После полного расплавления агарозного геля, термостат ставили на охлаждение до 41 °С. Далее раскладывали на плитке со слоем агарозы. Дозатором отбирали 50-60 мкл (свежая кровь) или 100 мкл (КК кровь) цельной крови, вносили в пробирки Эппендорфа с агарозой и ресуспендировали по 7 раз. 100 мкл ресуспендированной в агарозе крови наносили на стекло и накрывали покровным стеклом. Раскладывали препараты на плоскость и ставили на 5 минут в холодильник. Через 5 минут препараты доставали из холодильника, разогревали препараты рукой и стягивали покровные стекла.

Лизис:

Лизирующий раствор

В зависимости от количества стекол, готовили разный объём лизирующего буфера. Основной лизирующий раствор 89 мл (10 стекол)/178 мл (на 20 стекол), переливали в колбу. В колбу с ОЛР добавлялось Тритон X-100 объёмом 1 мл (на 10 стекол)/2 мл (на 20 стекол), также добавляли ДМСО 10 мл (на 10 стекол)/20 мл (на 20 стекол) в раствор. Тщательно смешивали получившийся раствор. Затем помещали в холодильник на охлаждение до +2

°C (таб. 7).

Таблица 7

Лизирующий раствор

	На 10 стекол	На 20 стекол
ОЛР	89 мл	178 мл
ТритонХ-100	1 мл	2 мл
ДМСО	10 мл	20 мл

Лизис

Препараты поместили в кювету Шиффердейккера, заливали в кювету рабочий лизирующий раствор. Кювету с препаратами ставили в холодильник на 1 час (максимум – на 1 сутки). В конце, после лизиса, вынимали из холодильника кюветы, сливали лизирующий раствор из кювет.

Щелочной форез:

Рабочий раствор для щелочного электрофореза

Измерительным стаканом отливали 20 мл буфера А, 5 мл буфера Б и 975 мл дистиллированной воды в колбу или стакан вместимости 1 л и смешивали. С помощью рН-метра измеряли рН полученного щелочного раствора, когда $pH < 13$, то добавляли буфер А до значения 13 или более.

Электрофорез

Препараты помещали в электрофорезную камеру шероховатой поверхностью к аноду (черный). По обоим краям электрофорезной камеры клали по одному хладагенту и заливали щелочным раствором до полного погружения препаратов. Далее препараты лежали в щелочном растворе в течение 20 минут для денатурации ДНК. После денатурации ДНК включали источник тока и проводили электрофорез в течение 20 минут, по данным параметрам: $V=25$, $mA = 300$. После окончания фореза приборы выключаются.

3) Фиксация препарата

Пинцетом вынимали препарат из фрезной камеры. Препараты ставили в кювету Шиффердейккера и заливали рабочим PBS раствором на 10 минут, после чего раствор сливали и для полной нейтрализации щелочи заливали препараты 75% этанолом на 10 минут. В конце препараты вынимали, ставили сушиться на воздухе.

2.4. Методы микроскопирования

Для обнаружения и съемки фотографий комет на препаратах, применяли метод флуоресцентной микроскопии. Преимущество данного метода заключается в возможности рассмотрения определенных структур, заранее зная молекулярный состав, с помощью окрашивания флуоресцентным красителем. В ходе окрашивания и рассмотрения строго соблюдали отсутствие света в помещении, чтобы краситель не повреждался. Далее, на препараты наносили 50 мкл красителя SYBR Green и закрывали покровным стеклом.

В ходе микроскопирования фотографировали кометы и их хвосты с использованием программы «COMET» для дальнейшей обработки полученных данных (измерение хвостов).

2.5. Методы оценки комет

Для анализа цифровых изображений комет, полученных в ходе флуоресцентной микроскопии, использовали программу «CaspLab». CaspLab – программа, которая применяется для анализа и оценки цифровых фотографий окрашенных комет. Данная программа может обрабатывать фотографии, в которых использовались разные красители или которые были сохранены в черно-белом формате TIF.

2.6. Статистические методы

Статистическую обработку осуществляли с помощью IBM PC, сред-

ствами программы StatSoft Statistica 12.0. Сравнение групп по качественным признакам и проверку на наличие признака значимости или не значимости различия проводили с помощью критерия Манна-Уитни , с поправкой Йетса для таблиц 2x2 (Реброва, 2006).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пребывание организма в нехарактерной для него сред инициирует внутриклеточные адаптивные процессы, которые выражаются в фенотипических изменениях. Они необходимы для снижения стрессового фактора, оказываемого на клетки и в целом на организм. Данные механизмы основываются на возможности использования неактивных генов клетки организма, выраженных синтезом органических молекул с определёнными нехарактерными модификациям. Такие модификации способствуют другим метаболическим и ферментативным процессам, которые в обычных для организма условиях не проявляются. Условия пребывания клеток в КС, при МКК или ВФ являются стрессовым фактором, который оказывает сильное влияние на ДНК и ферменты, участвующие в процессе репарации ДНК. Связанно это с полным ингибированием активности всех ферментативных и метаболических процессов в ходе КК. Следовательно, ингибируется активность ферментов системы репарации, что предположительно приводит к накоплению однонитевых, двухнитевых разрывов и точечных мутаций ДНК.

Отклонения от реальных показателей уровня повреждения ДНК методом ДНК-комет в щелочной среде неизбежны в связи с отсутствием возможности ДНК к репарации во время пребывания клеток в состоянии КС. Имеется мало сведений о возможном влиянии экологических факторов повреждения ДНК, при КС. Также следует учитывать генотоксические и цитотоксические свойства некоторых КК, что вносит свой вклад в уровень повреждения ДНК и её фрагментации при использовании метода ДНК-комет

в щелочной среде.

Анализ, детекция и оценка уровня фрагментации ДНК в данной работе выполнялись для исследуемой группы людей, которые ранее не подвергались воздействию радиационных факторов. Используя показатели метода ДНК-комет в качестве маркера, мы имеем возможность получать важные сведения, позволяющие оценить возможность использования КК БМ в генетических, биотехнологических, медицинских и криобиологических исследованиях.

Метод ДНК-комет – современный метод, обладающей высокой чувствительностью при оценке первостепенных повреждений ДНК и функционирования системы репарации. В настоящее время исследователями рассматриваются принципы и процедуры постановки модифицированных версий метода ДНК-комет для детекции повреждений ДНК других типов. Обсуждается эффективность и перспективы использование метода ДНК-комет в качестве индикаторного теста при исследовании в эпидемиологии, генотоксикологии, экологической генетике и т.д. Также рассматриваются вопросы значимости метода ДНК-комет для экспертной оценки при исследовании генотоксичности и прогноза мутагенности и канцерогенности веществ [Tice и др., 2001; Collins, 2004; Collins и др., 2008; Collins, 2009; Жанатаев, Середенин, Дурнев, 2010; Speit, Rothfuss, 2012; Collins и др., 2014]. Связи с этим, метод ДНК-комет часто в биологических мониторингах применяется [Klaude и др., 1996; Valverde, Rojas, 2009].

В публикациях Pubmed и других электронных издательств имеются многие работы, посвященные применению метода ДНК-комет в фундаментальных исследованиях и в клинической медицине [Пелевина и др., 2007; Dhawan, Вайрауе, Parmar, 2009; Сиротина, 2010]. Также были разработаны иные программы для оценки и анализа цифровых изображений и стандартизации протоколов использования метода ДНК-комет, позволяющие улучшить результативность исследования [Francescon, Del Terra, Meli, 2001; Ко́нса и др., 2003; Chuang, Hu, 2004; Chaubey, 2005; Struwe и др., 2007; Brunborg и др., 2014; Braafladt, Reipa, Atha, 2016].

В ряде работ приводятся сведения о том, что некоторые заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2-го типа, ожирение, новообразования, делают ДНК более чувствительной к факторам окружающей среды, что приводит к разрывам в структуре ДНК [Blasiak и др., 2004; Demirbag, Yilmaz, Kocyigit, 2005; Chernigina, Shcherbatyuk, 2016].

В 1988 г. была описана новая модификация метода ДНК-комет, которая предполагает предварительную денатурацию ДНК клеток и проведение электрофореза в щелочной среде сразу после лизиса клеток. Метод ДНК-комет в его щелочной модификации дает возможность детекции не только фрагментированных частей ДНК (двухцепочечные разрывы), как при электрофорезе в нейтральной среде, но также и одноцепочечных разрывов нитей ДНК, скрытых щелочеллабильных сайтов (разрывы ДНК, которые образуются в щелочных условиях) (рис. 8). Но детекция иных типов точечных мутации не поддается данной модификации методики (рис. 9). Щелочная модификация метода ДНК-комет способствовала повышению чувствительности детекции уровня фрагментации ДНК и большей воспроизводимости результатов [Møller и др., 2005; Almeida и др., 2006].

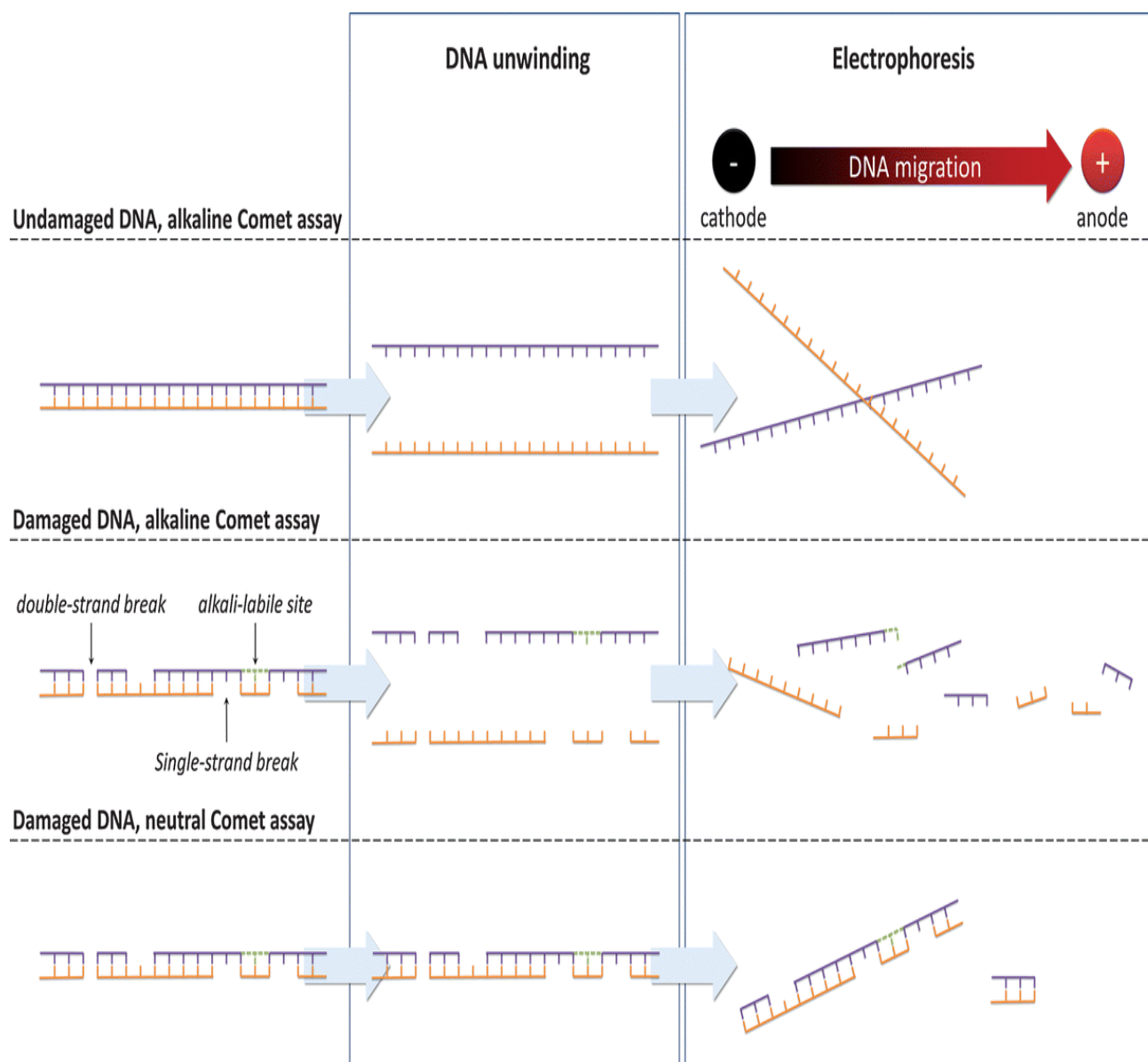


Рис. 8. Иллюстрация основных принципов метода ДНК-комет. Если ДНК вносится в сильно щелочной буфер, то она не только раскручивается, но и денатурирует, тогда раскрываются одно- и двухнитевые поломки и щелочеллабильные сайты, которые появляются под действием сильно щелочной среды. Повышается количество фрагментации и скорость миграции.

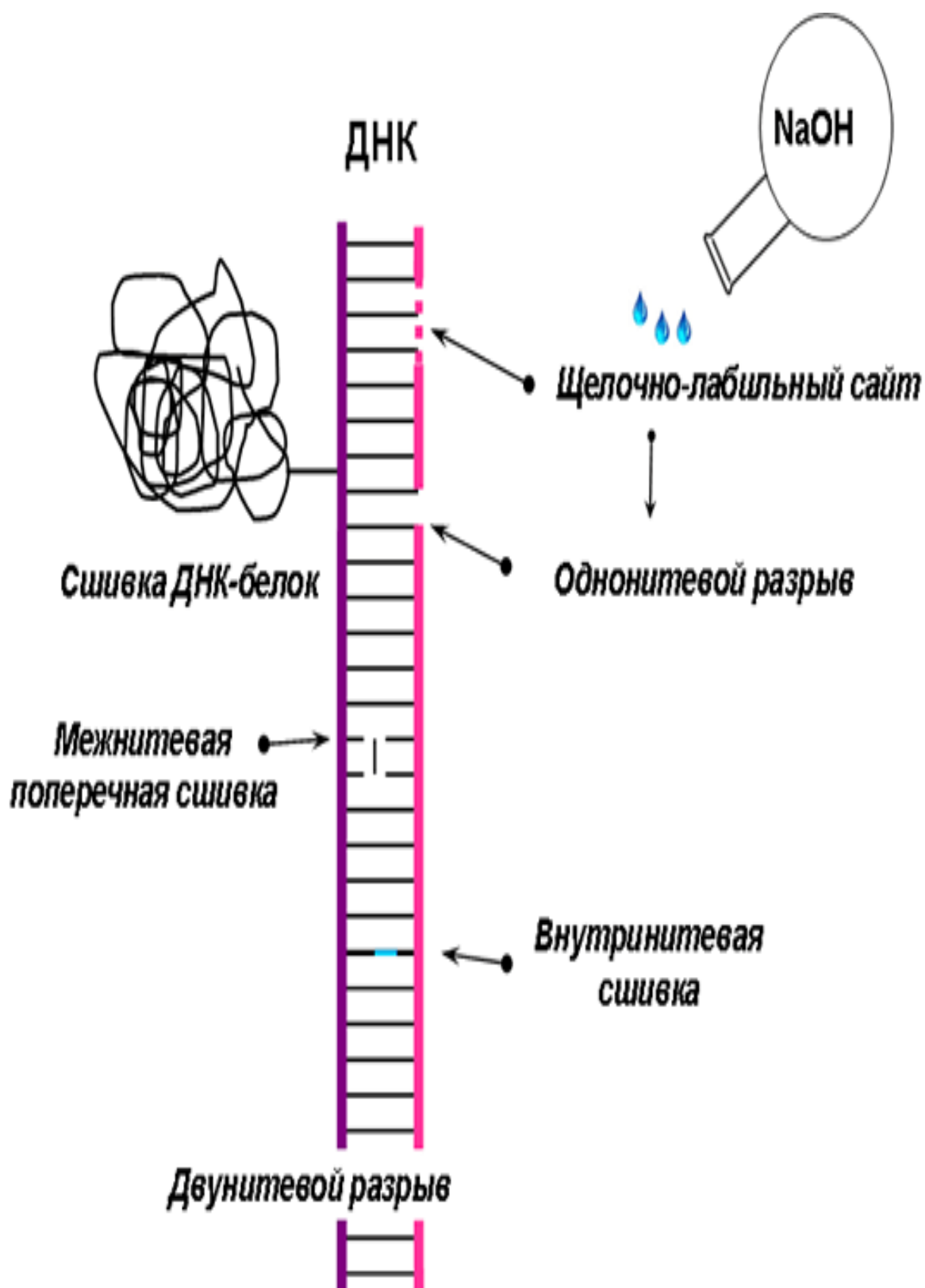


Рис. 9. Схема повреждений ДНК под действием факторов различной природы. (<https://biomolecula.ru/>)

Большинство лабораторий в настоящее время используют различные варианты данной методики ДНК-комет в своих исследованиях. В частности изменения модификации метода ДНК-комет в щелочной среде затрагивают продолжительность и условия протекания лизиса, денатурации ДНК, длительность электрофореза и окрашивание (рис. 10) (Филиппов, 2014).

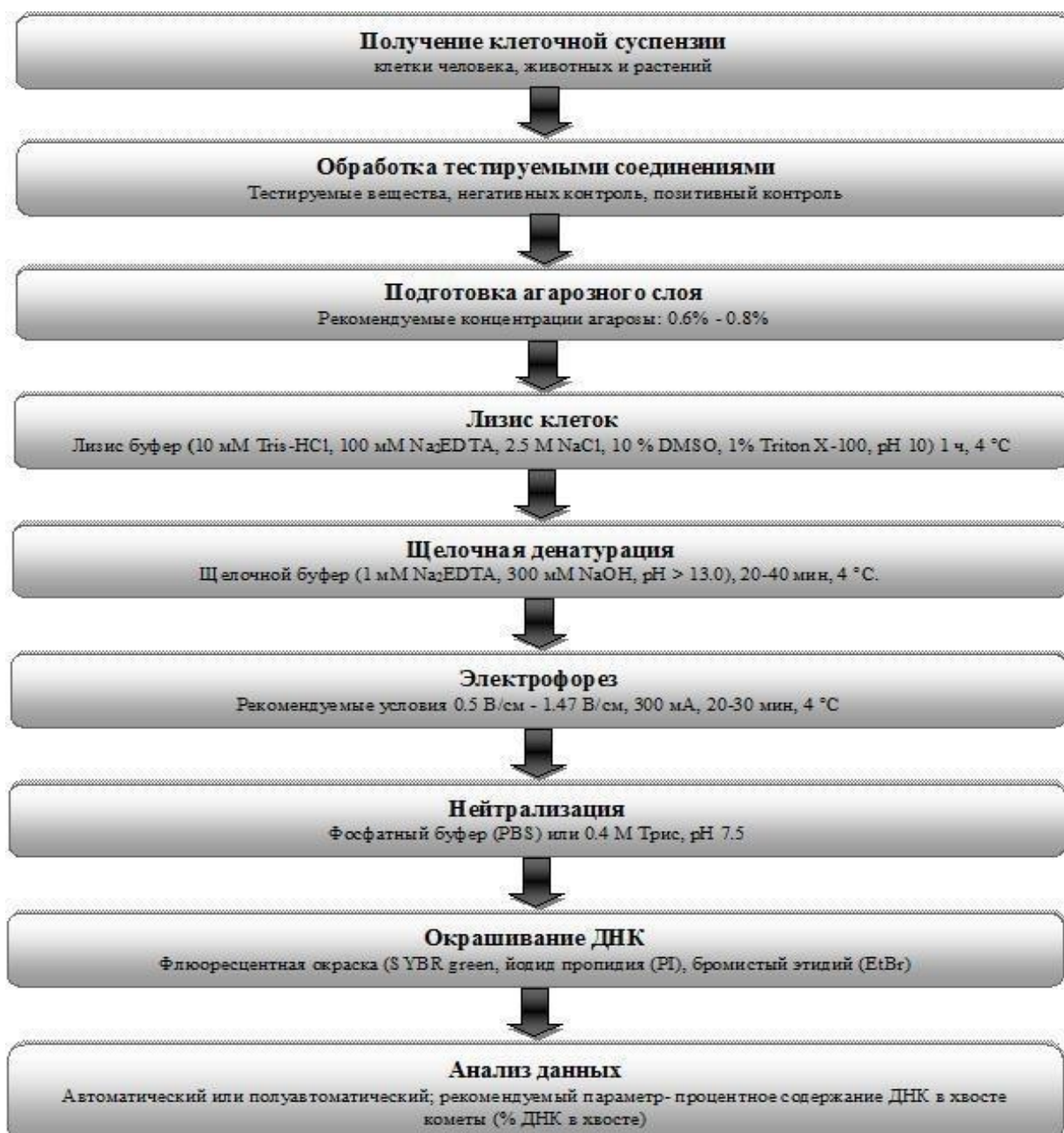


Рис. 10. Схема постановки метода ДНК-комет в щелочной среде (Glei et al., 2016).

Обнаружение как однонитевых, так и двунитевых разрывов ДНК при использовании метода ДНК-комет в щелочной среде позволяет оценивать выход нарушения структуры ДНК щелочеллабильными сайтами и однонитевыми разрывами, так как при постановке данного протокола выход повреждений ДНК двунитевыми разрывами составляет приблизительно 5 % (рис. 11).

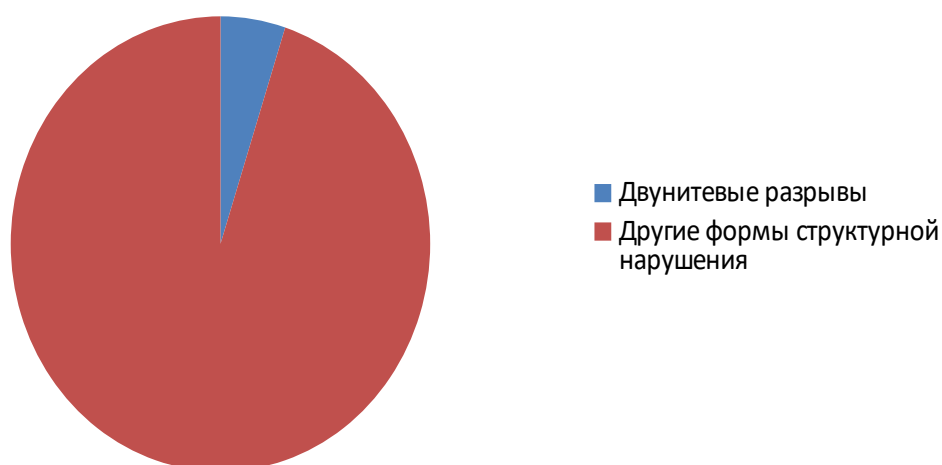


Рис. 11. Иллюстрация, показывающая долю двунитевых разрывов в общих случаях структурных нарушений.

На основе проведенных исследований были получены следующие результаты, представленные в таблицах 8 и 9.

Таблица 8

Показатели %-ного содержания ДНК в хвосте и момент хвоста по Оливу, при экспонировании в условиях -80 °С.

Параметры комет, статистические релевантные для анализа фрагментации ДНК	Контроль	После 1-й неделе криоконсервирования	После 2-х недели криоконсервирования	После 4-х недели криоконсервирования
	Среднее значение [95% доверительный интервал]			
TailComet DNA%	2,76 [2,56;2,95]	2,36 [2,11; 2,6] ^{^^}	3,64 [3,25; 4,04]	2,0 [1,73; 2,2]**
OTM	2,94 [-0,38;6,26]	4,22 [-2,97;11,41] ^{*^^}	0,85 [0,75; 0,95]**	0,45 [0,39; 0,51]**

Примечание: * - значимые различия по сравнению с контролем (*p<0,05; **p<0,01); ^ - значимые различия по отношению с одинаковым периодом экспонирования, при -196°С (^p<0,05; ^^p<0,01).

Таблица 9.

Показатели %-ного содержания ДНК в хвосте и момент хвоста по Оливу, при экспонировании в условиях -196 °С.

Параметры комет, статистические релевантные для анализа фрагментации ДНК	Контроль	После 1-й неделе криоконсервирования	После 2-х недели криоконсервирования	После 4-х недели криоконсервирования
	Среднее значение [95% доверительный интервал]			
TailComet DNA%	2,76 [2,56;2,95]	1,44 [1,26; 1,61] ^{``##}	4,19 [4,19; 5,37] ^{``}	1,62 [1,47; 1,77] ^{``}
OTM	2,94 [-0,38;6,26]	0,39 [0,31; 0,39] ^{``##}	6,07 [-3,66; 15,8] ^{``#}	0,32 [0,29; 0,35] ^{``}

Примечание: ` - значимые различия по сравнению с контролем (`p<0,05; ``p<0,01); # -

значимые различия по отношению с одинаковым периодом экспонирования, при -80°C ($\#p<0,05$; $\#\#p<0,01$).

Распределение параметров уровня фрагментации ДНК в кометах не соответствует норме. Для измерения уровня фрагментации в качестве показателей взяли %-ое содержание ДНК в хвосте кометах и момент хвоста по Оливу [Olive и др., 2001; Moller, 2006]. Сравнение между контролем и клетками, перетерпевшими состояние КС, показало положительные результаты при заморозке на -80°C и -196°C . При оценке различия по отношению опыта к контролю наблюдали снижение показателя %-ого содержания ДНК в хвостах комет лейкоцитов после 1 недели КК (при -196°C , $p<0,01$) и 4 недели КК (при -80°C и -196°C , $p<0,01$). Такая же закономерность наблюдалась при сравнении с контролем по ОТМ после 1 недели (при -196°C , $p<0,01$) и 4 недели (при -80°C и -196°C , $p<0,01$). Значимые различия хвостов между контролем и после 1-ой недели КК, при -80°C отсутствуют ($p>0,05$), одновременно ОТМ выше, чем в контроле ($p<0,05$). После 2-ой недели КК наблюдается в обоих случаях повышение показателя ДНК в хвостах и ОТМ ($p<0,01$).

Межгрупповые сравнения показали, что после 4-ой недели КК результативность показателей ДНК в хвостах и ОТМ между разными температурными режимами фактически отсутствуют ($p>0,05$). В период в 1 неделю между клетками, подвергнутыми КК при -80°C и -196°C , имелась разница. ОТМ и ДНК в хвосте ниже в лейкоцитах, которые замораживались при -196°C ($p<0,01$). Но после 2-ой недели КК, при -196°C , ОТМ выше ($p<0,05$).

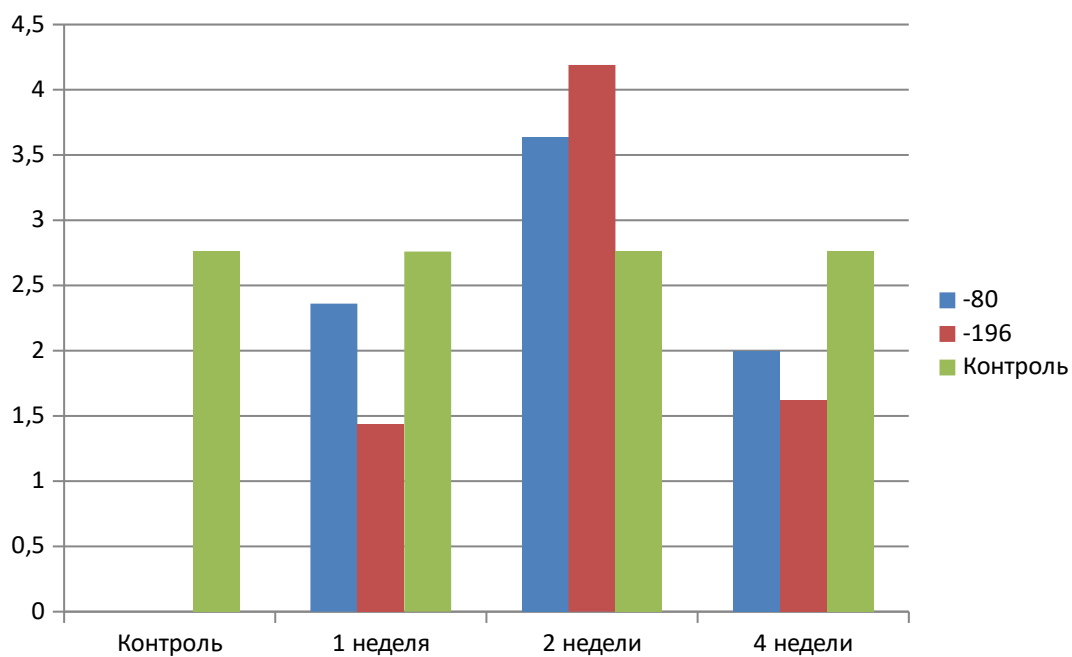


Рис. 10. Иллюстрация средних значения по %-ой содержание ДНК в хвосте комет, при разных температурных режимах и периодах экспонирования.

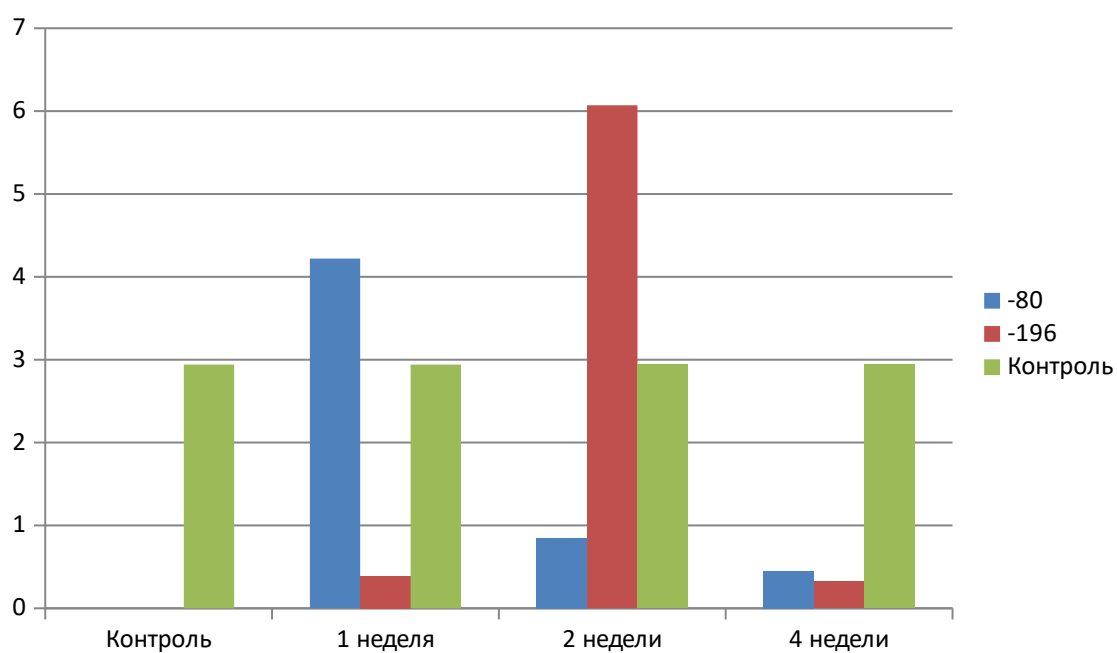


Рис. 11. Иллюстрация средних значений по ОТМ комет, при разных температурных режимах и периодах экспонирования.

Обсуждение

Показатели уровень фрагментации ДНК при криоконсервации клеток при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ снижаются при длительном криоконсервировании. Это объясняется тем, что в замороженном состоянии лед действует как естественная защита от экологических факторов риска повреждения ДНК, также активность ферментов системы репарации в замороженной среде в малой степени сохраняются. Комбинация этих факторов способствует медленному восстановлению ДНК от повреждений, и при постановке детекции снижаются показатели хвостов комет.

Наблюдали повышенные значения фрагментации ДНК после заморозки на протяжении 2 недель. Имеются несколько факторов повреждения ДНК, приводящих к фрагментации. Предполагается, что при размораживании происходили изменения в проницаемости и состоянии липидного бислоя мембраны – понижение вязкости, увеличение текучести, что могло спровоцировать повышенную активность или ингибирование ферментов, участвующих в метаболических процессах. Возможно, могло быть оказано влияние на активность ферментов репарации либо на саму структуру ДНК, также возможен вариант понижения активности ферментов системы репарации за счёт перехода состояния из твердой в жидкую фазу. В связи с этим в части клеток могло наблюдаться повышение фрагментации ДНК. Также возможен вариант, что размораживание клеток было осуществлено слишком медленно, что могло привести к формированию центров кристаллизации и активному росту кристаллов льда, повреждающих клеточную мембрану, либо изменить проницаемость клеточной мембраны, что в итоге привело к нарушениям метаболических и ферментативных процессов.

Исследование Мариолы Словинска и коллег (2008) показало, что криоконсервация гамет вызывала очень низкую фрагментацию ДНК (4–5%), которую измеряли методом ДНК-комет. Данные результаты продемонстрировали, что криоконсервация гамет характеризуется 100%

увеличением длины и момента хвоста. Также результаты показывают, что жизнеспособность и способность гамет к передвижению, низкий уровень фрагментации ДНК после криоконсервации являются характерными особенностями сперматозоидов быка, что позволяет их хранить в течение долгих сроков в интактном состоянии. Способность к криорезистентности гамет различаются между видами, что влияет на эффективность искусственного оплодотворения животных с использованием криоконсервированных сперматозоидов.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный анализ литературных источников свидетельствует о перспективах использования криоконсервированных образцов клеток в медицине, где необходимы исследования процессов криоконсервирования для осуществления безопасного замораживания компонентов крови, органов для пересадки. В центрах ЭКО данный способ хранения позволяет транспортировать материалы для оплодотворения либо хранения гамет при риске бесплодия.
2. Освоена и выполнена методика ДНК-комет для определения уровня фрагментации ДНК на образцах лейкоцитов человека, полученных от 6 здоровых доноров в возрасте от 19-22 лет.
3. Уровень фрагментации ДНК в образцах, криоконсервированных при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, составил в среднем 2,7, при заморозке $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ составил 2,52. Оба значения близки к %-му содержанию в хвостах по отношению к контролю, который составляет 2,76. Но при сравнении отдельных групп между собой установлено, что криоконсервация способствует снижению уровня повреждения ДНК. Следовательно, криоконсервированные клетки пригодны для использования в исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. — Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
2. Белоус А. М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко. - Киев: Наукова думка, 1982. – 256 с.
3. Бильданова, Л. Л. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков © 2012 г. / Л. Л. Бильданова, Е. А. Салина, В. К. Шумный // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. - Т. 16. – № 1 – С. 250–270.
4. Давыдова Е. В. Кластерная кристаллизация водных растворов глицерина / Е. В. Давыдова, А. И. Осецкий // Проблемы криобиологии. – 2011. - Т. 21. – № 2. – С. 200.
5. Жанатаев А. К. Метод ДНК-комет в генотоксикологических исследованиях / А. К. Жанатаев, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин // Гигиена и санитария. – 2011. – № 5. – С. 86–90.
6. Индивидуальные цитогенетические и молекулярно-биологические особенности лимфоцитов крови летчиков и космонавтов / И. И. Пелевина [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – Т. 47 – № 2 – С. 141–150.
7. Катков, И. И. Криобласт™ – новая технология сверхбыстрой кроконсервации клеток и тканей: 1. Термодинамические аспекты и перспективы применения в репродуктивной и регенеративной медицине / И. И. Катков, В. Ф. Болюх, Г. Т. Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 4. – С. 216–221.

8. Конов, К. Б. Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны: автореф. дис. ...канд. физ.-мат. наук / Конов Константин Борисович. – Казань, 2016. – 137 с.
9. Костяев, А. А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья) / А. А. Костяев, А. К. Мартусевич, А. А. Андреев // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. – № 6. – С. 54–74.
10. Левин, С. В. Структурные изменения клеточных мембран / С. В. Левин. – Л.: Наука, 1976. – 197 с.
- Пучков, Е. О. Биогенное управление образованием льда / Е. О. Пучков // Природа. – 2017. – № 2. – Режим доступа: https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/434274/Biogennoe_upravlenie_obrazovaniem_lda (Дата обращения: 03.06.2020).
12. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 305 с.
13. Филиппов, Э. В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды (обзор) / Э. В. Филиппов // НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ. - 2014. – № 2. – с. 72–78.
14. Худяков, А. Н. Возможность сохранения функций лейкоцитов крови при температуре -80°C под защитой различных криозащитных сред / А. Н. Худяков // Молодой ученый. – 2010. – Т. 2. – № 8 (19). – С. 206–209.
15. Щеглова, О. О. Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из холодового анабиоза при умеренно-низкой температуре: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. О. Щеглова. – Киров, 2005. – 116 с.
16. Blasiak J. и др. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2004. Т. 554. № 1–2. С. 297–304.

17. Braafladt S., Reipa V., Atha D. H. The Comet Assay: Automated Imaging Methods for Improved Analysis and Reproducibility // *Sci Rep*. 2016. Т. 6. № 1. С. 32162.
18. Brunborg G. и др. High throughput sample processing and automated scoring // *Front. Genet*. 2014. Т. 5.
19. Chaubey RC. Computerized image analysis software for the comet assay. *Methods Mol Biol* 2005; 291: 97–106. 33.
20. Chernigina I. A., Shcherbatyuk T. G. A New Version of Comet Assay // *Sovrem Tehnol Med*. 2016. Т. 8. № 1. С. 20–27.
21. Chuang C.-H., Hu M.-L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2004. Т. 564. № 1. С. 75–82.
22. Collins A. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009. Т. 681. № 1. С. 24–32.
23. Collins A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations // *MB*. 2004. Т. 26. № 3. С. 249–261.
24. Collins A. R. и др. Controlling variation in the comet assay // *Front. Genet*. 2014. Т. 5.
25. Collins A. R. и др. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis*. 2008. Т. 23. № 3. С. 143–151.
26. Cryopresevation of mamalian cell lines // *abcam - Cambridge*, 1998-2020. - Режим доступа: (дата обращения: 04.06.2020).
27. Del Bo' C, и др. Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis*. 2015;30(1):29-35. doi:10.1093/mutage/geu058
28. Demirbag R., Yilmaz R., Kocyigit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005. Т. 570. №

2. С. 197–203.

29. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models // *Cell Biol Toxicol*. 2009. Т. 25. № 1. С. 5–32.

30. Francesconi A. Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells / A. Francesconi, E. Del Terra, A. Meli, F. S. Ambesi-Impiombato // *Phys Med* – 2001. - 17 (1) –232–4. 34.

31. Klaude M. и др. The comet assay: mechanisms and technical considerations // *Mutation Research/DNA Repair*. 1996. Т. 363. № 2. С. 89–96.

32. Końca K. и др. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003. Т. 534. № 1–2. С. 15–20.

33. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96 (1): 1–2.

34. Moller P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures // *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006. Т. 98. № 4. С. 336–345.

35. Mozaffarieh, M. и др. Outcomes of comet assay analysis using freshly prepared and cryopreserved leukocytes / M. Mozaffarieh [и др.] // *Oxid Antioxid Med Sci*. – 2013. – 2 (3) – 6с.

36. Olive, P. L. Analysis of DNA damage in individual cells / P. L. Olive [и др.] // *Meth. Cell Biol* – 2001. – 64 – pp. 235-249

37. Schneider, C. A. Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 9, 671–675, (2012).

38. Speit G., Rothfuss A. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair // *DNA Repair Protocols Methods in Molecular Biology*. / под ред. L. Bjergbæk. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. С. 79–90.

39. Słowińska, M. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa / M. Słowińska, H. Karol, A. Ciereszko // *Cryobiology*. 2008. – 56(1) – P.

100–102. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.10.176

40. Struwe M. и др. The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007. Т. 632. № 1–2. С. 44–57.

41. Tice R. R. и др. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing С. 16.

42. Valverde M., Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009. Т. 681. № 1. С. 93–109.