

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Влияние предварительной обработки образцов периферической крови человека на качество Hi-C библиотек

М.М. Гридина<sup>1</sup>✉, Э. Весна<sup>1</sup>, М.Е. Миньженкова<sup>2</sup>, Н.В. Шилова<sup>2</sup>, О.П. Рыжкова<sup>2</sup>, Л.П. Назаренко<sup>3</sup>, Е.О. Беляева<sup>3</sup>, И.Н. Лебедев<sup>3</sup>, В.С. Фишман<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

✉ gridinam@gmail.com

**Аннотация.** Метод захвата конформации хроматина в его полногеномном варианте (Hi-C) – мощный инструмент не только для выявления закономерностей пространственной организации генома, но и для понимания влияния их нарушения на развитие заболеваний. Кроме того, метод может быть использован для детекции хромосомных перестроек, в том числе сбалансированных транслокаций и инверсий. Применение метода Hi-C для поиска хромосомных перестроек получает все более широкое распространение. Это связано с тем, что современные высокопроизводительные методы анализа генома позволяют эффективно детектировать точечные мутации и несбалансированные хромосомные перестройки. Однако чувствительность этих методов для определения сбалансированных транслокаций и инверсий остается достаточно низкой. Хранение образцов цельной крови может влиять на количество и целостность выделяемой из них геномной ДНК, а кроме того, приводит к искажению результатов последующих анализов в том случае, если хранение осуществлялось в ненадлежащих условиях. Метод Hi-C крайне требователен к исходному материалу, так как необходимым условием для его успешного применения и получения качественных данных является сохранение пространственной укладки хроматина внутри ядра. Цель нашего исследования состояла в том, чтобы определить оптимальные условия хранения крови для проведения последующего анализа Hi-C. Были выбраны 10 различных условий хранения образцов крови и пробоподготовки. Для каждого условия приготовлены Hi-C библиотеки и отсекуированы, после чего оценивалось качество полученных библиотек. В результате сформулированы требования к хранению и подготовке образцов, необходимые для получения качественных Hi-C данных. Нами установлен минимальный объем образца крови, достаточный для проведения Hi-C анализа. Помимо этого, мы определили способы выделения ядерных элементов крови и их долгосрочного хранения, наиболее подходящие для последующего проведения Hi-C анализа. Основное требование, сформулированное нами, – не замораживать цельную кровь.

Ключевые слова: Hi-C; периферическая кровь человека; хранение образцов крови.

**Для цитирования:** Гридина М.М., Весна Э., Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Рыжкова О.П., Назаренко Л.П., Беляева Е.О., Лебедев И.Н., Фишман В.С. Влияние предварительной обработки образцов периферической крови человека на качество Hi-C библиотек. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(1):83-87. DOI 10.18699/VJGB-23-11

## Influence of human peripheral blood samples preprocessing on the quality of Hi-C libraries

М.М. Gridina<sup>1</sup>✉, E. Vesna<sup>1</sup>, M.E. Minzhenkova<sup>2</sup>, N.V. Shilova<sup>2</sup>, O.P. Ryzhkova<sup>2</sup>, L.P. Nazarenko<sup>3</sup>, E.O. Belyaeva<sup>3</sup>, I.N. Lebedev<sup>3</sup>, V.S. Fishman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

✉ gridinam@gmail.com

**Abstract.** The genome-wide variant of the chromatin conformation capture technique (Hi-C) is a powerful tool for revealing patterns of genome spatial organization, as well as for understanding the effects of their disturbance on disease development. In addition, Hi-C can be used to detect chromosomal rearrangements, including balanced translocations and inversions. The use of the Hi-C method for the detection of chromosomal rearrangements is becoming more widespread. Modern high-throughput methods of genome analysis can effectively reveal point mutations and unbalanced chromosomal rearrangements. However, their sensitivity for determining translocations and inversions remains rather low. The storage of whole blood samples can affect the amount and integrity of genomic DNA, and it can distort the results of subsequent analyses if the storage was not under proper conditions. The Hi-C method is extremely demanding on the input material. The necessary condition for successfully applying Hi-C and obtaining high-quality data is the preservation of the spatial chromatin organization within the nucleus. The purpose of this study was to determine

the optimal storage conditions of blood samples for subsequent Hi-C analysis. We selected 10 different conditions for blood storage and sample processing. For each condition, we prepared and sequenced Hi-C libraries. The quality of the obtained data was compared. As a result of the work, we formulated the requirements for the storage and processing of samples to obtain high-quality Hi-C data. We have established the minimum volume of blood sufficient for conducting Hi-C analysis. In addition, we have identified the most suitable methods for isolation of peripheral blood mononuclear cells and their long-term storage. The main requirement we have formulated is not to freeze whole blood.

Key words: Hi-C; human peripheral blood; blood samples storage.

**For citation:** Gridina M.M., Vesna E., Minzhenkova M.E., Shilova N.V., Ryzhkova O.P., Nazarenko L.P., Belyaeva E.O., Lebedev I.N., Fishman V.S. Influence of human peripheral blood samples preprocessing on the quality of Hi-C libraries. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(1):83-87. DOI 10.18699/VJGB-23-11

## Введение

Сочетание метода захвата конформации хроматина с полногеномным секвенированием привело к разработке простого и эффективного протокола Hi-C, который позволяет изучать архитектуру хроматина в масштабах всего генома (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rao et al., 2014). Наряду с многочисленными сведениями об организации и динамике хроматина в ядре, результаты Hi-C показали, что зависимость между трехмерным расстоянием в пространстве ядра и «нуклеотидным» расстоянием в геномных координатах можно описать степенной функцией во всех изученных типах клеток. Это означает, что хромосомные перестройки не только оказывают эффект на частоту контактов районов, непосредственно расположенных в точках хромосомных разрывов, но и изменяют паттерн трехмерных контактов широкой области вокруг границы перестройки (Mozheiko, Fishman, 2019). Исходя из этой закономерности недавно были предложены методы детекции хромосомных перестроек на основе анализа изменений трехмерной организации ядра (Harewood et al., 2017; Chakraborty, Ay, 2018; Díaz et al., 2018; Fishman et al., 2018; Melo et al., 2020). Данные методы позволяют в том числе детектировать сбалансированные хромосомные перестройки, что до сих пор остается трудно разрешимой задачей (Hakim et al., 2012; Dong et al., 2017). Кроме того, из данных Hi-C можно извлечь информацию об однонуклеотидных вариациях (Mozheiko, Fishman, 2019), важную для генетической диагностики.

Кровь – один из удобных материалов для проведения генетической диагностики. Правильное обращение с образцами крови перед выделением нуклеиновых кислот является критическим фактором для полногеномных исследований. Продолжительное хранение и неадекватные условия приводят к уменьшению количества выделяемой ДНК (Nederhand et al., 2003; Malentacchi et al., 2015; Schröder, Steimer, 2018) и к ее деградации (Ross et al., 1990; Permenter et al., 2015). Высокая степень деградации ДНК представляет серьезную проблему для последующих молекулярно-биологических анализов (Palmirota et al., 2011; Malentacchi et al., 2015). Например, увеличение времени хранения образца крови приводит к завышенной оценке уровня метилирования ДНК, что может быть связано с разной стабильностью метилированной и неметилированной ДНК (Schröder, Steimer, 2018).

Ключевыми этапами протокола Hi-C являются фрагментация и лигирование хроматина. Для получения качественных данных необходимо, чтобы оба этих этапа проходили *in nucleus*, т. е. в условиях максимального со-

хранения целостности ядра. Таким образом, в отличие от методов анализа последовательности ДНК, метод Hi-C предъявляет дополнительные требования к качеству исходного материала. В связи с этим нам кажется актуальным определить подходящие условия хранения образцов крови, предназначенных для проведения Hi-C анализа.

## Материалы и методы

Кровь для исследования брали из локтевой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА. Условия хранения и подготовки образцов для фиксации указаны в таблице и на рис. 1.

Выделение ядерных элементов из 3 мл цельной крови проводили одним из следующих способов:

- лизис эритроцитов при помощи буфера RBCL (BioLegend) согласно инструкциям производителя. После лизиса клеточный осадок однократно промывали фосфатно-солевым раствором (PBS);
- центрифугирование 300 г в течение 10 мин. Сыворотку крови, включая интерфазу, переносили в PBS, повторно центрифугировали 300 г 10 мин;
- центрифугирование в градиенте Histopaque-1077 Hybri-max (Sigma, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя.

Криоконсервацию выделенных ядерных элементов крови проводили в среде для заморозки клеток: 10 % DMSO, 90 % KSR (Thermo Fisher Scientific). Клетки замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и хранили в жидком азоте. После разморозки клетки однократно промывали PBS.

## Описание сравниваемых условий

№ п/п	Краткое описание условия хранения и подготовки образцов для фиксации (время указано от момента забора крови)
1	Менее 4 ч; RBCLB
2	Менее 4 ч; RBCLB; заморозка KSR+DMSO
3	Менее 4 ч; центрифугирование
4	Менее 4 ч; центрифугирование; заморозка KSR+DMSO
5	24 ч RT; RBCLB
6	$-20^{\circ}\text{C}$ в течение 4 дней; RBCLB
7	2 дня при $+4^{\circ}\text{C}$ ; RBCLB
8	4 дня при $+4^{\circ}\text{C}$ ; RBCLB
9	7 дней при $+4^{\circ}\text{C}$ ; RBCLB
10	Менее 4 ч; Histopaque-1077 Hybri-max; заморозка KSR+DMSO



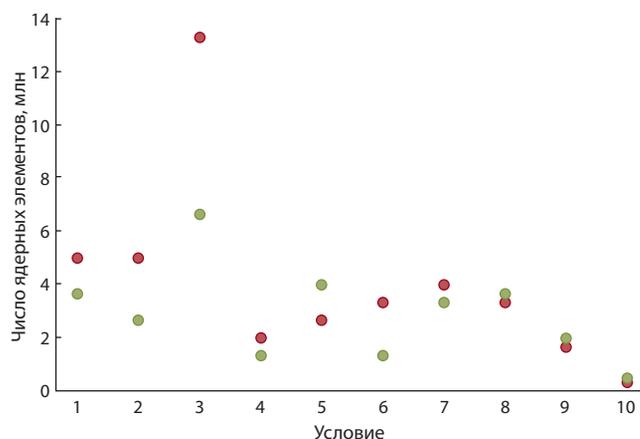
**Рис. 1.** Схема обработки образца крови перед фиксацией.

Клетки подсчитывали и ресуспендировали в PBS в концентрации 1 млн клеток/мл. Фиксацию клеток, приготовление Hi-C библиотек и анализ данных выполняли, как описано в (Gridina et al., 2021), используя для фрагментации хроматина DNКазу I (Thermo Fisher Scientific) или S1 нуклеазу (Thermo Fisher Scientific). Для приготовления библиотек для секвенирования использовали HAPA Hyper prep и QIAseq® FX DNA Library Kit (Qiagen), согласно инструкциям производителей. Концентрацию библиотек определяли флуориметром Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Библиотеки секвенировали на HiSeq XTen (Illumina) парными прочтениями 150 п. н.

### Результаты и обсуждение

Первым шагом протокола Hi-C, необходимым для того, чтобы сохранить пространственную организацию хроматина внутри ядра такой, какая она есть в клетке, является фиксация материала. Мы столкнулись с тем, что не всегда есть возможность доставить образец в лабораторию для фиксации в день забора крови, и решили систематически оценить влияние условий хранения крови перед проведением Hi-C анализа на качество получаемых данных. Были выбраны 10 условий, которые включали в себя: разные способы выделения ядерных элементов из цельной крови, разные время и температуру хранения образца, возможность заморозки ядерных элементов крови перед фиксацией для длительного хранения (см. рис. 1 и таблицу).

Несмотря на то что забор крови считается малоинвазивной процедурой, очевидно, что существуют определенные ограничения на объем крови, который можно получить от пациента. Особенно если пациент – маленький ребенок, или если он имеет определенные проблемы системы свертываемости крови. Для проведения Hi-C анализа необходимо 1.5–2.5 млн клеток. В норме в 1 мл крови содержится  $(4–11) \times 10^6$  клеток. Для тестирования каждого условия было взято по 3 мл цельной крови в двух репликах. После удаления из образцов эритроцитов, перед фиксацией проводили подсчет ядерных элементов крови (рис. 2). В случае условия № 3 (выделение ядерных элементов без обработки RBCL) было обнаружено существенно большее число клеток. При подсчете перед фиксацией мы не определяли долю живых клеток, поэтому возможно, что в условиях № 3 сохраняются погибающие клетки, которые в других случаях подвергаются лизису при использовании RBCL буфера (Brown et al., 2016) или заморозке. Аргументом в поддержку этого предположения может служить значительно более низкое число клеток в образцах № 4 и 10, которые не обрабатывались RBCL, но подвергались замораживанию, а не в условиях № 2.



**Рис. 2.** Число ядерных элементов в 1 мл крови.

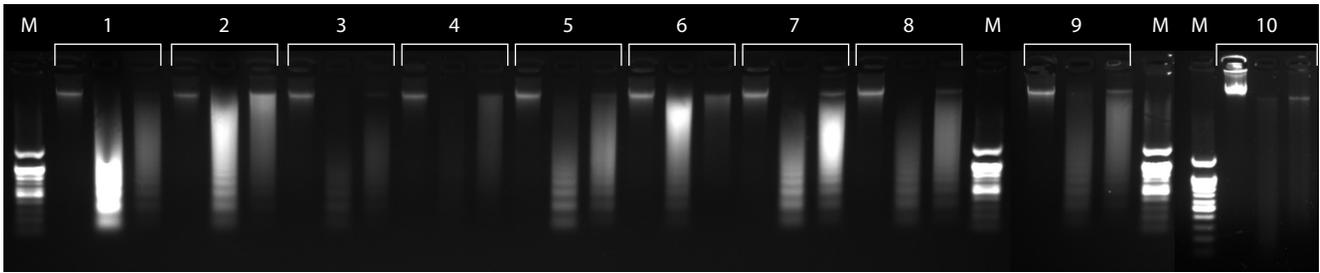
Эксперименты выполнены в двух независимых репликах, обозначенных на графике разным цветом. Номера по горизонтальной оси соответствуют разным условиям хранения и подготовки образцов, описанным в таблице.

Стоит отметить, что во всех образцах, кроме № 6, не было признаков выраженного гемолиза перед началом выделения ядерных элементов крови; для № 6 не было возможности оценить этот параметр. Гемолиза следует избегать, так как это один из основных факторов, негативно влияющих на количество ДНК при выделении (Sabouh et al., 2012), что может быть связано с деградацией ДНК под действием нуклеаз, высвобождающихся из разрушающихся клеток.

В процессе лизиса эритроцитов и последующих отмывок в некоторых образцах формировались конгломераты клеток, которые было невозможно диссоциировать. Конгломераты были в обеих репликах в условиях № 6, 8, 9 и 10. Следовательно, для этих образцов невозможно сказать, насколько точно было подсчитано число клеток и насколько равномерно клетки были распределены по аликвотам.

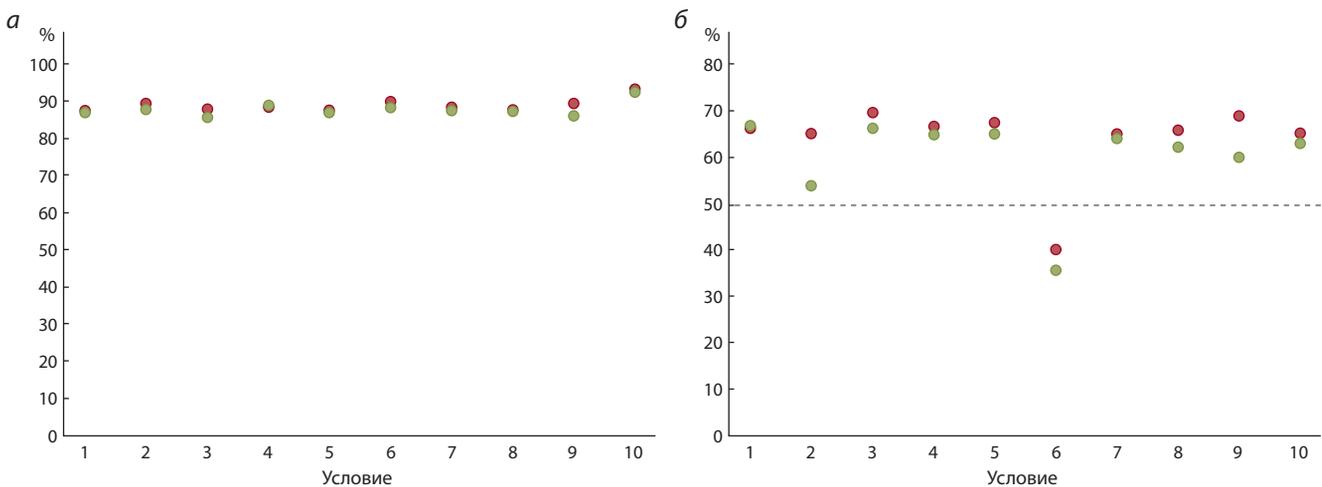
Для приготовления Hi-C библиотек брали по 2.5 млн фиксированных клеток. Чтобы оценить качество Hi-C библиотек, делают следующие контроли: геномная ДНК, ДНК после фрагментации хроматина и после лигирования хроматина (Belaghzal et al., 2017). Фореграмма контролей для всех условий давала похожую картину (рис. 3).

Полученные библиотеки секвенировали, прочтения были выровнены на геном человека сборки hg19 (GRCh\_37) и проведена оценка качества библиотек. Все библиотеки имели высокую долю выровненных прочтений (рис. 4, а).



**Рис. 3.** Контроли фрагментации и лигирования хроматина в Hi-C экспериментах.

Номера соответствуют разным условиям хранения и подготовки образцов. Порядок нанесения: геномная ДНК, ДНК после фрагментации, ДНК после лигирования. М – ДНК-маркер 100 п. н.



**Рис. 4.** Показатели качества Hi-C библиотек: а – доля выровненных прочтений; б – доля *cis* контактов среди Hi-C контактов в библиотеках.

Эксперименты выполнены в двух независимых репликах, обозначенных на графиках разным цветом. Номера по горизонтальной оси соответствуют разным условиям хранения и подготовки образцов, описанным в таблице.

Ранее нами было показано (Gridina et al., 2021), что наиболее важной для оценки качества библиотек является доля *cis* контактов (соотношение *cis/all* (FF and RR orient)) (см. рис. 4, б). Этот показатель отражает долю Hi-C прочтений, попадающих на одну хромосому, среди всех Hi-C прочтений. Он был сопоставим для всех библиотек, за исключением № 6, где составил 40.3 и 35.7 %. Это означает, что полученные Hi-C данные будут неинформативны из-за того, что лигирование большого числа фрагментов происходило случайным образом. В данном случае мы замораживали образцы крови без добавления каких-либо криопротекторов и хранили в течение 4 дней при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Столь низкая доля *cis* контактов может быть следствием возникновения случайных разрывов нитей ДНК, которые возникают при замораживании клеток без криопротекторов (Narayanan et al., 2001; Peng et al., 2008; Al-Salmani et al., 2011). С другой стороны, такой способ замораживания приводит к образованию кристаллов льда внутри клетки и в результате – к разрывам клеточных и ядерных структур (Mazur, 1984). В обоих случаях может происходить выход фрагментов ДНК из ядра и их лигирование в растворе, что приводит к образованию неинформативных фрагментов ДНК.

## Заключение

В данной работе мы систематически оценили различные условия хранения и предфиксационной обработки образцов крови. В результате исследования были сформулированы следующие рекомендации по хранению и предпроцессингу образцов крови для дальнейшего проведения Hi-C анализа:

- если нет возможности доставить образец в день забора крови, его можно хранить при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение как минимум 7 дней;
- для криоконсервации лучше предварительно провести обработку буфером RBCL;
- достаточно 1–2 мл цельной крови (человека без признаков лейкопении), однако если предполагается хранение образца более 48 ч, этот объем следует увеличить до 4–6 мл;
- категорически нельзя замораживать цельную кровь.

## Список литературы / References

Al-Salmani K., Abbas H.H., Schulpen S., Karbaschi M., Abdalla I., Bowman K.J., So K.K., Evans M.D., Jones G.D., Godschalk R.W., Cooke M.S. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;51(3):719-725. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.020.

- Belaghzal H., Dekker J., Gibcus J.H. Hi-C 2.0: an optimized Hi-C procedure for high-resolution genome-wide mapping of chromosome conformation. *Methods*. 2017;123:56-65. DOI 10.1016/j.ymeth.2017.04.004.
- Brown W.E., Hu J.C., Athanasiou K.A. Ammonium-chloride-potassium lysing buffer treatment of fully differentiated cells increases cell purity and resulting neotissue functional properties. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2016;22(9):895-903. DOI 10.1089/ten.tec.2016.0184.
- Caboux E., Lallemand C., Ferro G., Hémon B., Mendy M., Biessy C., Sims M., Wareham N., Britten A., Boland A., Hutchinson A., Siddiq A., Vineis P., Riboli E., Romieu I., Rinaldi S., Gunter M.J., Peeters P.H.M., van der Schouw Y.T., Travis R., Bueno-de-Mesquita H.B., Canzian F., Sánchez M.-J., Skeie G., Olsen K.S., Lund E., Bilbao R., Sala N., Barricarte A., Palli D., Navarro C., Panico S., Redondo M.L., Polidoro S., Dossus L., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Lagiou P., Boeing H., Fisher E., Tumino R., Agnoli C., Hainaut P. Sources of pre-analytical variations in yield of DNA extracted from blood samples: analysis of 50,000 DNA samples in EPIC. *PLoS One*. 2012;7(7):e39821. DOI 10.1371/journal.pone.0039821.
- Chakraborty A., Ay F. Identification of copy number variations and translocations in cancer cells from Hi-C data. *Bioinformatics*. 2018; 34(2):338-345. DOI 10.1093/bioinformatics/btx664.
- Díaz N., Kruse K., Erdmann T., Staiger A.M., Ott G., Lenz G., Vaquerizas J.M. Chromatin conformation analysis of primary patient tissue using a low input Hi-C method. *Nat. Commun.* 2018;9(1):4938. DOI 10.1038/s41467-018-06961-0.
- Dong Z., Wang H., Chen H., Jiang H., Yuan J., Yang Z., Wang W.-J., Xu F., Guo X., Cao Y., Zhu Z., Geng C., Cheung W.C., Kwok Y.K., Yang H., Leung T.Y., Morton C.C., Cheung S.W., Choy K.W. Identification of balanced chromosomal rearrangements previously unknown among participants in the 1000 Genomes Project: implications for interpretation of structural variation in genomes and the future of clinical cytogenetics. *Genet. Med.* 2018;20(7):697-707. DOI 10.1038/gim.2017.170. Epub 2017. Nov. 2.
- Fishman V.S., Salnikov P.A., Battulin N.R. Interpreting chromosomal rearrangements in the context of 3-dimensional genome organization: a practical guide for medical genetics. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018;83(4):393-401. DOI 10.1134/S0006297918040107.
- Gridina M., Mozheiko E., Valeev E., Nazarenko L.P., Lopatkina M.E., Markova Z.G., Yablonskaya M.I., Voinova V.Y., Shilova N.V., Lebedev I.N., Fishman V. A cookbook for DNase Hi-C. *Epigenetics Chromatin*. 2021;14(1):15. DOI 10.1186/s13072-021-00389-5.
- Hakim O., Resch W., Yamane A., Klein I., Kieffer-Kwon K.-R., Jankovic M., Oliveira T., Bothmer A., Voss T.C., Ansarah-Sobrinho C., Mathe E., Liang G., Cobell J., Nakahashi H., Robbani D.F., Nussenzweig A., Hager G.L., Nussenzweig M.C., Casellas R. DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature*. 2012;484(7392):69-74. DOI 10.1038/nature10909.
- Harewood L., Kishore K., Eldridge M.D., Wingett S., Pearson D., Schoenfelder S., Collins V.P., Fraser P. Hi-C as a tool for precise detection and characterisation of chromosomal rearrangements and copy number variation in human tumours. *Genome Biol.* 2017; 18(1):125. DOI 10.1186/s13059-017-1253-8.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozcy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326(5950):289-293. DOI 10.1126/science.1181369.
- Malentacchi F., Ciniselli C.M., Pazzagli M., Verderio P., Barraud L., Hartmann C.C., Pizzamiglio S., Weisbuch S., Wyrich R., Gelmini S. Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: the SPIDIA experience. *Clin. Chim. Acta*. 2015;440: 205-210. DOI 10.1016/j.cca.2014.12.004.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984;247(3):C125-C142. DOI 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
- Melo U.S., Schöpflin R., Acuna-Hidalgo R., Mensah M.A., Fischer-Zimsak B., Holtgrewe M., Klever M.-K., Türkmen S., Heinrich V., Pluym I.D., Matoso E., Bernardo de Sousa S., Louro P., Hülsemann W., Cohen M., Dufke A., Latos-Bieleńska A., Vingron M., Kalscheuer V., Quintero-Rivera F., Spielmann M., Mundlos S. Hi-C identifies complex genomic rearrangements and TAD-shuffling in developmental diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 2020;106(6):872-884. DOI 10.1016/j.ajhg.2020.04.016.
- Mozheiko E.A., Fishman V.S. Detection of point mutations and chromosomal translocations based on massive parallel sequencing of enriched 3C libraries. *Russ. J. Genet.* 2019;55(10):1273-1281. DOI 10.1134/S1022795419100089.
- Narayanan S., O'Donovan M.R., Duthie S.J. Lysis of whole blood *in vitro* causes DNA strand breaks in human lymphocytes. *Mutagenesis*. 2001;16(6):455-459. DOI 10.1093/mutage/16.6.455.
- Nederhand R.J., Droog S., Klufft C., Simoons M.L., De Maat M.P.M., Investigators of the EUROPA trial. Logistics and quality control for DNA sampling in large multicenter studies. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(5):987-991. DOI 10.1046/j.1538-7836.2003.00216.x.
- Palmirotta R., Ludovici G., De Marchis M.L., Savonarola A., Leone B., Spila A., De Angelis F., Della Morte D., Ferroni P., Guadagni F. Pre-analytical procedures for DNA studies: the experience of the inter-institutional multidisciplinary BioBank (BioBIM). *Biopreserv. Biobank*. 2011;9(1):35-45. DOI 10.1089/bio.2010.0027.
- Peng L., Wang S., Yin S., Li C., Li Z., Wang S., Liu Q. Autophosphorylation of H2AX in a cell-specific frozen dependent way. *Cryobiology*. 2008;57(2):175-177. DOI 10.1016/j.cryobiol.2008.06.005.
- Permenter J., Ishwar A., Rounsavall A., Smith M., Faske J., Sailey C.J., Alfaro M.P. Quantitative analysis of genomic DNA degradation in whole blood under various storage conditions for molecular diagnostic testing. *Mol. Cell. Probes*. 2015;29(6):449-453. DOI 10.1016/j.mcp.2015.07.002.
- Rao S.S.P., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 2014;159(7):1665-1680. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.021.
- Ross K.S., Haites N.E., Kelly K.F. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J. Med. Genet.* 1990;27(9):569-570. DOI 10.1136/jmg.27.9.569.
- Schröder C., Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192414. DOI 10.1371/journal.pone.0192414.

#### ORCID ID

M.M. Gridina orcid.org/0000-0002-7972-5949  
E. Vesna orcid.org/0000-0003-3480-3963  
M.E. Minzhenkova orcid.org/0000-0001-5458-0408

N.V. Shilova orcid.org/0000-0002-0641-1084  
I.N. Lebedev orcid.org/0000-0002-0482-8046  
V.S. Fishman orcid.org/0000-0002-5573-3100

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 22-24-00190. В исследовании использованы образцы биоколлекции «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН. Авторы выражают благодарность Александре Ян и Артему Нурисламову.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.11.2022. После доработки 29.12.2022. Принята к публикации 30.12.2022.