

Методические аспекты проведения ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях

Е.А. Гайдай, биолог, ORCID 0000-0002-5295-6384;

А.А. Дорофеева, старший лаборант, 0000-0002-8738-2296;

К.Л. Крышень, кандидат биологических наук, руководитель отдела токсикологии и микробиологии,
ORCID 0000-0003-1451-7716;

Д.С. Гайдай, биолог, ORCID 0000-0002-8773-5717

ООО «Институт доклинических исследований»

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

E-mail: gajdaj.ea@doclinika.ru

Резюме. Длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды на любую биологическую систему сопровождается накоплением повреждений структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и изменением активности системы репарации, что приводит к закрепляемым мутациям, онкогенезу и гибели клеток.

В обзоре приведены методические и методологические аспекты проведения метода ДНК-комет для определения степени повреждения геномной ДНК. В последние годы разработано много методов, позволяющих регистрировать повреждения ДНК, однако не все они обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, необходимыми для мониторинга широкого спектра повреждений ДНК. Метод ДНК-комет, впервые описанный Д. Остлингом и К. Йохансоном (1984) [1], – быстрый и чувствительный тест для оценки степени повреждений геномной ДНК и изучения активности систем репарации ДНК на уровне отдельных ядросодержащих клеток и может быть применен для определения целостности генома. Усовершенствования и модификации метода ДНК-комет позволили значительно повысить его чувствительность и расширить сферу применения, однако практически не затронули принципы, составляющие его основу.

В настоящее время ДНК-комет-тест находит применение в различных сферах – исследованиях генотоксического действия химических веществ (в том числе и фармацевтических препаратов), репарации ДНК, апоптоза, клинических исследованиях по пренатальной диагностике, предрасположенности к онкологическим заболеваниям, при терапии рака, катаракты. Метод ДНК-комет постепенно становится неотъемлемой частью программ по биомониторингу: влиянию пищевого рациона на организм, факторов внешней среды, изменений метаболизма и физиологического состояния, старения организма; по изучению механизмов радиопротекторных воздействий и формирования радиоадаптивного ответа; исследований по экологии.

ДНК-комет-тест имеет ряд особенностей, влияющих на результативность метода, среди этих особенностей ключевыми являются: возможность заморозки исследуемого материала при больших объемах, температурный режим обработки материала, световые условия и т.п. Для обеспечения повторяемости достоверных результатов необходима унификация проводимых мероприятий в ДНК-комет-тесте для снижения вариабельности результатов.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, генотоксичность, повреждение ДНК.

Для цитирования: Гайдай Е.А., Дорофеева А.А., Крышень К.Л., Гайдай Д.С. Методические аспекты проведения ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2020; 03: 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-03>

Methodological aspects of DNA-comet assay *in vivo* in pre-clinical research

E.A. Gajdaj, A.A. Dorofeeva, K.L. Kryshen, D.S. Gajdaj

Institute of Pre-Clinical Research Ltd.

188663, Russia, Leningradskiy region, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy, Zavodskaya st., 3-245

E-mail: gajdaj.ea@doclinika.ru

Summary. Prolonged influence of adverse factors of environment on any biological system is accompanied by accumulation of damages in cell's DNA and change of reparation systems activity that may lead to emergence of fixed mutations, oncogenesis and cell death.

Methodological and methodical bases of the Comet assay for detection of genomic DNA damages is presented in the review. During the last years, many analytical techniques have been developed to estimate DNA damage, however not all of them possess sufficient sensitivity and specificity for monitoring variety of DNA damages. The method, first described by Ostling and Johansson in 1984, possesses sensitivity necessary for registration of DNA damage and repair occurring on a single cell level and may be used for assessment of genome integrity. Improvements and modifications of the comet assay significantly increased its sensitivity and expanded the application area; however, they did not affect on the basic principles.

Currently, the comet assay is used in various fields: in studies of the genotoxic effect of chemicals (including pharmaceuticals), the study of DNA damage repair, apoptosis, clinical studies on prenatal diagnosis, susceptibility to cancer, cancer therapy, cataract. The comet assay is an integral part of biomonitoring programs: the influence of the diet on the body, environmental factors, changes in metabolism and physiological state, aging of the body; to study the mechanisms of radioprotective effects and the formation of the radio-adaptive response; research on ecology.

The comet assay has a number of features that affect the effectiveness of the method. Among these features are the possibility of freezing the material, temperature conditions for processing the material, light conditions, etc. To ensure repeatability of reliable results, it is necessary to unify the measures taken in the comet assay to avoid variability of results.

Key words: comet assay, genotoxicity, DNA damage.

For citation: Gajdaj E.A., Dorofeeva A.A., Kryshen K.L., Gajdaj D.S. Methodological aspects of DNA-comet assay *in vivo* in pre-clinical research. *Laboratory Animals for Science*. 2020; 3: 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-03>

Введение

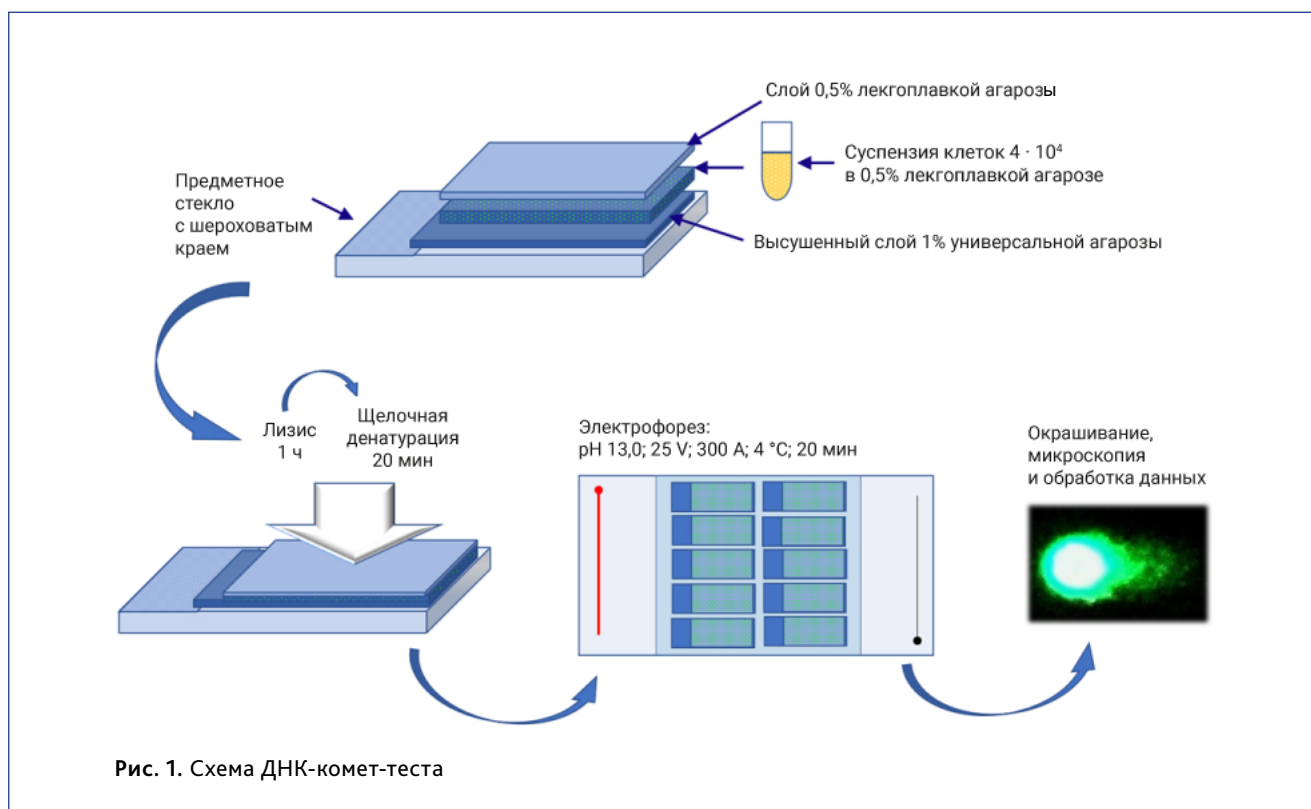
Постоянное воздействие негативных факторов окружающей среды (физических, химических и др.) в диапазонах интенсивности, выходящих за границы биологического оптимума жизнедеятельности, может приводить к повреждению генома. Это происходит как за счет прямого влияния (например, повреждение молекул ДНК ионизирующим излучением по принципу «мишени»), так и опосредовано, за счет образования в клетке свободных радикалов и активных форм кислорода. Угнетение и нарушение работы систем репарации ДНК приводят к накоплению повреждений, что в свою очередь приводит к закрепляемым мутациям, онкогенезу и гибели клеток. Образование повреждений ДНК – важное иницирующее событие в развитии патологических процессов в организме. В связи с этим особую актуальность приобретает оценка повреждений в структуре ДНК на ранних этапах, когда патологические процессы в организме еще не могут быть диагностированы на физиологическом уровне [2, 3]. Предупреждение контакта живых организмов с химическими соединениями (в том числе лекарственными средствами), способными оказывать генотоксическое действие, представляется наиболее конструктивным способом защиты от последствий индуцированного мутагенеза, поэтому возникает необходимость в совершенствовании методов для определения мутагенных свойств соединений [4].

Метод ДНК-комет (Comet assay, «комета-тест», электрофорез нуклеотидов отдельных клеток в геле агарозы) является наиболее перспективным из имеющихся на сегодняшний день тестов по оценке генотоксичности и канцерогенности различных химических соединений. Это быстрый и чувствительный тест, предназначенный для обнаружения повреждений ДНК и изучения эффективности функционирования систем репарации ДНК на уровне отдельных ядродержащих клеток, при воздействии широкого спектра повре-

ждающих агентов химической, физической и биологической природы. Данный метод также может применяться для оценки целостности генома. Преимущество метода – простота, небольшое количество экспериментального материала, экономичность, быстрота получения результатов, высокая чувствительность и производительность [4].

Значимость данного метода трудно переоценить, тем не менее важно учитывать биоэтические аспекты научных исследований. Для проведения исследования по оценке генотоксичности соединений методом ДНК-комет минимальное число животных для каждой группы составляет 5 самцов и 5 самок. При этом помимо экспериментальных групп животных, в исследование должны включаться 2 контрольные группы: интактные животные и животные, получающие вещество с доказанной мутагенной активностью (например, этилметансульфонат – ЭМС). При самых скромных подсчетах для проведения исследования необходимо приблизительно 50 голов животных. Согласно Руководству ICH S2 (R1) и Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ДНК-комет-тест входит в стандартную батарею тестов по изучению безопасности химических соединений. В соответствии с данными руководствами и принципами гуманности рекомендовано проведение ДНК-комет-теста в рамках исследования общетоксических свойств (в частности хронической и субхронической токсичности) с целью сокращения числа участвующих в эксперименте животных.

Традиционно анализируемые ткани в ДНК-комет-тесте готовят из небольшого свежего фрагмента ткани, используемого сразу после некропии животных. Агенты, вызывающие повреждение ДНК, в первую очередь воздействуют на органы кроветворения (костный мозг, селезенка), биотрансформации (печень, почки) и специфические органы-мишени. В связи с этим используется ДНК-комет-тест для большого количества органов, что приводит



к необходимости их криоконсервации для дальнейшего исследования. Замороженные клетки и ткани некоторые исследователи считают непригодными для теста, другие успешно применяют заморозку образцов. Основной проблемой экстренной заморозки является кристаллизация внутриклеточной жидкости, что приводит к разрушению клеточной структуры, в том числе и ядерной ДНК, необходимой для анализа [5].

Цель исследования заключалась в адаптации проведения ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* с подбором условий криоконсервации образцов тканей. В данной работе представлены методические рекомендации при осуществлении ДНК-комет-теста и ключевые особенности сохранения образцов органов и тканей животных для последующего анализа.

Общие принципы ДНК-комет-теста

Первым успешным опытом исследования повреждений ДНК индивидуальных клеток принято считать работу шведских ученых Д. Остлинга и К. Йохансона (1984) [1]. Основные процедуры метода ДНК-комет, описанные в первоначальном варианте метода, заключались в иммобилизации облученных клеток в низкоплавкой агарозе, нанесенной на предметное стекло. Далее проводили лизис клеточных

мембран и экстракцию белков в растворе с высоким содержанием соли. Молекулы ДНК разделяли электрофорезом, треки ДНК окрашивали флуоресцентным красителем, после чего образцы изучали микроскопически. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация ДНК, что приводит к ее релаксации, формируются фрагменты ДНК. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий хвост кометы. Кометы анализируют либо визуальным способом с дифференциацией по степени поврежденности ДНК, либо с использованием компьютерных программных средств обработки изображений [3].

В 1988 г. предложена модификация метода ДНК-комет [6]. В ней предлагалось подвергать лизированные клетки щелочной обработке для денатурации ДНК и последующего электрофореза в щелочной среде, что позволяло улучшить качество метода (появилась возможность обнаружения одонитевых разрывов ДНК и щелочлабильных сайтов, в которых разрывы ДНК образуются при щелочных условиях среды) и повысить его чувствительность и воспроизводимость, однако это практически не затрагивает основные принципы метода [7, 8]. Большинство лабораторий, внедривших данный методический подход в исследо-

Вещества положительного контроля, некоторые их ткани-мишени и дозы [9, 10]

Вещества, оказывающие генотоксическое действие (ткани-мишени)	Дозы, мг/кг	Источник литературы
Этилметансульфонат (для любой ткани)	200, 300	[12]
Этилнитрозомочевина (печень, желудок, двенадцатиперстная кишка и тонкий кишечник)	50, 100, 200	[13]
Метилметансульфонат (печень, желудок, двенадцатиперстная кишка и тонкий кишечник, легкие, почки, мочевой пузырь, костный мозг, кровь)	40, 80	[14]
1,2-диметилгидразин (HCl) (печень и кишечник)	50	[15]
N-метил-N-нитрозомочевина (печень, костный мозг, кровь, почки, желудок, тонкий кишечник и головной мозг)	20	[16]

вания, разработали многочисленные вариации протокола, в частности, касающихся продолжительности и условий лизиса клеток, денатурации, электрофореза и окрашивания ДНК [2].

На базе лаборатории клеточной биологии и цитогенетики (АО НПО «Дом Фармации», Ленинградская область, 2019) отработана методика ДНК-комет-теста в условиях *in vivo*. В качестве тест-системы использовали самцов и самок аутбредных крыс в возрасте 6–8 нед. Для теста выбраны печень, почки (как органы биотрансформации и выведения), селезенка, костный мозг (как органы кроветворения). Для сохранения образцы подвергали экстренной заморозке при температуре -80°C . Гомогенизированные органы иммобилизовали в низкоплавкой агарозе, нанесенной на предметное стекло для микроскопии. Далее образцы лизировали в буфере с высоким содержанием соли. После щелочной обработки молекулы ДНК разделяли электрофорезом в щелочной среде, треки ДНК визуализировали при помощи флуоресцентного красителя SYBR Green I (например, Sigma-Aldrich, США), после чего проводили микроскопию. Общая схема постановки теста представлена на рис. 1.

Выбор животных

Эксперимент предпочтительно проводить на мелких лабораторных грызунах – мышах или крысах, половозрелых самцах и/или самках. Также допускается использование других видов животных, если это научно обосновано. Во избежание большого разброса оцениваемых показателей необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не должно превышать 10%. Ни одна из инбредных или аутбредных линий не выделяется как предпочтительная [9, 10].

В целях уменьшения количества задействованных животных, а также оптимизации и уде-

шевления ДНК-комет-тест допускается проводить в рамках исследования общетоксических свойств химических соединений, в частности хронической токсичности [9, 11].

Вещества для положительного контроля

В качестве положительного контроля используют вещества супермутагены, оказывающие генотоксическое действие. Наиболее часто применяют ЭМС (например, Chem Cruz, США) в дозе 200 мг/кг, также могут быть выбраны и другие вещества, если это научно обосновано. Примеры веществ, дающих генотоксический эффект, некоторые их ткани-мишени и используемые дозы приведены в таблице.

Животных подвергают эвтаназии через 3 ч после введения контрольных веществ.

Особенности криоконсервации органов лабораторных животных

Поскольку объект для ДНК-комет-теста – целый ряд органов и тканей, анализ может быть продолжителен по времени, поэтому требуется криоконсервация для дальнейшего постепенного их исследования. Для проведения ДНК-комет-теста достаточно небольшого фрагмента исследуемого органа, оставшийся фрагмент подлежит рутинному гистологическому анализу (если это предусмотрено дизайном эксперимента). Этот аспект весьма важен при проведении ДНК-комет-теста в рамках изучения хронической токсичности. В ходе различных экспериментов выявлено, что наилучшим методом сохранения фрагментов органов и тканей без разрушения ядерной ДНК является экстренная заморозка в морозильной камере при -80°C в фосфатно-солевом буфере, содержащем 20 мМ ЭДТА и 10% диметилсульфоксид (ДМСО) [5].



Рис. 2. Удаление покровного стекла с застывшего геля

Очень важно не давать препаратам долго нагреваться выше 2–8°C до и после заморозки, так как ДМСО при нагревании оказывает генотоксическое действие [17].

Процедуру сохранения органов и тканей необходимо наладить таким образом, чтобы препараты были заморожены в течение 10 мин после эвтаназии животного. Для этого удобно использовать контейнер с сухим льдом, который должен находиться рядом с животным, подвергнутым вскрытию для извлечения органов и тканей.

Также стоит обратить внимание на размер замораживаемой ткани, фрагмент должен быть тонким и небольшим (75–100 мг), чтобы ДМСО успел пропитать все клетки. P. Jackson и соавт. [18] описывают метод быстрого измельчения образца ткани на льду перед его заморозкой при -80°C с целью снижения количества криоповреждений ДНК.

Приготовление препаратов клеток

Важнейшим этапом, от которого зависит продолжительность всего исследования и его качество, является приготовление препаратов с иммобилизованными в агарозе клетками. Заранее готовят 1% раствор универсальной агарозы, с этой целью в 50 мл приготовленного фосфатно-солевого буфера (10 мМ ЭДТА) растворяют 0,5 г универсальной агарозы, нагревают в микроволновой печи до полного растворения и ставят на термостатируемую поверхность электрической плитки, нагретую до 50°C. Особое внимание следует обращать на чистоту предметных стекол. Для соблюдения этого условия стекла замачивают на 4–8 ч в 95% спирте и удаляют спирт со стекол при помощи горелки. Подготовленные предметные стекла помещают на термостатируемую поверхность, нагретую до 50°C, затем опускают в горячий 1% раствор универсальной агарозы так, чтобы агароза покрывала всю действующую поверхность стекла, захватив примерно 5 мм шероховатой

части; протирают нижнюю поверхность стекла от агарозы и помещают на горизонтальную поверхность сушиться.

После этого наносят второй и третий слои агарозы, 1 и 0,5% растворы легкоплавкой агарозы для второго и третьего слоев следует приготовить заранее, чтобы агароза успела остыть до температуры 37°C.

Далее все манипуляции необходимо проводить в комнате с желтым светом, не допуская попадания ультрафиолетовых лучей на микропрепараты. Воздействие ультрафиолета оказывает повреждающее действие на молекулы ДНК клеток и может влиять на результаты анализа [4].

Размораживать образцы следует в воде, нагретой до 37°C. Как только буфер растаял, орган немедленно промывают в прохладном (4°C) фосфатно-солевом буфере, растирают в ступке на холоде с тем же буфером и быстро измельчают до образования суспензии клеток. Ждут не больше 1 мин, чтобы крупные фрагменты органа осели на дно, после чего 10–50 мкл суспензии клеток помещают в пробирку типа «эппендорф» с 250–290 мкл фосфатно-солевого буфера, при этом концентрация суспензии должна составлять примерно 4×10^4 клеток.

В эппендорфах смешивают 300 мкл суспензии клеток и 300 мкл 1% легкоплавкой агарозы и наносят на предметное стекло с одним слоем агарозы в объеме 70 мкл, накрывают покровным стеклом для равномерного распределения суспензии и ставят на холод до застывания геля. После затвердевания геля покровные стекла удаляют (рис. 2). Наносят третий слой 0,5% легкоплавкой агарозы, так же накрывают покровным стеклом и помещают на холод до застывания геля.

Лизис клеток

Через 10 мин покровные стекла снимают, микропрепараты помещают в тару для замачивания предметных стекол, заливают рабочим лизирующим раствором (2,5 М NaCl, 10 мМ Tris, 100 мМ Трилон Б, 1% Triton X-100, pH 10,0, 4°C) и помещают в холодильник при 4°C на 1 ч для проведения лизиса. Оптимальное время лизирования клеток составляет 1 ч, но этот процесс можно продлить до 24 ч [19]. Для предотвращения попадания света на клетки тару необходимо упаковать в фольгу.

Щелочная денатурация

По окончании лизиса стекла в течение 20 мин обрабатывают охлажденным щелочным буфером (0,3 М NaOH, 1 мМ ЭДТА, pH 13,0, 4°C) для раскручивания двойной спирали ДНК и образования щелочлабильных сайтов [19].

Электрофорез

Следующий этап проведения ДНК-комет-теста – электрофорез. Для электрофореза используют горизонтальную камеру SE-2 (170×180) (ООО «Хеликон», Россия) и источник питания PowerPac HV (BioRad, США). Для этого обработанные стекла выкладывают по всей площади камеры в один слой. Далее заливают охлажденным до 4°C щелочным электрофорезным буфером так, чтобы препараты были на 2–3 мм ниже уровня буфера.

Точное количество буфера необходимо для того чтобы уравновесить электродвижущую силу в 25 V при взятой за константу силе электрического тока 300 А. Объем буфера зависит от объема и площади электрофорезной камеры. Для облегчения регулировки необходимых параметров электрофореза в последующих экспериментах можно замерить необходимый объем буфера в электрофорезной камере. Электрофорез длится 20 мин (рис. 3).

Для предотвращения перегрева и поддержания температуры буфера 4°C при температуре окружающей среды 20–25°C необходимо сверху и снизу обложить камеру хладагентами. Отклонения в указанных температурных режимах может приводить к варибельности получаемых результатов [20].

По окончании электрофореза микропрепараты аккуратно (не допуская сползания агарозного слоя со стекла) помещают в контейнер с 70% этанолом на 2–3 мин для дегидратации и фиксации.

Окраска микропрепаратов

Микропрепараты окрашивают раствором SYBR Green I (например, Sigma-Aldrich, США) путем нанесения и распределения по всему препарату нескольких капель красителя. Окраску производят в течение 5 мин. Перед микроскопией остатки красителя с микропрепаратов не следует убирать [21].

Визуализация и анализ ДНК-комет

Визуализируют готовые и окрашенные микропрепараты с использованием флуоресцентной микроскопии, например, в флуоресцентном режиме (набор фильтров 09) микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с высокочувствительной камерой. Обработку комет осуществляют с помощью специализированного программного обеспечения (например, Comet-Д версия 2.0), проводят анализ результатов исследования определяя процент ДНК в «хвосте кометы». Данные обрабатывают на сохраненных цифровых изображениях либо в режиме



Рис. 3. Электрофорез

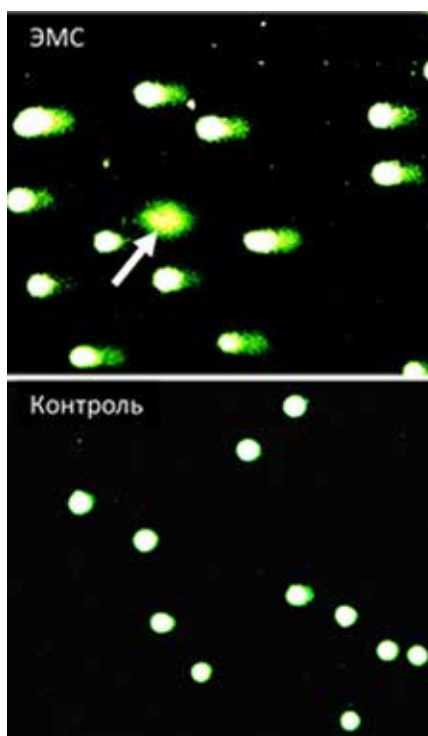


Рис. 3. Морфология комет клеток костного мозга крыс после воздействия ЭМС в дозе 200 мг/кг. Стрелкой указана апоптотическая клетка, исключенная из анализа

реального времени в зависимости от программного обеспечения. Важно отметить, что из анализа исключаются апоптотические клетки, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой» (рис. 4) [22].

Ожидаемые результаты

На рис. 5 приведены собственные результаты анализа повреждений ДНК в 3500 клеток в четырех органах – печени, почках, селезенке, костном мозге.

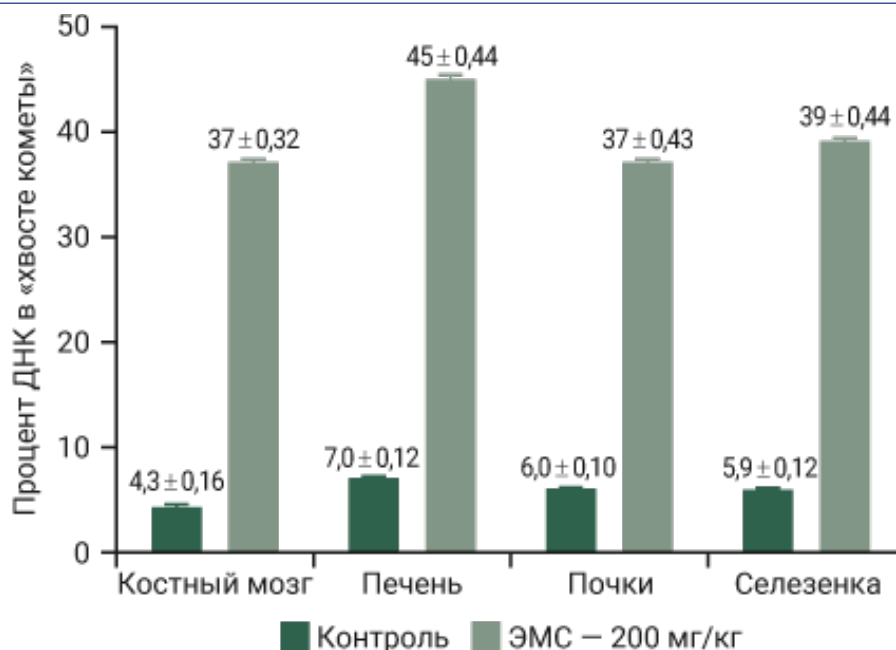


Рис. 5. Результаты теста ДНК-комет. % ДНК в «хвосте кометы» ($M \pm m$, $n = 3500$)

Примечание. ЭМС – этилметансульфонат в дозе 200 мг/кг, контроль – интактные клетки.

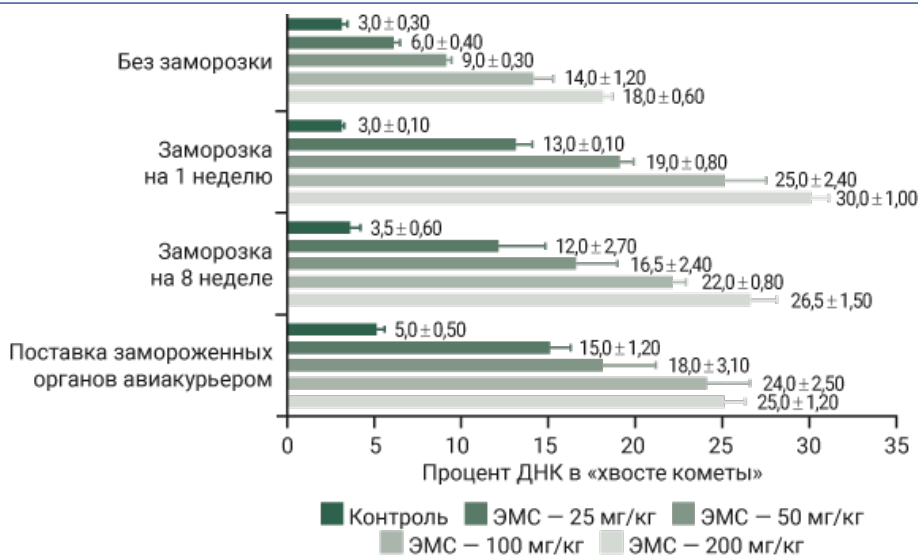


Рис. 6. Сравнительное исследование свежих и замороженных образцов тканей крыс линии SD, $M \pm m$ [23]

Примечание. ЭМС – этилметансульфонат, отрицательный контроль – интактные клетки.

Группе положительного контроля вводили внутрижелудочно ЭМС в дозе 200 мг/кг, контрольной группе животных – дистиллированную воду (растворитель).

Результаты исследования показали зависимость, при которой наблюдается в «хвосте кометы» до 10% ДНК у клеток без воздействия препарата и 30–50% ДНК у клеток, подвергшихся токсическому воздействию мутагена (см. рис. 5) [22].

В сравнительном исследовании свежих и замороженных образцов тканей крыс линии SD (рис. 6) показано, что замороженные ткани демонстри-

руют аналогичный свежим тканям дозозависимый эффект при внутрижелудочном введении ЭМС в дозе 0, 25, 50, 100 и 200 мг/кг [23].

Также есть данные, опубликованные W. Varfield, B. Burlinson [24], в которых процент «хвоста кометы» в интактных клетках варьирует от 3,2 до 14,9, а процент «хвоста» в положительном контроле колеблется от 50,4 до 64,4. При этом можно сделать вывод, что данные контрольных групп должны значимо различаться, однако могут иметь небольшой диапазон вариаций от лаборатории к лаборатории.

Ключевые рекомендации

ДНК-комет-тест имеет ряд особенностей, влияющих на результативность метода. При постановке пилотных экспериментов мы столкнулись с определенными трудностями. Для того чтобы избежать ошибок и наладить эксперимент должным образом, советуем обратить внимание на следующие аспекты:

- время заморозки и разморозки играет значительную роль для результатов анализа (препараты должны быть заморожены как можно быстрее после эвтаназии животного, а затем разморожены и зафиксированы в агарозные слои за максимально короткий промежуток времени);
- гомогенизацию органов стоит проводить быстро, в холодной ступке;
- все манипуляции с органами, начиная с гомогенизации, следует проводить в защищенном от ультрафиолета месте при желтом освещении;
- особое внимание необходимо уделять температуре буферных растворов, которая не должна превышать 4°C;
- при застывании агарозных слоев на хладагенте важно следить за температурой стекол, нельзя давать агарозным слоям замораживаться;
- стекла должны быть чистыми и обезжиренными для предотвращения сползания агарозных слоев со стекол во время электрофореза;
- для облегчения регулировки необходимых параметров электрофореза объем буфера в электрофорезной камере рекомендуется замерить.

Заключение

ДНК-комет-тест находит применение в различных сферах (при клинических и доклинических исследованиях, в области экологии и др.) и может использоваться для изучения разнообразных воздействий (лекарственных средств, радиационного излучения, бытовой химии, промышленных химических веществ, различных заболеваний и др.) на живые клетки. От лаборатории к лаборатории метод может изменяться и модернизироваться.

Описанный метод криоконсервации тканей животных может быть применен для проведения ДНК-комет-теста в рамках исследования общетоксических свойств, что позволит значительно сократить количество животных, используемых для реализации программы доклинических исследований.

Благодарности

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Acknowledgments

The work was done without sponsorship.

Вклад авторов

Е.А. Гайдай – сбор и анализ данных, концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста статьи

А.А. Дорофеева – постановка эксперимента, сбор данных литературных источников, написание текста статьи

К.Л. Крышень, Д.С. Гайдай – сбор данных литературных источников, редактирование текста статьи

Authors' contributions

E.A. Gajdaj – data collection and analysis, study concept and design, writing and editing of the text

A.A. Dorofeeva – setting up an experiment, literary data collection, writing of the text

K.L. Kryshen, D.S. Gajdaj – literary data collection, editing of the text

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Ostling D. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / D. Ostling, K.J. Johanson // Biochemical and biophysical research communications. – 1984. – P. 291-298. DOI:10.1016/0006-291x(84)90411-x
2. Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. – 2008. – Т. X. №3. – С. 303-309 [Sorochinskaya U.B. Primenenie metoda DNK-komet dlya otsenki povrezhdenii DNK, vyzvannykh razlichnymi agentami okruzhayushchei sredy / U.B. Sorochinskaya, V.M. Mikhailenko // Onkologiya. – 2008. –Vol. №3. – P. 303-309 (In Russ.)].
3. 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 [Filippov E.V. Ispol'zovanie metoda «DNK-komet» dlya deteksii i otsenki stepeni povrezhdenii DNK kletok organizmov rastenii, zhivotnykh i cheloveka, vyzvannykh faktorami okruzhayushchei sredy (obzor) / E.V. Filippov // Nauka i obrazovanie. – 2014. – №2. – P. 72-78 (In Russ.)].

4. МР 4.2.0014-10 Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro: Методические рекомендации. – 2010. – 16 с [МР 4.2.0014-10 Otsenka genotoksicheskikh svoystv metodom DNK-komet in vitro: Metodicheskie rekomendatsii. – 2010. – 16 p (In Russ.)].
5. Hu M.L. Simple Cryoprotection and Cell Dissociation Techniques for Application of the Comet Assay to Fresh and Frozen Rat Tissues / M.L. Hu, C.H. Chuang, H.M. Sio, S.L. Yeh // *Free Radic Res.* – 2002. – Vol. 36. №2 – P. 203-9. DOI:10.1080/10715760290006420
6. Singh N.P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. / N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider // *Exp Cell Res.* – 1988 – P. 184–91. DOI:10.1016/0014-4827(88)90265-0
7. Жанатаев А.К. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет / А.К. Жанатаев, В.А. Никитина, Е.С. Воронина, А.Д. Дурнев // *Прикладная токсикология.* – 2011. – Т.11. №2(4). – С. 28-37 [Zhanataev A.K. Metodicheskie aspekty otsenki DNK-povrezhdenii metodom DNK-komet / A.K. Zhanataev, V.A. Nikitina, E.S. Voronina, A.D. Durnev // *Prikladnaya toksikologiya.* – 2011. – Т.11. №2(4). – P. 28-37 (In Russ.)].
8. Olive P.L. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P.L. Olive, J.P. Banath // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol.1. №1. – P. 23–9. DOI:10.1038/nprot.2006.5
9. Guideline I. C. H. N. T. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1) // *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Expert Working Group.* – 2012. – P. 1-25
10. OECD No 489 guideline for the testing of chemicals. In vivo mammalian alkaline comet assay, Publishing, Paris. – 2014.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К. – 2012. – С. 845 – 855 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya // pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K. – 2012. – P. 845 – 855 (In Russ.)].
12. Recio L. et al. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol // *The Journal of toxicological sciences.* – 2010. – Vol. 35. №. 2. – P. 149-162. DOI:10.2131/jts.35.149
13. Suzuki T. A comparison of the genotoxicity of ethylnitrosourea and ethyl methane sulfonate in lacZ transgenic mice (Muta Mouse) / T. Suzuki, M. Hayashi, X. Wang, K. Yamamoto, T. Ono, B.C. Myhr, T. Sofuni // *Mutat. Res.* – 1997. – Vol.395. – P. 75-82. DOI: 10.1016/s1383-5718(97)00144-7
14. Sasaki Y.F. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) / Y.F. Sasaki, E. Nishidate, F. Izumiyama, N. Matsusaka, S. Tsuda // *Mutat Res.* – 1997. – Vol.391. №3. – P. 215-31. DOI: 10.1016 / s1383-5718 (97) 00073-9.
15. Sasaki Y.F. Organspecific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: difference between intra-peritoneal and oral administration / Y.F. Sasaki, A. Saga, M. Akasaka, S. Ishi-bashi, K. Yoshida, Y.Q. Su, N. Matsusaka, S. Tsuda // *Mutat Res.* – 1998. – Vol.415. №1-2. – P. 1-12. DOI: 10.1016/s1383-5718(98)00002-3
16. Monroe J.J. A comparative study of in vivo mutation assays: analysis of hprt, lacI, cll/cl and as mutational targets for N-nitroso-N-methylurea and benzo[a]pyrene in Big Blue mice / J.J. Monroe, K.L. Kort, J.E. Miller, D.R. Marino, T.R. Skopek // *Mutat Res.* – 1998. – Vol.12. – P. 121-36. DOI: 10.1016/s0027-5107(98)00171-7
17. 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 [Kostyaev A.A. Toksichnost' krioprotektorov i kriokonservantov na ikh osnove dlya komponentov krovi i kostnogo mozga (obzornaya stat'ya) / A.A. Kostyaev, A.K. Martusevich, A.A. Andreev // *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki.* – 2016. – № 6 – P. 54-74 (In Russ.)].
18. Jackson P. Validation of freezing tissues and cells for analysis of DNA strand break levels by comet assay / P. Jackson, L.M. Pedersen, Z.O. Kyjovska, N.R. Jacobsen, A.T. Saber, K.S. Hougaard, U. Vogel, H. Wallin // *Mutagenesis.* – Vol.28. №6. – P. 699–707. DOI: 10.1093/mutage/get049
19. Enciso J.M. Does the duration of lysis affect the sensitivity of the in vitro alkaline comet assay? / J.M. Enciso, O. Sanchez, A.L. de Cerain, A. Azqueta // *Mutagenesis.* – 2015. – Vol.30. – P. 21-28. DOI: 10.1093/mutage/geu047
20. Hartmann A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay / A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice // *Mutagenesis.* – 2003. – Vol.18. No.1. – P. 45–51. DOI: 10.1093/mutage/18.1.45
21. Sirota N.P. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay / N.P. Sirota, A.K. Zhanataev, E.A. Kuznetsova, E.P. Khizhnyaka, E.A. Anisinab, A.D. Durnev // *Mutation Research.* – 2014. – Vol.770. – P. 16–22. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.05.003
22. Жанатаев А.К. Феномен атипичных ДНК-комет / А.К. Жанатаев, Е.А. Анисина, З.В. Чайка, И.А. Мирошкина, А.Д. Дурнев // *Цитология.* – 2017. – Т.59. – №3. – С. 163-168 [Zhanataev A.K. Fenomen atipichnykh DNK-komet / A.K. Zhanataev, E.A. Anisina, Z.V. Chaika, I.A. Miroshkina, A.D. Durnev // *Tsitologiya.* – 2017. – Vol.59. №3. – P. 163-168 (In Russ.)].
23. Recio L. Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methane sulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues / L. Recio, G.E. Kissling, C.A. Hobbs, K.L. Witt // *Environmental and Molecular Mutagenesis.* – 2011. – Vol.53. No 2. – P. 101–113. DOI: 10.1002/em.20694
24. Barfield W., Burlinson B. p-Chloroaniline, t-butylhydroquinone, and methyl carbamate: Rat in vivo comet test, JaCVAM trial phase 4.2 // *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* – 2015. – Vol. 786. – P. 98-103. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.05.007