

У.Б. Сорочинская
В.М. Михайленко

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев, Украина

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ АГЕНТАМИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ключевые слова: повреждение ДНК, репарация ДНК, метод ДНК-комет, канцерогенные факторы окружающей среды.

Резюме. Длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается накоплением повреждений ДНК и изменением активности системы репарации, что может привести к возникновению мутаций и злокачественной трансформации клетки. В последние годы было разработано много методов, позволяющих регистрировать повреждения ДНК, а также исследовать процессы репарации. Однако не все они обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, необходимой для мониторинга широкого спектра повреждений ДНК, вызванных факторами окружающей среды. Цель обзора состоит в оценке эффективности метода гелеэлектрофореза лизированных единичных клеток (метод ДНК-комет) для детекции повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды. Метод обладает чувствительностью, необходимой для регистрации повреждений и репарации ДНК на уровне отдельной клетки, и может быть применен для оценки интегральной целостности генома.

Геном живых организмов подвергается постоянной атаке различных физических (ультрафиолетовая и ионизирующая радиация) и химических (генотоксические и канцерогенные вещества) факторов как окружающей среды, так и продуктов собственного метаболизма (свободные радикалы), которые могут повреждать ДНК клеток. Не будучи репарированными, повреждения ДНК могут инициировать каскад биологических реакций на клеточном, органном, организменном и популяционном уровне. Повышение уровня загрязнения окружающей среды генотоксическими веществами, равно как и использование ДНК-повреждающих агентов в химиотерапии приводит к накоплению повреждений ДНК, угнетению систем репарации, что в свою очередь приводит к возникновению мутаций и онкогенезу.

Образование повреждений ДНК является важным инициирующим событием в канцерогенезе. В течение последних 20 лет, было разработано много методов для мониторинга повреждений ДНК, обусловленных физическими и химическими факторами, среди которых высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез, ряд молекулярно биологических и иммунологических методов, позволяющих изучать процессы репарации ДНК [1].

Цель обзора состоит в том, чтобы оценить эффективность метода ДНК-комет для детекции повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды, в том числе при длительном воздействии на организм повреждающих факторов в низких дозах.

Метод ДНК-комет («DNA-comet assay»), впервые описанный Ostling и Johansson в 1984 г. [2], является быстрым и весьма чувствительным методом регистрации повреждений ДНК и изучения репарации ДНК на уровне одиночных клеток. Усовершенствования и модификации метода ДНК-комет позволили значительно повысить его чувствительность и расширить сферу применения, однако практически не затронули основные принципы, положенные в его основу [3].

Метод ДНК-комет применим в системах *in vivo* и *in vitro*. В настоящее время метод широко используется в исследованиях генотоксичности фармацевтических препаратов [4] и промышленных химических веществ [5], репарации ДНК [6], апоптоза [7–9], клинических исследованиях по пренатальной диагностике [10], предрасположенности к онкологическим заболеваниям, терапии при раке [11–13], катаракте [14]. Метод ДНК-комет постепенно становится неотъемлемой частью программ по биомониторингу — оценке влияния пищевого рациона [15], факторов внешней среды [16], изменений метаболизма и физиологического состояния [17], старения организма [16, 18] на накопление и репарацию повреждений ДНК; по изучению механизмов радиопротекторных воздействий [19, 20], формирования радиоадаптивного ответа [21, 22]; исследований по экологии [23–26]. Использование метода ДНК-комет позволяет учитывать гетерогенность сложных популяций, изучать выход повреждений ДНК и репарацию практически в любых эукариотических клетках [27–29]. При этом для анализа необходимо всего несколько тысяч клеток исследуемого образца.

Основные процедуры метода ДНК-комет, описанные в первоначальном варианте метода [2], заключались в иммобилизации облученных клеток в низкоплавкой агарозе, нанесенной на предметное стекло для микроскопии. Обработка образцов в буфере с высоким содержанием соли приводила к лизису клеточных мембран и экстракции белков. Молекулы ДНК разделяли электрофорезом, треки ДНК визуализировали посредством окрашивания флуоресцентным красителем, после чего образцы изучали микроскопически. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация ДНК, что приводит к релаксации этой биомолекулы, формируются фрагменты ДНК, не связанные с клеткой. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет» (отсюда и произошло название «comet assay», ставшее общеупотребительным). Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду и определяемое микрофотометром, может использоваться в качестве показателя, характеризующего уровень повреждений ДНК в изучаемых клетках. «Кометы» анализируют либо путем визуального наблюдения и дифференциации «комет» по степени поврежденности ДНК, либо с использованием компьютерных программных средств обработки изображений. Последний метод анализа «комет» особенно необходим для объективной оценки влияния небольшой концентрации повреждающего агента, или для выявления незначительных различий между субпопуляциями клеток [6, 7, 9].

В 1988 г. был описан новый вариант метода ДНК-комет, предполагающий проведение после лизиса клеток контролируемой денатурации ДНК и электрофорез в щелочной среде, что позволило детектировать однонитевые разрывы ДНК и щелочеллабильные сайты (разрывы ДНК в них образуются в щелочных условиях), а также повысить чувствительность метода и воспроизводимость результатов [30]. Щелочная обработка препаратов лизированных клеток вызывает расплетение дуплекса ДНК и позволяет отдельным нитям независимо мигрировать в электрическом поле.

Стандартизация метода ДНК-комет. В настоящее время большинство лабораторий, внедривших данный методический подход в исследования, разработали многочисленные вариации протокола, в частности продолжительности и условий лизиса клеток, денатурации, электрофореза и окрашивания ДНК. Подсчитывают 100–500 клеток на одном стекле в двух повторах. Результаты эксперимента являются достоверными при повторении не менее 6 раз. Анализ «ДНК-комет» может проводиться визуально или с помощью программно-аппаратного комплекса. При визуальном анализе «ДНК-кометы» ранжируются на пять условных типов с соответствующим числовым значением от 0 до 4.

Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс «ДНК-комет» ($I_{\text{ДК}}$), определяемый по формуле:

$$I_{\text{ДК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n_0 – n_4 — число «ДНК-комет» каждого типа, Σ — сумма подсчитанных «ДНК-комет» [31]. Программно-аппаратный комплекс включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров «ДНК-комет», характеризующих целостность структуры ДНК — длину «кометы», длину «хвоста», диаметр «головы», процентное содержание ДНК в «голове или хвосте». На сегодня разработано около десятка программ для анализа «ДНК-комет», несколько из которых находятся в свободном доступе. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров «ДНК-комет» проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК, чаще всего используют длину «хвоста», %ДНК в «хвосте» или их произведение — так называемый момент «хвоста» [32–34].

Для калибровки метода ДНК-комет использовали облучение от инкорпорированного ^{125}I , при этом предполагали, что один распад ^{125}I приводит к формированию одного двуникового разрыва ДНК [35]. Данные экспериментов свидетельствуют о том, что в результате рентгеновского облучения в дозе 1 Гр в диплоидных клетках фибробластов китайского хомячка формируется 23 двуниковых разрыва ДНК, что хорошо согласуется с данными, полученными методом импульсного гель-электрофореза [36].

Детекция однонитевых и двунитовых разрывов ДНК. Использование щелочного варианта метода ДНК-комет позволяет оценивать, главным образом выход однонитевых разрывов и щелочеллабильных сайтов, так как при использовании данного протокола двунитовые разрывы составляют менее 5% общего выхода повреждений ДНК [37].

Методом ДНК-комет, проводимым в нейтральных условиях среды, детектируют преимущественно двунитовые разрывы ДНК [38].

Метод ДНК-комет используется для биомониторинга генотоксических факторов окружающей среды. С помощью этого метода показано, что по прошествии 20 лет аварии на Чернобыльской АЭС степень поврежденности ДНК лейкоцитов детей, проживающих в Белоруссии на загрязненных радионуклидами территориях, достоверно превышает контрольные значения, причем наблюдается прямая корреляция выхода повреждений ДНК и дозы радиоактивного загрязнения [39].

Оценка методом ДНК-комет генотоксичности ионизирующего излучения проводилась и на растительных объектах — бобах [40], табаке [41], семенах 5 видов растений. Показана пригодность метода для выявления продуктов питания, подвергшихся

ся радиационной стерилизации, когда повреждения ДНК регистрировались при дозах облучения сухих семян в 25 Гр и выше [42]. Наблюдалась прямая зависимость «момента хвоста кометы» от дозы и времени облучения. Процессы репарации ДНК элиминировали все радиационно-индуцированные повреждения, детектируемые методом ДНК-комет, в течение 24 ч от момента облучения [43]. Следует также отметить, что значительная часть поврежденных ДНК, формируемых алкилирующими соединениями, такими как нитрозомочевина, остаются нерепарированными, по крайней мере в течение 1 мес после обработки растений мутагенами [41].

Детекция апоптотических клеток. Известно, что в клетках, гибнущих по механизму апоптоза, ДНК, как правило, претерпевает межнуклеосомную деградацию, являющуюся характерным маркером процесса. Апоптотические клетки имеют вид слабо флуоресцирующих «ДНК-комет» с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой». Использование метода ДНК-комет для регистрации апоптотических клеток в популяциях особенно актуально в случае, когда доступным является только небольшое количество образца. С помощью метода ДНК-комет удается получить информацию не только о содержании ДНК в апоптотических клетках, но и о размерах фрагментов ДНК, вышедших из клетки при действии электрического поля.

В ряде работ было показано, что использование метода ДНК-комет оказывается полезным для разделения субпопуляций апоптотических клеток и клеток на ранних стадиях некроза. При некрозе нарушение целостности клеточных мембран предшествует деградации ДНК, а при апоптозе деградация ДНК развивается раньше процесса разрушения клеточной мембраны. Поэтому метод ДНК-комет не менее информативен, чем другие методы, основанные на оценке степени деградации ДНК, такие как электрофоретическое выявление «лестницы» ДНК-фрагментов и проточная цитометрия [7–9, 37, 44].

Детекция повреждений оснований ДНК и сшивок ДНК-ДНК. Межнитевые сшивки ДНК-ДНК, формируемые многими терапевтическими средствами, также регистрируются методом ДНК-комет, проводимом в щелочных условиях [45–47]. Поперечные сшивки препятствуют расхождению нитей ДНК при щелочной денатурации, поэтому с увеличением числа таких сшивок количество ДНК, способной свободно мигрировать в электрическом поле, уменьшается. Значительное количество повреждений ДНК в клетках приводит к формированию фрагментов ДНК, диффундирующих из геля во время лизиса и электрофореза, а фрагменты ДНК с размерами менее 50 тыс. пар нуклеотидов могут быть трудно визуализируемы. Поэтому регистрация методом ДНК-комет незначительного количества сшивок на фоне значительного количества разрывов ДНК представляется затруднительной.

Регистрация субпопуляций гипоксических клеток в опухолях методом ДНК-комет. Известно, что клетки опухолей в состоянии гипоксии по крайней мере в 3 раза более резистентны к образованию разрывов ДНК по сравнению с клетками, хорошо снабжающимися кислородом. Показано, что по количеству индуцированных облучением разрывов ДНК и сшивок ДНК белком можно судить о процентном соотношении гипоксических клеток в исследуемых опухолях [48]. В случаях, когда опухолевые клетки быстро восстанавливаются после облучения в дозах 4 Гр и более, метод ДНК-комет может быть использован для идентификации гипоксических популяций клеток. Такое применение метода становится возможным благодаря тому, что кислород является одним из определяющих эндогенных факторов, значительно модифицирующим выход одонитевых разрывов в ДНК [49, 50].

Метод ДНК-комет может быть полезен для оценки эффективности терапевтических воздействий, направленных на повышение уровня снабжения опухолевых клеток кислородом, или на избирательное поражение гипоксических клеток [50]. В частности, зафиксирован отчетливый генотоксический эффект тирапазамина и RSU-1069, избирательно повреждающих гипоксические клетки, при этом было установлено, что цитотоксическое действие тирапазамина опосредуется индукцией большого количества одонитевых разрывов ДНК, в то время как RSU-1069 вызывает в гипоксических клетках накопление сшивок ДНК-ДНК [50].

Применение метода ДНК-комет в изучении механизмов биологического действия ультрафиолетового, ультразвукового излучения и высокочастотного электромагнитного поля. Было показано, что ультразвуковое воздействие приводит к формированию разрывов ДНК, которые частично репарируются [51–53]. Методом ДНК-комет, проводимого в щелочных условиях, было показано, что электромагнитные колебания (2,4 ГГц) индуцируют образование одонитевых разрывов ДНК в клетках головного мозга крыс [54, 55].

К настоящему времени выполнено много экспериментальных работ по изучению методом комет повреждений ДНК, индуцируемых ультрафиолетовым излучением [56]. Метод ДНК-комет позволяет зарегистрировать одонитевые разрывы ДНК, формируемые на эксцизионном этапе репарации ДНК после УФ-облучения клеток, что может найти применение в идентификации клеточных линий, дефектных по репарации ДНК. В частности, клетки больных пигментной ксеродермой дефектны по генам эксцизионной репарации ДНК, поэтому показатель «момент хвоста кометы» после УФ-облучения клеток больных меньше, чем у нормальных индивидуумов.

Следует отметить, что различные классы химических веществ могут стимулировать фототоксический эффект, поглощая световую энергию в

пределах диапазона длины волн солнечного света. Исследование фотобезопасности — обязательный этап при создании новых препаратов. Десять УФ-поглощающих соединений (кетопрофен, промазин, хлорпромазин, дакарбазин, акридин, ломефлоксацин, 8-метоксипсорален, хлоргексидин, двуокись титана, октилметоксициннамат) были проверены на потенциальную фотогенотоксичность в щелочном варианте метода ДНК-комет [56, 57]. Клетки лимфомы мыши культивировали с исследуемыми веществами в течении 20 мин и воздействовали светом, имитирующим солнечный, в диапазоне от 280 до 800 нм. Доза УФ-излучения составляла для УФ-А 600 мДж/см² и для УФ-Б 30 мДж/см². При сочетанном действии УФ и веществ, фотогенотоксичность которых известна (8-метоксипсорален, акридин, хлорпромазин, дакарбазин, кетопрофен, ломефлоксацин), образовывались разрывы ДНК, выявляемые методом ДНК-комет. Кроме того, были проанализированы четыре химических вещества, абсорбирующих УФ, которые, как известно, не являются фотогенотоксичными (промазин, хлоргексидин, двуокись титана, октилметоксициннамат). Ни для одного из них не выявлено увеличения уровня повреждений ДНК. Приведенные данные свидетельствуют о том, что метод ДНК-комет является надежной моделью для оценки фотохимической генотоксичности *in vitro* [58, 59].

Использование эндонуклеаз, формирующих одонитевые разрывы ДНК возле пиримидиновых димеров, позволяет значительно повысить чувствительность метода ДНК-комет для детекции повреждений ДНК, индуцированных УФ-облучением. В частности, зарегистрировано более чем двукратное возрастание выхода повреждений ДНК после 12-часовой экспозиции одноклеточных *Rhodospira* sp. к УФ-излучению А и Б [56, 60].

Метод ДНК-комет может использоваться для пренатальной диагностики пигментной ксеродермы и трихогиодистрофии [10]. Этот метод может быть полезен при детекции генетических нарушений репарации ДНК после облучения в лимфоцитах больных системным эритематозом и ревматоидным артритом.

Применение метода ДНК-комет в изучении генотоксического действия химических веществ.

Ежегодно в мире синтезируется или выделяется около 6 тыс. новых соединений [26, 56]. Среди 12 миллиардов известных веществ, 2,5 млн являются канцерогенными [61–63]. Вещества, которые могут вызывать повреждения ДНК, принадлежат к разным классам неорганических и органических соединений. Наиболее активны и распространены в окружающей среде: полициклические ароматические углеводы, гетероциклические ароматические углеводы, ароматические амины и амиды, аминокислоты, азосоединения, N-нитросоединения, металлы и их соединения (соединения никеля, хрома, бериллия, железа) [61, 64–67].

Возможности метода ДНК-комет, его преимущества и недостатки наиболее наглядно продемонстрированы в работе по исследованию генотоксичности 208 химических соединений, выбранных из различных групп канцерогенных веществ по классификации Международного агентства по исследованию рака (МАИР) и Национальной токсикологической программы США [61, 68]. Тестирование проводилось на мышах (в 8 органах) и продемонстрировало преимущества этого метода, в первую очередь связанные с возможностью определять повреждения ДНК в любом органе, независимо от степени митотической активности в нем. Результаты тестирования показали, что метод обладает наибольшей эффективностью при определении фрагментации молекул ДНК как вследствие одонитевых разрывов индуцированных химическими веществами, так и образующихся из щелочлабильных сайтов возникающих при алкилировании оснований и образовании аддуктов ДНК. Сравнение метода ДНК-комет с тестом Эймса, который является общепризнанным методом для скрининга генотоксичных веществ, выявило высокую степень корреляции результатов полученных при тестировании канцерогенных и неканцерогенных соединений. При исследовании канцерогенных веществ, которые в тесте Эймса дали отрицательный результат, половина из них оказалась генотоксичными при тестировании методом ДНК-комет. Последнее указывает на ограничения обоих методов, лишней раз свидетельствуя о том, что методы которые рассчитаны на выявление повреждений ДНК, мало подходят для идентификации негенотоксичных канцерогенов. Очевидно, что не существует одного метода способного выявлять все генотоксические воздействия. Поэтому общепринятым является использование набора тестов *in vivo* и *in vitro*. Сравнение метода ДНК-комет с другим традиционным тестом — образованием микроядер показало, что 49 из 54 тестируемых канцерогенов не индуцировали образование микроядер, но давали позитивный ответ в методе ДНК-комет. Таким образом, метод ДНК-комет может быть использован для оценки *in vivo* генотоксичности химических соединений [4, 26, 55, 63, 68].

Важным аспектом в исследованиях генотоксичности и канцерогенности химических соединений является их причастность к формированию радикальных форм кислорода и азота, которые могут инициировать канцерогенез благодаря своей способности реагировать с ДНК, вызывая мутации [69–71]. Так, в ряде экспериментов показано, что оксид азота (NO) и его производные могут содействовать процессу канцерогенеза. Генотоксичность NO определяется как его концентрацией, так и механизмами попадания в организм. NO и его реактивный радикал пероксинитрит (ONOO-) индуцируют одонитевые разрывы ДНК, вызывают как процессы репарации ДНК, так и гибели, путем некроза или апоптоза. Кроме того, ускорение апопто-

за в клетках является прямым ответом на проникновение NO. Это обстоятельство надо принимать во внимание при разработке химиотерапевтических препаратов, в составе которых содержатся NO и его радикалы [1, 72–74]. Метод ДНК-комет позволяет определять мутагенное действие экзогенного NO. Количество повреждений ДНК росло пропорционально увеличению концентрации NO, как в нормальных клетках, так и в клетках аденокарциномы легкого [75]. Такие исследования подтверждают, что метод ДНК-комет является надежным методом для оценки генотоксичности химиопрепаратов *in vitro* [4, 27, 75, 76].

Заключение. Основное преимущество метода ДНК-комет перед другими методами регистрации повреждений ДНК заключается в возможности детекции повреждений на уровне одиночных клеток эукариот практически любого происхождения. Результаты многих исследователей позволяют сделать заключение, о том, что метод ДНК-комет в зависимости от тестируемого генотоксичного агента [24, 26, 55, 56] по крайней мере сопоставим по чувствительности с традиционными цитогенетическими тестами и в некоторых случаях превосходит их [1, 23, 41, 68, 75–78]. Поскольку для анализа образца методом ДНК-комет необходимо наличие всего нескольких тысяч клеток, то в случаях, когда количество клеток является лимитирующим фактором (биоптаты и т. п.), рассмотренный метод может быть оптимальным для детекции повреждений ДНК. Привлекает быстрота проведения экспериментов и относительная простота лабораторного протокола. Однако, к сожалению, метод имеет ряд недостатков. В некоторых случаях возникает определенная неясность относительно биологического значения повреждений ДНК, выявляемых методом ДНК-комет. Известно, что значительная часть таких повреждений может быть элиминирована системами репарации ДНК и не зафиксирована в геноме. Несмотря на эти обстоятельства, метод ДНК-комет дает адекватную информацию об общем уровне повреждений ДНК клеток, а при исследовании через определенные временные интервалы и об эффективности процессов репарации.

Метод может успешно применяться при исследовании динамики действия генотоксических агентов окружающей среды, когда низкие дозы сочетаются с большой длительностью воздействия фактора. Кроме этого, он может быть использован для определения групп повышенного риска на производстве, а также при контроле результатов лечения и индивидуального подбора ДНК-тропных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств. Ведомости Фармакологического комитета 1998; 1: 21–4.

2. **Ostling O, Johanson KJ.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **123**: 291–8.
3. **Olive PL, Banáth JP.** The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006; **1** (1): 23–9.
4. **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B.** Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35**: 206–21.
5. **Жанатаев АК, Дурнев АД, Оганесянц ЛА.** Метод гелелектрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет») в пищевой генотоксикологии. *Хранение и переработка сельхозсырья* 2007; **1**: 15–20.
6. **Collins AR.** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; **26** (3): 249–61.
7. **Omidkhoda A, Mozdarani H, Movasaghpour A, Fatholah AA.** Study of apoptosis in labeled mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide using neutral comet assay. *Toxicol In Vitro*. 2007; **21** (6): 1191–6.
8. **Thiebault C, Carrière M, Milgram S, Simon A, et al.** Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells *Toxicol Sci* 2007; **98** (2): 479–87.
9. **Singh NP.** A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. *Experimental Cell Research* 2000; **256**: 328–37.
10. **Alapetite C.** The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J Invest Dermat* 1997; **108**: 154–9.
11. **Tronov VA, Kramarenko II, Kozlova AD, et al.** Sensitivity of human lymphocytes to genotoxic effect of n-methyl-n-nitrosourea: possible relation to gynecological cancers. *Exp Oncol* 2006; **28** (4): 314–8.
12. **Anuszevska E, Chłopkiewicz B, Gruber B, et al.** Estimation of DNA damage and cytotoxicity of anthracycline analogs in human melanoma cells on early and late passages. *Acta Pol Pharm* 2006; **63** (4): 321–4.
13. **Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M.** Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med* 2006; **6** (4): 177–90.
14. **Kleiman NJ, Spector A.** DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Res* 1993; **12**: 423–31.
15. **Hwang ES, Bowen PE.** DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007; **47** (1): 27–50.
16. **Sauvaigo S, Bonnet-Duquennoy M, Odin F, et al.** DNA repair capacities of cutaneous fibroblasts: effect of sun exposure, age and smoking on response to an acute oxidative stress. *Br J Dermatol* 2007; **157** (1): 26–32.
17. **Hartman A, Plappert U, Raddatz K, et al.** Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 1994; **9**: 269–72.
18. **Singh NP, Danner DB, Tice RR, et al.** Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991; **256**: 1–6.
19. **Vukovic V, Pheng SR, Stewart A, et al.** Protection from radiation-induced DNA single strand breaks by induction of nuclear metallothionein. *Int J Radiat Biol* 2000; **76**: 757–62.
20. **Wardman P, Rothkamm K, Folkes LK, et al.** Radiosensitization by nitric oxide at low radiation doses. *Radiat Res* 2007; **167** (4): 475–84.
21. **Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS, Kamada N.** Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. *J Radiat Res* 2001; **42**: 91–101.
22. **Wada S, Van Khoa T, Kobayashi Y, et al.** Prediction of cellular radiosensitivity from DNA damage induced by gamma-rays and carbon ion irradiation in canine tumor cells. *J Vet Med Sci* 2005; **67** (11): 1089–95.

23. **Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H.** Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutat Res* 2007; **628** (1): 19–30.
24. **Møller P.** Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; **96** (1): 1–2.
25. **Hartl MG, Kilemade M, Sheehan D, et al.** Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Mar Environ Res* 2007; **64** (2): 191–208.
26. **Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, et al.** Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004; **14** (6): 473–86.
27. **Green MH, Lowe JE, Delaney CA, Green IC.** Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol* 1996; **269**: 243–66.
28. **Desai SR, Verlecar XN, Nagarajappa A, Goswami U.** Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. *Ecotoxicology* 2006; **15** (4): 359–63.
29. **Palus J, Dziubałowska E, Stańczyk M, et al.** Biomonitoring of cyanobacterial blooms in polish water reservoir and the cytotoxicity and genotoxicity of selected cyanobacterial extracts. *Int J Occup Med Environ Health* 2007; **20** (1): 48–65.
30. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; **175**: 184–91.
31. **Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U.** The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutat Res* 2007; **632** (1–2): 44–57.
32. **Chaubey RC.** Computerized image analysis software for the comet assay. *Methods Mol Biol* 2005; **291**: 97–106.
33. **Francesconi A, Del Terra E, Meli A, Ambesi-Impiomato FS.** Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells. *Phys Med* 2001; **17** (1): 232–4.
34. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность. Методические указания. Вильнюс, 1989. 35 с
35. **Olive PL, Banath JP.** Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: «tail moment» as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res (DNA Repair)* 1993; **294**: 275–83.
36. **Iliakis G.** Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of 125I decay. *Int J Radiat Biol* 1991; **59**: 343–57.
37. **Olive PL.** DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1999; **75**: 395–405.
38. **Xie H, Wise SS, Holmes AL, et al.** Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutat Res* 2005; **586** (2): 160–72.
39. **Frenzilli G, Bosco E, Antonelli A, et al.** DNA damage evaluated by alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) in children of Chernobyl, 20 years after the disaster. *Mutat Res* 2006; **491**: 139–49.
40. **Koppen G, Varschaeve V.** The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat Res* 1996; **360**: 193–200.
41. **Gichner T, Ptáček O, Stavreva DA, et al.** A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat Res* 2000; **470**: 1–9.
42. **Cerda H, Delincée H, Haine H, Rupp H.** The DNA «comet assay» as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat Res* 1997; **375**: 167–81.
43. **Li BY, Tong J.** Adverse effects attributed to long-term radon inhalation in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2007; **70** (11): 925–30.
44. **Тронов ВА.** Апоптоз нестимулированных лимфоцитов человека и разрывы ДНК, индуцированные ингибитором топоизомеразы II этопозидом. *Биохимия* 1999; **64** (3): 412–20.
45. **Hohannisyann GG, Haroutunyan TS, Arutyunyan RM.** Evaluation of cisplatin-DNA crosslinks formation with UV-C application by the alkaline comet-assay. *Exp Oncol* 2004; **26** (3): 240–2.
46. **Almeida GM, Duarte TL, Steward WP, Jones GD.** Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. *DNA Repair (Amst)* 2006; **5** (2): 219–25.
47. **Liu Y, Li CM, Lu Z, et al.** Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks. *Front Biosci* 2006; **11**: 991–7.
48. **Zhang H, Koch CJ, Wallen CA, Wheeler KT.** Radiation-induced DNA damage in tumours and normal tissues. Oxygen dependence of the formation of strand breaks and DNA-protein crosslinks. *Radiat Res* 1995; **142**: 163–8.
49. **Wang J, Klem J, Wyrick JB, et al.** Detection of hypoxia in human brain tumor xenografts using a modified comet assay. *Neoplasia* 2003; **5** (4): 288–96.
50. **Sauer G, Weber KJ, Peschke P, Eble MJ.** Measurement of hypoxia using the comet assay correlates with preirradiation microelectrode pO₂ histography in R3327-AT rodent tumors. *Radiat Res* 2000; **154** (4): 439–46.
51. **Weston A, Plummer SM, Grafstrom RC, et al.** Genotoxicity of chemical and physical agents in cultured human tissues and cells. *Food Chem Toxicol* 1986; **24** (6–7): 675–9.
52. **Miller D.** Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasound cavitation in vivo. *Ultrasound Med Biol* 1995; **21**: 841–8.
53. **Vykhodtseva N, McDannold N, Hynynen K.** Induction of apoptosis in vivo in the rabbit brain with focused ultrasound and Optison. *Ultrasound Med Biol* 2006; **32** (12): 1923–9.
54. **Lai H, Singh NP.** Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 1995; **16**: 207–10.
55. **Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, et al.** Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004; **19** (1): 51–9.
56. **Gocke E, Müller L, Guzzie PJ, et al.** Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the International Workshop on Genotoxicity. *Env Mol Mutagenesis* 2000; **35** (3): 173–84.
57. **Rapp A, Greulich KO.** After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci* 2004; **117** (21): 4935–45.
58. **Wischermann K, Boukamp P, Schmezer P.** Improved alkaline comet assay protocol for adherent HaCaT keratinocytes to study UVA-induced DNA damage. *Mutat Res* 2007; **630** (1–2): 122–8.
59. **Chazal M, Roux E, Alapetite C, et al.** Interexperimental and interindividual variations of DNA repair capacities after UV-B and UV-C irradiations of human keratinocytes and fibroblasts. *Photochem Photobiol* 2004; **79** (3): 286–90.
60. **Sastre M, Vernet M, Steinert S.** Single-cell gel/comet assay applied to the analysis of UV radiation-induced DNA damage in *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta). *Photochem Photobiol* 2001; **74**: 55–60.
61. The National Toxicology Program, Report on Carcinogens. 2007; Eleventh edition.
62. **Sanner T, Dybing E, Kroese D, et al.** Potency grading in carcinogen classification. *Mol carcinog* 1997; **20**: 280–7.
63. **Yamasaki H, Ashby J, Bignami M, et al.** Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat Res* 1996; **353**: 47–56.
64. **Kulkarni M, Chaudhari A.** Microbial remediation of nitroaromatic compounds. *J Environ Manage* 2007; **85** (2): 496–512.

65. Nordling MM, Nygren J, Bergman J, *et al.* Toxicological characterization of a novel in vivo benzo[a]pyrene metabolite, 7-oxo-benz[*d*]anthracene-3,4-dicarboxylic acid anhydride. *Chem Res Toxicol* 2002; **15** (10): 1274–80.

66. Chico Galdo V, Massart C, Jin L, *et al.* Acrylamide, an in vivo thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **257–258**: 6–14.

67. Wu K, Jiang L, Cao J, *et al.* Genotoxic effect and nitrate DNA damage in HepG2 cells exposed to aristolochic acid. *Mutat Res* 2007; **630** (1–2): 97–102.

68. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, *et al.* The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol* 2000; **30** (6): 629–799.

69. Gröger M, Speit G, Radermacher P, Muth CM. Interaction of hyperbaric oxygen, nitric oxide, and heme oxygenase on DNA strand breaks in vivo. *Mutat Res* 2005; **572** (1–2): 167–72.

70. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol Sci* 2001; **59** (1): 5–16.

71. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998; **17** (1): 25–37.

72. Sardas S, Izdes S, Ozcagli E, *et al.* The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; **80** (2): 154–9.

73. Li CQ, Pang B, Kiziltepe T, *et al.* Threshold effects of nitric oxide-induced toxicity and cellular responses in wild-type and p53-null human lymphoblastoid cells. *Chem Res Toxicol* 2006; **19** (3): 399–406.

74. Wu X, Takenaka K, Sonoda E, *et al.* Critical roles for polymerase zeta in cellular tolerance to nitric oxide-induced DNA damage. *Cancer Res* 2006; **66** (2): 748–54.

75. Frenzilli G, Scarcelli V, Fornai F, *et al.* The comet assay as a method of assessment of neurotoxicity: usefulness for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1074**: 478–81.

76. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000; **463**: 13–31.

77. de Oliveira E, Suzuki MF, do Nascimento PA, *et al.* Evaluation of the effect of 90Sr beta-radiation on human blood

cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat Res* 2001; **476**: 109–21.

78. Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE. Human sperm DNA integrity assessed by the comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 1999; **14**: 71–75.

APPLICATION OF THE COMET ASSAY FOR THE DNA DAMAGE ASSESSMENT CAUSED BY DIFFERENT ENVIRONMENTAL AGENTS

J.B. Sorochinska, V.M. Mikhailenko

Summary. *The extended exposure to adverse environmental factors is accompanied by DNA damage increase and alters the repair system activity that can lead to initiation of mutations and malignant transformation in cells. During the last years, many analytical techniques have been developed to estimate DNA damage and investigate processes of DNA repair. However, not all of them possess sufficient sensitivity and specificity for monitoring variety of DNA damages caused by environmental factors. The aim of this review consists in efficiency evaluation of a Single Cells Gel Electrophoresis assay («Comet Assay») for DNA damages detection after exposure to different environmental agents. The assay 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.*

Key Words: DNA damage, DNA repair, Comet Assay, carcinogenic environmental factors.

Адрес для переписки:

Сорочинская У.Б.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: j.sorochinska@hotmail.com