

НОВАЯ ВЕРСИЯ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ

DOI: 10.17691/stm2016.8.1.03

УДК 577.213/.217:575

Поступила 13.07.2015 г.



И.А. Чернигина, зав. лабораторией молекулярной биологии кафедры биологии;

Т.Г. Щербатюк, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — оценить возможность использования озона для создания индуцированных повреждений ДНК в индивидуальных клетках при их анализе с помощью метода ДНК-комет.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на образцах цельной крови белых нелинейных интактных крыс-самцов ($n=16$) массой 250 ± 25 г. Проведены две серии экспериментов по индукции повреждений ДНК в лейкоцитах на слайдах. В первой серии образцы подвергали воздействию гамма-излучения, во второй — слайды обрабатывали озонированным фосфатно-солевым буфером. Далее проводили лизис клеток, денатурацию ДНК, электрофорез, промывку, окрашивание ДНК SYBR GREEN I, флуоресцентную микроскопию и обработку изображений.

Результаты. Разработана новая версия метода ДНК-комет. Установлено, что концентрация озона в озono-кислородной смеси 900 мкг/л и время воздействия 10 мин на клетки в слайдах оптимальны для детекции повреждений ДНК и их анализа, при этом применение озона позволяет минимизировать недостатки и ограничения использования с этой целью источника гамма-излучения.

Ключевые слова: тест-комета; повреждения ДНК лейкоцитов; озон; гамма-излучение.

Как цитировать: Shcherbatyuk T.G., Chernigina I.A. A new version of comet assay. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 20–27, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.03>.

English

A New Version of Comet Assay

I.A. Chernigina, Head of Molecular Biology Laboratory, Department of Biology;

T.G. Shcherbatyuk, DSc, Professor, Head of Biology Department

Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

The aim of the investigation was to assess the availability of ozone to induce DNA damage in individual cells when analyzing them using the Comet assay.

Materials and Methods. Experimental studies were performed on whole blood leukocytes of white non-linear intact male rats ($n=16$) weighing 250 ± 25 g. Two series of experiments were made to induce DNA damage in leukocytes. During the first series the samples were exposed to gamma-radiation, and during the second series the slides were treated with ozonized phosphate buffer saline. Further the cells were exposed to cytolysis followed by DNA denaturation, electrophoresis, neutralization, DNA being stained with a SYBR GREEN I. Comet visualization (fluorescent microscopy) and scoring were performed.

Results. The new version of the Comet assay was developed. Ozone concentration, 900 $\mu\text{g/L}$, in ozone-oxygen mixture, and the exposure time for 10 min on the cells on a microscope slides were found to be optimal for detection of DNA damage and its analysis. In addition, ozone application enables to minimize the drawbacks and limitations of gamma-radiation source.

Key words: Comet assay; DNA leukocyte damage; ozone; gamma-radiation.

Метод ДНК-комет, позволяющий определять уровень повреждений и репарации ДНК в отдельных неделящихся ядросодержащих клетках, впервые был разработан шведскими исследователями Остлингом и Йохансоном в 1984 г. [1, 2]. В базе данных PubMed тысячи работ посвящены применению метода в фундаментальных исследованиях и лишь десятки — в клинической медицине [1, 3–26] (рис. 1).

В ряде сообщений приводятся сведения о том, что при таких заболеваниях, как ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2-го типа, ожирение и злокачественные новообразования, наблюдается повышенный уровень повреждений в ДНК лейкоцитов периферической крови [22–26].

Опубликованы данные по определению базального уровня повреждений ДНК в лимфоцитах перифери-

Для контактов: Щербатюк Татьяна Григорьевна, e-mail: ozone_stg@mail.ru

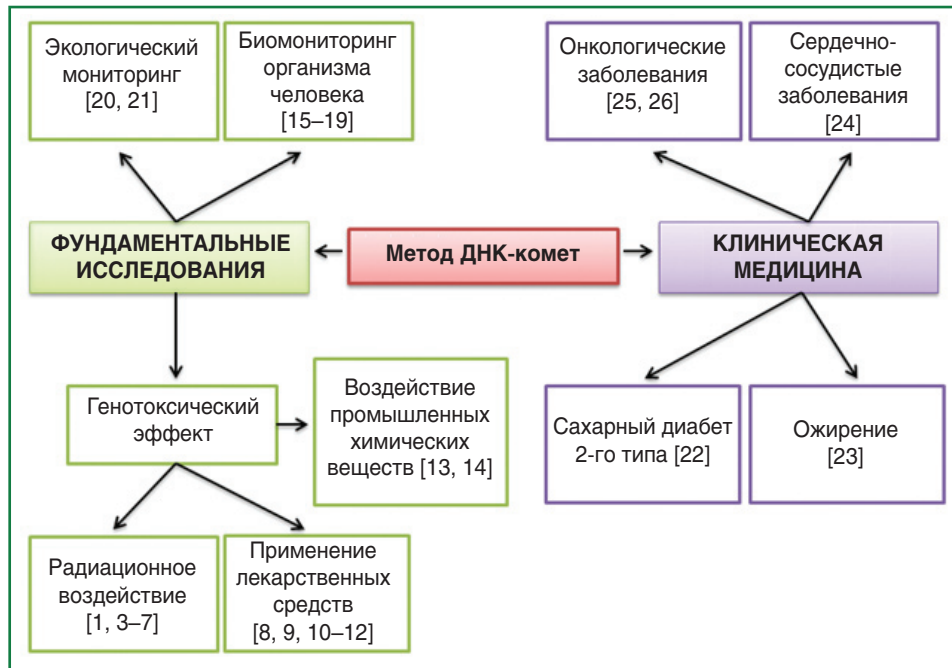


Рис. 1. Основные направления применения метода ДНК-комет в биомедицинских исследованиях

ческой крови при раке молочной железы и орофарингеальной зоны и при различных солидных опухолях на фоне лучевой, химиотерапии и химиолучевой терапии, после хирургического удаления опухоли мастэктомией и квадрантэктомией [27–30]. В исследованиях показан высокий уровень повреждений ДНК, который авторы считают серьезным фактором риска рецидива злокачественных новообразований.

В литературном обзоре, посвященном критериям использования нового метода в клинике для диагностики рака, S.E. Taube с соавт. [31] утверждает, что каждый новый диагностический способ должен пройти три основных теста, прежде чем он будет принят для рутинного клинического использования. Во-первых, он должен быть хорошо отлаженным и воспроизводимым, во-вторых, клиническое назначение способа должно быть доказано (т.е. с его помощью должен заключаться правильный диагноз, приводящий к улучшению состояния здоровья пациента), в-третьих, медицинское сообщество должно быть убеждено в необходимости использования этого способа и в преимуществах, которыми он обладает.

По мнению европейских исследователей [32, 33], метод ДНК-комет в силу своего удобства пригоден именно для использования в клинической практике — для анализа повреждений и репарации ДНК достаточно 50–100 отдельных ядродержащих клеток. К тому же, что немаловажно, данный метод фактически является экспресс-диагностикой: результаты анализа могут быть получены в течение нескольких часов. Однако несмотря на эти преимущества, метод ДНК-комет в настоящее время все еще не используют в качестве стандартного аналитического способа в клинических лабораториях.

И одной из причин этого является наличие некоторых методических трудностей, которые препятствуют хорошей воспроизводимости и отлаженности данного метода [32, 33].

В настоящее время исследователи создают индуцированные повреждения ДНК в индивидуальных клетках на слайдах рентгеновским и гамма-излучением [1, 4, 34–37]. Для обеспечения такого подхода необходимо соблюдение ряда технических требований, существенно ограничивающих широкое применение метода ДНК-комет в практической медицине [38].

В специальном выпуске Оксфордского журнала *Mutagenesis* профессор Норвежского университета фундаментальной медицины Andrew R. Collins призывает ученых публиковать больше материалов, посвященных развитию и модернизации метода и использованию его в относительно новых или неизученных областях исследований [39].

Все сказанное обуславливает актуальность поиска новой модификации способа создания индуцированных повреждений ДНК в индивидуальных клетках при использовании метода ДНК-комет.

Цель исследования — оценить возможность использования озона для создания индуцированных повреждений ДНК в индивидуальных клетках при их анализе с помощью метода ДНК-комет.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на лейкоцитах цельной крови 16 белых нелинейных интактных крыс-самцов массой 250 ± 25 г. Взятие крови (20 мкл) производили из подъязычной вены и смешивали с 500 мкл 0,5% легкоплавкой агарозы.

Работа проведена в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской кон-

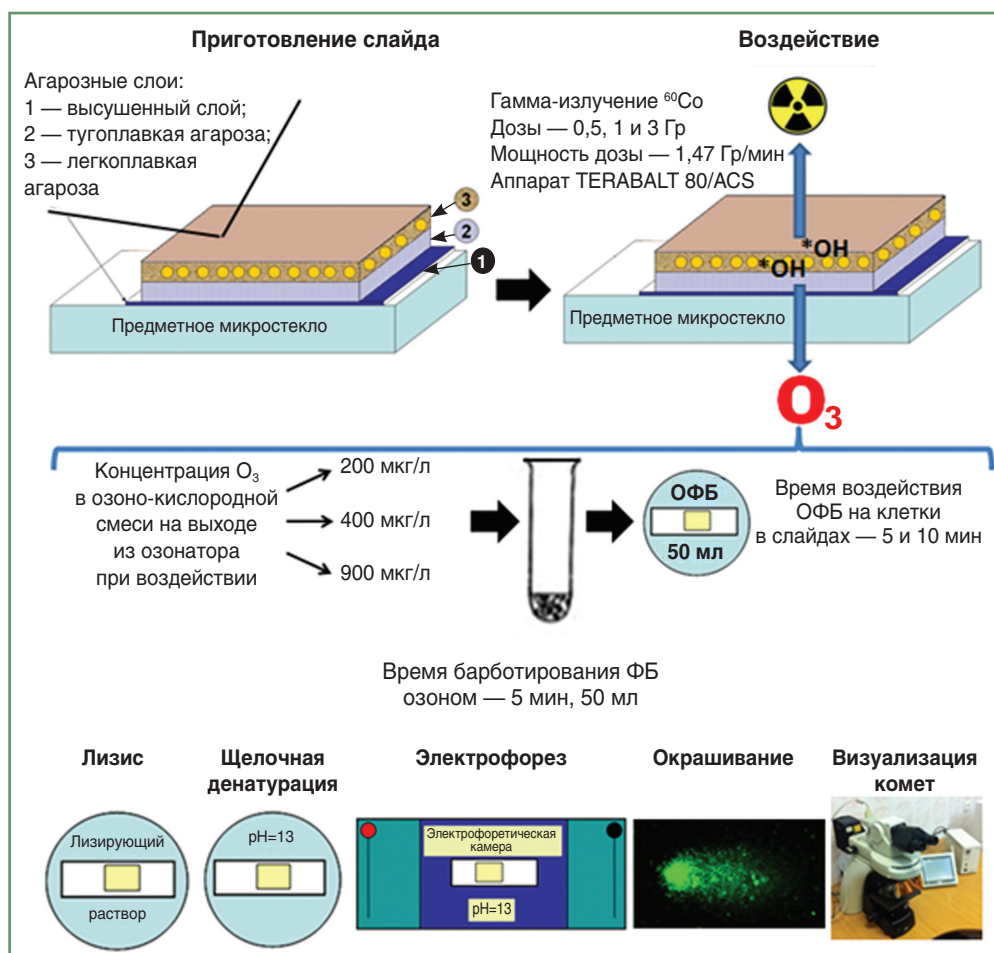


Рис. 2. Схема индукции повреждений ДНК в лейкоцитах на слайдах на одном из этапов метода ДНК-комет. ФБ — фосфатно-солевой буфер; ОФБ — озонированный ФБ

венцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.) и одобрена Этическим комитетом НижГМА.

Конечная концентрация лейкоцитов в растворе составляла 500 000 кл./мл. Такое разбавление клеток является оптимальным для того, чтобы наблюдаемые кометы равномерно располагались в поле зрения на предметном стекле. Далее готовили слайды с индивидуальными клетками в агарозном геле. Для этого на предметное стекло наносили слой 1% тугоплавкой агарозы и сушили его при комнатной температуре для лучшей адгезии следующих наносимых слоев [9, 40]. Суспензию клеток, смешанных с 500 мкл 0,5% легкоплавкой агарозы, наносили на застывший слой 1% тугоплавкой агарозы по 2 капли на стекло и накрывали покровными стеклами размером 24x24 мм. Таким образом, на каждом стекле было по 2 слайда с иммобилизованными клетками в агарозном слое. Далее после застывания слайдов в течение 4–5 мин при комнатной температуре покровные стекла снимали для дальнейших манипуляций с клетками в агарозном слое.

Для индукции повреждений ДНК в лейкоцитах на слайдах проводили две серии экспериментов по оригинальной схеме, представленной на рис. 2.

Основные процедуры обработки слайдов: лизис клеток в составе агарозного геля (1 ч), денатурацию ДНК, электрофорез при $\text{pH} > 13$, промывку, окрашивание ДНК SYBR GREEN I — проводили, как указано в работе [4]. После окрашивания изображения комет фотографировали, главным образом в центральной части слайдов, где кометы располагались в одной плоскости.

Фотографирование проводили цифровой камерой серии DS, модель DS-Fi2 (Nikon Corporation, Япония), соединенной с прямым микроскопом Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Corporation, Япония). Полученные изображения обрабатывали с помощью специализированного программного обеспечения Comet.exe, разработанного для регистрации и анализа отображений В.Н. Степановым [41]. Всего в эксперименте было приготовлено 68 слайдов на 34 стеклах. Анализировали по 100 комет на стекло и из полученных данных рассчитывали среднее значение для каждой экспериментальной точки. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали

параметр %TDNA — процент ДНК в хвосте кометы [1]. Контролем служили клетки без каких-либо воздействий. Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010 и AtteStat.

Результаты и обсуждение. Известно, что воздействие ионизирующего излучения на клетки подразделяют на прямое и косвенное. В первом случае радиация напрямую взаимодействует с компонентами клетки, в частности с ДНК, повреждение которой нарушает нормальное функционирование клетки или вызывает ее гибель. В случае косвенного воздействия излучение взаимодействует с молекулами воды, которые составляют около 80% вещества клетки, что приводит к ее радиационному разложению — радиолитическому разложению — радиолитическому разложению — радиолитическому разложению. В результате этого процесса образуются свободные радикалы, в частности высокореакционный гидроксильный радикал OH^{\bullet} , который обладает сильным цитотоксическим действием [42, 43].

Озон, реагируя с двойными связями азотистых оснований нуклеиновых кислот, образует озониды, что в конечном итоге приводит к образованию однонитевых или двойных разрывов в спиральных [44, 45]. В водных же растворах происходит спонтанное разложение озона и его реакция с ионом гидроксидила OH^{\bullet} , который образуется в воде за счет диссоциации части ее молекул. Ион гидроксидила легко и быстро реагирует с озоном по достаточно сложному многостадийному механизму с образованием свободных радикалов OH^{\bullet} и OH_2^{\bullet} [46].

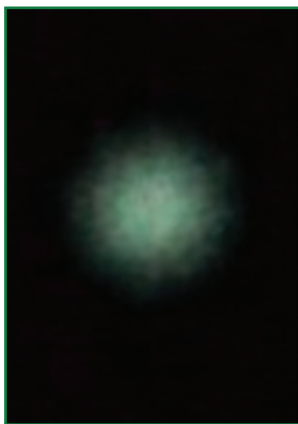


Рис. 3. Микрофотография нуклеоида клетки, не подвергавшейся воздействию (%TDNA=0,9); $\times 200$

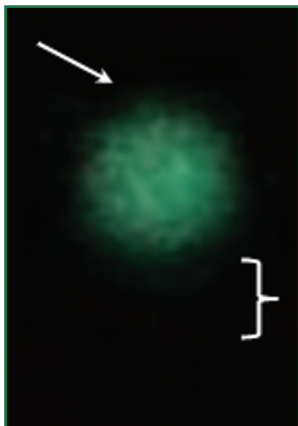


Рис. 4. Микрофотография нуклеоида клетки после воздействия озоном при концентрации 900 мкг/л в течение 5 мин (%TDNA=4,6); $\times 200$. Стрелкой указана голова комет, фигурной скобкой — длина хвоста

Рис. 5. Микрофотография нуклеоида клетки после воздействия озоном при концентрации 900 мкг/л в течение 10 мин (%TDNA=12,6); $\times 200$. Стрелкой указана голова комет, фигурной скобкой — длина хвоста

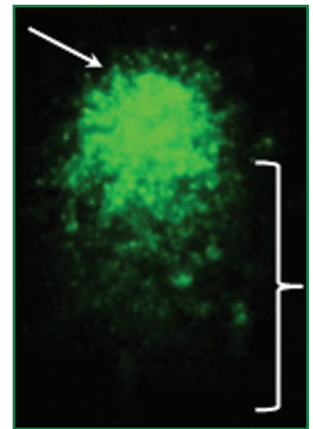
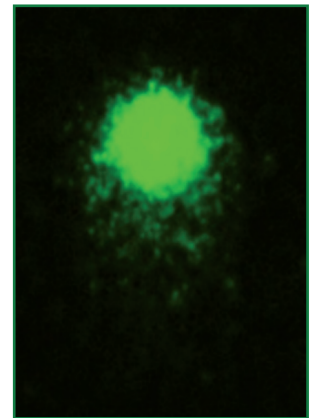


Рис. 6. Микрофотография нуклеоида клетки после одноразового воздействия гамма-излучением в дозе 3 Гр (%TDNA=12,4); $\times 200$



Радикалы OH^{\bullet} в свою очередь взаимодействуют с дезоксирибозой, входящей в состав нуклеиновых кислот, и это взаимодействие лежит в основе мутагенного действия гидроксильных радикалов. Кроме этого, гидроксил-радикалы взаимодействуют с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот, что может привести к нарушению комплементарности оснований в цепи ДНК и в конечном итоге вызвать мутацию или гибель клетки [44].

Таким образом, механизм действия ионизирующего излучения и озона на ДНК клетки одинаков: в обоих случаях возникает окислительный стресс, при котором происходит чрезмерная выработка гидроксильного радикала OH^{\bullet} .

При воздействии, вызывающем повреждение ДНК, выявляются особенности в морфологии ДНК-комет.

Нуклеоиды клеток, не подвергавшихся воздействию, имеют вид сферы со светящимся «галом» вокруг коровой части. «Гало» представляет собой петли ДНК, прикрепленные к белкам ядерного матрикса [47] (рис. 3). Кометы, полученные после воздействия на клетки в слайдах озоном в озono-кислородной смеси при концентрации 900 мкг/л в течение 5 мин, имели небольшой короткий хвост, состоящий из различных фрагментов ДНК (рис. 4). У нуклеоидов клеток после воздействия озоном в той же концентрации — 900 мкг/л, но в течение 10 мин наблюдался уже хорошо выраженный, протяженный хвост (рис. 5). Рис. 3–4 выполнены с использованием функции «Авто», встроенной в микроскоп,

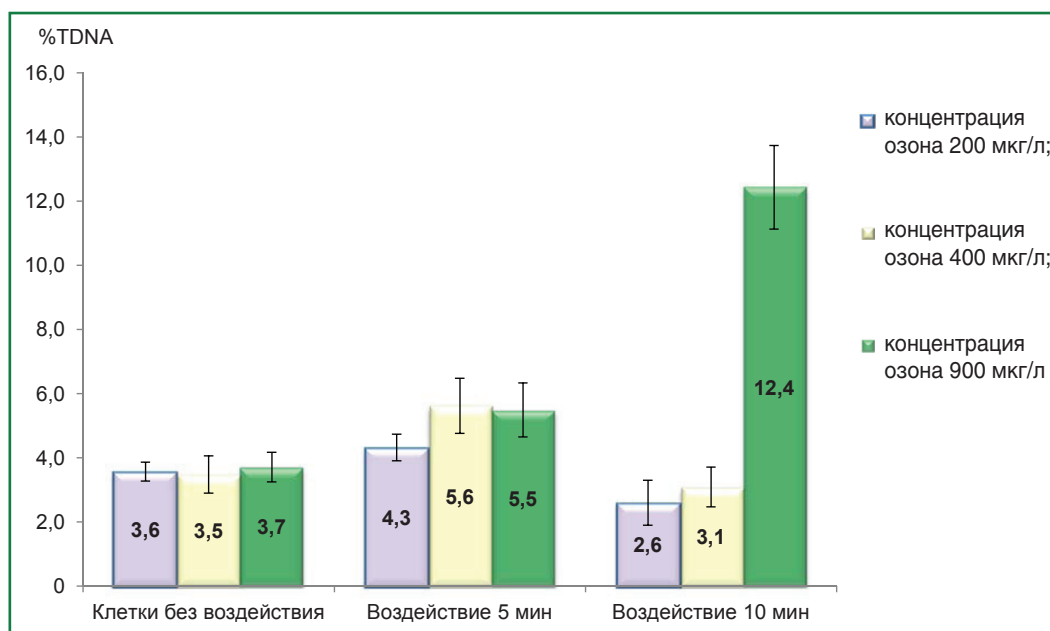


Рис. 7. Средние значения уровня индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах цельной крови крыс в зависимости от времени воздействия разными концентрациями озона в озono-кислородной смеси на клетки в слайдах

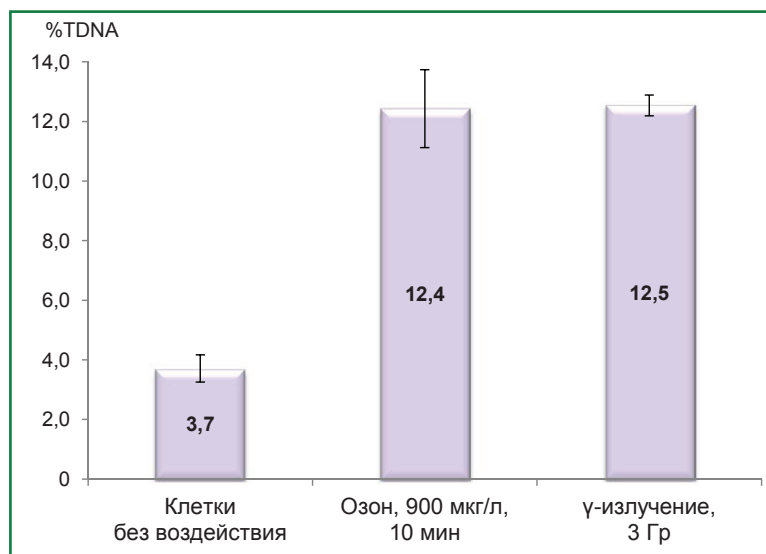


Рис. 8. Средние значения уровня индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах цельной крови крыс после воздействия озонem в концентрации 900 мкг/л в течение 10 мин и гамма-излучением в дозе 3 Гр на клетки в слайдах

которая позволяет регулировать яркость изображения для обеспечения наилучшего цветовоспроизведения объекта.

При сравнении микрофотографий нуклеотидов клеток, полученных после воздействия озонem (см. рис. 5) и гамма-излучением в дозе 3 Гр (рис. 6), оказалось, что ДНК-кометы имели одинаково протяженные и хорошо выраженные хвосты в обоих способах индуцированного повреждения ДНК.

Анализ распределения выборочных данных по критерию Колмогорова–Смирнова показал отсутствие отличий от нормального распределения, поэтому в дальнейшем был использован параметрический критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони при множест-

венных сравнениях. Анализ результатов исследований не выявил статистически значимых различий средних значений уровня индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах цельной крови крыс после воздействия озонem при разных концентрациях в озono-кислородной смеси — 200, 400 и 900 мкг/л — в течение 5 мин (рис. 7). Однако уровень индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови после воздействия на клетки озонem при концентрации 900 мкг/л в течение 10 мин был статистически значимо выше, чем уровень таковых повреждений после воздействия озонem при всех трех концентрациях в течение 5 мин и при концентрациях 200 и 400 мкг/л в течение 10 мин.

Сравнение средних значений уровня индуцирован-

ных повреждений ДНК в лейкоцитах цельной крови крыс после воздействия озоном в озono-кислородной смеси при концентрации 900 мкг/л в течение 10 мин (%TDNA=12,4±1,3) и после воздействия гамма-излучением ^{60}Co в дозе 3 Гр (%TDNA 12,5±0,4) статистически значимых различий не выявило (рис. 8).

Таким образом, замена гамма-излучения на озонирование при анализе повреждений и репарации ДНК помогает устранить методические трудности, ограничивающие широкое применение метода ДНК-комет в практической медицине.

Заключение. Разработанная версия метода ДНК-комет — воздействие на клетки в слайдах озоном при концентрации озона в озono-кислородной смеси 900 мкг/л и времени воздействия 10 мин — является оптимальным решением для применения ее в целях детекции повреждений ДНК и их анализа и позволяет избежать недостатков традиционного использования гамма-излучения.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино Московской области): старшему научному сотруднику Николаю Петровичу Сироте и к.б.н. Елене Ананьевне Кузнецовой за помощь в освоении метода ДНК-комет, ценные указания и теплое отношение. Кроме того, благодарят сотрудника ННГУ им. Н.И. Лобачевского к.б.н. Алексея Анатольевича Радаева за консультационную помощь при проведении статистической обработки полученных результатов исследований.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода «комета тест» в радиобиологических исследованиях. Радиационная биология. Радиоэкология 2010; 50(3): 329–339. Sirota N.P., Kuznetsova E.A. The application of comet assay in radiobiological studies. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* 2010; 50(3): 329–339.

2. Liao W., McNutt M.A., Zhu W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009; 48(1): 46–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2009.02.016>.

3. Пелевина И.И., Антошина М.М., Бондаренко В.А., Воробьева Н.Ю., Воронков Ю.И., Готлиб В.Я., Кудряшова О.В., Осипов А.Н., Рябченко Н.И., Серебряный А.М., Цетлин В.В. Индивидуальные цитогенетические и молекулярно-биологические особенности лимфоцитов крови летчиков и космонавтов. Радиационная биология. Радиоэкология 2007; 47(2): 141–150. Pelevina I.I., Antoshchina M.M., Bondarenko V.A., Vorob'eva N.Yu., Voronkov Yu.I., Gotlib V.Ya., Kudryashova O.V., Osipov A.N., Ryabchenko N.I., Serebryanu A.M., Tsetlin V.V. Individual cytogenetic and biomolecular characteristics of blood leukocytes of pilots and cosmonauts. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* 2007; 47(2): 141–150.

4. Хаймович Т.И., Нагиба В.И., Никанорова Е.А.,

Калиновская О.В., Иванов К.Ю., Паточка Г.Л. Репаративный статус и конформационное состояние хроматина клеток крови профессионалов-атомщиков, работавших с тритием и его окисью. Экологический вестник 2010; 12(2): 84–94. Khaimovitch T.I., Nagiba V.I., Nikanorova E.A., Kalinovskaya O.V., Ivanov K.Yu., Patochka G.L. Reparative status and conformational state of blood cell chromatin among nuclear professionals, handling tritium and tritium oxide. *Ekologicheskiy vestnik* 2010; 12(2): 84–94.

5. Газиев А.И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации. Радиационная биология. Радиоэкология 2011; 51(5): 512–529. Gaziev A.I. Low repair efficiency of critical DNA damage caused by small doses. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* 2011; 51(5): 512–529.

6. Osipov A.N., Smetanina N.M., Pustovalova M.V., Arkhangel'skaya E., Klovov D. The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 34–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.027>.

7. Hornhardt S., Rößler U., Sauter W., Rosenberger A., Illig T., Bickböller H., Wichmann H.E., Gomolka M. Genetic factors in individual radiation sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2014; 16: 54–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.001>.

8. Котова Е.В., Сергиенко Т.Ф., Иванова М.А., Смольникова В.В., Глушен С.В., Меркулова И.П., Свирновский А.И. Влияние цисплатина на репарацию разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека. Медицинский журнал 2006; 2(16): 1–5. Kotova E.V., Sergienko T.F., Ivanova M.A., Smol'nikova V.V., Glushen S.V., Merkulova I.P., Svirnovskiy A.I. The effect of cisplatin on DNA break repair in human peripheral blood lymphocytes. *Meditsinskiy zhurnal* 2006; 2(16): 1–5.

9. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А. и др. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. М: Полиграфсервис; 2006. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., et al. *Primenenie metoda shchelochnogo gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoystv prirodnykh i sinteticheskikh soedineniy* [The application of alkaline gel-electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic characteristics of natural and synthetic compounds]. Moscow: Poligrafservis; 2006.

10. Ordzhonikidze K.G., Znadvorova A.M., Abilev S.K. Organ specificity of the genotoxic effects of cyclophosphane and dioxidine: an alkaline comet assay study. *Russian Journal of Genetics* 2011; 47(6): 754–756, <http://dx.doi.org/10.1134/s1022795411050127>.

11. Recio L., Hobbs C., Caspary W., Witt K.L. Witt doze-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus and comet assay. *Toxicol Sci* 2010; 35(2): 149–162.

12. Braz M.G., Mazoti M.Á., Giacobino J., Braz L.G., Golim Mde A., Ferrasi A.C., de Carvalho L.R., Braz J.R., Salvadori D.M. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis* 2011; 26(3): 415–420, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq109>.

13. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды. Онкология 2008; 10(3): 303–309. Sorochinskaya U.B., Mikhaylenko V.M.

The application of DNA-comet assay to assess DNA damages resulted from various environmental agents. *Onkologiya* 2008; 10(3): 303–309.

14. García-Lestón J., Roma-Torres J., Vilares M., Pinto R., Prista J., Teixeira J.P., Mayan O., Conde J., Pingarilho M., Gaspar J.F., Pásaro E., Méndez J., Laffon B. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environment International* 2012; 43: 29–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.03.001>.

15. Pacini S., Giovannelli L., Gulisano M., Peruzzi B., Polli G., Boddi V., Ruggiero M., Bozzo C., Stomeo F., Fenu G., Pezzatini S., Pitozzi V., Dolara P. Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42(3): 127–135, <http://dx.doi.org/10.1002/em.10188>.

16. Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R.H., Mann M., Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2004; 566(3): 209–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.09.007>.

17. Szeto Y.T., Benzie I.F., Collins A.R., Choi S.W., Cheng C.Y., Yow C.M., Tse M.M. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 2005; 578(1–2): 371–381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.014>.

18. Dusinska M., Collins A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interaction set. *Mutagenesis* 2008; 23(3): 191–205, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen007>.

19. Stcherbatyuk T.G., Davydenko D.V., Novikova V.A. Oxidative stress level and anthropogenic load index as prognostic criteria of disease outcome in patients with oropharyngeal cancer. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(4): 25–32.

20. Скальский С.В., Ступакова Л.В., Роскошная Д.В., Турчанинов Д.В., Полещук Е.И., Охлопков В.А., Говоруха Ю.С. Перспективы метода ДНК-комет в технологиях биомониторинга и оценки влияния окружающей среды на здоровье населения. *Современные проблемы науки и образования* 2015; 3: 1–6. Skalskiy S.V., Stupakova L.V., Roskoshnaya D.V., Turchaninov D.V., Poleschuk E.I., Okhlopov V.A., Govorukha Yu.S. Comet assay prospects in biomonitoring technology and assessment of environmental. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 3: 1–6.

21. Lee R.F., Steinert S. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 2003; 544(1): 43–64, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).

22. Blasiak J., Arabski M., Krupa R., Wozniak K., Zadrozny M., Kasznicki J., Zurawska M., Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2004; 554(1–2): 297–304, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.05.011>.

23. Harangi M., Remenyik E.E., Seres I., Varga Z., Katona E., Paragh G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutat Res* 2002; 513(1–2): 17–25, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00285-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00285-6).

24. Demirbag R., Yilmaz R., Kocyigit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570(2): 197–203, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.003>.

25. Sánchez P., Peñarroja R., Gallegos F., Bravo J.L.,

Rojas E., Benítez-Bribiesca L. DNA damage in peripheral lymphocytes of untreated breast cancer patients. *Arch Med Res* 2004; 35(6): 480–483, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.11.008>.

26. Sigurdson A.J., Hauptmann M., Alexander B.H., Doody M.M., Thomas C.B., Struewing J.P., Jones I.M. DNA damage among thyroid cancer and multiple cancer cases, controls, and long-lived individuals. *Mutat Res* 2005; 586(2): 173–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.07.001>.

27. Gamulin M., Garaj-Vrhovac V., Kopjar N. Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline comet assay. *Coll Antropol* 2007; 31(3): 837–845.

28. Gamulin M., Kopjar N., Grgić M., Ramić S., Bisof V., Garaj-Vrhovac V. Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. *Croat Med J* 2008; 49(4): 515–527, <http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2008.4.515>.

29. Gamulin M., Garaj-Vrhovac V., Kopjar N., Ramić S., Viculin T., Juretić A., Grgić M. DNA and cytogenetic damage in white blood cells of postmenopausal breast cancer patients treated with radiotherapy. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2010; 45(3): 292–304, <http://dx.doi.org/10.1080/10934520903467881>.

30. Sánchez-Suárez P., Ostrosky-Wegman P., Gallegos-Hernández F., Peñarroja-Flores R., Toledo-García J., Bravo J.L., Del Castillo E.R., Benítez-Bribiesca L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res* 2008; 640(1–2): 8–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.11.008>.

31. Taube S.E., Jacobson J.W., Lively T.G. Cancer diagnostics: decision criteria for marker utilization in the clinic. *Am J Pharmacogenomics* 2005; 5(6): 357–364, <http://dx.doi.org/10.2165/00129785-200505060-00003>.

32. McKenna D.J., McKeown S.R., McKelvey-Martin V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 2008; 23(3): 183–190, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen054>.

33. Fikrová P., Štětina R., Hronek M., Hyšpler R., Tichá A., Zadák Z. Application of the comet assay method in clinical studies. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123(23–24): 693–699, <http://dx.doi.org/10.1007/s00508-011-0066-0>.

34. Тронов В.А., Гринько Е.В., Бериташвили Д.Р., Филиппович И.В. Микроэлектрофорез ДНК индивидуальных интактных и гамма-облученных тимоцитов. *Цитология* 1991; 33(2): 94–102. Tronov V.A., Grin'ko E.V., Beritashvili D.R., Filippovich I.V. Microelectrophoresis DNA individual intact and gamma-radiated thymocytes. *Tsitologiya* 1991; 33(2): 94–102.

35. Chaubey R.C., Bhilwade H.N., Rajagopalan R., Bannur S.V. Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for Comet assay. *Mutat Res* 2001; 490(2): 187–197, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00166-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00166-2).

36. Lankoff A., Bialczyk J., Dziga D., Carmichael W.W., Gradzka I., Lisowska H., Kuszewski T., Gozdz S., Piorun I., Wojcik A. The repair of gamma-radiation — induced DNA damage is inhibited by microcystin — LR, the PP1 and PP2A phosphatase inhibitor. *Mutagenesis* 2006; 21(1): 83–90, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen002>.

37. Vorob'eva N.I., Antonenko A.V., Osipov A.N. Particularities of blood lymphocyte response to irradiation *in vitro* in breast cancer patients. *Radiats Biol Radioecol* 2011; 51(4): 451–456.

38. Требования радиационной безопасности при

производстве, эксплуатации и выводе из эксплуатации (утилизации) медицинской техники, содержащей источники ионизирующего излучения. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ №91 от 07.07.2011. *Trebvaniya radiatsionnoy bezopasnosti pri proizvodstve, ekspluatatsii i vyvode iz ekspluatatsii (utilizatsii) meditsinskoj tekhniki, sodержashchey istochniki ioniziruyushchego izlucheniya*. Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF №91 ot 07.07.2011 [Radiation safety requirements in the production, operation and retirement from operation (utilization) of medical equipment containing ionizing radiation sources. The Resolution of Chief State Medical Officer of the Russian Federation No.91 dated 07.07.2011].

39. Collins A.R. The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis* 2015; 30(1): 1–4, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu079>.

40. Speit G., Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 2006; 314: 275–286, <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>.

41. Степанов В.Н. Методы и программные средства автоматизации анализа изображений медико-биологических микрообъектов. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. М; 2005. Stepanov V.N. *Metody i programmnye sredstva avtomatizatsii analiza izobrazheniy mediko-biologicheskikh mikroob"ektov*. Avtoref. dis. ... kand. tekhn. nauk [The techniques and software tools for automation of image analysis of biomedical micro-objects. PhD Thesis]. Moscow; 2005.

42. Киселева Е.С., Голдобенко Г.В., Канаев С.В. и др. Лучевая терапия злокачественных опухолей. Под ред. Киселевой Е.С. М: Медицина; 1996; 464 с. Kiseleva E.S., Goldobenko G.V., Kanaev S.V., et al. *Luchevaya terapiya*

zlokachestvennykh opukholey [Radiation therapy of malignant tumors]. Kiseleva E.S. (editor). Moscow: Meditsina; 1996; 464 p.

43. Ильин Л.А., Кириллов В.Ф., Коренков И.П. Радиационная безопасность и защита. М: Медицина; 1996; 336 с. Il'in L.A., Kirillov V.F., Korenkov I.P. *Radiatsionnaya bezopasnost' i zashchita* [Radiation safety and protection]. Moscow: Meditsina; 1996; 336 p.

44. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М: Слово; 2006; 556 с. Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., et al. *Okislitel'nyy stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. Moscow: Slovo; 2006; 556 p.

45. Viebahn-Hänsler R., León Fernández O.S., Fahmy Z. The low-dose ozone concept — guidelines and treatment strategies. *Ozone: Science & Engineering Journal* 2012; 34(6): 408–424.

46. Разумовский С.Д., Константинова М.Л., Гриневич Т.В., Коровина Г.В., Зайцев В.Я. Брутто — закономерности разложения озона в физиологическом растворе и методика оценки количества озона, введенного больному вместе с дозой раствора. Биомедицинская химия 2010; 56(3): 380–386. Razumovskii S.D., Konstantinova M.L., Grinevich T.V., Korovina G.V., Zaitsev V.Ya. Brutto — law of ozone decomposition in physiologic solutions and a method of evaluation of ozone dose really introduced to patients together with solution volume. *Biomeditsinskaya khimiya* 2010; 56(3): 380–386, <http://dx.doi.org/10.18097/pbmc20105603380>.

47. Тронов В.А., Никольская Т.А., Конопляников М.А. ДНК-кометы как маркер клеточной гибели. Биофизика 1999; 44(2): 288–295. Tronov V.A., Nikol'skaya T.A., Konoplyannikov M.A. DNA comets as markers of cells death. *Biofizika* 1999; 44(2): 288–295.