

ФЕНОМЕН АТИПИЧНЫХ ДНК-КОМЕТ

© А. К. Жанатаев,¹ Е. А. Анисина, З. В. Чайка, И. А. Мирошкина, А. Д. Дурнев

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова, Москва, 125315;

¹электронный адрес: azhanataev@yandex.ru

Описан и проиллюстрирован феномен атипичных ДНК-комет, выявляемых при проведении исследований методом ДНК-комет. Рассмотрены текущие гипотезы, объясняющие возникновение атипичных ДНК-комет, предложено собственное видение вопроса, обсуждена практическая значимость регистрации атипичных ДНК-комет при оценке генотоксичности.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, атипичные ДНК-кометы, апоптоз, цитотоксичность, генотоксичность, окислительный стресс, ДНК-повреждения.

В 1984 г. Остлинг и Йохансон (Ostling, Johanson, 1984) предложили новый оригинальный метод оценки двухнитевых разрывов ДНК в отдельных клетках. Клетки, подвергнутые действию радиационного излучения, помещали в агарозный гель, лизировали и подвергали электрофорезу. Позднее Сингх с соавторами (Singh et al., 1988) модифицировали метод, заменив электрофорез в нейтральных условиях на щелочной (pH > 13) и включив этап щелочной денатурации, что позволило помимо двухнитевых разрывов ДНК выявлять одонитевые разрывы и щелочно-лабильные сайты. Метод получил название гелелектрофореза отдельных клеток (single-cell gel electrophoresis, SCGE) или метод ДНК-комет (DNA comet assay).

Высокая чувствительность, малое количество необходимого для анализа материала (в том числе полученного неинвазивными или малоинвазивными способами), применимость к любым типам клеток, содержащим ДНК, оценка повреждений ДНК на уровне отдельных клеток обусловили интерес исследователей к этому методу. На сегодня разработаны модификации метода, позволяющие выявлять различные типы повреждений ДНК, такие как специфически модифицированные основания ДНК, сшивки ДНК—ДНК и ДНК—белок, а также оценивать кинетику репарации ДНК. Получены значимые экспериментальные данные с применением метода в эпидемиологических и санитарно-гигиенических исследованиях, в клинических исследованиях при профилактике, диагностике и мониторинге терапии ряда заболеваний. Проведены масштабные международные исследования по валидации и верификации метода, результатом которых стало его введение в ряд официальных руководств, в том числе отечественных, в качестве экспертного теста по оценке генотоксической и потенциальной канцерогенной активности факторов различной природы. Разработаны и приняты единые протоколы проведения метода *in vivo* и *in vitro*, позволяющие минимизировать или исключить вариабельность экспериментальных данных.

В то же время важным, но малоизученным методическим аспектом остается феномен атипичных ДНК-комет.

На сегодняшний день нет полного понимания того, отражают атипичные ДНК-кометы индуцированную генотоксикантами поврежденность ДНК или являются свидетельством фрагментации (деградации) ДНК в ходе клеточной гибели или иных процессов. Поскольку генез и значимость атипичных ДНК-комет остаются неясными, во избежание ложной интерпретации экспериментальных генотоксических данных общепринято выделять их в отдельную группу и исключать из общего анализа. Вместе с тем выявление таких ДНК-комет как в норме, так и при патологических состояниях и воздействии широкого ряда агентов, в том числе негенотоксических, позволяет предполагать, что их возникновение может отражать важные, фундаментальные процессы жизнедеятельности клеток.

В настоящей работе описан феномен атипичных ДНК-комет, рассмотрены и обсуждены текущие гипотезы их возникновения, анализ литературных данных позволил теоретически обосновать новую гипотезу, основанную на механизме активации доменной топоизомеразы II в ответ на цито- и (или) генотоксическое воздействие.

Принцип метода ДНК-комет

Стандартная процедура метода ДНК-комет включает в себя получение геле-слайдов с подложкой из агарозы, внесение исследуемых клеток в агарозный гель и нанесение на геле-слайды, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, фиксацию/нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ. Заключенные в агарозный гель клетки на предметных стеклах подвергают лизису при 4 °С. Для обеих версий метода используется лизирующий буфер, содержащий 10 мМ Трис-НСl (pH 10), 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na, 1 % Тритона X-100 и 10 % диметилсульфоксида. В зависимости от типа исследуемых клеток для полноты лизиса буфер может включать в себя протеиназу К и (или) N-лаурилсаркозин. В процессе лизиса под действием высокой концентрации соли и детергента (детергентов) происходит диссоциация клеточ-

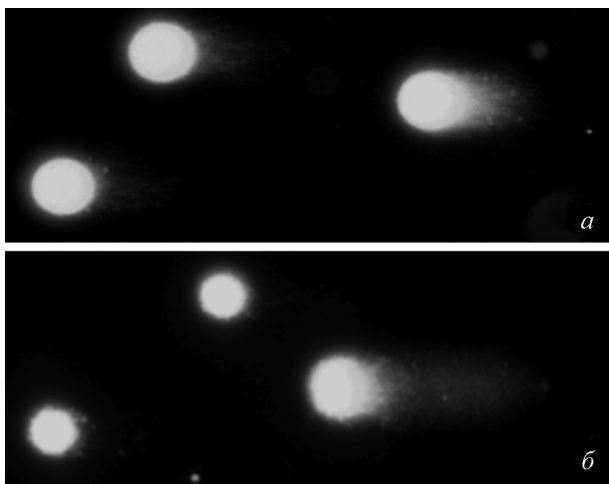


Рис. 1. Изображения ДНК-комет клеток при нейтральном (а) и щелочном (б) гель-электрофорезе.

Окраска SYBR Green I, об. 20×.

ных структур, депротеинизированная ДНК заполняет образованную клеткой полость в агарозе. В нейтральной версии метода по окончании лизиса проводится электрофорез в классическом для электрофореза нуклеиновых кислот Трис-боратном или Трис-ацетатном буфере. При

этом ДНК в виде линейных фрагментов и (или) петель двухнитевой ДНК мигрирует в порах агарозы к аноду, формируя электрофоретический хвост. Щелочная версия метода включает в себя дополнительный этап щелочной денатурации с последующим электрофорезом в щелочном буфере (300 мМ NaOH и 1 мМ EDTA-Na, pH > 13). В ходе щелочной денатурации ДНК переходит в однонитевую форму, щелочно-лабильные сайты реализуются в однонитевые разрывы. Во время электрофореза в том же буфере образовавшиеся нити и фрагменты однонитевой ДНК мигрируют к аноду, образуя хвост ДНК-комет, в котором после нейтрализации (фиксации) случайным образом (негомологично) ренатурируют в двухнитевую ДНК. Таким образом, ДНК в хвосте комет при нейтральной версии представлена в виде двухнитевой ДНК, в щелочной версии — в виде петель и фрагментов одно- и двухнитевой ДНК (Olive et al., 1994; Афанасьева и др., 2009). На рис. 1 представлены изображения типичных ДНК-комет, формируемых при нейтральном (а) и щелочном (б) электрофорезе ДНК лизированных клеток.

Атипичные ДНК-кометы

На микропрепаратах ДНК-комет при различных экспериментальных условиях можно наблюдать имеющие нестандартную морфологию ДНК-кометы, далее описы-

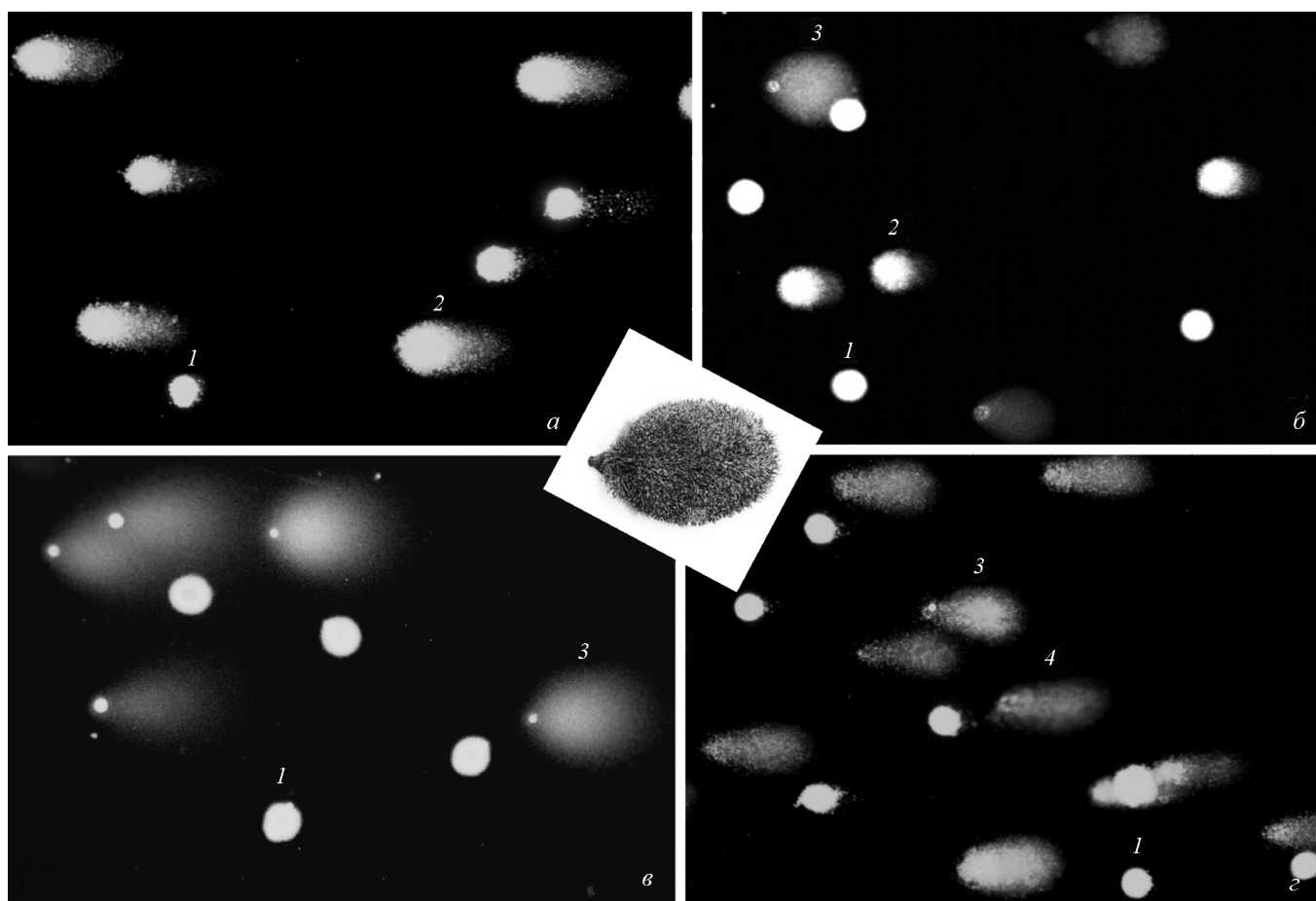


Рис. 2. Микропрепараты, не содержащие (а) и содержащие атипичные ДНК-кометы (б—г).

Цифрами обозначены примеры ДНК-комет клеток с неповрежденной (1) и поврежденной (2) ДНК, атипичные ДНК-кометы типа «ежики» (3) и «облака» (4). В центре — фотография ежа (вид сверху). Щелочной гель-электрофорез. Окраска SYBR Green I, об. 20×.

ваемые термином «атипичные». Их общей характеристикой являются небольшая или недифференцируемая голова и широкий диффузный хвост (рис. 2), при этом в хвосте кометы представлено от 70 до 100 % от всей ДНК клетки. В литературе такие ДНК-кометы получили различные определения — клетки-призраки (*ghost cells*), облака (*clouds*), ежики (*hedgehogs*) или сильноповрежденные клетки (*high damaged cells*) (Lorenzo et al., 2013). Предполагается, что в процессе лизиса короткие фрагменты ДНК свободно диффундируют в геле, формируя широкое гало либо с небольшой головой в центре, либо без таковой. На этом принципе основан метод DNA halo assay (ДНК-гало), используемый для определения клеток с фрагментированной ДНК. В ходе электрофореза образовавшееся гало смещается относительно головы, формируя в первом случае ДНК-комету, морфологически напоминающую ежика в горизонтальной проекции (отсюда название *hedgehog*) или подобие облака (*cloud*) во втором случае. Важно отметить, что отклонения от протокола проведения метода также могут приводить к возникновению атипичных ДНК-комет, которые при этом составляют > 90 % от всех ДНК-комет на микропрепаратах, включая микропрепараты интактных (контрольных) клеток. В частности, такое наблюдается в случае присутствия в буфере для выделения клеток ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} или снижения его $\text{pH} < 7.0$, при использовании высоких концентраций трипсина для снятия культивируемых клеток с матраса, высокой температуре агарозного геля при внесении клеток и т. д. (Жанатаев и др., 2011).

Гипотеза апоптотической фрагментации

Поскольку ДНК в хвосте атипичных ДНК-комет представлена в виде коротких фрагментов дискретной длины, очевидным явилось предположение о том, что такие ДНК-кометы могут формировать апоптотические клетки, находящиеся на стадии фрагментации хроматина. Было показано, что депривация сыворотки в клетках Rec-1 приводит к возникновению ДНК-комет с высокофрагментированной ДНК, при этом их процентное содержание коррелирует с содержанием клеток, позитивных к аннексину V, являющемуся маркером ранней стадии апоптоза (Florent et al., 1999). Аналогичные результаты были получены в экспериментах с радиацией (Olive, Banáth, 1995), индуктором апоптоза стауроспорином и ингибиторами топоизомеразы II (Godard et al., 1999, 2002) и нейротоксинами (Noda et al., 2004). Косвенным подтверждением указанного предположения послужили данные о размере фрагментов ДНК в хвосте атипичных ДНК-комет — около 50 т. п. н., что соответствует начальным этапам фрагментации хроматина при апоптозе (Olive, Banáth, 1995). В то же время было показано, что инкубация клеток в присутствии индукторов апоптоза дексаметазона, Тритона X-100 и додецилсульфата натрия не приводит к появлению атипичных ДНК-комет, тогда как генотоксиканты N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, метилметансульфонат и этопозид индуцировали повреждения ДНК и выход атипичных ДНК-комет, но не позитивных к аннексину V клеток (Rosier et al., 2001; Meinties et al., 2003). Не было выявлено корреляций между индукцией апоптоза и образованием атипичных ДНК-комет после обработки опухолевых клеточных линий γ -радиацией и 7β -гидроксихолестеролом (Siles et al., 1998; O'Callaghan et al., 2001).

Противоречивость этих результатов может быть связана с различиями между экспериментальными условиями, использованными авторами процитированных работ. После инициации апоптоза расщепление ДНК начинается с образования фрагментов длиной 50—300 т. п. н, с последующим их распадом до нуклеосомальных фрагментов длиной 180—200 п.н. или фрагментов, кратных им. Согласно расчетам, разрешающая способность метода ДНК-комет в щелочной версии составляет ~10 т. п.н., более короткие фрагменты диффундируют в геле на значительные расстояния и ввиду слабого свечения не детектируются визуально или цифровой камерой (Rapp et al., 2000). Таким образом, метод ДНК-комет позволяет наблюдать апоптотическую фрагментацию ДНК лишь на ее начальной стадии, которая занимает достаточно узкий временной интервал, и, следовательно, «окно для наблюдения» будет варьировать в зависимости от используемого тест-объекта, действующего агента, его концентрации (дозы) и т. д.

Вместе с тем природа атипичных ДНК-комет отчасти может быть объяснена фрагментацией хроматина в ходе апоптотической гибели клеток. В данную гипотезу не укладываются экспериментальные данные о возникновении атипичных ДНК-комет при экспозиции клеток различными агентами, в том числе негенотоксическими и неапоптогенными, на короткие сроки, недостаточные для инициации и реализации программы апоптоза. Так, в наших собственных исследованиях метилметансульфонат, бромат калия и диоксидин в нецитотоксических концентрациях индуцировали в клетках костного мозга мышей *in vitro* до 30 % атипичных ДНК-комет через 30—60 мин после воздействия. Перекись водорода при 5-минутной экспозиции приводила к выходу до 25 % атипичных ДНК-комет в клетках крови больших системной красной волчанкой (Жанатаев и др., 2009). Через 2 ч после обработки клеток р-нитрофенолом, N-лауроилсаркозином и D-ментолом (веществами, не являющимися генотоксикантами) в цитотоксических концентрациях наблюдали ДНК-кометы с сильноповрежденной ДНК на фоне отсутствия ДНК-комет со средней или низкой поврежденностью ДНК (Hartmann, Speit, 1997). После обработки радиацией в высокой дозе (600 Гр) клетки сразу формировали атипичные ДНК-кометы, тогда как после воздействия дозой 7.5 Гр их наблюдали только через 24 ч (Olive, Banáth, 1995). Примечательно, что в этой работе впервые была предложена гипотеза об атипичных ДНК-кометах как апоптотических, но их выявление сразу после радиационного воздействия на клетки не получила какого-либо объяснения.

Гипотеза окислительного стресса

Согласно данной гипотезе, формирование атипичных ДНК-комет может быть связано с индукцией в клетках окислительного стресса (Vasquez, 2012; Lorenzo et al., 2013). Прямая или опосредованная цитотоксическим действием гиперпродукция активных форм кислорода приводит к нарушению целостности митохондриальных мембран с высвобождением локализованной в межмембранном пространстве каспазозависимой эндонуклеазы G (EndoG). Последняя осуществляет первоначальное расщепление хроматина на фрагменты ДНК длиной ~50—300 т. п. н., которые далее подвергаются распаду до нуклеосомальных фрагментов под действием эндо-

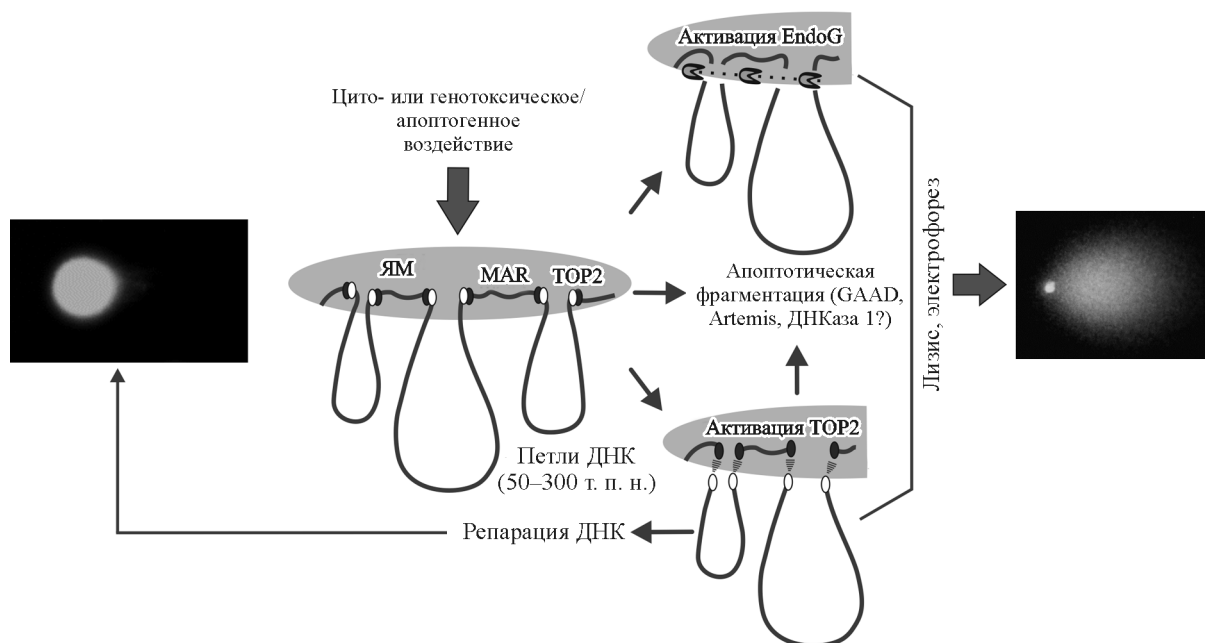


Рис. 3. Гипотетические механизмы формирования атипичных ДНК-комет.

ЯМ — ядерный матрикс, TOP2 — доменная топоизомераза II, MAR — matrix attachment region.

нуклеаз, участвующих в апоптотической и (или) некротической гибели клеток (Александровская, Ванюшин, 2012).

Однако за рамки данной гипотезы выходят некоторые экспериментальные факты. Во-первых, действие ряда генотоксикантов, таких как метилметансульфонат, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин и ингибиторы топоизомеразы II, не сопровождается окислительным стрессом, в то же время они индуцируют выход атипичных ДНК-комет. Во-вторых, известно, что со стадии фрагментации хроматина процесс клеточной гибели становится необратимым. В двух исследованиях было показано, что ДНК в атипичных ДНК-кометах, возникающих после обработки H_2O_2 не в цитотоксических концентрациях, может быть отрепарирована (Rundell et al., 2003; Lorenzo et al., 2013). Кроме того, часты ситуации, когда не выявляется прямая зависимость между долей жизнеспособных клеток и уровнем атипичных ДНК-комет.

Гипотеза активации доменной топоизомеразы II

Для понимания возможных механизмов формирования атипичных ДНК-комет следует обратиться к существующей петельно-доменной модели организации хроматина в клетках. Сформированная с участием гистона H1 в нуклеосомы ДНК образует 30-нанометровую хроматиновую фибриллу (рис. 3), которая в свою очередь образует закрепленные на ядерном матриксе петли (хромомеры) длиной 50—300 т. п. н. (Разин, Быстрицкий, 2015). Образование петель становится возможным благодаря наличию у их оснований определенных последовательностей ДНК, которые специфически взаимодействуют с ядерным матриксом (скэффолдом) — сетчатой структурой в интерфазном ядре, образованной белками и РНК. Участки прикрепления петель к матриксу включает в себя сложный комплекс функциональных элементов, в

том числе регулирующую топологию ДНК топоизомеразу II, выполняющую роль нуклеазы, обратимо расщепляющей ДНК в местах закрепления петельных доменов. Примечательно, что ингибиторы ДНК-лигазной активности топоизомеразы II, такие как этопозид, приводят к необратимой фрагментации ДНК, при этом по мере увеличения количества ингибитора пик распределения смещается в сторону более коротких (50 т. п. н.) фрагментов (Разин, Быстрицкий, 2015). Таким образом, каждая петля образует топологически обособленный домен и рассматривается как функциональная единица регуляции процессов репликации, транскрипции и репарации ДНК, а также предположительно клеточной гибели (Afanasieva et al., 2013). Установлено, что именно в участках прикрепления петель начинается расщепление ДНК апоптотическими «крупнощепящими» гранзин-А-активируемой эндонуклеазой GAAD, нуклеазой Artemis и каспазонезависимой эндонуклеазой G с образованием фрагментов длиной 50—300 т. п. н. (Vasquez, 2012), т. е. фрагментов, наблюдаемых в хвосте атипичных ДНК-комет (рис. 3).

Как упоминалось выше, фрагментация ДНК эндонуклеазами — процесс необратимый. Поэтому требуют объяснения экспериментальные факты, указывающие на то, что в ряде случаев фрагментированная ДНК атипичных ДНК-комет может быть восстановлена. Было показано, что окислительный стресс приводит к активации доменной топоизомеразы II, осуществляющей АТФ-зависимое расщепление ДНК у оснований доменных петель и снятие топологического напряжения на этих участках ДНК предположительно для контроля за возможными повреждениями ДНК и осуществления репарации (Li et al., 1999). При этом в случае удачной репарации поврежденной ДНК внесенные ферментом разрывы им же лигируются с восстановлением исходной структуры, а в случае нерепарируемых повреждений активируются эндонуклеазы, участвующие в апоптотической деградации ДНК.

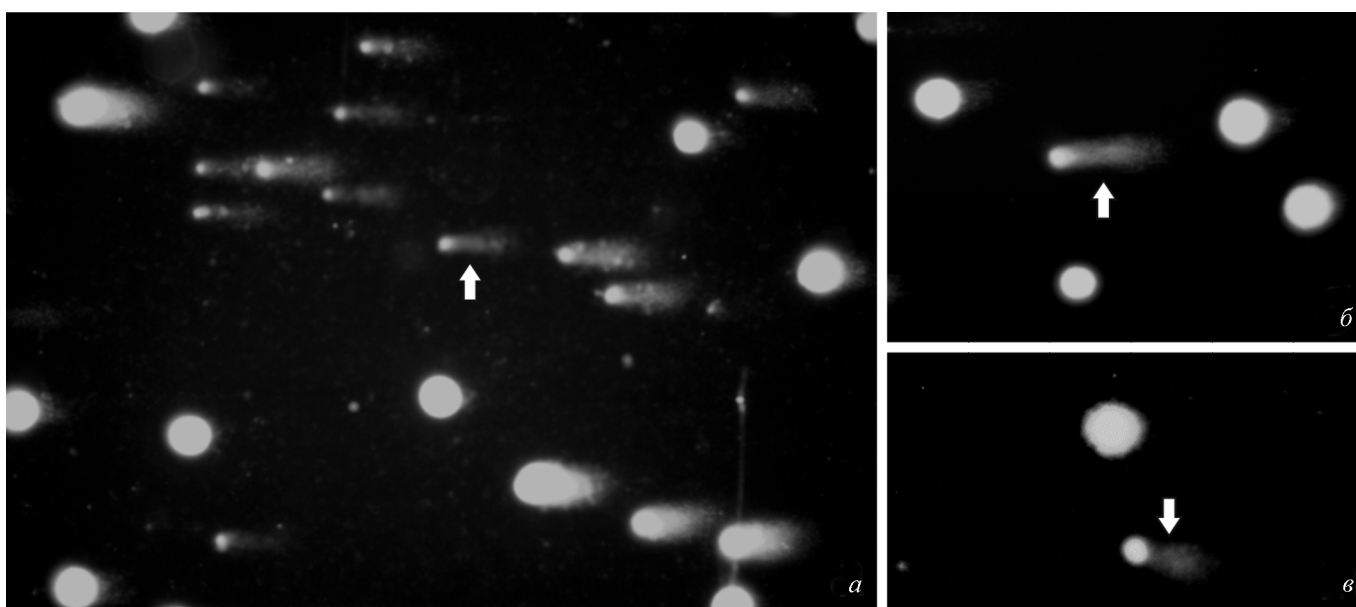


Рис. 4. ДНК-кометы клеток ишемизированного миокарда крысы (а) и клеток крови пациента с тяжелой сочетанной травмой (б, в). Стрелками указаны «малые» ДНК-кометы. Нейтральный гель-электрофорез. Окраска SYBR Green I, об. 20×.

Таким образом, активация в ответ на повреждение ДНК доменной топоизомеразы II, вносящей временные разрывы в ДНК, может рассматриваться как один из возможных механизмов формирования атипичных ДНК-комет. Подтверждение данной гипотезы может быть получено в экспериментальных исследованиях, в частности с использованием модификаторов каталитической активности доменной топоизомеразы II.

Феномен «малых» ДНК-комет

На препаратах клеток крови пациентов с тяжелой сочетанной травмой нами впервые были выявлены ранее не описанные в литературе ДНК-кометы, имеющие типичную морфологию, но при этом значимо меньших размеров (рис. 4). Позднее аналогичные ДНК-кометы нами наблюдались на препаратах ДНК-комет клеток ишемизированного миокарда крыс. В обоих случаях отмечены следующие особенности таких «малых» ДНК-комет: а) они имеют хвосты приблизительно одинаковой длины с содержанием ДНК в хвосте в пределах 45—60 %; б) общее содержание ДНК (голова + хвост) широко варьирует и составляет максимально ~1/3 от значения для типичных ДНК-комет; в) они выявляются только в условиях нейтрального гель-электрофореза. Очевидно, что такие ДНК-кометы формируют клетки, находящиеся на стадии гибели, поскольку большая часть хроматина в них деградирована. Логично предположить некротическую гибель, поскольку, во-первых, травматическое поражение может сопровождаться некрозом тканей и попаданием в кровотоки гибнущих клеток, во-вторых, некроз является основным следствием ишемии миокарда. В пользу данного предположения может свидетельствовать случайный характер расщепления хроматина при некротической гибели, сопровождающегося образованием фрагментов различной длины. При этом короткие фрагменты при электрофорезе могут полностью диффундировать в геле, а оставшиеся крупные фрагменты —

формировать ДНК-комету меньших размеров и с меньшим содержанием ДНК, т. е. «малую». Значимость «малых» ДНК-комет как биомаркеров специфических патологических процессов и (или) состояний клеток может быть получена по мере накопления массива фактологического материала.

Заключение

Несмотря на морфологическую схожесть, в основе возникновения атипичных ДНК-комет могут лежать различные клеточные процессы, протекающие по различным механизмам, в зависимости от типа ткани (клеток), индуцирующего фактора, уровня и времени экспозиции и т. д. Нередко исследователями вывод о принадлежности наблюдаемых атипичных ДНК-комет к тому или иному процессу делается на основе теоретических соображений, не подкрепленных экспериментально. Это обстоятельство порождает терминологическую и фактологическую путаницу, которая имеется в литературе, посвященной методу ДНК-комет. Очевидно, что накопленный на сегодня экспериментальный материал требует переосмысления данных и ревизии выводов, а сам феномен атипичных ДНК-комет требует целенаправленного изучения в рамках существующих и вновь выдвигаемых гипотез. Ответ на вопрос о природе атипичных ДНК-комет не только расширит сферы практического приложения метода, но может внести определенный вклад в понимание механизмов функционирования клетки в норме и при патологии.

С точки зрения использования метода ДНК-комет для рутинной оценки генотоксичности на сегодня целесообразно придерживаться существующего подхода учета атипичных ДНК-комет как отдельного показателя, не характеризующего генотоксичность, но указывающего на способность исследуемого агента индуцировать в клетках процессы, приводящие к обратимой (необратимой) фрагментации ДНК.

Авторы выражают благодарность рецензенту за высокопрофессиональное рассмотрение статьи и ценные для нашей дальнейшей работы идеи и соображения.

Список литературы

- Александрюшкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. 2012. Эндонуклеазы и апоптоз у животных. Успехи биол. хим. 52 : 63—96. (Aleksandrushkina N. I., Vanyushin B. F. 2012. Endonucleases and apoptosis in animals. Biochemistry (Moscow). 77 (13) : 1436—1451.)
- Афанасьева К. С., Зажницкая М. О., Сиволоб А. В. 2009. Механизмы выхода ДНК при нейтральном и щелочном кометном электрофорезе. Цитология и генетика. 43 (6) : 3—7. (Afanasyeva K. S., Zazhitskaia M. O., Sivolob A. V. 2009. Mechanisms of DNA exit during neutral and alkaline comet assay. Tsitologiya and Genetika. 43 (6) : 3—7.)
- Жанатаев А. К., Лисицына Т. А., Дурнев А. Д., Насонов Е. Л., Середенин С. Б. 2009. Влияние афобазола на ДНК-повреждения у больных системной красной волчанкой. Бюл. эксперим. биол. мед. 147 (10) : 404—408. (Zhanataev A. K., Lisitsyna T. A., Durnev A. D., Nasonov E. L., Seredenin S. B. 2009. Effect of afobazole on DNA damage in patients with systemic lupus erythematosus. Bull. Exp. Biol. Med. 148 (4) : 602—605.)
- Жанатаев А. К., Никитина В. А., Воронина Е. С., Дурнев А. Д. 2011. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет. Приклад. токсикол. 2 (4) : 28—37. (Zhanataev A. K., Nikitina V. A., Voronina E. S., Durnev A. D. 2011. Methodological aspects of DNA damage assessment using comet assay. Priklad. Toksikol. 2 (4) : 28—37.)
- Разин С. В., Быстрицкий А. А. 2015. Хроматин: упакованный геном. М.: Бином. 172 с. (Rasin S. V., Bystritskiy A. A. 2015. Chromatin: packed Genome. M.: Binom. 172 p.)
- Florent M., Godard T., Ballet J., Gauduchon P., Sola B. 1999. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. Cell Biol. Toxicol. 15 : 185—192.
- Godard T., Deslandes E., Lebaillly P., Vigreux C., Poulain L., Sichel F., Poul J., Gauduchon P. 1999. Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. Cytometry. 36 : 117—122.
- Godard T., Deslandes E., Sichel F., Poul J., Gauduchon P. 2002. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. Mutat. Res. 520 : 47—56.
- Hartmann A., Speit G. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). Toxicol. Lett. 90 : 183—188.
- Li T., Chen A., Yu C., Mao Y., Wang H., Liu L. 1999. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. Genes Develop. 13 : 1553—1560.
- Lorenzo Y., Costa S., Collins A., Azqueta A. 2013. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. Mutagenesis. 28 : 427—432.
- Meintieres S., Nesslany F., Pallardy M., Marzin D. 2003. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. Environ. Mol. Mutagen. 41 : 260—209.
- Noda Y., Sumino T., Fujisawa Y., Miyata N., Kaiya T., Kohda K. 2004. 1-Amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium salt, the 1-amino analogues of neurotoxins, MPTP and MPP+, induce apoptosis in PC12 cells: detection of apoptotic cells by Comet assay and flow cytometric analysis. In Vivo. 18 : 561—569.
- O'Callaghan Y., Woods J., O'Brien N. 2001. Limitations of the single-cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7beta-hydroxycholesterol. Biochem. Pharmacol. 61 : 1217—1226.
- Olive P., Banáth J. 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. Exp. Cell Res. 221 : 19—26.
- Olive P., Banáth J., Fjell C. 1994. DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay. Cytometry. 16 (4) : 305—312.
- Ostling O., Johanson K. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123 : 291—298.
- Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich K. 2000. UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. J. Photochem. Photobiol. B. 56 : 109—117.
- Roser S., Pool-Zobel B., Rechkemmer G. 2001. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. Mutat. Res. 497 : 169—175.
- Rundell M., Wagner E., Plewa M. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? Environ. Mol. Mutagen. 42 : 61—67.
- Siles E., Villalobos M., Jones L., Guerrero R., Eady J., Valenzuela M., Núñez M., McMillan T., Ruiz de Almodóvar J. 1998. Apoptosis after gamma irradiation. Is it an important cell death modality? Br. J. Cancer. 78 : 1594—1599.
- Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175 : 184—191.
- Afanasyeva K., Chopei M., Zazhyska M., Vikhrevva M., Sivolob A. 2013. DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis. Biochim. biophys. acta. 1833 (12) : 3237—3244.
- Vasquez M. 2012. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. Mutat. Res. 747 : 142—156.

Поступила 21 X 2016

PHENOMENON OF ATYPICAL DNA COMETS

A. K. Zhanataev,¹ E. A. Anisina, Z. V. Chayka, I. A. Miroshkina, A. D. Durnev

State V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315;
e-mail: azhanataev@yandex.ru

The phenomenon of atypical DNA comets in experiments using DNA comet assay is described and illustrated. The current hypotheses explaining the nature of atypical DNA comets and own vision of the issue are considered. The practical importance of the registration of atypical DNA comets in assessing the genotoxicity is discussed.

Key words: comet assay, atypical DNA comets, apoptosis, cytotoxicity, genotoxicity, oxidative stress, DNA damage.