**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*

**Методические рекомендации**
**МР 4.2.0014—10**

Издание официальное

**Москва • 2011**

gost.e-ecolog.ru

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*

**Методические рекомендации**
**МР 4.2.0014—10**

ББК 51.2
О93

О93 **Оценка** генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—16 с.

1. Разработаны: НИИ фармакологии им.В.В.Закусова РАМН, Москва (чл.-корр. РАМН, профессор, д.м.н., А. Д. Дурнев, к.б.н. А. К. Жанатаев); Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область (Н. П. Сирота); Открытое Акционерное Общество Завод экологической техники и экопитания «ДИОД», Москва (академик РАЕН, к.т.н. В. П. Тихонов, к.б.н. Т. В. Шевченко, к.б.н. И. А. Родина, К. Л. Плигина).

2. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г. Г. Онищенко 14 октября 2010 г.

3. Введены впервые.

**ББК 51.2**

Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 25.02.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 44

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

**© Роспотребнадзор, 2011**
**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011**

## Содержание

Введение ..... 4
1. Область применения ..... 5
2. Принцип метода ..... 5
3. Оборудование, материалы и реактивы ..... 6
3.1. Характеристика объектов исследования ..... 7
4. Культивирование перевиваемых культур клеток ..... 8
5. Подготовка к исследованию ..... 8
5.1. Подготовка растворов и буферов ..... 8
6. Подготовка объектов исследования ..... 9
6.1. Подготовка перевиваемых клеток ..... 9
6.2. Получение лимфоцитов периферической крови ..... 9
6.3. Подготовка исследуемых образцов ..... 10
6.3.1. Растворители ..... 10
6.3.2. Контроли ..... 10
6.3.3. Исследуемые концентрации ..... 10
6.3.4. Подготовка парфюмерно-косметической продукции и средств гигиены полости рта ..... 10
6.3.5. Подготовка товаров бытовой химии ..... 11
6.3.6. Подготовка изделий из полимерных материалов ..... 12
6.3.7. Подготовка стекол для микропрепаратов ..... 12
7. Процедура тестирования ..... 12
7.1. Инкубация клеток с исследуемыми образцами ..... 12
7.2. Приготовление микропрепаратов ..... 13
7.3. Лизис ..... 13
7.4. Щелочная денатурация ..... 13
7.5. Щелочной электрофорез ..... 13
7.6. Окрашивание ..... 14
7.7. Микроскопический анализ ..... 14
8. Статистическая обработка данных ..... 14
9. Форма представления результатов ..... 15
10. Интерпретация результатов ..... 15
11. Список литературы ..... 16

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
14 октября 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*

## Методические рекомендации МР 4.2.0014—10

### Введение

Предупреждение контакта человека с потенциальными генотоксикантами представляется наиболее конструктивным способом защиты организма человека от последствий индуцированного мутагенеза. Вместе с тем, тотальная проверка ксенобиотиков/комплекса ксенобиотиков на генотоксичность невозможна вследствие огромного объема исследований. Это обусловило внедрение в практику генотоксикологических исследований понятия «первоочередность» тестирования. Первоочередному тестированию подлежат лекарственные средства, пищевые добавки, пестициды, парфюмерно-косметические средства, бытовая химия, а также наиболее широко распространенные загрязнители воды, воздуха и производственные вредности. Для удешевления и ускорения работ по генетическому скринингу проводится изучение генотоксичности с помощью простых и быстровыполнимых методов и использованием качестве тест-объекта микроорганизмов или культур клеток млекопитающих.

Из имеющихся на сегодняшний день в арсенале генотоксикологии методов для решения указанных задач наиболее перспективным представляется метод гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет. Метод является высокочувствительным и обеспечивает высокую надежность получаемых результатов.

Данные методические рекомендации содержат порядок проведения оценки генотоксических свойств с применением метода ДНК-комет в клетках млекопитающих в системе *in vitro*. Преимуществом настоящей тест-системы являются простота, экономичность, быстрота получения результатов. Кроме того, система отвечает современным этическим требованиям, согласно которым следует ограничивать использование млекопитающих в эксперименте.

## 1. Область применения

Методические рекомендации предназначены для токсикологических (генотоксикологических) исследований и испытаний пищевых ингредиентов (пищевых добавок, красителей и др.), биологически активных добавок к пище и сырья для их производства, парфюмерно-косметической продукции и средств гигиены полости рта, товаров бытовой химии, полимерных материалов и различных изделий из них (изделия детского ассортимента, изделия, контактирующие с пищевыми продуктами), сырья и продуктов, с том числе полученных с применением нанотехнологий, а также объектов и факторов среды обитания (вода централизованных источников, сточная вода и т. д.).

## 2. Принцип метода

Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК и/или фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК.

Общая процедура метода включает получение гель-слайдов (подложки), получение микропрепаратов, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ. Гель-слайды готовятся с использованием предметных стекол, которые покрывают агарозным гелем. Исследуемые образцы инкубируют с клетками, затем в агарозном геле на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, приводящему к разрушению клеточных и ядерных мембран, диссоциации ДНК-белковых комплексов. Проводится щелочная денатурации (pH > 13), которая переводит щелочно-лабильные сайты ДНК в однонитевые разрывы, затем проводят электрофореза. После завершения щелочного электрофореза слайды нейтрализуют, окрашивают и анализируют под флуоресцентным

микроскопом. Далее проводят компьютерный анализ цифровых изображений комет с помощью специализированного программного обеспечения и определяют основной показатель процент ДНК в хвосте кометы и другие параметры.

## 3. Оборудование, материалы и реактивы

| | |
|---|---|
| Ламинарный бокс с вертикальным потоком | ГОСТ ИСО 14644-1–2002 |
| Микроскоп эпифлуоресцентный | |
| Высокочувствительная цифровая фотокамера или видеокамера с адаптером к микроскопу | |
| Микроскоп инвертированный | |
| $CO_2$-Инкубатор встряхиватель лабораторный типа Вортекс | ТУ 64-1-1081—73 |
| pH-метр или аналоги | ТУ-4215-00-18294344–01 |
| Термометр лабораторный 0—55 °С | ГОСТ 8.279—78 |
| Холодильник бытовой | ГОСТ 26678—85 |
| Микротермостат для пробирок 25—99 °С | |
| Камера для горизонтального электрофореза | ГОСТ 4.372—85 |
| Источник питания для электрофореза (диапазон регулирования напряжения до 400 В) | ГОСТ 4.372—85 |
| Центрифуга лабораторная | ГОСТ Р МЭК 61010-2-020–99 |
| Центрифуга лабораторная для микропробирок | ГОСТ Р МЭК 61010-2-020–99 |
| Магнитная мешалка | ТУ 25-11-834—73 |
| Весы аналитические (предел допустимой погрешности не более 0,01 мг) | ГОСТ 24104-2001 |
| Плитка электрическая | ГОСТ 14919—83 |
| Колбы, цилиндры стеклянные мерные | ГОСТ 1770—74 |
| Колбы стеклянные лабораторные вместимостью 0,5 и 1,0 $дм^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Микропробирки пропиленовые конические объемом 0,5 и 1,5 $см^3$ с крышкой | |
| Штатив для микропробирок вместимостью 0,5 и 1,5 $см^3$ | |
| Наконечники одноразовые для дозаторов переменного объема в штативах | |
| Дозаторы автоматические переменного объема | ТУ 9452-002-33189998–2002 |
| Часы сигнальные | ТУ 25-07—57 |
| Пинцеты медицинские | ГОСТ 21241—89 |
| Шпатели металлические | ГОСТ 19126—2007 |

| | |
|---|---|
| Камера для счета форменных элементов крови по Горяеву | ТУ 42-816 |
| Стекла покровные для микропрепаратов | ГОСТ 6672—75 |
| Стекла предметные | ГОСТ 9284—75 |
| Спиртовка лабораторная стеклянная | ГОСТ 25336—82 |
| Фильтры АФА-ВП-10 | ТУ 95-743—80 |
| Фильтровальная бумага | ГОСТ 12026—76 |
| Агароза универсальная Тип I | |
| Агароза легкоплавкая (низкоплавкая) Тип VII | |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—02 |
| Натрия гидроокись | ГОСТ 4328—77 |
| Этилендиамин-N,N,N′,N′-тетрауксусной кислоты динатриевая соль двухводная | ГОСТ 10652—7 |
| N-лауроилсаркозин натриевая соль | |
| Натрий хлористый | ГОСТ 4233—77 |
| Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный | ГОСТ 4172—76 |
| Калий фосфорно-кислый однозамещеннный | ГОСТ 4198—75 |
| Калий хлористый | ГОСТ 4234—77 |
| Трис (гидроксиметил)-аминометан | ТУ 6-09-4292—76 |
| Тритон X-100 | |
| Этидий бромистый | ТУ 6-09-13-452—75 |
| Краситель SYBR Green I (возможно использование других красителей, применяемых для визуализации ДНК: DAPI; пропидиум иодид, акридиновый оранжевый и др.) | |
| Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота | |
| Среда ДМЕМ; | |
| Среда RPMI-1640 | |
| Смесь Ficoll-Paque или аналогичная | |
| L-глутамин | |
| Пенициллин | |
| Стрептомицин | |

### *3.1. Характеристика объектов исследования*

Для оценки генотоксических свойств в качестве тест-объекта используют традиционно применяемые в генотоксикологических исследованиях клетки первичных и перевиваемых клеточных культур человека (лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, карцинома шейки матки HeLa, карцинома легкого А-549, карцинома гортани Нер2

и др.). Среди данных тест-объектов целесообразно использовать лимфоциты периферической крови, клеточные культуры фибробластов человека или HeLa, что обусловлено рядом их преимуществ по сравнению с другими клетками: простота процедуры получения материала; высокая синхронизированность популяции клеток, широкая изученность биологических процессов.

## 4. Культивирование перевиваемых культур клеток

Фибробласты и клетки HeLa культивируют в среде DMEM с 0,3 мг/мл L-глутамина с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Cibro BRL, США), 100 ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина в контролируемых условиях (37 °С, 5 % $CO_2$) в пластиковых флаконах с площадью дна 25 $см^2$ (посевная концентрация 1 х $10^6$ клеток/флакон).

## 5. Подготовка к исследованию

### *5.1. Подготовка растворов и буферов*

*Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 (хранят при 4 °С).*

*Фосфатно-солевой буфер с 1мМ ЭДТА-Na (ФСБ+ЭДТА) pH 7,4 (хранят при 4 °С).*

*Универсальная 1 % агароза.* Готовят 10 мл 1 % раствора универсальной агарозы в ФСБ + ЭДТА в стеклянном флаконе с крышкой на водяной бане до получения полностью прозрачного геля.

*Легкоплавкая 1 % агароза.* Готовят 1 % раствор легкоплавкой агарозы в ФСБ + ЭДТА и инкубируют в микротермостате при 70°С до получения полностью прозрачного агарозного геля. Приготовленный агарозный гель охлаждают до (39 ± 2) °С.

*Легкоплавкая 0,5 % агароза.*

*Основной лизирующий раствор.* Готовят основной лизирующий раствор – 10мМ Трис-HCl (pH 10) 2,5М NaCl, 100 мМ ЭДТА-Na. Раствор хранится при комнатной температуре в течение месяца.

Рабочий лизирующий раствор готовится и используется непосредственно в день эксперимента.

*Готовят 1 % раствор Тритон-Х100 в основном лизирующем растворе.*

*Щелочной раствор для электрофореза (pH13).* Готовят раствор 0,3М NaOH и 1мМ ЭДТА-Na. Раствор охлаждают до 4 °С.

*Раствор этидиум бромида.* Готовят раствор с концентрацией этидиум бромида 2 мкг/см$^3$ в ФСБ. Полученный раствор хранят при 4 °С.

*SYBR Green I.* Готовят раствор SYBR Green I 1 : 10 000 в ТЕ-буфере. Полученный раствор хранят при 4 °С не более 2 недель.

## 6. Подготовка объектов исследования

### *6.1. Подготовка перевиваемых клеток*

Непосредственно перед тестированием клеточный монослой 2 раза промывают ФСБ без $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ и заливают на 5 минут 0,05 % раствором трипсина (1 см$^3$ на флакон). Затем инактивируют трипсин средой для культивирования клеток, осторожно пипетируют клетки в среде до образования однородной суспензии. После чего клетки осаждают центрифугированием (5 мин 400 g). После этого клетки еще 2 раза отмывают в охлажденном растворе ФСБ + ЭДТА (4 °С).

Жизнеспособность клеток оценивают окраской 0,4 % трипанового синего. Суспензию клеток разводят до концентрации 1 х $10^6$ кл/ см$^3$ (подсчет клеток осуществляют в камере Горяева). До получения микропрепаратов возможно хранение клеток при 4 °С не более 3 часов.

### *6.2. Получение лимфоцитов периферической крови*

Для исследования кровь берут у здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет, не работающих в сфере химического производства, не контактирующих с источниками ионизирующего излучения, не болевших за последние 3—6 месяцев вирусными заболеваниями и не проходивших за последние 6 месяцев рентгенодиагностическое обследование. Из локтевой вены асептически отбирают аликвоту крови и переносят в стерильные пробирки, содержащие содержащих антикоагулянт. Цельную кровь смешивают с равным объемом среды RPMI-1640 (без L-глютамина) и осторожно наслаивают на градиентную смесь фиколла Ficoll-Paque (или аналогичную) плотностью 1,077 и центрифугируют при 400 g в течение 40 мин. Образующее на разделе фаз «кольцо» из мононуклеаров аккуратно отбирают пипеткой и дважды отмывают средой RPMI-1 640 центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. После второй отмывки осадок разводят в среде RPMI-1640 до концентрации клеток 1—5 х $10^5$/ см$^3$ и помещают до использования в холодильник при 4 °С.

### *6.3. Подготовка исследуемых образцов*

#### 6.3.1. Растворители

При работе с гидрофильными веществами в качестве растворителя используют бидистиллированную воду. При работе с гидрофобными веществами в качестве растворителя используют диметилсульфоксид или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1 %. При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта, что должно быть установлено экспериментально.

#### 6.3.2. Контроли

В качестве негативного контроля используется растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В качестве позитивного контроля используют пероксид водорода. Непосредственно перед использованием готовят 1 мМ раствор пероксида водорода в охлажденном (4 °С) ФСБ.

#### 6.3.3. Исследуемые концентрации

Во избежание ложноположительных или ложноотрицательных результатов образцы исследуются в концентрациях, не вызывающих изменение pH инкубационной среды и/или осмотического давления.

Исследование начинают с определения цитотоксичности *in vitro*. В качестве максимальной исследуемой концентрации принимается $^1/_2$ $LC_{50}$. Если $^1/_2$ $LC_{50}$ превышает 10 мМ, то в качестве максимальной концентрации принимается последняя. Для низкотоксичных и нетоксичных образцов в качестве максимальной используется концентрация 5 мг/ $см^3$, 5 мкл/ $см^3$ либо 10 мМ. Две последующие концентрации для исследования составляют $^1/_{10}$ и $^1/_{100}$ от максимальной.

#### 6.3.4. Подготовка парфюмерно-косметической продукции и средств гигиены полости рта

Экстракты из испытуемых образцов готовят согласно МР № 29 ФЦ/394 от 29.01.03 путем настаивания в дистиллированной воде. Соотношения веса образца и объема модельной среды (дистиллированной воды) приведены в табл. 1. Навески образцов взвешивают в сухой чистой колбе, куда потом добавляют требуемый объем модельной среды. В другую колбу наливают модельную среду и обе колбы помещают в термостат на 24 часа при 37 °С. После окончания экстракции растворы охлаждают до комнатной температуры.

Таблица 1

**Условия приготовления экстрактов**

| Вид продукции | Масса образца, г | Объем модельной среды, мл | Степень разведения образца | Продолжительность экстракции, час |
|---|---|---|---|---|
| Шампуни для волос и тела | 0,1 | 250 | 1 : 2 500 | 24 |
| Жидкое туалетное мыло | 0,1 | 250 | 1 : 2 500 | 24 |
| Пена для ванн, гель для душа | 0,1 | 250 | 1 . 2 500 | 24 |
| Дезодоранты и депилятории в аэрозольной упаковке | 1,0 | 300 | 1 : 300 | 1 |
| Туалетная и парфюмированная вода, духи, одеколон, спиртосодержащие лосьоны | 1,0 | 700 | 1 : 700 | 1 |
| Зубные пасты и отбеливающие системы | 0,1 | 250 | 1 : 2 500 | 1 |

После завершения экстракции раствор подвергают фильтрации через бумажный фильтр. Фильтрованию также подвергают модельную среду. Используют фильтр АФА-ВП-10 диаметром 9 см. Бумажные фильтры заранее промывают в дистиллированной воде. Для этого 10 бумажных фильтров опускают в большой стакан, заполненный 1,5 л дистиллированной воды. Стакан накрывают и ставят в термостат на 24 ч при 37 °С. Затем воду сливают и высушивают фильтры, не вынимая из стакана, в термостате до постоянной массы. Достижение постоянной массы контролируют взвешиванием каждого фильтра на аналитических весах.

### 6.3.5. Подготовка товаров бытовой химии

Растворы образцов готовят согласно МР №29 ФЦ/4746 от 27.12.01. Испытуемый образец в количестве 0,1 г помещают в мерную колбу с притертой крышкой, объемом 250 $см^3$, и доводится до метки дистиллированной водой, что соответствует разведению образца 1 : 2 500. Это разведение является стандартным для исследования моющих средств. Во вторую колбу в качестве контроля помещается 250 $см^3$ дистиллированной воды. Обе колбы помещают в термостат на 24 ч при 37 °С, затем охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения контрольный и опытный образцы подвергают фильтрованию через бумажный фильтр.

### 6.3.6. Подготовка изделий из полимерных материалов

Образцы изделий из полимерных материалов готовятся согласно МУ № 1.1.037—95 от 20.12.95.

Изделия из полимерных материалов измельчаются на куски максимальным сечением 20 х 20 мм. Навеску 30 г помещают в термостойкую колбу, емкостью 250 $см^3$, заливают 100 $см^3$ кипящей дистиллированной воды. По достижении температуры вытяжки 37 °С колбу помещают в термостат и выдерживают до 24 часов при температуре 37 ° С.

### 6.3.7. Подготовка стекол для микропрепаратов

Обезжиренные предметные стекла выкладывают на термостатируемую поверхность электрической плитки, нагретой до 65—70 °С. Расправленную 1 % агарозу из расчета 20 $мм^3$ на площадь стекла 25 $мм^2$, дозатором наносят на край стекла и равномерно распределяют по всей поверхности. После полного высыхания геля стекла снимают и охлаждают до комнатной температуры. Приготовленные стекла для микропрепаратов могут храниться 1 месяц при комнатной температуре.

## 7. Процедура тестирования

### *7.1. Инкубация клеток с исследуемыми образцами*

В микропробирки, содержащие 5 $мм^3$ ФСБ, вносят 20 $мм^3$ раствора исследуемого образца и 225 $мм^3$ клеточной суспензии (1 х $10^6$ клеток/ $см^3$). Для контроля растворителя в микропробирки приливают 5 $мм^3$ ФСБ, 20 $мм^3$ растворителя и 225 $мм^3$ клеточной суспензии (1 х $10^6$ клеток/ $см^3$). Клеточную суспензию с образцами инкубируют при 37 °С в течение 30 мин и 3 ч. По окончании инкубации пробирки центрифугируют при 400 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают и осажденные клетки дважды отмывают в ФСБ + ЭДТА центрифугированием при 400 g 5 мин. После второй отмывки осажденные клетки разводят ФСБ + ЭДТА и сразу приступают к процедуре получения микропрепаратов. Каждая экспериментальная точка проводится не менее чем в двух повторностях, по три микропрепарата на каждую повторность.

В микропробирки вносят 25 $мм^3$ раствора пероксида водорода и добавляют 225 $мм^3$ клеточной суспензии (1 х $10^6$ клеток/мл) и инкубируют 5 мин при 4 °С. По окончании инкубации пробирки центрифугируют при 400 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают и осажденные клетки дважды отмывают в ФСБ + ЭДТА центрифугированием при 400 g 5 мин. После второй отмывки осажденные клетки разводят ФСБ + ЭДТА и сразу приступают к процедуре получения микропрепаратов.

### *7.2. Приготовление микропрепаратов*

При использовании предметных стекол нестандартного размера для получения микропрепаратов исследуемые клетки иммобилизируют в трехслойные агарозные блоки по принципу «сэндвича». На стекла с высушенной универсальной 1 % агарозой наносят слой универсальной 1 % агарозы. Охлаждают 5 мин 4 °С для застывания геля. В микропробирке быстро смешивают в равных частях (1 : 1) 1 % легкоплавкую агарозу с суспензией клеток после воздействия исследуемых образцов и наносят следующим слоем. Охлаждают 5 мин при 4 °С для застывания геля. После этого наносят третий слой – 0,5 % легкоплавкую агарозу и охлаждают 5 мин при 4 °С.

При использовании стандартных стекол в микроцентрифужные пробирки с 240 мм$^3$ агарозного геля вносят 60 мм$^3$ клеточной суспензии 2—3 раза прокачивают дозатором. В центральную часть предметного стекла наносят 60 мм$^3$ полученного агарозного геля с клетками и накрывают покровным стеклом под углом, так, чтобы не было пузырей. Предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют на 10 мин для затвердевания геля. Аккуратно снимают покровные стекла (тянут за край) и предметные стекла помещают в стеклянную кювету.

Далее все манипуляции проводятся только в затемненном месте при свете желтой или зеленой лампы.

### *7.3. Лизис*

В кювету с микропрепаратами заливают рабочий лизирующий раствор пока раствор не покроет микропрепараты на 2—3 мм, накрывают крышкой и инкубируют при 4 °С в течение 1 ч. Допускается нахождение препаратов в лизирующем растворе до 24 ч.

### *7.4. Щелочная денатурация*

По окончании лизиса, микропрепараты вынимают из лизирующего раствора и переносят в кювету с охлажденным (4 °С) щелочным раствором для электрофореза (pH13). Инкубируют при 4 °С в течение 20 мин.

### *7.5. Щелочной электрофорез*

Микропрепараты раскладывают на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Электрофорез осуществляют в свежей порции охлажденного (4 °С) щелочного раствора для электрофореза (pH13) при температуре окружающей среды 20—25 °С. Отклонения в указанных температурных режимах может приводить к вариабельности получаемых результатов. Электрофорез проводят в течение 20 мин при на-

пряженности электрического поля 1В на 1см длины площадки для микропрепаратов.

### *7.6. Окрашивание*

Микропрепараты помещают в кювету и заливают бидистиллированной водой. Проводят нейтрализацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Процедуру нейтрализации повторяют дважды в свежей порции $H_2O$. При окраске препаратов красителем SYBR Green I препараты после электрофореза фиксируются в 70 % растворе этанола в течение 15 мин и высушиваются при комнатной температуре.

Для окрашивания «ДНК-комет» этидиум бромидом микропрепараты погружают в кювету с раствором красителя и инкубируют в темном месте при 4 °С не менее 1 ч. Непосредственно перед проведением анализа микропрепарат, выбранный для регистрации «ДНК-комет», промывают в дистиллированной воде 2—3 раза.

Для окраски ДНК-комет SYBR Green I краситель наносят на микропрепарат из расчета 100 мм$^3$ на площадь 25 мм$^2$ и проводят окраску в течение 20 мин. По окончании окраски остающийся на микропрепаратах краситель не удаляется.

### *7.7. Микроскопический анализ*

Микропрепараты анализируют под флуоресцентным микроскопом. Рекомендуемое увеличение х200—х400. С каждого микропрепарата рандомизированно анализируется не менее 50 ДНК-комет без наложений хвостов. Получение изображения и обработку данных осуществляют с помощью программно-аппаратного комплекса, включающего в себя высокочувствительную камеру или цифровой фотоаппарат, совмещенные с микроскопом, и специализированное программное обеспечение. 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 используют % ДНК в хвосте кометы.

## 8. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка экспериментальных данных проводится по всем повторностям каждой экспериментальной точки путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах с использованием непараметрического критерия Даннета. Данные двух повторностей объединяются и определяется среднее, если 95 % доверительные интервалы перекрываются. Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увели-

чение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по-крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

## 9. Форма представления результатов

Протокол представления результатов:

Название эксперимента _____
Тест-объект (название) _____
Вещество (название) _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы _____
Схема эксперимента _____
Дата проведения эксперимента _____
Дозы _____
Полученные результаты _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

## 10. Интерпретация результатов

Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по-крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемый агент индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

Показателем генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), который вычисляется по формуле:

ИП = «% ДНК в хвосте» в опытной группе/«% ДНК в хвосте» в контрольной группе.

Индекс повреждения, превышающий 2,0, указывает на то, что исследуемый образец обладает генотоксическими свойствами в условиях *in vitro*.

В случае выявления положительного результата для оценки безопасности применения необходимо проведение дальнейших исследований в тестах *in vivo* на млекопитающих.

## 11. Список литературы

1. Дурнев А. Д., Жанатаев А. К., Анисина Е. А., Сиднева Е. С., Никитина В. А., Оганесянц Л. А., Середенин С. Б., Бекиш В. Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. Москва, 2006, 28 стр.

2. Жанатаев А. К., Дурнев А. Д., Оганесянц Л. А. Метод гель-электрофореза изолированных клеток (метод «ДНК-комет») в пищевой генотоксикологии //Хранение и переработка сельхозсырья. 2007. № 1. С. 31—33.

3. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R.The comet assay: topical issues //Mutagenesis. 2008 May;23(3):143-51.

4. Comet Assay in Toxicology //A. Dhawan, D. Anderson (Eds); Royal Society of Chemistry, 2009, 461 p.

5. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D.Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models// Cell Biol Toxicol. 2009 Feb; 25(1) : 5—32.

6. Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers// Mutat Res. 2009 Mar-Jun; 681(2—3) : 241—58.

7. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing// Environ Mol Mutagen. 2000; 35(3) : 206—21.

8. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека: МР 1.2.2522—09. Москва, 2009.

9. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: МУ 1.2.2520—09. Москва, 2009.

gost.e-ecolog.ru