



Горенская О.В., Демидова Ю.В., Котнова А.П., Илюшина Н.А.

Возможности применения ДНК-кометного анализа (обзор литературы)

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия

РЕЗЮМЕ

Для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения необходим мониторинг среды обитания. В настоящее время существует множество методов определения неблагоприятных факторов, способных влиять на здоровье человека, в том числе нарушать генетические структуры в клетках. Одним из ключевых инструментов в генотоксикологии, который позволяет оценить повреждение ДНК на уровне отдельных клеток, является метод ДНК-кометного анализа. С момента появления в 1980-х годах он претерпел значительные модификации, направленные на повышение чувствительности, специфичности и универсальности. В данном обзоре рассмотрены принципы метода и основные протоколы, модификации классического кометного анализа, способы улучшения детекции разных типов повреждений ДНК и оценки репарационных процессов. Выполнен поиск релевантных исследований, опубликованных в реферативных базах данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ, за период 1984–2024 гг. В обзор включена информация 47 полнотекстовых источников.

Заключение. Метод ДНК-комет становится востребованным инструментом в исследованиях, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия, выявление опасных для генетического здоровья населения факторов окружающей и производственной среды, оценку индивидуальной чувствительности клеток человека к генотоксикантам, с целью формирования групп риска и разработки мер профилактики. Новые методики с применением ферментов репарации для специфических типов повреждений и флуоресцентных красителей позволяют оценить процессы восстановления ДНК и типы повреждений. Использование криоконсервации цельной крови и лимфоцитов для последующего ДНК-анализа даёт возможность проводить крупномасштабные долгосрочные эпидемиологические исследования. Автоматизация анализа комет с помощью методов глубокого обучения повысит точность идентификации типов повреждений ДНК, что необходимо для выяснения механизмов действия конкретных веществ.

Ключевые слова: ДНК-кометный анализ; модификации; генотоксичность; обзор

Для цитирования: Горенская О.В., Демидова Ю.В., Котнова А.П., Илюшина Н.А. Возможности применения ДНК-кометного анализа (обзор литературы). *Гигиена и санитария*. 2025; 104(10): 1369–1374. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-10-1369-1374> <https://elibrary.ru/qjfrux>

Для корреспонденции: Илюшина Наталья Алексеевна, e-mail: ilushina.na@fncg.ru

Участие авторов: Горенская О.В. — сбор материала и обработка данных, написание текста, редактирование; Демидова Ю.В. — сбор материала; Котнова А.П. — сбор материала; Илюшина Н.А. — дизайн исследования, сбор материала и обработка данных, написание текста, редактирование. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех её частей.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания № 121090800086-7.

Поступила: 30.06.2025 / Принята к печати: 15.10.2025 / Опубликована: 14.11.2025

Olga V. Gorenskaya, Yuliya V. Demidova, Alina P. Kotnova, Natalia A. Ilyushina

Possibilities of application of DNA Comet Assay (literature review)

Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation

ABSTRACT

To ensure the sanitary and epidemiological well-being of the population, it is necessary to monitor the state of the environment. Today, there is a wide range of methods available for identifying factors that can adversely affect human health, including those capable of disrupting genetic structures in cells. One of the key tools in genotoxicology that enables the assessment of DNA damage at the level of individual cells is the comet assay. Since its introduction in the 1980s, this method has undergone significant modifications aimed at increasing its sensitivity, specificity, and versatility of application. This review outlines the principles and basic protocols of the method, discusses modifications of the classical comet assay; methods for improving detection capability of different types of DNA damage and assessment of repair processes. A search for relevant studies published in the databases Scopus, Web of Science, PubMed, Russian Research Citation Index, for the period 1984–2024 was performed. The review includes information from forty seven full-text sources.

Conclusion. The DNA comet assay is becoming an increasingly in-demand tool in research aimed at ensuring the sanitary and epidemiological well-being of the population, identifying environmental and industrial factors dangerous to the genetic health of the population, assessing the individual sensitivity of human cells to genotoxicants to determine risk groups and implement preventive measures. The development of new protocols involving DNA repair enzymes specific to particular types of damage, along with the use of fluorescent dyes, allows evaluating DNA damage and repair processes. The use of cryopreservation of whole blood and lymphocytes for subsequent DNA analysis enables large-scale, long-term epidemiological studies. Automating comet assay analysis using deep learning methods will improve the accuracy of identifying DNA damage types, which is essential for clarifying the mechanisms of action of specific substances.

Keywords: Comet Assay; modifications; genotoxicants; review

For citation: Gorenskaya O.V., Demidova Yu.V., Kotnova A.P., Ilyushina N.A. Possibilities of application of DNA Comet Assay (literature review). *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2025; 104(10): 1369–1374. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-10-1369-1374> <https://elibrary.ru/qjfrux> (In Russ.)

For correspondence: Nataliya A. Ilyushina, e-mail: ilushina.na@fncg.ru

Contribution: Gorenskaya O.V. — data collection and analysis, writing and editing the text; Demidova Yu.V. — data collection; Kotnova A.P. — data collection; Ilyushina N.A. — the study concept and design, data collection and analysis, writing and editing the text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was carried out within the framework of the state task No. 121090800086-7.

Received: June 30, 2025 / Accepted: October 15, 2025 / Published: November 14, 2025

Введение

В настоящее время существует множество методов выявления неблагоприятных факторов, способных влиять на здоровье человека, в том числе нарушать генетические структуры в клетках. При изучении генотоксического (мутагенного) действия химических веществ требуется оценить их способность индуцировать разные типы повреждений генетического материала — первичные повреждения ДНК, генные, хромосомные, геномные мутации [1].

Для оценки повреждений ДНК ранее широко использовали метод внепланового синтеза, позволяющий измерять репаративный синтез ДНК после эксцизии (вырезания) участка молекулы ДНК, содержащего повреждение. Метод основан на измерении уровня меченного тритием тимидина, включаемого в ДНК в условиях подавления основного репликативного синтеза (например, в присутствии гидроксимочевина, блокирующей клетки в G1-S-фазе клеточного цикла) [2, 3]. Основным недостатком метода было использование радиоактивной метки, что небезопасно для исследователя и требует специальных условий проведения эксперимента и оборудования.

В последнее время всё более широкое применение находит метод электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет), основанный на визуализации фрагментации ДНК, возникающей в результате одно- или двухцепочечных разрывов, с использованием флуоресцентного красителя [1, 4, 5]. Метод ДНК-комет широко используется для оценки генотоксичности различных химических соединений, таких как пестициды, промышленные химикаты (например, тяжёлые металлы, растворители), лекарственные препараты, а также наночастиц и новых материалов в экспериментах *in vivo* и *in vitro* на клетках практически всех эукариотических организмов, в том числе дрожжей [6]. Кометный анализ применяют для мониторинга окружающей среды и здоровья человека [7–9].

ДНК-кометный анализ включён в качестве одного из тестов в систему оценки генотоксичности и прогноза мутагенности и канцерогенности в клетках млекопитающих [2], используется в качестве индикаторного теста при проведении эпидемиологических, экспериментальных и клинических исследований [1, 10]. По мнению Дурнева и соавт. [1], метод позволяет решить актуальную задачу оценки потенциальной генотоксичности *in vivo*: органо- и тканеспецифичность действия и даёт возможность более детально исследовать патогенетическое значение повреждений ДНК.

Цель работы — обобщение современных представлений о методе ДНК-комет, его модификациях и перспективах совершенствования.

Принцип метода и классические протоколы

Метод ДНК-комет был впервые предложен в 1980-х годах [11, 12] как метод обнаружения радиационно-индуцированных разрывов ДНК в отдельных клетках млекопитающих. Он стал одним из стандартных инструментов оценки генотоксичности благодаря своей относительной простоте, высокой чувствительности и возможности анализа повреждений ДНК на уровне отдельных клеток.

Принцип кометного анализа основан на особенностях пространственной организации ДНК в ядре: хроматин представлен многоуровневыми динамическими петлями [13], конформация которых обеспечивается гистоновыми и негистоновыми ядерными белками. Петли доменов хроматина «заякорены» на ламине, которая прилегает к внутренней ядерной мембране [14]. При проведении кометного анализа белки удаляются на стадии лизиса, и ДНК остаётся в компактном спирализованном состоянии. Однако при наличии разрывов цепей ДНК сверхскрученность петель в процессе релаксации ослабевает. В результате при проведении электрофореза часть петель притягивается к аноду, образуя характерный «хвост кометы», видимый при световой микроскопии. Относительное количество ДНК в хвосте отражает частоту разрывов.

Разработаны методические рекомендации для проведения кометного анализа^{1,2,3}. В зависимости от типа повреждений ДНК (одноцепочечные или двухцепочечные разрывы, щёлочнолабильные сайты) используют различные протоколы исследований: щелочной и нейтральной [15, 16].

Щелочной кометный анализ способен выявлять разрывы цепей ДНК и щёлочнолабильные сайты в ядре практически всех типов эукариотических клеток. Щёлочнолабильные сайты представляют собой, по сути, любую модификацию ДНК, которая приводит к разрыву цепей в щелочных условиях, например, пуриновые/апириимидиновые участки. В этой версии метода дополнительный этап денатурации и электрофорез проводят в щелочных условиях ($\text{pH} > 13,0$). Во время щелочной денатурации ДНК переходит в однонитевую форму, щёлочнолабильные сайты реализуются в одонитевые разрывы. Хвост комет образуют дву- и одонитевые фрагменты ДНК. Нейтральный протокол ($\text{pH} \sim 8,0$) применяют для обнаружения двухцепочечных разрывов.

Для анализа ДНК-комет используют микроскоп, совмещённую с ним высокочувствительную камеру и специализированное программное обеспечение, которое позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. Для количественной оценки повреждения ДНК на уровне отдельных клеток учитывают следующие параметры: длина хвоста кометы (отражает степень миграции фрагментов ДНК из ядра клетки под действием электрического поля), процент ДНК в хвосте кометы (доля ДНК, которая мигрировала из ядра в хвост кометы, выражается в процентах от общей ДНК клетки), момент хвоста (интегральный показатель, рассчитывается как произведение длины и процента ДНК в хвосте кометы), олив-момент (учитывает смещение центра массы ДНК в хвосте относительно центра ядра).

Для выявления корреляции описанных показателей с повреждениями ДНК и выбором параметра, подходящего для использования в рутинных генотоксикологических исследованиях, в работе [17] сопоставили данные, полученные в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* и характеризующие повреждение ДНК при действии на клетки крови человека ионизирующей радиации и различных химических факторов. Результаты показали, что параметр «процент ДНК в хвосте кометы» можно считать наиболее значимым и простым для понимания. Его рекомендовано использовать для повышения воспроизводимости результатов и сопоставления результатов работ различных исследователей при оценке повреждений ДНК. Этот показатель наиболее часто встречается в работах, опубликованных после 2010 г. [18]. Надёжность метода при оценке способности загрязняющих веществ вызывать повреждения ДНК в окружающей и производственной среде подтверждена и в системном обзоре [19]. Авторы указывают на необходимость стандартизации методологических условий, влияющих на измеряемые показатели («длина хвоста», «процент ДНК в хвосте кометы», «момент хвоста»), для сопоставления данных, собранных в лабораториях по всему миру.

Типы клеток

Метод ДНК-комет подходит для оценки широкого спектра повреждений ДНК и применим для различных типов клеток (например, лимфоциты, клетки печени и костного мозга, эпителиальные клетки и др.) в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. В большинстве случаев биомониторинг человека проводят на клетках крови, поскольку кровь является легко-

¹ МР 4.2.0014–10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2010.

² МУ 1.2.2520–09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2009.

³ МУ 1.2.3364–16 «Оценка мутагенной активности пестицидов». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016.

доступным биологическим материалом и содержит клетки разных типов [20, 21]. ДНК-кометный анализ может быть проведён и на других типах клеток, например, лимфоцитах слюны, клетках букального эпителия [22], хрусталика, половых клетках [19]. Описан протокол проведения кометного анализа НераCometChip на гепатоцитах. Этот способ обладает высокой пропускной способностью и чувствительностью [23].

Для установления базовых значений уровня повреждения ДНК лимфоцитов человека по проценту ДНК в хвосте комет, а также возможного влияния физиологического состояния организма, образа жизни и воздействия генотоксических агентов была создана база из 19 320 значений, объединяющая данные 105 исследований, проведённых 44 лабораториями в 26 странах в период с 1999 по 2019 г. [6]. Результаты метаанализа показали, что базовый уровень повреждения ДНК лимфоцитов (процент ДНК в хвосте комет) у лиц контрольных групп (8229 человек — доноры, не имеющие злокачественных новообразований, болезней системы кровообращения, диабета, ожирения, почечной недостаточности, воспалительных патологий и др.) варьирует в пределах $7,4 \pm 8,8$ (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение), медианное значение (межквартильные диапазоны между 75% и 25%) — 4,5 (1,6–9,9). Проведённый метаанализ данных показал отсутствие влияния возраста на показатель «процент ДНК в хвосте комет», хотя результаты многомерного моделирования случайных эффектов предполагают более высокий уровень повреждения ДНК в старших возрастных группах.

Преимущества кометного анализа связаны с условной простотой и дешёвизной метода, а также его быстротой и точностью. Метод требует сравнительно небольших объёмов образцов и может быть выполнен на замороженной крови или лимфоцитах [24]. В работах [25, 26] продемонстрировано, что криоконсервация цельной крови и лимфоцитов позволяет сохранять образцы для долгосрочного анализа без значительной потери качества данных. Протокол криоконсервирования цельной крови человека для использования в кометном анализе был оптимизирован путём удаления избытка плазмы перед добавлением среды для замораживания [27]. Высокая воспроизводимость метода при использовании криоконсервированных образцов достигнута и в работе [20]. Результаты работ свидетельствуют о том, что метод кометного анализа может применяться и в крупномасштабном биомониторинге здоровья человека, и в долгосрочных эпидемиологических исследованиях.

Модификации метода ферментами репарации

Многие повреждающие ДНК агенты непосредственно не вызывают одно- и двухцепочечных разрывов. Модификации метода кометного анализа ферментами, участвующими в репарации, позволяют обнаруживать повреждения ДНК, которые не могут быть выявлены стандартными методами, — окислённые и алкилированные азотистые основания, циклобутан-пиримидиновые димеры, неправильно включённые урациловые участки, апуриновые/апириимидиновые (АП-) сайты, некоторые аддукты ДНК и др. [8]. При проведении модифицированного кометного анализа непосредственно после стадии лизиса клетки, находящиеся в агарозе, обрабатывают ферментами. В течение инкубационного периода фермент индуцирует разрывы, которые анализируются в соответствии со стандартным протоколом анализа комет.

Фермент эндонуклеаза III (Endo III), выделенный из *E. coli*, как и его гомолог у человека NTHL1, обладает субстратной специфичностью к модифицированным (окислённым) пиримидиновым основаниям. Endo III способен распознавать широкий спектр окислённых пиримидинов, включая тимингликоль, 5-гидроксцитозин, урацилгликоль, цитозингликоль, 5-гидроксиурацил.

Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg) участвует в репарации 8-оксогуанина (8-охо-G) — одного из са-

мых распространённых окислительных повреждений ДНК. Основными субстратами Fpg *in vivo* являются окислённые пурины. Для удаления 8-охо-G млекопитающие используют и другой фермент, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазу (OGG1). Методом щелочного кометного анализа, модифицированного посредством использования ДНК-гликозилазы Endo III, OGG1 и Fpg, Dalberto и соавт. [28] оценили генотоксичность никотина и котинина (основной метаболит никотина) на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y. Результаты показали статистически значимое увеличение уровня разрывов ДНК по сравнению с контролем только при культивировании клеток с ферментом Fpg, что свидетельствовало об окислении пуринов, а не пиримидинов, при действии котинина и никотина. Показано, что для выявления окислённых оснований ДНК, индуцированных химическими соединениями, метод кометного анализа является более информативным, чем хроматографические методы, в которых во время подготовки образца происходит вторичное окисление, искажающее результаты. Так, при использовании фермента Fpg для выявления окислённых пуринов методом кометного анализа применяющая шадящую процедуру лизиса с минимальным риском вторичного окисления, связанного с методическими особенностями пробоподготовки [29].

Алкилирующие агенты реагируют с пуриновыми основаниями, в частности гуанином, по N-7. При значениях pH, близких к нейтральному, в остатках 7-алкилгуанина в составе алкилированной ДНК не происходит раскрытия имидазольного кольца. В щелочных условиях при денатурации ДНК и раскрытии кольца N-7 алкилгуанины распознаются и репарируются ферментом Fpg. Так, Muruzabal и соавт. [30] продемонстрировали, что сайты, чувствительные к Fpg, не обнаруживались в клетках, обработанных алкилирующим агентом метилметансульфонатом, если лизис проводился при pH 7,0, но были обнаружены при pH 10,0.

В качестве модели для оценки генотоксичности химических факторов *in vitro* на основе модифицированного Fpg анализа комет разработана совместная культура первичных гепатоцитов и спленоцитов мыши [31]. Эта модель продемонстрировала высокую чувствительность и позволила идентифицировать чувствительные к Fpg участки ДНК при действии генотоксикантов. Pellegri и соавт. [32] стандартизировали протокол кометного анализа в комбинации с Fpg для биомониторинга уровня загрязнённости пресноводных сред. В качестве объекта использовали *Daphnia magna* в возрасте 48 ч, подвергшихся в течение 24 ч воздействию 23 образцов воды. Проведённый модифицированный кометный анализ позволил выявить присутствие загрязняющих веществ, вызывающих окислительный стресс.

Фермент *uvrABC* представляет собой бактериальную АТФ-зависимую эксцизионную эндонуклеазу, состоящую из трёх субъединиц: *uvrA*, *UvrB* и *UvrC*. Этот белковый комплекс распознаёт такие субстраты, как сшивки белок-ДНК, окислённые основания, межцепочечные сшивки, объёмные аддукты ДНК, присутствие рибонуклеотидов в ДНК и др. Использование этого фермента в сочетании с кометным анализом позволяет детектировать повреждения, вызванные, например, ультрафиолетовым излучением [33]. Ограничения в использовании этого фермента связаны с тем, что он эволюционно оптимизирован для бактериальной ДНК, эффективность его работы на ДНК эукариотических организмов может быть снижена.

Урацил-ДНК-гликозилаза (Udg) обнаруживает и удаляет урацил, присутствующий как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной ДНК [34]. Наличие остатков урацила в ДНК является результатом спонтанного дезаминирования цитозина или ошибок репликации. Udg также способен распознавать, но менее эффективно, продукты дезаминирования ДНК. Модифицированный ферментом Udg кометный анализ применяют, в частности, для оценки геномной нестабильности в ответ на содержание фолиевой кислоты (дефицит или избыток) в клетках человека [35].

Для выявления повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым излучением, в сочетании с кометным анализом используют фермент T4endoV. Это ДНК-гликозилаза, специфичная для узнавания пиримидиновых димеров, индуцируемых преимущественно средневолновым ультрафиолетовым излучением (UVB). Так, в работе [36] методом секвенирования выявляли циклобутановые пиримидиновые димеры в суспензионных культурах активно растущих клеток протонемы мха *Physcomitrella patens* после облучения ультрафиолетом и отслеживали кинетику их удаления при помощи кометного анализа, модифицированного ферментом T4endoV.

Методические аспекты проведения ДНК-кометного анализа для выявления модифицированных оснований и АР-сайтов в ДНК подробно изложены в [37].

В обзоре [30] подробно рассмотрены более редкие варианты сочетаний метода кометного анализа и таких ферментов, как экзонуклеаза III (ExoIII), 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза II (AlkA), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (hOGG1), эндонуклеаза IV (EndoIV), выполняющий функцию гликозилазы ДНК белок NTH1 (endonuclease III-like protein 1), 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза (AlkD), эндонуклеаза APE1 и алкиладенин-ДНК-гликозилаза человека (hAAG), распознающие и устраняющие специфические повреждения ДНК. Комбинированное использование ферментов в методе ДНК-комет позволяет повысить чувствительность и специфичность детекции различных типов повреждений ДНК.

Информативность модифицированного ферментами кометного анализа несомненна, и это обуславливает необходимость расширения существующих методических руководств. В системном обзоре [30] отмечено, что использование ферментов при проведении ДНК-кометного анализа позволит выявлять многие повреждения ДНК, выяснять механизм действия генотоксических агентов, а также оценивать интенсивность репарационных процессов в клетке после воздействия.

Другие возможности и рекомендации

ДНК-кометный анализ даёт возможность оценить активность репарационных процессов в ДНК, однако такая работа имеет ряд методических особенностей. Так, важно оценить кинетику репарации, которая зависит от внешних повреждающих факторов и индивидуальных особенностей организма (уровня экспрессии репарационных ферментов, наличия мутаций в генах репарации и др.). Ключевыми параметрами кинетики репарации являются скорость восстановления ДНК и полупериод репарации (время, за которое уровень повреждений снижается в два раза). Кроме того, репарация ДНК в доступных для анализа тканях должна отражать активность репарации в целевых тканях [38].

Для обнаружения объёмных аддуктов используют ингибиторы синтеза ДНК — афидиколин, гидроксимочевину. Эти соединения ингибируют репликацию ДНК, при этом накапливаются разрывы, образующиеся при эксцизионной репарации, что соответственно увеличивает процент ДНК в хвосте комет при проведении кометного анализа [39].

Методом ДНК-кометного анализа с использованием эндонуклеаз рестрикции HpaII и MspI в работе [40] оценивали эпигенетический статус клеток линии HepG2. Применение эндонуклеазы рестрикции MspI (разрезает ДНК по 5-метилцитозину и используется для изучения статуса метилирования ДНК высших организмов, в том числе человека) в сочетании с методом кометного анализа позволило выявить изменения в метилировании ДНК клеток линии HeLa-S3 в ответ на воздействие химиотерапевтических препаратов [41].

Модифицированный метод ДНК-комет, названный Comet-X, был разработан для выявления поперечных межцепочечных сшивок в ДНК [42]. Авторы предложили так называемый обратный кометный анализ — чем меньше по-

казатель «процент ДНК в хвосте комет», тем больше связей между цепями образовалось в ДНК после воздействия.

Следует отметить, что повреждения ДНК, которые мы можем выявить методом кометного анализа, обычно характеризуют немедленный ответ на действующий фактор. Эффекты хронического или пролонгированного действия этим методом оценить сложно. Однако в работе [29] получены доказательства того, что уровни повреждения ДНК в циркулирующих лимфоцитах людей, определяемые методом кометного анализа в течение длительного времени, могут быть предикторами риска развития хронических болезней и смертности и характеризовать нестабильность генома.

В работе [43] предложено модифицировать метод кометного анализа, увеличив количество гелей на предметном стекле до 12 (обычный формат — один или два геля на предметном стекле, по одному образцу). Это позволило авторам, помимо повышения производительности и экономии времени, создать практически идентичные условия для анализа активности ферментов репарации, а также совместить ДНК-кометный анализ с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) для идентификации конкретных генов или участков хромосом, подвергшихся повреждению. Такой мультиплексный кометный анализ позволяет одновременно анализировать несколько различных типов повреждений ДНК, используя для каждого разные флуоресцентные метки.

Кометный анализ модифицирован для выявления повреждений ДНК в трёхмерных структурах, таких как сфероиды или ткани, что позволяет проводить эксперименты *in vitro* приближённо к условиям *in vivo* [44]. 3D-кометный анализ с использованием фермента Fpg показал генотоксичность колхицина, гидрохлорида хлорпромазина и метилметансульфоната в сферических культурах гепатоцитов человека в трёхмерном пространстве (3D-сфероиды).

Для сравнения экспериментальных данных, полученных методом кометного анализа, Møller и соавт. [45] предложили систему рекомендаций для авторов, которую назвали MIRCA (Minimum Information for Reporting on the Comet Assay). Согласно этой системе, следует указывать в публикациях «желательную» и «необходимую» информацию. «Необходимая» информация относится к точным деталям, которые важны для оценки качества экспериментальной работы, а «желательная» информация связана с техническими проблемами, которые могут возникнуть при повторении экспериментов. Соблюдение рекомендаций MIRCA должно гарантировать, что данные, полученные в ДНК-кометном анализе, могут быть легко интерпретированы и независимо проверены другими исследователями. Опубликованы стандартизированные протоколы проведения кометного анализа на различных типах клеток [8], а также рекомендации по описанию и статистическому анализу полученных результатов [18, 46].

Для более точного выявления и классификации повреждений ДНК используют методы глубокого обучения для обработки компьютерных изображений [47]. Объединение различных модификаций метода ДНК-комет и искусственного интеллекта важно для более точного анализа типов повреждений ДНК.

Заключение

Уровень повреждения ДНК, определяемый методом кометного анализа, является важным биомаркером генотоксического воздействия и состояния клеточной ДНК. Для повышения точности и воспроизводимости результатов необходима тщательная подготовка образцов и контроль условий проведения эксперимента в зависимости от типа клеток. Стандартизация протоколов и внедрение автоматизированных систем анализа повышают точность выявления и классификации повреждений ДНК. Разработка новых протоколов с использованием ферментов репарации для специфических типов повреждений даст возможность оценить конкретные нарушения целостности ДНК. Ис-

пользование флуоресцентных красителей позволяет локализовать специфические нуклеотидные последовательности и одновременно анализировать несколько типов повреждений ДНК. Использование криоконсервации цельной крови и лимфоцитов обеспечивает возможность долгосрочного хранения образцов без потери качества данных и проведения крупномасштабных долгосрочных эпидемиологических исследований. Автоматизация анализа комет с помощью методов глубокого обучения повысит точность идентифика-

ции типов повреждений ДНК, что необходимо для выяснения механизмов действия конкретных веществ.

Таким образом, метод ДНК-комет является одним из наиболее востребованных инструментов для оценки генотоксичности химических веществ и изучения механизмов повреждения ДНК. Высокая чувствительность, универсальность и возможность применения в различных условиях делают его незаменимым в исследованиях, направленных на обеспечение экологической и биологической безопасности.

Литература

(п.п. 2–9, 11–33, 35, 36, 38–47 см. References)

- Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Еремина Н.В. *Генетическая токсикология*. М.: Миттель Пресс; 2022. <https://elibrary.ru/fbwcbt>
- Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Метод ДНК-комет в генотоксикологических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2011; 90(5): 86–90. <https://elibrary.ru/ohikpp>
- Алексеева И.В., Бакман А.С., Яковлев Д.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Сравнительный анализ активности полиморфных вариантов урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 и MBD4. *Молекулярная биология*. 2021; 55(2): 277–88. <https://doi.org/10.31857/S0026898421020026> <https://elibrary.ru/ftnumq>
- Илюшина Н.А., Егорова О.В., Котнова А.П., Горенская О.В., Аверьянова Н.С. Схема «Процедура проведения ДНК-кометного анализа для выявления модифицированных оснований и АР-сайтов в ДНК». Патент РФ 146952; 2025. <https://elibrary.ru/yfwpbp>
- Durnev A.D., Zhanataev A.K., Eremina N.V. *Genetic Toxicology [Geneticheskaya toksikologiya]*. Moscow: Mittel Press; 2022. <https://elibrary.ru/fbwcbt> (in Russian)
- OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in Vivo; 1997. Available at: https://oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/1997/07/test-no-486-unscheduled-dna-synthesis-uds-test-with-mammalian-liver-cells-in-vivo_g1gh2977/9789264071520-en.pdf
- OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 482: Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells *in vitro*; 1986. Available at: <https://oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/replaced-and-deleted-test-guidelines.html>
- Azqueta A., Collins A.R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 2013; 87(6): 949–68. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Rajendran M.S., Prabhakaran R., Vignesh S., Nagarathinam B. Comet assay: is it a sensitive tool in ecogenotoxicology? In: Gothandam K.M., Srinivasan R., Ranjan S., Dasgupta N., Lichtfouse E., eds. *Environmental Biotechnology Volume 4. Environmental Chemistry for a Sustainable World*, vol. 68. Cham: Springer; 2021: 181–99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77795-1_6
- Milić M., Ceppi M., Bruzzzone M., Azqueta A., Brunborg G., Godschalk R., et al. The hCOMET project: International database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2021; 787: 108371. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108371>
- Collins A., Koppen G., Valdiglesias V., Dusinska M., Kruszewski M., Möller P., et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2014; 759: 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.10.001>
- Collins A., Möller P., Gajski G., Vodenková S., Abdulwahed A., Anderson D., et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat. Protoc.* 2023; 18(3): 929–89. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Möller P., Loft S. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118(8): 1126–36. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901725>
- Zhanatayev A.K., Durnev A.D., Seredenin S.B. DNA comet assay in genotoxicological studies. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2011; 90(5): 86–90. <https://elibrary.ru/ohikpp> (in Russian)
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123(1): 291–8. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175(1): 184–91. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Bohn M., Heermann D.W. Diffusion-driven looping provides a consistent framework for chromatin organization. *PLoS One*. 2010; 5(8): e12218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012218>
- Dittmer T.A., Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol.* 2011; 12(5): 222. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35(3): 206–21. <https://vk.cc/cR4KWd>
- Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26(3): 249–61. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Kumaravel T.S., Jha A.N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.* 2006; 605(1–2): 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.03.002>
- Möller P., Azqueta A., Boutet-Robinet E., Koppen G., Bonassi S., Milić M., et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat. Protoc.* 2020; 15(12): 3817–26. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Valverde M., Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat. Res.* 2009; 681(1): 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.001>
- Ladeira C., Koppen G., Scavone F., Giovannelli L. The comet assay for human biomonitoring: Effect of cryopreservation on DNA damage in different blood cell preparations. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 843: 11–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.002>
- Ladeira C., Möller P., Giovannelli L., Gajski G., Haveric A., Bankoglu E.E., et al. The comet assay as a tool in human biomonitoring studies of environmental and occupational exposure to chemicals – a systematic scoping review. *Toxics*. 2024; 12(4): 270. <https://doi.org/10.3390/toxics12040270>
- Russo C., Acito M., Fatigoni C., Villarini M., Moretti M. B-comet assay (comet assay on buccal cells) for the evaluation of primary DNA damage in human biomonitoring studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17(24): 9234. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249234>
- Owiti N.A., Kaushal S., Martin L., Sly J., Swartz C.D., Fowler J., et al. Using the HepaCometChip assay for broad-spectrum DNA damage analysis. *Curr. Protoc.* 2022; 2(9): e563. <https://doi.org/10.1002/cpz1.563>
- Russo P., Lamonaca P., Milic M., Rojas E., Prinzi G., Cardaci V., et al. Biomarkers of DNA damage in COPD patients undergoing pulmonary rehabilitation: Integrating clinical parameters with genomic profiling. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 843: 111–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.003>
- Gajski G., Gerić M., Živković Semren T., Tariba Lovaković B., Oreščanin V., Pizent A. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage from frozen human whole blood samples: Implications for human biomonitoring. *Toxicol. Lett.* 2020; 319: 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.010>
- Plitta-Michalak B.P., Ramos A., Stepien D., Trusiak M., Michalak M. The comet assay as a method for assessing DNA damage in cryopreserved samples. *Cryo. Letters*. 2024; 45(1): 1–15.
- Koppen G., De Prins S., Jacobs A., Nelen V., Schoeters G., Langie S.A.S. The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2018; 33(1): 41–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex034>
- Dalberto D., Nicolau C.C., Garcia A.L.H., Nordin A.P., Grivicich I., Silva J.D. Cytotoxic and genotoxic evaluation of cotinine using human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Genet. Mol. Biol.* 2020; 43(2): e20190123. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0123>
- Bonassi S., Ceppi M., Möller P., Azqueta A., Milić M., Neri M., et al. DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 16793. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95976-7>
- Muruzabal D., Sanz-Serrano J., Sauvaigo S., Gützkow K.B., López de Cerain A., Vettorazzi A., et al. Novel approach for the detection of alkylated bases using the enzyme-modified comet assay. *Toxicol. Lett.* 2020; 330: 108–17. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.021>
- Meng T., Zhang M., Song J., Dai Y., Duan H. Development of a co-culture model of mouse primary hepatocytes and splenocytes to evaluate xenobiotic genotoxicity using the medium-throughput Comet assay. *Toxicol. In Vitro*. 2020; 66: 104874. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104874>

32. Pellegrini V., Gorbi G., Buschini A. DNA damage detection by Comet Assay on *Daphnia magna*: Application in freshwater biomonitoring. *Sci. Total. Environ.* 2020; 705: 135780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135780>
33. Dusinska M., Collins A.R. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim.* 1996; 24(3): 405–11.
34. Alekseeva I.V., Bakman A.S., Iakovlev D.A., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Comparative analysis of the activity of the polymorphic variants of human uracil-DNA-glycosylase SMUG1 and MBD4. *Molekulyarnaya biologiya.* 2021; 55(2): 277–88. <https://doi.org/10.31857/S0026898421020026> <https://elibrary.ru/ftnumq> (in Russian)
35. Catala G.N., Bestwick C.S., Russell W.R., Tortora K., Giovannelli L., Moyer M.P., et al. Folate, genomic stability and colon cancer: The use of single cell gel electrophoresis in assessing the impact of folate in vitro, in vivo and in human biomonitoring. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 843: 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.08.012>
36. Holá M., Vágnerová R., Angelis K.J. Mutagenesis during plant responses to UVB radiation. *Plant. Physiol. Biochem.* 2015; 93: 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.013>
37. Ilyushina N.A., Egorova O.V., Kotnova A.P., Gorenskaya O.V., Averyanova N.S. Scheme "Procedure for conducting Comet Assay to identify modified bases and AP sites in DNA". Patent RF N 146952; 2025. <https://elibrary.ru/ylwpbp> (in Russian)
38. Azqueta A., Langie S.A.S., Boutet-Robinet E., Duthie S., Ladeira C., Möller P., et al. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2019; 781: 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.03.002>
39. Ngo L.P., Owiti N.A., Swartz C., Winters J., Su Y., Ge J., et al. Sensitive CometChip assay for screening potentially carcinogenic DNA adducts by trapping DNA repair intermediates. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48: e13–e13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1077>
40. Wentzel J.F., Gouws C., Huysamen C., Dyk Ev., Koekemoer G., Pretorius P.J. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Anal. Biochem.* 2010; 400(2): 190–4. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.008>
41. Townsend T.A., Parrish M.C., Engelward B.P., Manjanatha M.G. The development and validation of EpiComet-Chip, a modified high-throughput comet assay for the assessment of DNA methylation status. *Environ. Mol. Mutagen.* 2017; 58: 508–21. <https://doi.org/10.1002/em.22101>
42. Danson S., Ranson M., Denny O., Cummings J., Ward T.H. Validation of the comet-X assay as a pharmacodynamic assay for measuring DNA cross-linking produced by the novel anticancer agent RH1 during a phase I clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 60(6): 851–61. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0432-9>
43. Shaposhnikov S., Azqueta A., Henriksson S., Meier S., Gaivão L., Huskisson N.H., et al. Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Toxicol. Lett.* 2010; 195(1): 31–4. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.017>
44. Elje E., Hesler M., Rundén-Pran E., Mann P., Mariussen E., Wagner S., et al. The comet assay applied to HepG2 liver spheroids. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019; 845: 403033. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.006>
45. Möller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000; 9(10): 1005–15.
46. Azqueta A., Ladeira C., Giovannelli L., Boutet-Robinet E., Bonassi S., Neri M., et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2020; 783: 108288. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.108288>
47. Softić A., Merdović N., Dlakić V., Mrdanović E., Mahmutović L., Ler D., et al. Comet Assay in the Digital Era: A Review of the Use of Artificial Intelligence for the Analysis of DNA Damage Based on the Results of the Comet Assay. In: Jarm T., Šmerc R., Mahnić-Kalamiza S., eds. *9th European Medical and Biological Engineering Conference. IFMBE Proceedings, vol 112*. Cham: Springer; 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-031-61625-9_20

Сведения об авторах

Горенская Ольга Владимировна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. отд. генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия. E-mail: gorenskaya.ov@fncg.ru

Демидова Юлия Вячеславовна, мл. науч. сотр. отд. генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия. E-mail: demidova.yu@fncg.ru

Котнова Алина Петровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия. E-mail: kotnova.ap@fncg.ru

Илюшина Наталья Алексеевна, доктор биол. наук, зав. отд. генетической токсикологии ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи, Россия. E-mail: ilyushina.na@fncg.ru

Information about the authors

Olga V. Gorenskaya, PhD (Biology), docent, senior researcher, Department of genetic toxicology, Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522> E-mail: gorenskaya.ov@fncg.ru

Yuliya V. Demidova, junior research, Department of genetic toxicology, Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-5356-2600> E-mail: demidova.yu@fncg.ru

Alina P. Kotnova, PhD (Biology), senior researcher, Department of genetic toxicology, Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety of the Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4333-9288> E-mail: kotnova.ap@fncg.ru

Natalia A. Ilyushina, DSc (Biology), head, Department of genetic toxicology, Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465> E-mail: ilyushina.na@fncg.ru