

ТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭТАПА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В МЕТОДЕ ДНК-КОМЕТ

© А.К. Жанатаев, Е.А. Анисина, К.Л. Плигина, А.А. Лисицын, А.Д. Дурнев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Москва

Для цитирования: Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Плигина К.Л., и др. Технические аспекты проведения этапа электрофореза в методе ДНК-комет // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 2. – С. 203–214. <https://doi.org/10.17816/ecogen16239>.

Поступила: 24.09.2019

Одобрена: 20.01.2020

Принята: 23.06.2020

☼ Причины меж- и внутрилабораторной варибельности данных, полученных в исследованиях методом ДНК-комет, на сегодняшний день не до конца ясны. Гель-электрофорез является определяющим этапом при использовании метода анализа поврежденности ДНК единичных клеток. В настоящей работе проведена сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в варибельность оцениваемой поврежденности ДНК. Только для одной камеры измеренная напряженность совпала с расчетной — 1 В/см, тогда как для четырех варьировала от 0,6 до 2,0 В/см. Оцененные в одних и тех же образцах клеток почек мышей значения поврежденности ДНК различались между камерами до 4,7 крат для индуцированной и до 10 крат для спонтанной поврежденности ДНК. Выявлена высокая локальная вариация напряженности электрического поля и температуры раствора по площадке камер и варибельность поврежденности ДНК в идентичных образцах клеток в условиях одного электрофореза. Таким образом, несоответствие при электрофорезе расчетной (теоретической) и фактической напряженности электрического поля может служить причиной межлабораторной варибельности данных метода ДНК-комет. Рециркуляция раствора в ходе электрофореза позволяет значительно снизить внутриэкспериментальную и внутрилабораторную варибельность результатов.

☼ **Ключевые слова:** метод ДНК-комет; повреждение ДНК; меж- и внутрилабораторная варибельность; электрофоретическая камера; напряженность электрического поля; напряжение.

TECHNICAL ASPECTS OF THE ELECTROPHORESIS STAGE IN THE COMET ASSAY

© А.К. Zhanataev, Е.А. Anisina, К.Л. Pligina, А.А. Lisitsyn, А.Д. Durnev

Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Cite this article as: Zhanataev AK, Anisina EA, Pligina KL, et al. Technical aspects of the electrophoresis stage in the comet assay. *Ecological genetics*. 2020;18(2):203-214. <https://doi.org/10.17816/ecogen16239>.

Received: 24.09.2019

Revised: 20.01.2020

Accepted: 23.06.2020

☼ Inter- and intralaboratory variability of results is still a serious issue in the comet assay. There are several technical conditions of procedure, which may critically affect the results and electrophoresis terms were identified as main. A comparative assessment of the expected and actual electric field strength in five electrophoretic tanks and the contribution of the revealed differences to the variability in DNA damage carried out. Only for one tank, the measured electric field strength coincided with the expected 1 V/cm, while for four it ranged from 0.6 to 2.0 V/cm. The values of DNA damage assessed in the same samples of mouse kidney cells differed between tanks up to 4.7-fold for induced and up to 10-fold for spontaneous DNA damage. High local variations in the electric field strength and solution temperature across the platform as well as in %DNA in the tail of identical cell samples within electrophoresis runs also revealed. These variations were reduced by recirculation of electrophoresis solution. The results show that discrepancy between the estimated and the actual electric field strength can be reason of inter-laboratory variation of the comet assay results. Recirculation of the solution during electrophoresis will be useful to control of intra-laboratory and intra-assay variations.

☼ **Keywords:** comet assay; inter- and intralaboratory variability; DNA damage; electric field strength; voltage; electrophoresis tank.

ВВЕДЕНИЕ

Оценка уровней первичных повреждений ДНК в качестве биомаркера в медико-биологических и генотоксикологических исследованиях *in vitro*

и *in vivo* получила широкое распространение с внедрением в практику метода гель-электрофореза отдельных клеток (SCGE, метод ДНК-комет) [1, 2].

Важными характеристиками метода, в особенности при использовании в качестве экспертного теста в генотоксикологии, является его точность и воспроизводимость. Меж- и внутрилабораторная вариабельность данных, получаемых методом ДНК-комет, остается нерешенной проблемой, порождающей получение неопределенных или противоречивых данных [3, 4].

Европейской группой по валидации метода ДНК-комет (The European Comet Assay Validation Group, ECVAG) были проведены масштабные международные сличительные испытания, целью которых явилось определение меж- и внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости данных метода ДНК-комет [5, 6]. Результаты исследований продемонстрировали высокую вариабельность данных между лабораториями, причиной которой, по заключению специалистов, явилось использование различных протоколов проведения метода. Было установлено, что критическими методическими факторами, определяющими результаты метода ДНК-комет, являются концентрация агарозного геля, длительность щелочной денатурации/электрофореза и напряженность электрического поля [3, 4, 7]. Температура раствора в ходе электрофореза также оказывает значительное влияние на оцениваемые показатели [8, 9]. Стандартизация экспериментальных процедур в последующих исследованиях ECVAG позволила снизить внутрилабораторную вариабельность результатов, однако межлабораторная осталась на высоком уровне [10–12].

Использование лабораториями различного оборудования *a priori* не позволяет полностью стандартизовать протокол исследования. Технические средства получения и анализа изображений ДНК-комет не оказывают существенного влияния на получаемые результаты, тогда как вклад в вариабельность данных особенностей используемого для этапа гель-электрофореза оборудования остается не до конца изученным [13–15].

Традиционно в методе ДНК-комет применяются электрофоретические камеры, предназначенные для агарозного гель-электрофореза нуклеиновых кислот или специально разработанные под метод камеры схожей конструкции. При этом напряженность электрического поля, как и для гель-электрофореза нуклеиновых кислот, определяется от-

ношением подаваемого напряжения к расстоянию между электродами [15, 16]. Неоднократно высказывалось мнение, что такой принцип расчета напряженности при щелочном электрофорезе ДНК-комет может быть ошибочным [4, 15, 17]. Вместе с тем, только в единственной работе на примере единичной электрофоретической камеры была проведена оценка соответствия между расчетной и фактической напряженностью электрического поля [3].

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в вариабельность показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение слайдов ДНК-комет. Исследование выполнено на половозрелых самцах мышей-гибридов F_1 (СВА × С57В1/6), массой 22–24 г, в возрасте 6–8 недель, полученных из питомника лабораторных животных «Столовая». Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях) и с одобрения Комиссии по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол № 6 от 04.07.19). С целью соответствия принципам 3R использовали образцы тканей животных, задействованных в качестве позитивного и негативного контроля в доклинических исследованиях лекарственных средств.

Для индукции повреждений ДНК животным вводили внутривентриально метилметансульфонат (ММС, Sigma-Aldrich) в дозе 30 мг/кг. Животным негативного контроля вводили тем же путем эквивалентные объемы физиологического раствора. Через 3 ч после введения физиологического раствора или ММС животных выводили из эксперимента путем декапитации. В первой серии экспериментов проводили оценку поврежденности ДНК в клетках почек, для второй серии экспериментов использовали клетки почек и костного мозга.

Выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга 2 мл пред-

варительно охлажденного до 6 °С фосфатно-солевого буфера, содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10 % диметилсульфоксид (рН 7,4). Почки измельчали в стеклянной пробирке в 3 мл того же буфера, раздавливали стеклянной палочкой и выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани.

Для каждой серии экспериментов готовили идентичные слайды из одной суспензии клеток. Для этого суспензию клеток в объеме 60 мкл вносили в пробирки с 240 мкл 1 % раствора легкоплавкой агарозы в фосфатно-солевом буфере, подогретой до 42 °С (микротермостат «Термит», Россия) и ресуспендировали. Готовили несколько таких пробирок. По 35 мкл раствора агарозы с клетками наносили на предварительно покрытые 1 % универсальной агарозой предметные стекла, накрывали покровным стеклом (24 × 24 мм) и помещали на лед. Покровные стекла осторожно удаляли, микропрепараты помещали в стеклянную кювету (тип Шиффендекер) с охлажденным до 4 °С лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl [рН 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1 % Triton X-100, 10 % диметилсульфоксид) и инкубировали в течение 1 ч [22]. После окончания лизиса слайды помещали в кюветы с охлажденным до 6 °С раствором для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, рН > 13) и инкубировали в течение 20 мин для денатурации ДНК и реализации щелочно-лабильных сайтов.

Электрофорез. Электрофорез проводили в электрофоретических камерах SE-2 (Хеликон), Sub-Cell 192 (BioRad), multiSUB Screen 32, CSL-COM40 и COMPAС-50 (Clever Scientific) в охлажденном до 6 °С растворе для электрофореза в течение 20 мин при начальной силе тока 300 мА (источник питания Power PRO 300, Cleaver Scientific). В камерах CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32 слайды с клетками располагали на 12 участках площадки камер, согласно схеме на рис. 1. Оставшееся пространство на площадке заполняли слайдами с агарозой без клеток таким образом, чтобы между слайдами не оставалось пробелов. В камеру SE-2 помещали 8 слайдов с клетками, которые полностью заполняли площадку камеры.

Подаваемое напряжение (В) равнялось расстоянию (см) между электродами камеры — расчет-

ная напряженность электрического поля 1 В/см. Определение фактической напряженности электрического поля проводили измерением разности потенциалов в электрофорезном растворе на высоте ~1 мм над слайдами (мультиметр Mastech MAS838 с позолоченными щупами) в начале электрофореза (0–1 минута) и в конце (19–20-я минута).

В первой серии экспериментов фактическую напряженность электрического поля определяли путем измерения разности потенциалов между двумя точками в срединной части площадки камеры, расположенными на расстоянии 10 см. Для камеры COMPAС-50 проводили измерение разности потенциалов между двумя точками на расстоянии 7,6 см (по ширине слайда) в левой и правой частях камеры погружением щупов в раствор для электрофореза на глубину 1 мм возле поверхности слайдов. Во второй серии экспериментов для оценки локальной напряженности электрического поля измеряли разность потенциалов на сантиметровом отрезке над слайдами с клетками (рис. 1). Измерение температуры электрофорезного раствора на этих же участках во второй серии экспериментов проводили с помощью цифрового пирометра DT-8860В (СЕМ). Во всех случаях определяли среднее значение для трех измерений. В экспериментах с рециркуляцией электрофорезного раствора использовали перистальтический насос ВЗ-V PER (Etatron D.S.) с устойчивым к щелочным

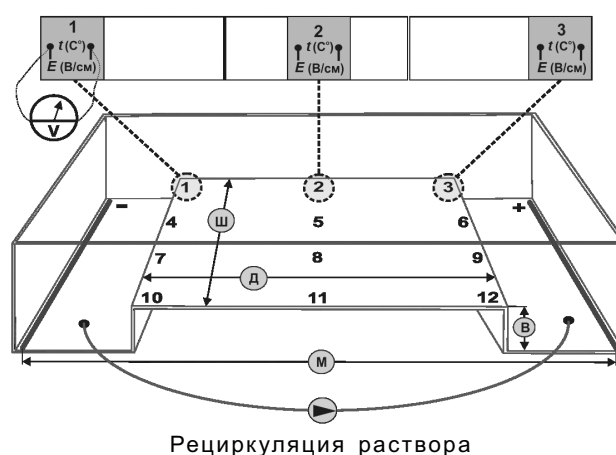


Рис. 1. Геометрические параметры камер, расположение слайдов с клетками на площадке и участки (обозначены цифрами 1–12) определения локальной напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора в камерах CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32. М — межэлектродное расстояние; В — высота, Д — длина, Ш — ширина площадки камер

растворам шлангом из сантопрена (Santoprene®). В ходе электрофореза раствор из катодного резервуара камеры подавался в анодный со скоростью, обеспечивающей смену 1,5 объемов раствора в резервуарах (рис. 1).

Анализ препаратов. После электрофореза слайды отмывали в фосфатно-солевом буфере, фиксировали в 70 % растворе этилового спирта в течение 15 мин, высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре. Слайды окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (Invitrogen, 1 : 10000 в ТЕ-буфере с 50 % глицерином, рН 8,5) в течение 20 мин. Цифровые изображения со слайдов (по 10–15 на слайд) получали на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия) с помощью камеры высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия) при общем увеличении $\times 800$ (оптическое — $\times 20$, цифровое — $\times 40$). На каждом слайде с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2 анализировали по 100 ДНК-комет и вычисляли среднее значение процентного содержания ДНК в «хвосте» ДНК-комет (ДНК в «хвосте», %).

Проверку гипотезы о равенстве средних значений показателя поврежденности ДНК для электрофореза с и без рециркуляции проводили с исполь-

зованием *U*-критерия Манна – Уитни. Проверку равенства генеральных дисперсий выборок проводили с использованием *F*-критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены геометрические характеристики использованных камер и измеренные в ходе электрофореза реальные значения напряженности электрического поля (первая серия экспериментов). Только для CSL-COM40 измеренное значение совпало с расчетным. Для камеры SE-2 различие между расчетным и измеренным значениями оказалось наименьшим. Камера Sub-Cell 192 комплектуется устанавливаемой поверх площадки дополнительной платформой, позволяющей увеличить размер агарозного геля и, соответственно, количество слайдов при использовании камеры для метода ДНК-комет. При проведении электрофореза с дополнительной платформой измеренное значение напряженности составило 1,2 В/см, тогда как без нее напряженность возрастала до 2,0 В/см.

В камере multiSUB Screen 32 при подаваемом напряжении 46 В и высоте электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм сила тока составила ~420 мА. Понижение силы тока до рекоменду-

Таблица 1

Геометрические параметры электрофоретических камер и значения спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей при электрофорезе с расчетной и фактической напряженностью электрического поля 1 В/см

Наименование камеры	Параметры камеры, см				Объем раствора, мл*	При расчете подаваемого напряжения по измерению М			При $E = 1$ В/см		
	Ш	В	Д	М		E , В/см**	ДНК в «хвосте», % ($m \pm SD$)***		Напряжение, В	ДНК в «хвосте», % ($m \pm SD$)	
							контроль	ММС в дозе 30 мг/кг		контроль	ММС в дозе 30 мг/кг
SE-2	13	2,4	17,6	27	550	1,1	1,9 \pm 0,9	13,1 \pm 1,7	26	1,6 \pm 0,8	12,2 \pm 1,5
CSL-COM40	35,5	3,3	14,5	25	1900	1,0	3,4 \pm 2,8	13,3 \pm 3,7			
Sub-Cell 192 (без платформы)	26	4,1	15,2	32	2080	2,0	9,0 \pm 1,7	20,7 \pm 1,9	24	1,7 \pm 0,7	9,9 \pm 0,9
Sub-Cell 192 (с платформой)	26	4,6	25,7	32	2150	1,2	2,2 \pm 0,3	15,5 \pm 2,9	30	1,5 \pm 0,4	12,8 \pm 2,2
multiSUB Screen 32	27	2,5	32	46	1280	1,4	4,9 \pm 1,9	16,7 \pm 3,2	38	1,8 \pm 0,5	11,8 \pm 1,6
COMPAC-50	10,6	3,2#	18	21	550	0,6	0,9 \pm 0,3	4,6 \pm 0,6	28	1,5 \pm 0,8##	12,9 \pm 2,1##

Примечание. * Высота электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм. ** Измерения проведены в начале электрофореза при силе тока ~300 мА (кроме камер COMPAC-50 и multiSUB Screen 32; см. в тексте). *** Для 12 слайдов (камеры CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32) и для 8 слайдов (камеры COMPAC-50 и SE-2). # Высота столба электрофорезного раствора (рис. 2). ## Электрофорез 30 мин. Ш — ширина, В — высота, Д — длина площадки камер; М — межэлектродное расстояние (рис. 1). ММС — метилметансульфонат.

емых 300 мА удалением части раствора оказалось технически невозможным, поскольку в этом случае раствор не покрывал слайды. Измеренная напряженность при указанных параметрах оказалась значительно выше расчетной — 1,4 В/см.

Камера СОМРАС-50 имеет уникальную запатентованную конструкцию с вертикальной ориентацией слайдов ДНК-комет (рис. 2), имеющую преимущества в виде компактности и большой вместимости (до 50 слайдов). Измерения показали, что при рекомендуемом производителем напряжении 21 В значение напряженности электрического поля возле поверхности слайдов составляет 0,6 В/см.

Анализ препаратов ДНК-комет выявил высокую вариабельность в уровнях спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, оцененных для одного и того же образца клеток почек мышей при проведении электрофореза в различных камерах (табл. 1, рис. 3). Наибольшие значения уровней поврежденности ДНК были получены при использовании камеры Sub-Cell 192 без платформы ($E = 2,0$ В/см), наименьшие — для камеры СОМРАС-50 ($E = 0,6$ В/см).

Эмпирически для камер было подобрано подаваемое напряжение, при котором напряженность электрического поля составляет 1 В/см (табл. 1) и эксперименты с препаратами клеток почек мышей были повторены. В результате унификации напряженности электрического поля в камерах были получены сходные уровни как спонтанных, так и индуцированных повреждений ДНК. Исключение составила камера СОМРАС-50, для которой сходные результаты были получены при проведении электрофореза в течение 30 мин (1 В/см, 680 мА; см. ниже).

В ходе анализа данных был выявлен значительный разброс средних показателей поврежденности ДНК между идентичными слайдами, полученными в условиях одного электрофореза. Для камеры CSL-COM40 он оказался наибольшим, от 1,1 до 8,8 % ДНК в «хвосте» для спонтанной поврежденности ДНК и от 4,1 до 17,9 % ДНК в «хвосте» для индуцированной. Было выдвинуто предположение, что наблюдаемая вариабельность данных может быть обусловлена неоднородностью напряженности поля и/или температуры по площадке камер. В описанных выше

экспериментах напряженность поля определяли путем измерения разности потенциалов над слайдами на десятисантиметровом отрезке в срединной части площадки камер. Далее в камере CSL-COM40 провели определение напряженности на 12 участках площадки (рис. 1) измерением разности потенциалов на сантиметровом отрезке над слайдами в стандартных условиях и с рециркуляцией электрофорезного раствора. Одновременно на этих участках определяли температуру электрофорезного раствора.

Измерения выявили выраженные различия напряженности, варьирующей от 0,8 до 1,5 В/см в начале электрофореза и от 1,0 до 1,3 В/см

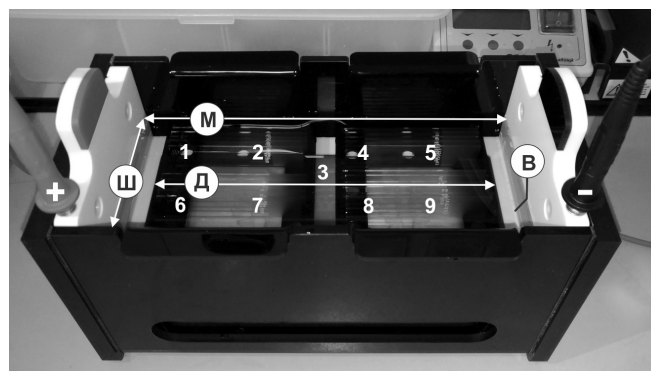


Рис. 2. Камера СОМРАС-50 с вертикальной ориентацией слайдов. 1–9 — участки определения напряженности электрического поля. М — межэлектродное расстояние; В — высота раствора для электрофореза, Д — длина, Ш — ширина резервуара камеры

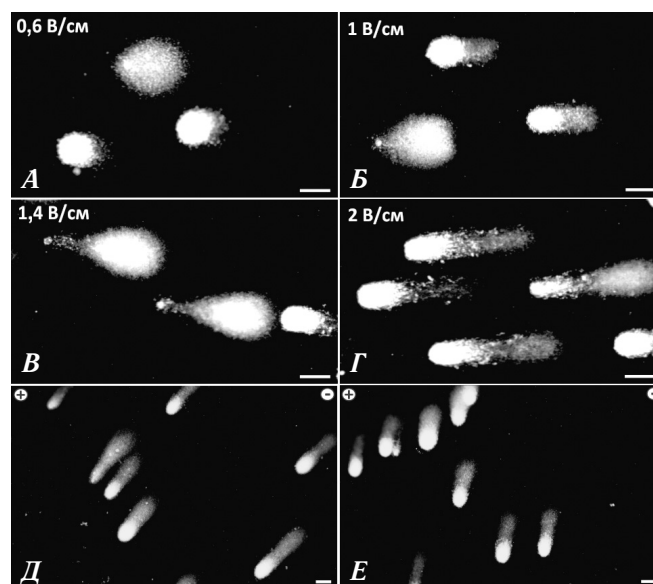


Рис. 3. Морфология ДНК-комет в зависимости от напряженности электрического поля (А, Б, В и Г; электрофорез 20 мин) и при увеличении скорости рециркуляции в 2 раза (Д и Е; камера multiSUB Screen 32). Шкала — 50 мкм

Таблица 2

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры CSL-COM40

Номер участка измерения в камере	Без рециркуляции раствора		С рециркуляцией раствора	
	$t_s/t_f, ^\circ\text{C}^*$	$E_s/E_f, \text{В/см}$	$t_s/t_f, ^\circ\text{C}$	$E_s/E_f, \text{В/см}$
1	8,0/18,7	1,4/1,3	9,4/9,4	1,0/1,0
2	9,4/18,2	1,2/1,1	11,1/10,8	1,0/1,0
3	9,8/17,0	0,9/1,1	14,1/10,3	1,1/1,1
4	10,0/19,1	1,4/1,2	9,7/9,5	1,0/1,0
5	11,3/16,7	1,1/1,1	12,2/9,9	1,0/1,0
6	11,7/17,5	0,8/1,0	13,3/10,5	1,1/1,0
7	10,4/18,0	1,5/1,3	10,5/10,0	1,1/1,0
8	10,1/18,3	1,3/1,1	12,1/11,0	1,0/1,1
9	10,6/17,3	0,8/1,0	14,1/11,7	1,1/1,0
10	12,6/17,6	1,5/1,3	10,8/9,5	0,9/1,0
11	11,2/17,0	1,2/1,1	11,1/10,2	1,0/1,0
12	10,0/17,6	0,9/1,0	12,2/10,4	1,0/1,0
<i>CV, %</i>		22,6/10,2		6,1/3,8

Примечание. * Здесь и в табл. 3, 4 указаны значения, полученные в начале t_s, E_s (0–1-я минута), и в конце t_f, E_f (19–20-я минута) электрофореза

в конце (табл. 2). При этом наибольшие значения были отмечены на участках, расположенных около катодного резервуара (участки 1, 4, 7 и 10), наименьшие — около анодного (участки 3, 6, 9 и 12). Температура электрофорезного раствора в начале электрофореза варьировала от 8,0 до 12,6 °С, а к концу значительно повысилась на всех участках до сходных значений.

Рециркуляция электрофорезного раствора привела к выравниванию напряженности электрического поля по площадке камеры 0,9–1,1 В/см. Температура электрофорезного раствора в условиях рециркуляции в начале электрофореза также различалась между участками, однако к концу не повышалась, а на некоторых участках снизилась.

Аналогичные измерения были проведены в камерах Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32 при проведении электрофореза препаратов ДНК-комет клеток костного мозга и почек интактных мышей и обработанных ММС в дозе 30 мг/кг (вторая серия экспериментов).

В камере Sub-Cell 192 значения напряженности без рециркуляции раствора варьировали в пределах 0,8–1,1 В/см (табл. 3). В условиях рециркуляции напряженность на всех участках, за исключением 11-го, в начале электрофореза составляла 1,0 В/см,

а к концу электрофореза повысилась до 1,2 В/см. Средние значения поврежденности ДНК не отличались статистически значимо для электрофореза с рециркуляцией и без нее. Также выявлен высокий уровень вариабельности показателя между идентичными слайдами интактных клеток костного мозга при проведении электрофореза без рециркуляции буфера — от 0,9 до 3,6 % ДНК в «хвосте» (CV 41,9 %). В условиях электрофореза с рециркуляцией раствора коэффициент вариации снизился до 14,3 %.

Меньший разброс значений выявлен при анализе слайдов ДНК-комет клеток костного мозга животного, обработанного ММС. Коэффициент вариации в случае электрофореза без рециркуляции раствора составил 8,6 %, в условиях рециркуляции — 4,6 %. Как и в случае с камерой CSL-COM40, без рециркуляции температура электрофорезного раствора к концу электрофореза значительно повысилась, тогда как с рециркуляцией не превысила 11,8 °С. При этом в обоих случаях разница температур раствора над слайдами и в резервуарах камер не превышала 3 °С.

В камере multiSUB Screen 32 напряженность электрического поля по площадке варьировала в пределах 0,8–1,2 В/см в начале электрофореза и 0,9–1,3 В/см — в конце (табл. 4).

Таблица 3

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры Sub-Cell 192 (с дополнительной платформой) и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках костного мозга мышей

Номер участка измерения в камере	Без рециркуляции раствора				С рециркуляцией раствора			
	$t_s/t_f, ^\circ\text{C}$	$E_s/E_f, \text{В/см}$	ДНК в «хвосте», %		$t_s/t_f, ^\circ\text{C}$	$E_s/E_f, \text{В/см}$	ДНК в «хвосте», %	
			контроль	ММС в дозе 30 мг/кг			контроль	ММС в дозе 30 мг/кг
1	8,6/17,0	1,0/1,0	0,9	7,3	6,5/10,1	1,0/1,2	1,4	6,3
2	8,5/17,2	1,0/0,9	1,4	6,2	8,0/10,9	1,0/1,2	1,3	6,0
3	8,5/17,2	1,1/0,9	2,9	7,5	8,6/11,3	1,0/1,2	1,7	6,9
4	9,9/16,1	1,0/1,0	1,3	6,8	7,3/10,8	1,0/1,2	1,5	6,6
5	8,8/19,5	1,0/0,9	1,8	6,8	9,5/11,5	1,0/1,2	1,3	6,5
6	8,3/18,8	1,0/0,9	2,0	6,8	9,3/11,6	1,0/1,2	1,2	6,5
7	9,2/18,5	1,0/0,8	2,0	6,1	9,2/10,4	1,0/1,2	1,4	7,0
8	9,2/19,1	0,9/0,8	1,7	6,6	9,0/11,1	1,0/1,2	1,4	6,1
9	6,6/18,5	1,0/0,9	1,3	5,5	9,4/11,4	1,0/1,2	1,8	6,5
10	9,6/19,3	0,9/0,8	3,6	6,0	7,7/10,2	1,0/1,2	1,2	6,3
11	8,7/19,4	0,8/0,8	1,7	6,9	8,3/11,2	0,9/1,1	1,7	6,5
12	6,1/14,7	0,8/0,8	1,2	6,5	9,4/11,8	1,0/1,2	1,7	6,2
$m \pm SD$			1,8 \pm 0,5	6,6 \pm 0,4			1,5 \pm 0,2* $\&$	6,5 \pm 0,3* $\&$
$CV, \%$		9,4/8,6	41,9	8,6		2,9/2,4	14,3	4,6

Примечание. * $p = 0,0002$; # $p = 0,04$ (F-критерий Фишера); $\&$ $p > 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с электрофорезом без рециркуляции.

Таблица 4

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры multiSUB Screen 32 и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей

Номер участка измерения в камере	Без рециркуляции раствора				С рециркуляцией раствора			
	$t_s/t_f, ^\circ\text{C}$	$E_s/E_f, \text{В/см}$	ДНК в «хвосте», %		$t_s/t_f, ^\circ\text{C}$	$E_s/E_f, \text{В/см}$	ДНК в «хвосте», %	
			контроль	ММС в дозе 30 мг/кг			контроль	ММС в дозе 30 мг/кг
1	8,9/20,6	0,8/1,0	1,9	9,6	8,3/13,7	1,0/1,0	1,3	9,2
2	9,2/20,8	0,8/0,9	1,2	10,4	8,7/13,5	0,9/0,9	1,4	11,1
3	9,0/15,8	1,2/1,2	2,3	9,9	8,6/14,2	1,2/1,0	1,7	13,5
4	7,9/18,8	0,8/1,0	2,6	13,3	9,3/12,1	1,0/1,0	1,8	12,2
5	9,3/20,5	0,8/0,9	1,1	13,8	8,8/14,8	0,9/0,9	0,9	10,3
6	8,8/10,6	1,2/1,2	2,1	14,7	7,0/12,1	1,2/0,9	2,3	12,0
7	9,1/18,7	0,9/1,0	1,9	15,1	8,8/13,4	1,0/1,0	1,6	13,1
8	8,7/20,4	0,9/0,9	1,4	11,4	8,0/14,3	0,9/1,0	1,1	8,8
9	8,1/15,2	1,2/1,3	0,7	10,4	7,8/17,7	1,1/0,8	2,1	10,4
10	8,9/21,7	0,9/1,0	2,1	11,5	6,2/13,3	1,0/1,0	2,1	10,8
11	9,0/21,5	0,9/0,9	1,3	10,8	7,8/17,8	0,9/0,9	1,7	8,7
12	8,5/15,0	1,0/1,1	2,8	10,8	7,7/16,8	1,0/0,8	1,8	12,1
$m \pm SD$			1,8 \pm 0,5	11,8 \pm 1,6			1,7 \pm 0,4* $\&$	11,0 \pm 1,3* $\&$
$CV, \%$		17,1/13,3	36,1	16,2		10,8/8,3	25,4	14,6

Примечание. * $p > 0,05$ (F-критерий Фишера); $\&$ $p > 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с электрофорезом без рециркуляции.

При этом наблюдалась обратная, по сравнению с камерой CSL-COM40, картина — высокие значения напряженности зарегистрированы на участках, расположенных около анодного резервуара, низкие — около катодного. Рециркуляция электрофорезного раствора несколько снизила неравномерность напряженности электрического поля по площадке.

В отличие от камер CSL-COM40 и Sub-Cell 192 рециркуляция раствора не предотвращала вариабельность температуры по площадке камеры и ее повышение к концу электрофореза. Двукратное увеличение скорости рециркуляции не оказывало влияния на вариабельность напряженности и температуры (данные не представлены), однако приводило к изменению направленности «хвостов» ДНК-комет на слайдах. Анализ таких изображений не проводили (рис. 3, Д и Е). Средние значения поврежденности ДНК не отличались статистически значимо для электрофореза с рециркуляцией и без нее. Показатель поврежденности ДНК для интактных клеток почек варьировал между слайдами в пределах 0,7–2,8 % ДНК в «хвосте» (CV 36,1 %). Коэффициент вариации для слайдов с индуцированной поврежденностью ДНК в клетках почек оказался выше по сравнению с камерой Sub-Cell — 16,2 %. Зарегистрировано снижение по сравнению с электрофорезом без рециркуляции коэффициентов вариации показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК, однако оно было не столь выраженным, как в случае с камерой Sub-Cell 192.

Стоит отметить особенности проведения электрофореза в камере СОМРАС-50. При рекомендуемом производителем напряжении 21 В сила тока составила 420 мА, напряженность поля — 0,6 В/см. Напряженности электрического поля в 1 В/см удалось достигнуть при подаваемом напряжении 28 В, однако сила тока возросла до 680 мА, что находится в районе предела для использованного источника питания. Эксперименты с измерением локальной напряженности на 9 участках (рис. 2) показали, что в начале электрофореза она составляла 1,0 В/см на всех участках (1,2 В/см на участке 3 между слайдами). К концу электрофореза возрастание силы тока до предельных 700 мА привело к падению напряжения на выходе источника питания до 25 В (переход от стабилизации по напря-

жению к стабилизации по току) и, соответственно, падению напряженности поля и ее вариации по участкам от 0,7 до 0,9 В/см.

ОБСУЖДЕНИЕ

При горизонтальном агарозном гель-электрофорезе нуклеиновых кислот для расчета напряженности электрического поля независимо от геометрии камеры используется отношение подаваемого напряжения к расстоянию между электродами [15, 16]. Поскольку в методе ДНК-комет применяются такие же или схожей конструкции электрофоретические камеры, данный принцип был принят по умолчанию при расчете рекомендуемой напряженности в 1,0 В/см, когда подаваемое напряжение (В) равно межэлектродному расстоянию (см). Из использованных в нашем исследовании камер только для одной измеренная напряженность совпала с расчетной, тогда как для четырех варьировала от 0,6 до 2,0 В/см. В результате оцененные в одних и тех же образцах клеток почек мышей значения поврежденности ДНК различались между камерами до 4,7 крат при оценке ММС-индуцированной и до 10 крат при оценке спонтанной поврежденности ДНК. Несоответствие измеренных значений напряженности электрического поля расчетным было показано в исследовании A. Azqueta et al. [3]. Были зарегистрированы значения ниже расчетных, при этом разница была обратно пропорциональна подаваемому напряжению (модель электрофоретической камеры не указана). В нашем исследовании напряженность ниже расчетной выявлена для камеры СОМРАС-50, имеющей нестандартную конфигурацию с вертикальной ориентацией слайдов, в остальных случаях значения оказались выше.

P.L. Olive et al. [17] для получения оптимальных препаратов ДНК-комет было предложено проводить электрофорез в течение 20–25 мин при напряжении, равном произведению расстояния между электродами камеры на 0,6. Такой расчет применительно к использованным в настоящем исследовании камерам во всех случаях дает значения напряжения значительно ниже определенных экспериментально для получения напряженности 1 В/см (табл. 1). В ряде работ предлагают рассчитывать напряженность как отношение подаваемого напряжения к длине площадки камеры (рис. 1, Д) [3].

Ожидаемые и фактические значения напряженности при таком принципе расчета совпадают только для Sub-Cell 192 без дополнительной платформы и multiSUB Screen 32. Кроме того, при постоянных межэлектродном расстоянии и подаваемом напряжении напряженность электрического поля на площадке со слайдами зависит от ее размеров. Так, в камере Sub-Cell 192 напряженность 1 В/см достигалась при подаваемом напряжении 24 В, тогда как при установке дополнительной платформы для получения указанной напряженности требовалось напряжение 30 В. Полученные данные свидетельствуют, что невозможен общий принцип расчета напряженности электрического поля в случае щелочного электрофореза ДНК-комет и в каждом конкретном случае следует экспериментально определять напряжение, обеспечивающее требуемую напряженность. К аналогичному заключению пришли в недавней работе G. Brunborg et al. [15].

На сегодняшний день нет общепринятого правила при какой напряженности электрического поля проводить электрофорез в методе ДНК-комет. В руководстве OECD со ссылкой на результаты исследований японского центра по валидации альтернативных методов (JaCVAM) рекомендуется проводить электрофорез в течение 20 мин при напряженности 0,7 В/см [18]. По мнению ряда авторитетных специалистов оптимально проведение электрофореза при 1,15 В/см в течение 20 мин или при 0,7 В/см в течение 30 мин [3, 4, 15, 19]. Согласно данным литературы большинство исследователей использует напряженность 1 В/см, ориентируясь на рекомендации, выпущенные в 2000 г. R.R. Tice et al. [20]. Собственный многолетний опыт применения метода ДНК-комет показывает, что проведение электрофореза при напряженности 1,0–1,2 В/см в течение 20 мин является оптимальным. Использование меньших значений снижает чувствительность метода, тогда как более высокие значения могут приводить к искажению результатов анализа. Отрыв от «хвоста» ДНК-комет и/или диффузия в геле небольших фрагментов ДНК может приводить к недооценке показателя (рис. 3) [15].

Считается, что сила тока не оказывает влияние на миграцию ДНК в геле, но в то же время в отличие от напряженности электрического поля

для силы тока рекомендовано определенное значение — 300 мА в начале электрофореза. Доподлинно неизвестно, почему именно такая сила тока изначально была принята как оптимальная в методе ДНК-комет. Существует мнение, что на момент разработки метода источники питания электрофоретических камер с номинальным током нагрузки более 300 мА не были широко доступны из-за их дороговизны [21]. Сила тока напрямую зависит от высоты электрофорезного раствора над слайдами и регулируется удалением/добавлением последнего. G. Brunborg et al. [15] рекомендовано проведение электрофореза при высоте раствора над стеклами не менее 5 мм. По мнению авторов, это позволяет снизить неравномерность температуры и напряженности по площадке камеры и, соответственно, внутриэкспериментальную вариабельность данных. Незначительное снижение напряженности электрического поля с повышением силы тока при этом может быть скорректировано увеличением подаваемого на камеру напряжения.

Наряду с межлабораторной важной проблемой является внутрилабораторная вариабельность данных метода ДНК-комет [3, 4, 15]. В зависимости от использованной камеры коэффициент вариации показателя для идентичных образцов клеток в условиях одного электрофореза составил 8–16 % для индуцированных повреждений ДНК и 36–42 % для спонтанных. Сходные результаты были получены в двух исследованиях [22, 23]. Если для индуцированных повреждений ДНК коэффициент вариации не превышал 14 %, то для спонтанных он достигал 52 %. Данное наблюдение приобретает особое значение при применении метода ДНК-комет в исследованиях, направленных преимущественно на оценку низких уровней поврежденности ДНК, таких как генетический мониторинг или клинические исследования.

В работе K.V. Gutzkow et al. [19] с использованием вместо стандартных слайдов минигелей GelBond® было показано, что рециркуляция электрофорезного раствора снижает коэффициент вариации показателя поврежденности ДНК в облученных клетках с 26 до 7 %. Авторы предположили, что выявленная внутриэкспериментальная вариабельность может быть связана с неоднородностью напряженности электрического поля по площадке камеры. В последующем исследовании ими было

показано, что напряженность поля варьирует по площадке камеры (CV 10,5 %) и рециркуляция раствора, в зависимости от ее скорости, снижает коэффициент вариации до 0,5 % [15]. Для трех исследованных нами камер выявлена вариабельность напряженности поля — CV от 9,4 до 22,6 %. Для камер Sub-Cell 192 и CSL-COM40 рециркуляция раствора в ходе электрофореза значительно снижала неравномерность напряженности, тогда как в камере multiSUB Screen 32 это снижение было менее выраженным. Если в камере Sub-Cell 192 в условиях рециркуляции уменьшение неоднородности напряженности сопровождалось и снижением вариабельности показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК, то в камере multiSUB Screen 32 вариабельность показателей в обоих случаях оставалась на высоком уровне. Неоднородность напряженности поля связывают, предположительно, с локальными изменениями в ходе электрофореза удельной электропроводности раствора вследствие возникновения в камере градиентов температуры и/или концентрации ионов [15, 24]. Было показано, что возрастание в ходе электрофореза температуры раствора сопровождается ее гетерогенностью в камере, с более высокими значениями в срединной части площадки (камера SE-1) [9]. Для камеры multiSUB Screen 32 на участках около анодного резервуара (3, 6, 9, 12), в которых температура раствора была ниже чем в остальных, наблюдались более высокие значения напряженности. Эксперименты показали, что если температура раствора над слайдами к концу электрофореза возрастает значительно, то в резервуарах камеры она повышается не более чем на 5 °С, создавая таким образом температурные градиенты. Рециркуляция приводит к активной смене раствора над слайдами, способствуя выравниванию его температуры по камере (разница <3 °С). Вероятно, аналогичным образом рециркуляция позволяет предотвратить и возникновение градиентов концентрации ионов электролита [15, 24]. Значимое отличие камеры multiSUB Screen 32 от камеры Sub-Cell 192 — меньший объем используемого электрофорезного раствора (1280 против 2150 мл). Можно предположить, что чем меньше объем электрофорезного раствора при сходных размерах площадки камер, тем меньший стабилизирующий эффект имеет рециркуляция.

Возникающие вследствие электролиза воды изменения pH раствора возле электродов также могут оказывать влияние на локальную напряженность электрического поля [25]. Вместе с тем, учитывая высокую концентрацию электролита в используемом растворе, высокое значение (pH > 13,0) и относительно короткое время электрофореза, вклад изменений pH рассматривается как незначительный [14, 15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные показывают, что несоответствие при электрофорезе расчетной напряженности электрического поля фактической может служить причиной межлабораторной вариабельности данных метода ДНК-комет. Перед проведением экспериментов для конкретной электрофоретической камеры следует эмпирически определить напряжение, обеспечивающее заданные значения напряженности электрического поля и силы тока. Для снижения внутрилабораторной вариабельности данных, в особенности при применении камер больших размеров, рекомендуется проведение в ходе электрофореза рециркуляции раствора, стабилизирующей его температуру, а также, вероятно, электрохимические процессы в камере. В совокупности с унификацией других экспериментальных условий (концентрация агарозного геля, длительность щелочной денатурации и электрофореза) указанное позволит обеспечить меж- и внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость данных, полученных с использованием метода ДНК-комет.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и коммерческой составляющей при планировании, выполнении и подготовке к печати настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koppen G, Azqueta A, Pourrut B, et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th international comet assay workshop. *Mutagenesis*. 2017;32(3):397-408. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>.
2. Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 2018;33(1):1-7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>.

3. Azqueta A, Gutzkow KB, Brunborg G, Collins AR. Towards a more reliable comet assay: optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*. 2011;724(1-2):41-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.010>.
4. Azqueta A, Muruzabal D, Boutet-Robinet E, et al. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutat Res*. 2019;843:24-32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>.
5. Forchhammer L, Johansson C, Loft S, et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*. 2010;25(2):113-123. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb048>.
6. Johansson C, Møller P, Forchhammer L, et al. An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. *Mutagenesis*. 2010;25(2):125-132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb055>.
7. Ersson C, Möller L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*. 2011;26(6):689-695. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger034>.
8. Speit G, Trenz K, Schütz P, et al. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett*. 1999;110(1-2):73-78. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00137-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00137-X).
9. Sirota NP, Zhanataev AK, Kuznetsova EA, et al. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;770:16-22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.05.003>.
10. Møller P, Möller L, Godschalk RW, Jones GD. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay validation group. *Mutagenesis*. 2010;25(2):109-111. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb067>.
11. Godschalk RW, Ersson C, Riso P, et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay validation group (ECVAG). *Mutat Res*. 2013;757(1):60-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.020>.
12. Ersson C, Møller P, Forchhammer L, et al. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2013;28(3):279-286. <https://doi.org/10.1093/mutage/get001>.
13. Plappert-Helbig U, Guérard M. Inter-laboratory comparison of the *in vivo* comet assay including three image analysis systems. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(9):788-793. <https://doi.org/10.1002/em.21964>.
14. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res*. 1992;198(2):259-267. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90378-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90378-1).
15. Brunborg G, Rolstadaas L, Gutzkow KB. Electrophoresis in the comet assay. (September 12th 2018). In: Bolduna OM, Balta C, eds. *Electrophoresis – Life Sciences Practical Applications*. London: Intech Open; 2018. P. 63-80. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76880>.
16. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
17. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. 2006;1(1):23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.
18. OECD. Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2016. Available from: <https://www.oecd.org/env/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay-9789264264885-en.htm>.
19. Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, et al. High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*. 2013;28(3):333-340. <https://doi.org/10.1093/mutage/get012>.
20. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::CO;2-J).

21. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008;23(3):143-151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
22. Collins AR, El Yamani N, Lorenzo Y, et al. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet*. 2014;5:359. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359>.
23. Roy M, Hamel A, Cardoso R. Effect of slide positioning in electrophoresis chamber over comet assay results [Internet]. Charles River Laboratories, Senneville, Quebec, Canada, H9X 3R3. Available from: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/EffectofSlidePositioninginElectrophoresisChamberOverCometAssayResults.pdf>.
24. Brody JR, Kern SE. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. 2004;36(2):214-216. <https://doi.org/10.2144/04362BM02>.
25. O'Conner JL, Wade MF, Zhou Y. Control of buffer pH during agarose gel electrophoresis of glyoxylated RNA. *Biotechniques*. 1991;10(3):300-302.

✿ Информация об авторах

Алий Курманович Жанатаев — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 7070-0510. E-mail: zhanataev@academpharm.ru.

Елена Александровна Анисина — научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. E-mail: anisinalena@yandex.ru.

Кира Львовна Плигина — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 7315-5417. E-mail: kira-pligina@rambler.ru.

Артем Андреевич Лисицын — лаборант-исследователь, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. E-mail: nordical@yandex.ru.

Андрей Дмитриевич Дурнев — д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. РАН, директор, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 8426-0380. E-mail: addurnev@mail.ru.

✿ Authors and affiliations

Aliy K. Zhanataev — PhD, Main Researcher, Laboratory of Pharmacology and Mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 7070-0510. E-mail: zhanataev@academpharm.ru.

Elena A. Anisina — Researcher, Laboratory of Pharmacology and Mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. E-mail: anisinalena@yandex.ru.

Kira L. Pligina — PhD, Researcher, Laboratory of pharmacology and mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 7315-5417. E-mail: kira-pligina@rambler.ru.

Artem A. Lisitsyn — Researcher, Laboratory of pharmacology and mutagenesis. Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. E-mail: nordical@yandex.ru.

Andrey D. Durnev — Doctor of Science, Professor, Corresponding member of Russian Academy of Sciences, Head of Institute. Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 8426-0380. E-mail: addurnev@mail.ru.