

## KOMET TEST – VISOKO SENZITIVNA METODA DETEKCIJE OŠTEĆENJA DNK

### THE COMET ASSAY – HIGHLY SENSITIVE METHOD FOR DETECTION OF DNA DAMAGE

Ninoslav Djelić, Biljana Marković i Dijana Djelić

Katedra za Biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

E-mail: [ndjelic@vet.bg.ac.rs](mailto:ndjelic@vet.bg.ac.rs)

#### *Apstrakt*

*Komet test (gel elektroforeza pojedinačnih ćelija) predstavlja relativno novu metodu detekcije i evaluacije oštećenja DNK. Princip testa zasniva se na elektroforezi DNK iz pojedinačnih ćelija u gelovima od agaroze i bojenju fluorescentnim bojama. Step en elektroforetske pokretljivosti DNK direktno je srazmeran količini DNK prekida. S obzirom da DNK iz pojedinačnih ćelija migrira odvojeno, moguć je uvid u heterogenost odgovora u okviru ispitivane grupe ćelija. Prednosti Komet testa nad standardnim genotoksikološkim metodama su visoka osetljivost, fleksibilnost, mali broj potrebnih ćelija i mala količina test supstance za analizu, relativno niska cena, rezultati su gotovi za kratko vreme i široka mogućnost primene. Test može da se izvodi in vitro ili in vivo, a neznatne modifikacije omogućuju praćenje kinetike reparacije DNK, analizu ćelijske kinetike i detekciju specifičnih lezija u molekulima DNK. Osim u genotoksikologiji Komet test nalazi primenu u molekularnoj epidemiologiji, biomonitoringu, proučavanju citotoksičnosti, nekroze, apoptoze, kao i kliničkim istraživanjima.*

*Ključne reči: oštećenja DNK, elektroforeza, Komet test,*

#### *Summary*

*Comet assay (single cell gel electrophoresis) is a relatively new method of DNA damage detection. The basic principle of the assay is to perform electrophoresis of DNA from single cells in agarose gels and, afterwards, to stain DNA using fluorescent dyes. The extent of DNA migration is directly proportional to the level of DNA breakage. Since the DNA migrates separately from different cells, the heterogeneity of response within cell population can be evaluated. The advantages of Comet assay are sensitivity, small numbers of cells per sample, flexibility, low costs, small amounts of test substance needed, results are obtained in relatively short period and it can be applied in various fields. The assay can be performed either in vitro or in vivo, whereas small modifications enable DNA repair kinetics study, analysis of cell cycle kinetics and detection of specific DNA lesions. Apart from being used in genetic toxicology, the Comet assay is applied in molecular epidemiology, biomonitoring, analysis of cytotoxicity, necrosis, apoptosis, as well as in clinical research.*

*Key words: agarose, DNA damage, electrophoresis, Comet assay*

## Uvod

Neprekidno povećavanje broja i raznovrsnosti genotoksičnih agenasa u životnoj sredini nameće potrebu za adekvatnim tehnikama njihove detekcije i evaluacije efekata. Tako je do danas razvijeno na desetine testova na genotoksičnost, koji se u laboratoriji sprovode pod striktno kontrolisanim uslovima najčešće prema smernicama Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD). Pri tome se koriste veoma različiti biološki sistemi, od bakterija, preko jednoćelijskih eukariota (npr. kvasci), voćne mušice (*Drosophila*) do različitih vrsta sisara. Testovi se mogu izvoditi u *in vitro*, *in vivo* uslovima, ili se ponekad vrši kombinovanje *in vivo* i *in vitro* uslova (tretiraju se životinje ali se zatim njihove ćelije analiziraju *in vitro*). Svaki od ovih testova ima svoje prednosti i ograničenja tako da se najbolji uvid u to da li je agens genotoksičan može dobiti primenom nekoliko testova na različitim nivoima (tzv. "baterija testova"). Međutim, s obzirom da je često neophodna ekonomska isplativost testiranja, ukoliko ne postoji realna opasnost da agens može da se unese direktno u organizam čoveka (npr. intermedijeri industrijskih procesa), dovoljno je obaviti preliminarna istraživanja samo na bakterijama (Ames-ov test) i ukoliko je rezultat negativan (agens nije genotoksičan) može se dati dozvola za njegovo korišćenje (Zimonjić i sar., 1990).

Postoji veći broj tehnika za detekciju oštećenja DNK zasnovanih na praćenju različitih bioloških efekata (mikronukleusi, genske mutacije, hromozomske aberacije). Pored toga, postoje senzitivnije metode detekcije oštećenja DNK kao što su praćenje reparacione sinteze DNK (tzv. test neplanirane sinteze DNK, engl. "unscheduled DNA synthesis, UDS") kojom se mogu pratiti efekti na pojedinačnim ćelijama, ili detekcija jednolančanih prekida i oštećenja nestabilnih pri visokim pH (engl. "alkali labile sites, ALS") koji se detektuju metodom alkalne elucije na nivou cele grupe analiziranih ćelija. Tehnikom UDS prati se pojačana sinteza DNK usled popravke oštećenja tokom ekscizije reparacije. Mada se mogu dobiti informacije o stepenu oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama, metoda je skupa, zahteva posebne uslove rada zbog korišćenja radioizotopa i ograničene je senzitivnosti. Metoda alkalne elucije zahteva veliki broj ćelija za analizu i, s obzirom da se izvodi na pulovanom urorku, ne pruža informacije o međućelijskim razlikama u osetljivosti na genotoksični agens. Razvoj metode elektroforeze pojedinačnih ćelija (engl. single cell gel electrophoresis, SCGE), popularno nazvane Komet test, (engl. Comet assay) omogućio je pouzdanu, senzitivnu detekciju oštećenja DNK sa uvidom u heterogenost odgovora analizirane grupe ćelija.

Začeci ove metode potiču iz radova Ostling-a i Johanson-a (1984) koji su prvi razvili mikrogel elektroforezu za detekciju oštećenja DNK na nivou pojedinačnih ćelija. Princip metode je da se nakon tretmana genotoksičnim agensom ćelije suspenduju u agarozu, razliju na mikroskopske pločice, liziraju deterdžentima i visokim koncentracijama soli, a oslobođena DNK se podvrgava elektroforezi u puferu neutralnog pH. Ćelije sa povećanom frekvencom dvolančanih prekida DNK ispoljavaju povećanu migraciju DNK ka anodi. Nakon bojenja fluorescentnom bojom etidijum-bromidom, meri se intenzitet fluorescencije pomoću mikroskopskog fotometra.

Nešto kasnije, Singh i sar. (1988) modifikovali su pomenutu metodu uvođenjem elektroforeze u jako alkalnoj sredini (pH > 13). Pri tako visokom pH molekuli DNK se denaturišu (raspliću), tako da se ne identifikuju samo dvolančani, već i jednolančani

prekdi DNK. Sem toga detektuju se jednolančani prekdi stvoreni tokom ekscizione reparacije kao i mesta osetljiva na alkalije (engl. alkali-labile sites, ALS). S obzirom da skoro svi genotoksini indukuju mnogo više jednolančanih prekida nego drugih lezija DNK, alkalna verzija je znatno pojačala senzitivnost Komet testa.

Sam naziv Komet test potekao je od izgleda migrirajuće DNK – jedan deo se zadržava u nivou jedra, dajući vizuelni utisak “glave”, a molekuli fragmentisane DNK koji brže migriraju nadovezuju se na glavu dajući utisak “repa” komete.

Ubrzo se uvidelo da Komet test pruža niz prednosti nad drugim metodama u genotoksikologiji. Osnovne prednosti su:

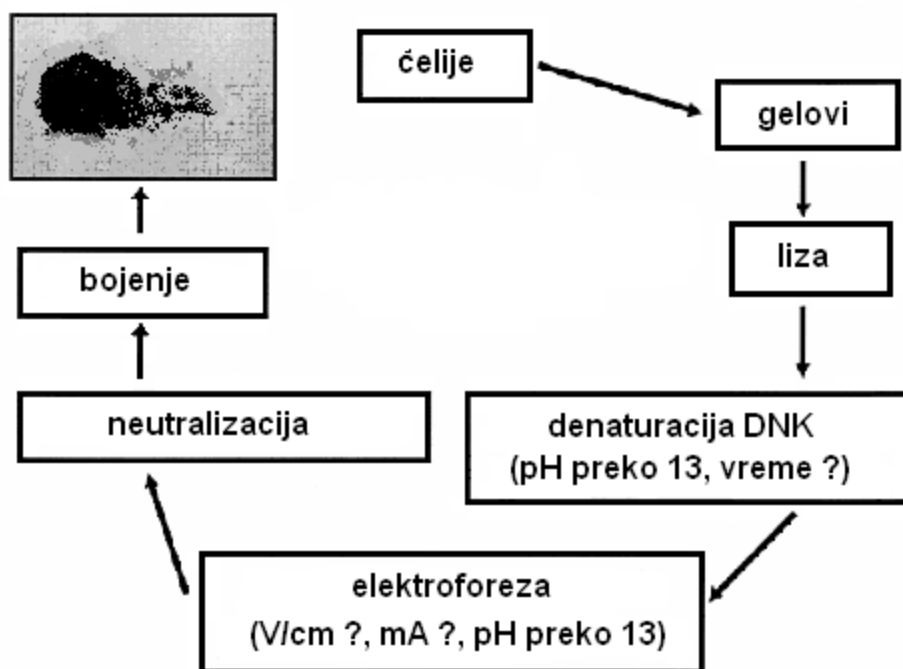
- visoka senzitivnost i mogućnost detekcije niskog stepena oštećenja DNK
- dovoljan je mali broj ćelija za analizu
- fleksibilnost metode
- relativno niska cena
- dovoljne su male količine testirane supstance
- rezultati su gotovi za svega nekoliko dana
- široka mogućnost primene

### **Metodologija Komet testa**

U Vašingtonu je 1999. godine održan međunarodni radni sastanak za standardizaciju uslova pod kojima treba da se radi Komet test (Tice et al., 2000). Svi koraci pri izvođenju alkalne verzije Komet testa podjednako su važni da bi se ostvarili reproducibilni i pouzdani rezultati. Za pripremu uzorka, rastvora i korišćenje relevantne opreme potrebna je striktna kontrola kvaliteta kao u tehnikama molekularne biologije. Teorijski, Komet test može da se izvede na bilo kom tipu ćelija pod uslovom da su žive i da se mogu dobiti u obliku suspenzije. Kada se obavi tretman ćelija odgovarajućim agensom, osnovni koraci u izvođenju metode su:

1. tretman ćelija
2. postavljanje agaroznih gelova sa ćelijama na mikroskopska predmetna stakla
3. liza ćelija radi oslobađanja DNK,
4. denaturacija DNK pri visokom pH > 13,
5. elektroforeza u puferu sa pH > 13,
6. neutralizacija alkalija,
7. bojenje DNK i vizuelizacija kometa,
8. analiza kometa i obrada rezultata.

**Tretman ćelija** zavisi od jačine suspektog mutagena i njegovog vremena poluživota. Ukoliko je agens jak genotoksin, dovoljno je svega 30 min. na 37°C. Ako se koristi slabiji mutagen, ćelije se tretiraju povećanom koncentracijom ili, ukoliko je količina supstance ograničena, tretman može da se produži na 1, 2 ili 4 sata na 37°C.



Slika 1. Šematski prikaz osnovnih kritičnih koraka u alkalnoj verziji Komet testa

**Priprema gelova** ima za cilj dobijanje uniformnih, mehanički stabilnih gelova koji će ostati kompaktni tokom izvođenja metode. U literaturi se sreću podaci o upotrebi jednog do tri sloja agaroze. U tehnici sa tri sloja, na predmetnom staklu se nalazi tanak sloj agaroze osušene na sobnoj temperaturi (najmanje dva dana), da bi se zatim tretirane ćelije resuspendovane u agarozu niske tačke topljenja (engl. low melting point agarose, LMPA), preko kojeg se nanosi sloj agaroze bez ćelija. Važno je da se naneta agarozna ohladi na ledu da bi očvrstnula. Ćelije se unose u takvoj količini da se obezbedi dovoljan broj za analizu, a s druge strane prevelik broj ćelija bi otežao analizu zbog preklapanja kometa.

**Liza ćelija** ima zadatak da dezintegriše biološke membrane i oslobodi DNK za analizu. Vreme liziranja znatno varira zavisno od vrste ćelije (od 1 sat do prekonoćnog tretmana). Rastvor za liziranje pored visoke koncentracije soli obavezno sadrži deterdžent Triton X-100. Pored toga, dodaje se dimetilsulfoksid da bi se sprečila oštećenja DNK od oksidativnih radikala.

**Denaturacija DNK** se odvija u istom rastvoru ( $\text{pH} > 13$ ) koji će se kasnije upotrebiti za elektroforezu. Vreme odmotavanja DNK (engl. DNA unwinding) zavisi od vrste upotrebljenih ćelija i u slučaju humanih limfocita iznosi 30 min.

**Elektroforeza** se obavlja najčešće na 25 V i 300 mA, ali vreme trajanja zavisi od vrste upotrebljenih ćelija (za humane limfocite 30 min, za spermiju konja ili bika 20 min). S obzirom da postoji veliki broj komercijalno dostupnih uređaja za napajanje i kadica za elektroforezu, smatra se da je bolje izražavati uslove u V/cm. Optimalni napon u većini slučajeva iznosi od 0,7 do 1,0 V/cm. Temperatura na kojoj se vrši elektroforeza prema

dostupnim literaturnim podacima varira od 5°C do sobne temperature, ali se pri nižoj temperaturi obezbeđuje bolja reproducibilnost dobijenih rezultata.

Nakon elektroforeze pristupa se **neutralizaciji** alkalija u gelovima pomoću pufera koji sadrži trizmu i ima pH 7,5. Neutralizacija se vrši ispiranjem, najčešće tri puta po 5 min. Gelovi se posle neutralizacije mogu odmah da korsite za bojenje i očitavanje kometa, ili je, prema potrebi, moguće osušiti gelove (dehidratacijom u hladnom metanolu i sušenjem na 45 °C), da bi se kasnije rehidratirali u destilovanoj vodi i očitavali.

**Bojenje** DNK i vizuelizacija kometa vrši se, po pravilu, nekom fluorescentnom bojom, kao što su: etidijum bromid, propidijum jodid, 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), SYBR zeleno I, YOYO-1 (benzoksazolijum-4-kvinolin oksazol žuti homodimer). Nekim bojama se mogu da dodaju posebne supstance koje redukuju slabljenje signala (Tebbs i sar., 1999). Pored toga, postoje pokušaji nefluorescentnog bojenja DNK primenom srebrno nitrata (Kizilian i sar., 1999).

**Analiza kometa** obavlja se, najčešće, pri uveličanju 200× - 400×, mada je u literaturi opisano korišćenje uvećanja od 160× do 600×, što zavisi od tipa analiziranih ćelija, opsega migracije DNK, karakteristika mikroskopa i kompjuterskog softvera. Sva predmetna stakla moraju se nezavisno kodirati pre početka analize. U sve većem broju laboratorija za analizu se koriste kompjuterski softveri (Bocker i sar., 1999). Ipak, analiza je moguća i bez kompjutera, najčešće razvrstavanjem kometa u nekoliko kategorija (obično četiri do pet) na osnovu dužine migracije DNK i/ili relativne količine DNK u "repu" komete (Anderson et al., 1994). Dužina migracije DNK, jedan od najčešće korišćenih parametara koji se izražava se u mikrometrima, direktno je proporcionalna količini jednolančanih prekida i ALS, a obrnuto proporcionalna stepenu ukrštenih veza (DNK-DNK ili DNK-protein).

Razvojem kompjuterskih softvera omogućeno je praćenje niza pokazatelja stepena oštećenja DNK (DNK u "glavi", DNK u "repu", procenat DNK koja je migrirala itd.), ali se najpreciznijim smatra tzv. moment repa (engl. tail moment, TM) (Olive i sar., 1990). Analogno momentu sile u fizici koji predstavlja proizvod sile i odstojanja od tačke u kojoj se deluje ( $M = F \times L$ ), moment repa je proizvod količine DNK u repu (umesto sile u fizici), dok je distanca određena dužinom repa. Ipak se smatra da je, za tumačenje rezultata, pored momenta repa prikladno prikazati dužinu repa i procenat DNK koja je migrirala.

### ***In vitro* Komet test**

Praktično ne postoje ograničenja eksperimentalnih *in vitro* uslova za utvrđivanje sposobnosti agenasa da indukuju oštećenja DNK. Nauprot tome, uslovi pod kojima se pokazuje da agens nema genotoksične efekte znatno više su ograničeni. Testiranje na genotoksičnost *in vitro*, može se obaviti dodatkom egzogene metaboličke aktivacije (npr. mikrozomalna frakcija iz jetre pacova tretiranih supstancom Aroclor 1254), ali mikrozomalni enzimi ne mogu kompletno da simuliraju *in vivo* uslove. Pri izvođenju *in vitro* Komet testa, izuzetno je važno da se ne dobiju lažno pozitivni rezultati koji proističu od oštećenja DNK usled citotoksičnosti. Zato se na kraju kultivacije obavezno meri citotoksičnost (npr. bojom tripan plavo). Toleriše se citotoksičnost do 30%, a ukoliko je citotoksičnost veća, doza ispitivanog agenasa mora da se smanji (Elia i sar., 1994; Anderson i sar., 1998).

Mada se, teorijski, može da koristi bilo koji tip ćelije za ispitivanje genotoksičnih efekata, ipak se najčešće upotrebljavaju dobro okarakterisane ćelijske linije ili primarne kulture ćelija koje se inače koriste u genotoksikologiji. Od standardnih ćelijskih linija često se koriste ćelije L5178Y limfoma miša, ćelije ovarijuma kinekog hrčka (CHO – Chinese hamster ovary), a od ćelija primarnih kultura limfociti čoveka i hepatociti različitih vrsta glodara. U principu, nije od značaja da li su ćelije mitotički aktivne, ali se ipak rađe uzimaju one koje ne proliferišu, s obzirom da je manja verovatnoća pojave lažno pozitivnih rezultata.

Ćelije se kultivišu u odgovarajućim medijumima na standardan način uz proveravanje eventualne kontaminacije mikoplazmama. Suspekti genotoksin se aplikuje u najmanje tri različite koncentracije sa ili bez metaboličke aktivacije. Rastvor ispitivanog agensa treba da bude svež ili, ukoliko je pokazano da nema reaktivnosti sa rastvaračem, može se napraviti odgovarajući "stock" rastvor. Kultivacija se vrši najčešće na 37°C. Najjača upotrebljena koncentracija treba da izazove znake citotoksičnosti, ali ispod nivoa od 30%, a najmanja koncentracija ne sme da bude citotoksična. Ukoliko agens ne ispoljava citotoksičnost za maksimalnu koncentraciju uzima se najmanja moguća od 5µl/ml, 5mg/ml ili 0,01 M. Pored negativne kontrole (rastvarača) upotrebljava se i pozitivna kontrola (dokazan mutagen). Ceo ekperiment mora da se nezavisno ponovi najmanje još jednom, da se pokaže reproducibilnost. Iz svake epruvete u kojoj se vršila kultivacija postavljaju se po dva agarozna gela sa ćelijama. Sa svake pločice analizira se najmanje 25 kometa (ukupno 50 po koncentraciji). Pozitivan rezultat ukazuje da ispitivani agens izaziva oštećenja molekula DNK.

### ***In vivo* Komet test**

S obzirom da je za analizu potreban mali broj ćelija, teorijski, može da se upotrebi bilo koje tkivo pod uslovom da se izoluju pojedinačne ćelije (suspenzija) ili jedra. Ipak je najpodesnije koristiti tkivo koje ispitivana supstanca može da dosegne. Važno je izbeći lažno pozitivne rezultate koji ne proističu iz genotoksičnosti već iz apoptoze ili nekroze.

Životinje koje se najčešće koriste su razne vrste laboratorijskih glodara (uglavnom miševi i pacovi). Suspekti mutagen se ispituje u najmanje tri koncentracije, a pored toga se u istom ciklusu eksperimentata koristi negativna i pozitivna kontrola. Za svaku dozu analizira se najmanje po četiti mlade adultne životinje. Najveća doza treba da ispolji znake toksičnosti. U svakom ekspreimentu, pored kontrola, moraju da se upotrebe najmanje dve doze ispitivanog agensa. Ako je agens netoksičan, maksimalna doza ne sme da pređe 2000 mg/kg u slučaju jednokratnog ili tretmana do 14 dana, a ukoliko je tretman duži od 14 dana najveća dnevna doza iznosi 1000 mg/kg. Supstanca se unosi u organizam životinje najčešće oralno ili intraperitonealno, s tim da maksimalna zapremina unete tečnosti ne sme da pređe 20 ml/kg.

Ako nema informacija o tome koje je ciljno tkivo za ispitivani agens, najčešće se koriste jetra i ćelije crevnog trakta. Prema jednoj veoma opsežnoj studiji, od kancerogena koji ispoljavaju efekte u Komet testu 73% je dalo efekte bar na ćelijama jetre, a 96% u ćelijama jetre i kolona (Sasaki i sar., 2000).

Uzorci tkiva tretiranih životinja uzimaju se, po pravilu, u dva vremenska intervala: 3-6 sati i 22-26 sati od momenta aplikacije agensa. Ukoliko su životinje tretirane višekratno, onda se pristupa uzimanju uzoraka 3-6 sati od poslednjeg tretmana.

Suspenzija ćelija iz čvrstih tkiva dobija se inkubacijom usitnjenog tkiva sa kolagenazom ili tripsinom. Alternativno, moguća je izolacija jedara homogenizacijom. Prilikom usitnjavanja ili homogenizacije dodaje se EDTA radi heliranja jona kalcijuma i magnezijuma čime se sprečava aktivacija endonukleaza. Takođe, dodaje se DMSO radi sprečavanja dejstva oksidativnih radikala na molekule DNK (Tice i sar., 1997).

Analiza kometa izvodi se na kodiranim predmetnim staklima. Analizira se najmanje 50 kometa po predmetnom staklu, tj. ukupno 100 kometa po životinji (od svake životinje se naprave po dva gela na predmetnim staklima). Eksperiment mora da se ponovi najmanje još jednom, radi potvrđivanja reproducibilnosti.

### **Primene Komet testa**

Pored upotrebe u genetičkoj toksikologiji Komet test je našao iznenađujuće široku primenu u različitim disciplinama (biomedicina, antimutagenaza, genetika kancera, proučavanje kinetike reparacije DNK, analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze, biomonitoring itd.). Od kliničkih aplikacija Komet test je upotrebljavan u prenatalnoj dijagnostici, zatim za proučavanje katarakte, dijabetesa, reumatoidnog artritisa, sistemskog lupus eritematosus, Alzheimer-ove bolesti itd.).

Različite modifikacije osnovne metodologije Komet testa omogućuju detekciju specifičnih lezija molekula DNK (Tice i sar., 2000). Smanjivanjem pH do 12,1 eliminiše se ispoljavanje ALS i jednolančanih prekida DNK. Tako bi smanjenje migracije DNK pri pH 12,1 govorilo o prisustvu ALS, dok bi jednak stepen migracije pH 12,1 i pH 13 ukazivao na postojanje samo jednolančanih prekida DNK.

Ukrštene veze (engl. "crosslinks") smanjuju elektroforetsku pokretljivost DNK. Moguće je utvrditi da li u stvaranju ukrštenih veza učestvuju DNK ili proteini. Naime, u ponovljenom eksperimentu pri inkubaciji ćelija dodaje se protein kinaza (PK). Ukoliko tretman enzimom PK poveća pokretljivost DNK, to znači da su ukrštene veze bile prevashodno tipa DNK-protein.

Specifični kovalentno modifikovani nukleotidi u DNK mogu se identifikovati prijemnom odgovarajućih enzima. Na primer, lezije pod dejstvom UV zračenja identifikuju se inkubacijom sa UV-specifičnim endonukleazama. Oksidovani pirimidini se detektuju enzimom endonukleazom III. Takođe, tehnikama imunofluorescencije antitelima se prepoznaju specifične lezije molekula DNK (Tice i sar., 2000).

Imajući u vidu da se u procesima apoptoze i nekroze javlja fragmentacija molekula DNK, Komet test nalazi primenu u izučavanju ovih fenomena. Pošto su fragmentni DNK uglavnom dvolančani, za njihovu identifikaciju koristi se kako neutralna, tako i alkalna verzija Komet testa. Ima sugestija da bi različit izgled kometa mogao da se iskoristi za razlikovanje apoptoze od nekroze u alkalnoj verziji Komet testa (Kizilian i sar., 1999). Izgleda da se iz apoptotičnih ćelija stvaraju velike komete sa lepezastim repovima i malim glavama (engl. hedgehogs), dok iz nekrotičnih ćelija nastaju komete sa relativno velikim glavama i uzanim repovima varijabilne dužine.

Analize kinetike proliferacije i ćelijskog ciklusa moguće su usled različitog intenziteta fluorescencije DNK u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. Naime, u G<sub>1</sub> fazi količina DNK je upola manja nego u G<sub>2</sub> fazi, te se na osnovu intenziteta obojenosti DNK u kometama veoma lako može da prati stepen proliferacije ispitivanih ćelija.

Upotreba Komet testa u biomonitoringu pružila je rezultate u istraživanjima starenja, oksidativnog stresa pri fizičkom naporu, nepravilne ishrane, uticaja ozona, molekularno epidemioloških analiza izloženosti štetnim agensima kao i biomonitoringu različitih vrsta u suvozemnim i vodenim ekosistemima.

## Literatura

1. Anderson D, Yu T-W, McGregor DB, 1998, Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. *Mutagenesis*, 13, 539-55.
2. Anderson D, Zu T-W, Phillips BJ, Schmezer P, 1994, The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay, *Mutat Res*, 307, 261-71.
3. Bocker W, Rolf W, Bauch T, Muller WU, Steffer C, 1999, Automated comet assay analysis, *Cytometry* 35, 134-144.
4. Elia MC, Storer RD, McKelvey TW, 1994, Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environ Mol Mutagen*, 24, 181-91
5. Kizilian N, Wilkins RC, Reinhardt P, Ferrarollo C, McLean JRN, McNamee JP, 1999, Silver-stained comet assay for detection of apoptosis, *Biotechniques*, 27, 926-930.
6. Olive PL, Banath JP, Durand RE, 1990, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay, *Radiat Res*, 122, 86-94.
7. Ostling O, Johanson KJ, 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 292-98.
8. Sasaki YF, Sekihashi K, Itumizama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S, 2000, The comet assay with mouse multiple organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 206 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. *Crit Rev Toxicol*, 30, 629-799.
9. Singh NP, McCoz MT, Tice RR, Schneider EL, 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175, 184-91.
10. Tebbs RS, Pederson RA, Cleaver JE, Hartmann A, 1999, Modification of the comet assay for the detection of DNA strand breaks in extremely small samples. *Mutagenesis*, 14, 437-38.



11. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobazashi H, Mizamae Y, Rojas E, Rzu J-C, Sasaki YF, 2000, Single cell gell/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicologz testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-21.
12. Tice RR, Yager JW, Andrews A, Crecelius E, 1997, Effect of hepatic methyl donor status on urinarz excrecion and DNA damage in B6C3F1 nuce treated with sodium arsenite. *Mutat Res*, 386, 315-334.
13. Vrzoc M, Petras M, 1996, Comparison of three power supplies used for the single-cell gell assay, *Environ Mol Mutagen*, 28, 154-57.
14. Zimonjić DB, Savković N, Anđelković M, 1990, Genotoksični efekti – efeti, principi i metodologija detekije, *Naučna Knjiga*, Beograd, str. 158-69.