

УДК: 577.391:576.367

## КОМЕТ-АНАЛІЗ СТУПЕНЯ УШКОДЖЕННЯ ДНК ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ОДНОРІЧОК КОРОПА ЗА ДІЇ ЕКТОПАРАЗИТІВ

Ю. В. Лобойко, В. В. Стибель  
llobojko@ukr.net

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна

У статті представлені результати досліджень ступеня ушкодження ДНК лімфоцитів крові одnorічок коропа за ураження ектопаразитами *Lernaea cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator* та за змішаної інвазії. Підтвердженням мутагенних властивостей ектопаразитарної інвазії на організм хазяїна є результати вивчення її генотоксичного і цитотоксичного впливу на основі сучасного методу ДНК-комет на клітинах лімфоцитів крові коропів. Для перевірки даної гіпотези було проведено дослідження рівня фрагментованої ДНК у лімфоцитах одnorічок коропа за дії ектопаразитів за допомогою методу ДНК-комет. Для цього було сформовано дванадцять груп риб по 6 особин у кожній, з різним ступенем інвазії. По чотири групи риб (контрольна та три дослідні) за ураження ектопаразитами *Lernaea cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator* та за змішаної інвазії. За інвазії *Lernaea cyprinacea* у риб 3-ї дослідної групи апоптичні клітини лімфоцитів крові перевищували контрольний показник в 1,2 рази ( $P < 0,05$ ). За ураження  $> 0,26$  екз./г м.т. (4-а дослідна група) відсоток «моменту хвоста» був у 3,4 рази вищим, ніж у контролі ( $P < 0,01$ ). Кількість апоптичних клітин перевищувала у 1,2 рази цю величину у лімфоцитах крові контрольних риб ( $P < 0,01$ ). За ураження риб дактилогірусами вірогідні зростання показників «моменту хвоста» та апоптичних клітин у лімфоцитах крові встановлено у риб 4-ї дослідної групи, а саме у 2,6 ( $P < 0,05$ ) та 1,3 рази ( $P < 0,05$ ), відповідно.

При дослідженні показника «моменту хвоста» у клітинах лімфоцитів за змішаної інвазії було встановлено вірогідне його зростання у риб 2-ї, 3-ї та 4-ї дослідних груп, відповідно у 2,3 рази ( $P < 0,05$ ), 4,3 ( $P < 0,01$ ) та 4,8 рази ( $P < 0,001$ ). Водночас відмічали вірогідне зростання кількості апоптичних клітин у лімфоцитах крові риб 3-ї та 4-ї дослідних груп у 1,6 ( $P < 0,05$ ) та 1,9 рази ( $P < 0,01$ ).

У наших дослідженнях встановлено, що дія ектопаразитів на лімфоцити крові риб характеризувалася збільшенням показника «моменту хвоста» і кількості апоптичних клітин поряд із зростанням ступеня інвазії. Ектопаразити виявляють генотоксичну та цитотоксичну дію на лімфоцити крові риб, спричиняють зростання односторонніх розривів лужно-лабільних сайтів ядерної молекули ДНК, апоптичних клітин у лімфоцитах крові, яке є прямо пропорційним зростанню кількості ектопаразитів.

**Ключові слова:** ДНК-КОМЕТ, МОМЕНТ ХВОСТА, АПОПТИЧНІ КЛІТИНИ, ЛІМФОЦИТИ, ОДНОРІЧКИ КОРОПА, ЕКТОПАРАЗИТИ, *LERNAEA CYPRINACEA*, *DACTYLOGYRUS VASTATOR*

## COMET ASSAY OF INFESTATION DEGREE OF CARP YEARLINGS BLOOD LYMPHOCYTES DNA UNDER THE EFFECT OF ECTOPARASITES

Y. V. Loboiko, V. V. Stybel  
llobojko@ukr.net

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named  
after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska st., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The results of research of infestation degree of carp yearlings blood lymphocytes DNA under the invasion by ectoparasites *Lernaea cyprinacea* and *Dactylogyrus vastator* and under the mixed infestation are presented in the article. Mutagenic properties of ectoparasite infestation on the host body are proved by

study results of its genotoxic and cytotoxic influence on the basis of modern DNA-comet assay on the cells of carp blood lymphocytes. To test this hypothesis it had been conducted the research of fragmented DNA level in carp yearlings lymphocytes under the influence of ectoparasites using the DNA-comet method. For this purpose there were formed twelve groups with 6 individuals in each with varying degrees of infestation. They were presented by four groups of fish (control and three experimental) under the infestation by ectoparasites *Lernaea cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator* and under the mixed infestations. Under the invasion by *Lernaea cyprinacea* the blood lymphocytes apoptotic cells of the fishes of 3rd experimental group exceeded the control 1.2 times ( $P<0.05$ ). Under the invasion  $>0.26$  ind./g b.w. (4th experimental group) the percentage of «tail moment» was 3.4 times higher than of control one ( $P<0.01$ ). The number of apoptotic cells exceeded 1.2 times this amount in the blood lymphocytes of control fish ( $P<0.01$ ). Under the invasion of fish by *Dactylogyrus vastator* reliable values of the "tail moment" and apoptotic cells in blood lymphocytes were registered in the fish of 4th experimental group, namely 2.6 ( $P<0.05$ ) and 1.3 times ( $P<0.05$ ), respectively.

When researching «tail moment» index in lymphocyte cells under the mixed invasion it was set up its reliable growth in 2nd, 3rd and 4th experimental groups, respectively, 2.3-times ( $P<0.05$ ), 4.3 ( $P<0.01$ ) and 4.8 times ( $P<0.001$ ). However, it was registered the reliable increasing of the apoptotic cells number in blood lymphocytes of the fishes of 3rd and 4th experimental groups in 1.6 ( $P<0.05$ ) and 1.9 times ( $P<0.01$ ).

There were observed in our study a certain regularity of ectoparasites effect on fish blood cells, which was characterized by increasing of «tail moment» index and the number of apoptotic cells along with increasing of infestation degree. Apparently, ectoparasites have genotoxic and cytotoxic effect on fish blood cells, cause the growth of single-stranded breaks of alkali labile sites of nuclear DNA molecule of apoptotic cells in blood lymphocytes, which is directly proportional to the increase in the number of ectoparasites.

**Keywords:** DNA COMET ASSAY, TAIL MOMENT, APOPTOTIC CELLS, LYMPHOCYTE, YEARLINGS CARP, ECTOPARASITES, *LERNAEA CYPRINACEA*, *DACTYLOGYRUS VASTATOR*

## КОМЕТ-АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ГОДОВИКОВ КАРПА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКТОПАРАЗИТОВ

Ю. В. Лобойко, В. В. Стибель  
llobojko@ukr.net

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, Львов, 79010, Украина

В статье представлены результаты исследований степени повреждения ДНК лимфоцитов крови годовиков карпа при поражении эктопаразитами *Lernaea cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator* и при смешанной инвазии. Подтверждением мутагенных свойств эктопаразитарных инвазий на организм хозяина являются результаты изучения их генотоксического и цитотоксического воздействия на основе современного метода ДНК-комет на клетках лимфоцитов крови карпов. Для проверки данной гипотезы было проведено исследование уровня фрагментированной ДНК в лимфоцитах годовиков карпа при действии эктопаразитов с помощью метода ДНК-комет. Для этого было сформировано двенадцать групп рыб по 6 особей в каждой, с разной степенью инвазии. По четыре группы рыб (контрольная и три опытных) при поражении эктопаразитами *Lernaea cyprinacea*, *Dactylogyrus vastator* и при смешанной инвазии. При инвазии *Lernaea cyprinacea* у рыб 3-й опытной группы апоптические клетки лимфоцитов крови превышали контрольный показатель в 1,2 раза ( $P<0,05$ ). При поражении  $>0,26$  экз./г м.т. (4-я опытная группа) процент «момента хвоста» был в 3,4 раза выше, чем в контроле ( $P<0,01$ ). Количество апоптических клеток превышало в 1,2 раза данный показатель в лимфоцитах крови контрольных рыб ( $P<0,01$ ). При поражении рыб дактилогирисами достоверный рост показателей «момента хвоста» и апоптических клеток в лимфоцитах крови отмечали у рыб 4-й опытной группы, а именно в 2,6 ( $P<0,05$ ) и 1,3 раза ( $P<0,05$ ), соответственно.

При дослідженні показателя «момента хвоста» в клітках лимфоцитів при смешанній інвазії був установлений достовірний його ріст в риб 2-ї, 3-ї і 4-ї опытних груп, відповідно в 2,3 ( $P < 0,05$ ), 4,3 ( $P < 0,01$ ) і 4,8 рази ( $P < 0,001$ ). В той же час, відзначали достовірний ріст кількості апоптичних кліток в лимфоцитах крові риб 3-ї і 4-ї опытних груп в 1,6 ( $P < 0,05$ ) і 1,9 рази ( $P < 0,01$ ).

В наших дослідженнях встановлено, що дія ектопаразитів на лимфоцити крові риб характеризувалось збільшенням показателя «момента хвоста» і кількості апоптичних кліток поряд з ростом ступеня інвазії. Следователно, ектопаразити проявляють генотоксичне і цитотоксичне дія на лимфоцити крові риб, викликають ріст одноцелочечних разрывов целочно-лабільних сайтів ядерної молекули ДНК, апоптичних кліток в лимфоцитах крові, котроре являється прямо пропорциональним росту кількості ектопаразитів.

**Ключевые слова:** ДНК-КОМЕТ, МОМЕНТ ХВОСТА, АПОПТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ, ЛИМФОЦИТЫ, ГОДОВИКИ КАРПА, ЭКТОПАРАЗИТЫ, *LERNAEA CYPRINACEA*, *DACTYLOGYRUS VASTATOR*

Одним з сучасних методів виявлення первинних пошкоджень молекули ДНК окремих клітин за дії чинників навколишнього середовища вважається гель-електрофорез поодиноких клітин — «Comet assay» або метод «ДНК-комет» [1].

Після лізису і електрофорезу еукаріотичних клітин, які проникли у агарозний шар, пошкоджена ДНК мігрує в електричному полі у напрямку до анода, і таким чином утворює структуру, схожу на комету, в якій виділяється «голова» і «хвіст». Інтерпретація результатів заснована на гіпотезі, що викликані генотоксичними чинниками пошкодження ДНК ядра складаються з низькомолекулярних ділянок, розривів, репараційно-вирізаних пошкоджень і кислотно-лабільних ділянок ДНК [2].

Метод ДНК-комет дає змогу виявляти пошкодження на клітинному рівні, тому він знайшов широке застосування в дослідженнях впливу різних екстремальних чинників довкілля на організм тварин [3, 4].

Попередніми нашими дослідженнями було встановлено, що ектопаразити спричинюють хромосомні мутації та утворення мікроядер в еритроцитах крові, що може бути наслідком їх імунотоксичної дії. Як наслідок, було зроблено припущення про потенційний токсичний вплив ектопаразитів на ДНК найчутливіших

клітин — лимфоцитів. У зв'язку з цим виникла необхідність з'ясування впливу *L. cyprinacea* та *D. vastator* на фрагментацію ДНК лимфоцитів. Як відомо, метод ДНК-комет дає змогу виявляти пошкодження на клітинному рівні, тому він знайшов широке застосування для дослідження впливу різних екстремальних чинників довкілля на організм риб [5–7].

Метою нашої роботи було дослідити, як впливає інтенсивність інвазії ектопаразитами на цілісність ДНК лимфоцитів крові однорічок коропа, яку оцінювали за допомогою ДНК-комет аналізу.

### Матеріали і методи

З метою дослідження ступеня ушкодження ДНК лимфоцитів крові однорічок коропа за ураження ектопаразитами з різним ступенем інвазії в акваріальних умовах було проведено дослід, в якому використовували спонтанно інвазованих збудниками дактилогірозу та лернеозу риб.

Період акліматизації риб становив 14 діб за температури води 16–18 °С. Перед виконанням досліду було проведено паразитологічне обстеження риб та визначено показники рівня їх інвазованості. Для цього було сформовано дванадцять груп риб по 6 особин у кожній, масою тіла 38,0±4,8 г. По чотири групи риб (контрольна та три дослідні) за ураження

ектопаразитами *L. cyprinacea*, *D. vastator* та за змішаної інвазії. За ураження *L. cyprinacea* риби першої групи були контрольними, другої — з інтенсивністю інвазії до 0,08 лерней на г маси тіла (г м.т.), третьої — з інтенсивністю від 0,11 до 0,26 лерней на г м.т. і четвертої — більше 0,26 лерней на г м.т. риби. За ураження *D. vastator* риби першої групи були контрольними, другої — уражені з інтенсивністю до 0,26 дактилогірусів на г м.т., третьої від 0,29 до 0,53 дактилогірусів на г м.т. та четвертої — більше 0,53 дактилогірусів на г м.т. За змішаної інвазії риби першої групи були контрольними, другої — з інтенсивністю інвазії до 0,08 лерней на г м.т. та до 0,26 дактилогірусів на г м.т., третьої — з інтенсивністю 0,11–0,26 лерней на г м.т. та 0,29–0,53 дактилогірусів на г м.т. і четвертої — більше 0,26 лерней г м.т. та 0,53 дактилогірусів на г м.т. Іхтіопаразитологічний аналіз проводили за методом неповного паразитологічного розтину за І. Є. Биховською-Павловською [8]. Видову належність паразитів визначали за «Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР» [9].

Інтенсивність інвазії (II) визначали шляхом підрахунку кількості паразитів в тилі та зябрах досліджуваної риби.

Рибу утримували в акваріумах ємністю 40 дм<sup>3</sup> зі штучною аерацією за температури 18–20 °С. Догляд за рибою та її годівлю проводили згідно відповідних норм та раціонів. Протягом усього періоду досліджень спостерігали за поведінкою та клінічним станом риб.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з рибами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [10].

Дослідження фрагментації ДНК методом ДНК-комет проводили згідно з Collins et al. [11]. Суспензію лімфоцитів інкубували в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР — 0,01 М фосфатно-буферний розчин, рН 7,2–7,4), після цього клітини осаджували центрифугуванням за 1500 об/хв протягом 2 хв. Потім клітини ресуспендували в ЗФР до концентрації 3×10<sup>4</sup> клітин/мл. До 0,5 мл суспензії клітин додавали 1,5 мл 1 % агарози. Одержану суспензію наносили на охолоджене предметне скельце. На скельця, покриті агарозою зі суспензією лімфоцитів, наносили буфер лізису (30 мМ ЕДТА, 0,5 % додецисульфат натрію, рН 8,0) протягом 4 год за температури 50 °С для того, щоб зруйнувати мембрани клітин. Далі їх промивали ТВЕ-буфером (90 мМ трис, 2 мМ ЕДТА, 90 мМ борна кислота, рН 8,5) протягом 2 год, після цього здійснювали електрофорез у ТВЕ-буфері (25 хв, 0,55 V/см<sup>2</sup>). Після електрофорезу зразки фарбували протягом 1 год 2,5 мкг/мл розчином пропідій йодиду. Під час мікроелектрофорезу лізатів клітин фрагментована ядерна ДНК утворює на електрофореграмі своєрідний ореол, який схожий на хвіст комети. Вважається, що розміри хвоста комети позитивно корелюють зі ступенем фрагментації ДНК [12, 13]. Візуалізацію результатів проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа («Karl Zeiss», Німеччина). Комети класифікували із використанням стандартної таблиці співвідношення розмірів «голови» та «хвоста» ДНК-комет [14].

### Результати й обговорення

При застосуванні методу ДНК-комет у лімфоцитах крові контрольних риб, інвазованих лернеями, протягом досліду показник «моменту хвоста» становив 0,46±0,12 %, а відсоток апоптичних клітин 3,81±0,38 (табл. 1, рис.). За інвазії *L. cyprinacea* до 0,08 екз./г м.т. у лімфоцитах крові експериментальних риб відсотки «моменту хвоста» та апоптичних клітин не перевищували контрольні показники.

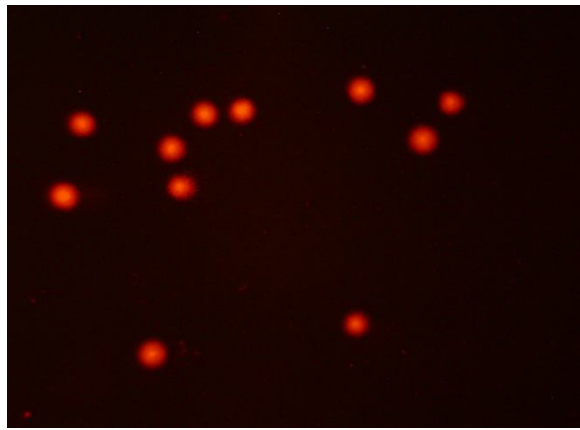
Показники «моменту хвоста» та апоптичних клітин лімфоцитів крові однорічок коропа, інвазованих *L. cyprinacea*, % ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показники	Групи риб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,08 екз./г м.т.	0,11-0,26 екз./г м.т.	> 0,26 екз./г м.т.
Момент хвоста	0,46±0,12	0,38±0,09	0,78±0,24	1,56±0,32**
Апоптичні клітини	3,81±0,38	4,06±0,75	4,56±0,67*	4,68±0,65**

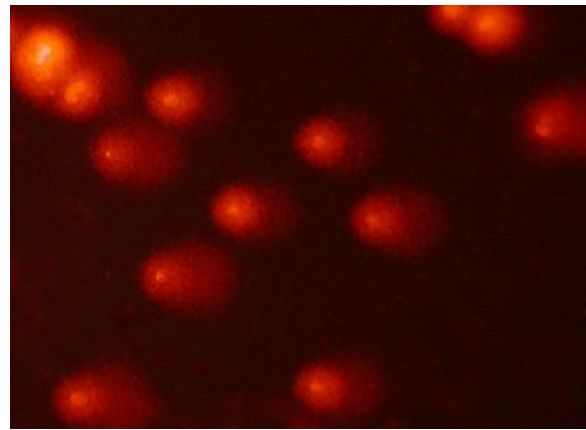
Примітка: \*—  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$

За інтенсивності інвазії 0,11–0,26 екз./г м.т. відсоток «моменту хвоста» був у 1,7 рази вищим від показника контрольної групи. Відсоток апоптичних клітин перевищував контрольний показник в 1,2 рази ( $P < 0,05$ ). За ураження

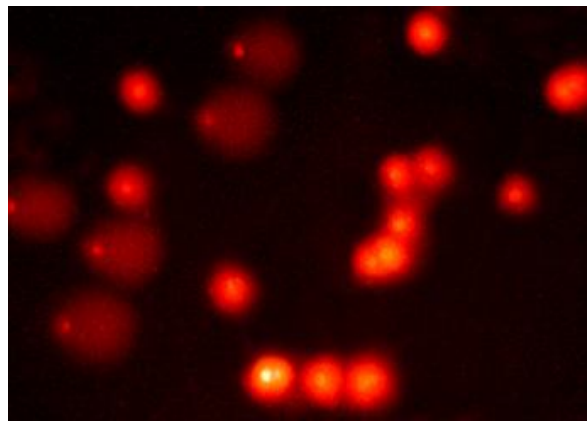
>0,26 екз./г м.т. відсоток «моменту хвоста» був у 3,4 рази вищим, ніж у контролі ( $P < 0,01$ ). Кількість апоптичних клітин перевищувала у 1,2 рази цю величину в лімфоцитах крові контрольних риб ( $P < 0,01$ ).



а



б



в

Рис. Лімфоцити крові однорічок коропа, отримані методом лужного гель-електрофорезу поодиноких клітин (метод ДНК-комет): а — клітини у нормі, б — клітини із пошкодженими ділянками ДНК у «моменті хвоста», в — апоптичні клітини. х 600

За ураження риб дактилогірусами вірогідні коливання показника «моменту хвоста» та кількості апоптичних клітин у лімфоцитах крові риб відмічали за

інтенсивності інвазії >0,53 екз./г м.т. (табл. 2), а саме у 2,6 ( $P < 0,05$ ) та 1,3 рази ( $P < 0,05$ ), відповідно.

Таблиця 2

**Показники «моменту хвоста» та апоптичних клітин лімфоцитів крові однорічок коропа, інвазованих *D. vastator*, % (M±m, n=6)**

Показники	Групи риб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,26 екз./г м.т.	0,29-0,53 екз./г м.т.	> 0,53 екз./г м.т.
Момент хвоста	0,37±0,14	0,43±0,18	0,51±0,16	0,97±0,16*
Апоптичні клітини	3,54±0,36	3,76±0,42	3,84±0,48	4,76±0,28*

Примітка: \* — P<0,05; \*\* — P<0,01

При дослідженні показника «моменту хвоста» у клітинах лімфоцитів за змішаної інвазії було встановлено вірогідне його зростання у риб 2-ї, 3-ї та 4-ї дослідних груп, відповідно у 2,3 рази

(P<0,05), 4,3 (P<0,01) та 4,8 рази (P<0,001) (табл. 3). Водночас відмічали вірогідне зростання кількості апоптичних клітин у лімфоцитах крові риб 3-ї та 4-ї дослідних груп у 1,6 (P<0,05) та 1,9 рази (P<0,01).

Таблиця 3

**Показники «моменту хвоста» та апоптичних клітин лімфоцитів крові однорічок коропа, за змішаної інвазії, % (M±m, n=6)**

Показники	Групи риб			
	1	2	3	4
	Контроль	до 0,8 лерней/ г м.т.; до 0,26 дактилогірусів/ г м.т.	0,11-0,26 лерней/ г м.т.; 0,29-0,53 дактилогірусів/ г м.т.	> 0,26 лерней/ г м.т.; > 0,53 дактилогірусів/ г м.т.
Момент хвоста	0,41±0,17	0,94±0,14*	1,76±0,32**	1,98±0,27***
Апоптичні клітини	3,62±0,41	4,56±0,53	5,64±0,56*	6,75±0,78**

Примітка: \* — P<0,05; \*\* — P<0,01; \*\*\* — P<0,001

Отже, було встановлено зростання ступеня фрагментації ДНК, що виявлялося у збільшенні показників «моменту хвоста» та кількості апоптичних клітин лімфоцитів крові коропа, які піддавалися впливу ектопаразитарної інвазії.

**Висновки**

За інвазії *L. suprinacea* у риб 3-ї дослідної групи кількість апоптичних клітин перевищувала контрольний показник в 1,2 рази (P<0,05). За ураження >0,26 екз./г м.т. відсоток «моменту хвоста» був у 3,4 рази вищим, ніж у контролі (P<0,01). Кількість апоптичних клітин перевищувала у 1,2 рази цей

показник у контрольних риб (P<0,01). За ураження риб дактилогірусами вірогідні коливання показників «моменту хвоста» та кількості апоптичних клітин у лімфоцитах крові риб відмічали у риб 4-ї дослідної групи, а саме у 2,6 (P<0,05) та 1,3 рази (P<0,05), відповідно. При дослідженні показника «моменту хвоста» та кількості апоптичних клітин лімфоцитів за змішаної інвазії було встановлено вірогідне їх зростання у риб 2-ї, 3-ї та 4-ї дослідних груп.

Враховуючи той факт, що на сьогодні важливе місце належить розробці сучасних методів діагностики стану водних біоресурсів, то одержані результати можуть мати практичне застосування при

вирішенні проблеми дослідження впливу паразитів на організм риб.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому буде досліджено вплив препаратів з групи макроциклічних лактонів, які використовують для лікування риб за ектопаразитозів, на рівень фрагментації ДНК у лімфоцитах однорічок коропа.

1. Cotelle S., Ferard J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Mutat. Res. Envir. and Mol. Mutagen*, 1999, 34, pp. 246–255.

2. Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J. Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res. Fund, and Mol. Mech. of Mutagen*, 2001, 478, pp. 89–96.

3. Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Diseases*, 2012, 35, (2), pp. 83–108.

4. Onyskovets M. Komet-analiz stupenya ushkozennya DNK limfocytiv krovi *Cyprinus carpio* L. za dii ioniv svincu. [Analysis of the DNA-damage level in lymphocytes of the *Cyprinus carpio* L. due to lead ions influence]. *Visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu. Seriya biolohichna — Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, 2013, issue. 61, pp. 20–24 (in Ukrainian).

5. Gopalakrishna P., Khar A. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1995, 30, pp. 69–73.

6. Merk O., Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to

genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1999, 33, pp. 167–172.

7. Olive P. L. The comet assay. An overview of techniques. *Methods in Molecular Biology*, 2001, 203, pp. 179–194.

8. Bychovskaya-Pavlovskaya E. I. *Parazity ryb. Rukovodstvo po izucheniju* [Parasites of fish. Guide to Study]. L., Nauka, 1985. 121 p. (In Russian).

9. Bauera O. N. Opredelitel parazitov presnovodnykh ryb fauny SSSR: V 3 t. [Determinant of freshwater fish parasites fauna of the USSR: In 3t.]. Leningrad, Nauka, 1987, T. 3 (2). 584 p.

10. Official Journal of the European Union L276/33. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — 86/609/EC. — 20.10.2010.

11. Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 1997, 375, pp. 183–193.

12. Heaton P. R., Ransley R., Charlton C. J. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J. Nutrition*, 2002, 132, (6), pp. 1598–1603.

13. Sanyal G., Doig P. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opinion Drug Discovery*, 2012, 7 (4), pp. 327–339.

14. Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. Single cell gel electrophoresis: methodology and applications, *J. Chromatography*, 1999, 722 (1–2), pp. 225–254.