

Исследование кластерных повреждений ДНК в печени при остром токсическом поражении

© А. Г. Скуратов, А. С. Шафорост, А. А. Зяцьков, А. Н. Лызииков, О. В. Осипкина, Е. В. Воропаев

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: провести апробацию и оптимизацию метода определения кластерных повреждений ДНК с оценкой количественных характеристик изменений в печени на экспериментальной модели острого токсического гепатита.

Материал и методы. В работе использовали лабораторных мышей линии C57Bl/6 в возрасте 10 недель. Острое токсическое повреждение печени индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения 30 % раствора CCl₄ в оливковом масле. Вывод из эксперимента проводили через 72 часа, резецировали фрагмент печени для определения кластерных повреждений ДНК.

Результаты. Предложены параметры электрофореза, которые являются наиболее оптимальными для получения первичных данных для последующего расчета количества кластерных повреждений ДНК. Количество кластеров в образцах ДНК животных контрольной группы статистически значимо меньше, чем в экспериментальной группе, и составляет 54,80 [37,65; 59,24] и 76,82 [60,95; 92,41] APE1-кластеров на миллион п.о. соответственно.

Заключение. Проведена успешная апробация и оптимизация метода OCDL для определения кластерных повреждений в ДНК печени. Показано увеличение количества APE1-кластеров и двухнитевых разрывов в ДНК лабораторных мышей линии C57Bl/6 на фоне индуцированного острого токсического гепатита, что свидетельствует о значительных нарушениях целостности ДНК и повышении риска развития прогрессирующих заболеваний печени при ее токсическом поражении.

Ключевые слова: острый токсический гепатит, кластерные повреждения ДНК.

Вклад авторов: Скуратов А.Г., Шафорост А.С., Зяцьков А.А., Лызииков А.Н., Осипкина О.В., Воропаев Е.В.: концепция и дизайн исследования, сбор материала и создание базы образцов, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, редактирование, обсуждение данных, обзор публикаций по теме статьи, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования: ПНИ «Фундаментальные и прикладные науки — медицине», 2016–2020 гг.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Скуратов АГ, Шафорост АС, Зяцьков АА, Лызииков АН, Осипкина ОВ, Воропаев ЕВ. Исследование кластерных повреждений ДНК в печени при остром токсическом поражении. *Проблемы здоровья и экологии.* 2020;4: 29–37.

Study of clustered DNA lesions in the liver in acute toxic injury

© ALEXANDER G. SKURATOV, ALEXANDER S. SHAFOROST, ALEXEY A. ZYATSKOV, ANATOLY N. LYZIKOV, OLGA V. OSIPKINA, EVGENII V. VOROPAЕV

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

ABSTRACT

Objective: to test and optimize a method for detecting clustered DNA lesions with an assessment of the quantitative characteristics of hepatic changes using an experimental model of acute toxic hepatitis.

Material and methods: Laboratory C57Bl/6 mice at the age of 10 weeks were used for the study. Acute toxic liver injury was induced by means of a single intraperitoneal injection of 30 % CCl₄ solution in olive oil. The withdrawal of the animals from the experiment was made after 72 hours. For the detection of clustered DNA lesions, a liver fragment was resected.

Results. The electrophoretic parameters which are the most optimal for obtaining primary data for the subsequent calculation of the number of clustered DNA lesions have been proposed. The number of clusters in the DNA samples from the animals of the control group is significantly lower than in the experimental group and amounts to 54.80 [37.65; 59.24] and 76.82 [60.95; 92.41] APE1 clusters per million bp., respectively.

Conclusion. Successful testing and optimization of the OCDL method for the detection of clustered lesions in liver DNA have been performed. The study has shown an increase in the number of APE1 clusters and double-strand breaks in the DNA of the C57Bl/6 laboratory mice with induced acute toxic hepatitis, which indicates significant derangement of DNA integrity and a high risk of developing progressive liver diseases in its toxic damage.

Key words: acute toxic hepatitis, clustered DNA lesions.

Author contributions: research concept and design, collecting material and creating a sample database, obtaining experimental data, statistical data processing, editing, discussing data, reviewing publications on the topic of the article, checking critical content, approving the manuscript for publication.

Conflict of interests: authors declare no conflict of interest.

Funding: State program of scientific research «Basic and applied sciences for medicine» 2016–2020.

FOR CITATION:

Skuratov AG, Shaforost AS, Zyatskov AA, Lyzikov AN, Osipkina OV, Voropaev EV. Study of clustered DNA lesions in the liver in acute toxic injury. *Health and ecology Issues*. 2020;4:29–37. (in Russ.)

Введение

Лечение пациентов с необратимыми поражениями печени, которые развиваются в результате персистирующей вирусной инфекции, хронической алкогольной или медикаментозной интоксикации, острых отравлениях и прочих причин, остается актуальной проблемой современной медицины. По данным ВОЗ за 2017 г., в мире только пациентов с хронической формой гепатита В и С проживает около 325 миллионов [1]. Основным методом лечения необратимых стадий этих прогрессирующих заболеваний является трансплантация печени, доступ к которой ограничен из-за недостатка донорских органов [2].

В то же время многие заболевания печени зачастую не требуют срочной трансплантации, так как степень поражения органа позволяет рассчитывать на его регенерацию и восстановление функции при корректном лечении. В частности, при остром токсическом поражении печени происходит нарушение нормального функционирования органа, что проявляется в виде баллонной или жировой дистрофии, центролобулярного некроза гепатоцитов, а также изменений в соединительной ткани в виде неспецифического реактивного гепатита [3]. В этих случаях для принятия оптимального решения необходимо иметь информацию о характере повреждения печени и ее регенерационном потенциале. Механизмы компенсации функций печени при ее повреждении реализуются при участии в той или иной форме ДНК. Именно поэтому исследование ее организации, структуры и целостности используется для изучения процессов репарации печени.

Одной из наиболее простых техник является морфометрический анализ гепатоцитов: проводится определение размера клетки, размера и площади ядра, доли двухядерных форм и др. [4, 5]. Высокой информативностью обладает метод ДНК-комет, который позволяет оценить степень фрагментации генетического материала после действия гетоксических факторов. По данным Кропотова А.В., 5-кратное ежедневное подкожное введение 0,4 мл 50 %

раствора тетрахлорметана в оливковом масле вызывает увеличение доли ДНК в хвосте комет с $26,2 \pm 11,3$ % до $74,8 \pm 16,7$ % по сравнению с животными контрольной группы, которым вводили оливковое масло (без тетрахлорметана) [6]. Перечисленные методы позволяют получить информацию о количестве повреждений без уточнений их вида. В частности, с помощью метода ДНК-комет в зависимости от его модификации возможно определить число одно- или двухнитевых повреждений.

Как правило, необходимость разработки новых методов исследования опосредована недостаточной информативностью существующих методик. Основой для их создания является появление новой парадигмы, объясняющей ранее известные научные данные о природе появления повреждений генетического материала и выдвигающей новые гипотезы о механизмах их формирования. Вышеперечисленные подходы к определению повреждений ДНК базировались на предположении о том, что генотоксический агент образует только одно повреждение в одном месте.

На смену этому утверждению пришла концепция формирования комплекса повреждений. Впервые эта идея была предложена Джоном Вордом в 1981 г. Он ввел понятие «локального множественно поврежденного участка» (locally multiply damaged site — LMDS) [7]. По его мнению, помимо повреждений ДНК при прямом действии повреждающего фактора образуются дополнительные за счет того, что при его взаимодействии с клеточной средой в очень малом объеме создается высокая концентрация свободных радикалов. В настоящее время для определения всего комплекса повреждений, возникающих при действии генотоксического фактора, применяют термин «Oxidative induced clustered DNA lesions (OCDL)» — окислительно индуцированные кластерные повреждения ДНК. В рамках данной концепции используются следующие термины:

— одиночные повреждения ДНК — отдельные участки с измененной структурой ДНК (одиночные разрывы, окисленные

основания, нуклеотиды с утеранным основанием);

— кластерные повреждения — 2 и более одиночных повреждений, расположенных на противоположных цепях ДНК на участке длиной 1–10 пар оснований (п.о.) [8]. Примером кластерного повреждения может быть двухнитевой разрыв, комплекс из однонитевого разрыва и окисленного основания или окисленного основания и нуклеотида с утраченным основанием.

Кластерные повреждения образуются при действии малых доз ионизирующего излучения, воздействии препаратов-радиомиметиков, химических агентов и, в меньшей степени, в результате протекания метаболических процессов [9].

Для определения кластерных повреждений используют подход, позволяющий идентифицировать различные их виды с помощью обработки ферментами, которые участвуют в процессе репарации ДНК — эксцизионной репарации оснований или эксцизионной репарации нуклеотидов. Для выявления кластерных повреждений используют ферменты, выделенные из микроорганизмов (*E. coli*) или тканей человека.

На рисунке 1 схематически показаны различные виды повреждений ДНК, принцип работы ферментов, участвующих в репарации повреждений, а также результат электрофоретического разделения проб интактной и облученной ДНК с/без обработки ферментом [10].

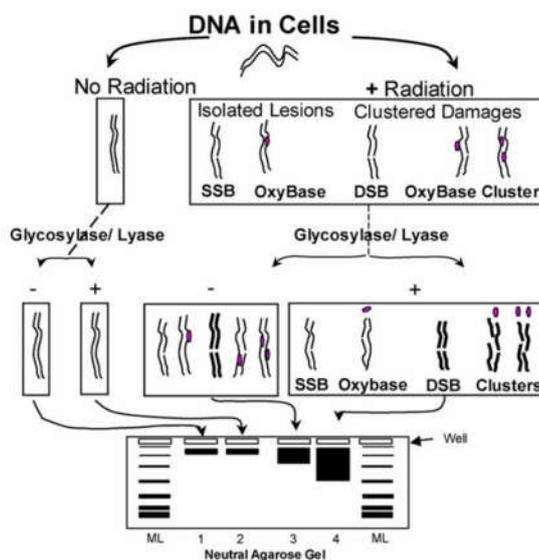


Рисунок 1 — Определение кластерных повреждений при помощи ферментов, обладающих гликозилазной/лиазной активностью, и электрофореза в агарозном геле (по Sutherland B. M. et al., 2003), где SSB — однонитевой разрыв; DSB — двухнитевой разрыв; ML — молекулярный стандарт веса ДНК

Вследствие отсутствия повреждений в образцах интактной ДНК обработка ферментом не приводит к увеличению фрагментации ДНК. При облучении ДНК (проба № 3) возникают двухнитевые разрывы, что на электрофореграмме отражается в увеличении размера бенда за счет увеличения числа фрагментов ДНК и уменьшения их размера. После ферментативной обработки образца облученной ДНК (№4) количество фрагментов увеличивается по сравнению с пробой №3 за счет образования двухнитевых разрывов в местах кластерных повреждений [10].

Электрофореграмма позволяет получить лишь качественную оценку целостности ДНК. Для количественного подсчета повреждений ДНК используется метод NALA (от англ. Number Average Length Analysis — ана-

лиз количества и средней длины фрагментов). Данный метод основан на подходе по определению средней длины молекул в популяции полимеров, который был адаптирован для биополимеров J.C. Sutherland [10].

Для экспериментальной и клинической медицины определение количества кластерных повреждений у экспериментальных животных и пациентов с различной патологией печени является важным шагом в понимании механизмов патогенеза и поиска новых концепций в лечении.

Цель исследования

Провести апробацию и оптимизацию метода определения кластерных повреждений ДНК с оценкой количественных характеристик изменений в печени на

экспериментальной модели острого токсического гепатита.

Материал и методы

Моделирование острого токсического гепатита

Для эксперимента использовали лабораторных мышей линии С57В1/6 в возрасте 10 недель. Животных содержали группами по 5–6 особей в клетке. Мыши до и после экспериментального воздействия содержались в стандартных условиях вивария учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» и получали стандартный рацион и воду *ad libitum*. Все работы были выполнены в соответствии с правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях [11].

Острое токсическое повреждение печени индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения 30 % раствора CCl_4 в оливковом масле (La Espanola, Испания) в количестве 3 мкл/г веса животного.

Были сформированы следующие экспериментальные группы:

группа 1 (n = 10) — интактный контроль (10 недель), масса тела = $34,32 \pm 2,94$ г, инъекция 1хPBS 3 мкл/г веса животного;

группа 2 (n = 10) — эксперимент (10 недель), масса тела = $34,52 \pm 3,69$ г, инъекция 30 % раствора CCl_4 3 мкл/г веса животного.

Таблица 1 — Состав реакционной смеси для определения кластерных повреждений

Реагент/проба	АРЕ1+	АРЕ1-
Вода, мкл	4,8	5
10х ферментативный буфер, мкл	1	1
DNA, мкл	4	4
Фермент (10000 U/ml), мкл	0,2	0
Объем смеси, мкл	10	10

Компоненты смешивали на льду, фермент добавляли в последнюю очередь. Готовую смесь инкубировали на льду 15 мин, а затем 1 час при температуре 37 °С.

Для прекращения реакции добавляли 5 мкл охлажденного Стоп-раствора (50 % глицерол (v/v), 100 мМ ЭДТА, 0,025 % бромфеноловый голубой (w/v), 0,025 % ксиленцианол (w/v)), который одновременно является загрузочным буфером для внесения в агарозный гель. Инкубировали 30 мин на льду.

Пробы загружали в 1,0% агарозный гель и оставляли на 10 мин для уравнивания. В качестве маркера использовали λ DNA HindIII (Thermo Fisher Scientific, США),

вывод из эксперимента проводили через 72 часа путем передозировки хлороформным наркозом. Для определения кластерных повреждений отбирали фрагмент средней доли печени массой около 100 мг. Биоптаты после взятия помещали в 50 мкМ раствор антиоксиданта TEMPOL (Sigma Aldrich, США), приготовленный на 1х PBS. По завершении эксперимента образцы замораживали и хранили при -80 °С.

Выделение ДНК

Перед выделением ДНК образец печени предварительно измельчали с помощью стеклянного пестика. Выделение ДНК из биоматериала проводили с помощью коммерческого набора Fermentas Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно инструкции. Концентрацию ДНК измеряли на безкюветном спектрофотометре NanoDrop ND-1000.

Методика определения кластерных повреждений ДНК (OCDL)

Методика учета кластерных повреждений основана на сравнении миграции ДНК в геле для проб, подвергшихся обработке ферментами-эндонуклеазами, и интактных проб. Наиболее часто используются следующие эндонуклеазы: АРЕ1 (Nfo1), OGG1 (Fpg), NTH1 (EndoIII).

Протокол метода

Для определения скрытых повреждений готовили реакционную смесь, содержащую 4 мкл ДНК (100 нг). Данные о ее составе приведены в таблице 1.

который позволяет идентифицировать массу фрагментов ДНК от 23130 до 564 п.о.

Электрофоретическое разделение ДНК проводили в 0,5х TBE (44,5 мМ Tris-основание, 44,5 мМ H3BO3, 1 мМ ЭДТА, pH = 7,6) в течение 3 ч при постоянном напряжении 2,5 В/см. Гель окрашивали 10 мин с помощью 0,0001 % раствора этидиум бромид.

Изображения результатов электрофоретического разделения ДНК получали с помощью системы гель-документации ChemiDoc XR (Bio-Rad, США).

Анализ полученных изображений

1. Загружали изображение (формат jpg), полученное с помощью системы гель-документации, в программу ImageJ.

2. Выделяли линии геля при помощи инструмента «Прямоугольное выделение», строили для каждой «Профиль в вертикальном направлении» (Analyze → Plot Profile (Alt+K)) и получали данные об изменении интенсивности свечения в зависимости от дистанции пробега в пикселях.

3. Определяли соответствие дистанции пробега (в пикселях) молекулярному весу фрагментов ДНК (в п.о.) по образцу маркера молекулярного веса.

4. Строили график зависимости дистанции пробега от молекулярного веса ДНК. В качестве аппроксимирующей функции использовали two phase exponential decay (уравнение 1):

$$Y = \text{Span1} * \exp(-K1*X) + \text{Span2} * \exp(-K2*X) + \text{Plateau} \quad (1)$$

5. С его помощью рассчитывали значения молекулярного веса для каждого пикселя миграции. Значения необходимых переменных находили во вкладке Results/Nonlinfit of Data, расположенной в левой части интерфейса программы Graph Pad Prism 5.00.

6. Ограничивали область анализа путем исключения данных до начала пика, соответствующего нативной ДНК (23 000 п.н.).

7. В MS Excel находили минимальное значение интенсивности серого для каждого ряда, соответствующего линии геля. Проводили удаление фонового свечения для каждой линии геля вычитанием минимального значения интенсивности свечения из каждого значения ряда.

8. Из-за отличий в количестве ДНК в разных линиях геля необходимо приведение данного показателя к единому значению. Это достигается за счет нормализации данных (деления интенсивности в данной точке на суммарную интенсивность свечения ряда).

9. Рассчитывали среднюю длину молекул ДНК для каждого ряда по уравнению 2:

$$L = \int f(x)dx / (\int f(x)dx / L(x)dx) \quad (2),$$

где $f(x)dx$ — интенсивность свечения в данной точке пробега, $f(x)dx/L(x)dx$ — отношение интенсивности свечения к молекулярному весу (L) в данной точке пробега.

Частоту встречаемости кластеров рассчитывали следующим образом (уравнение 3):

$$\Phi_c = 1/L(\text{enzyme}+) - 1/L(\text{enzyme}-) \quad (3).$$

Частоту двухнитевых разрывов рассчитывали по уравнению 4:

$$\Phi_{\text{DSB}} = 1/L(\text{воздействие}+) - 1/L(\text{воздействие}-) \quad (4).$$

Статистические методы исследования

Статистический анализ данных проводился при помощи пакета «Statistica», 10 (StatSoft). Проверка соответствия распределения количественных данных закону нормального распределения выполнялась с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Количественные данные, распределение которых не являлось нормальным, описывались с помощью медианы и межквартильного размаха. Сравнение двух выборок количественных признаков проводили с помощью U-теста Манна-Уитни. Статистически значимым считали результат, если вероятность отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Морфологическая характеристика печени животных

При отборе образцов проводили фотосъемку печени (рисунок 2).



а



б

Рисунок 2 — Печень мышей-самцов C57Bl на 3-и сутки после введения: а) раствора PBS (3 мкл/г веса); б) 30 % р-ра ТХМ на оливковом масле (3 мкл/г веса)

Печень мышей-самцов С57В1 из контрольной группы имеет глянцевую поверхность, однородную структуру и насыщенный цвет. Для здорового органа характерно отсутствие уплотнений, доли свободно движутся относительно друг друга. У экспериментальных животных после введения ТХМ поверхность печени становится визуально шероховатой, зернистой. По сравнению со здоровым органом поверхность матовая. Наблюдается увеличение размера органа.

Оптимизация методики определения кластерных повреждений ДНК

Для определения кластерных повреждений использовали образцы ДНК с высокой степенью чистоты (отношение ОП 260/280 не менее 1,9).

Для повышения качества результатов исследования было проведено электрофоретическое разделение одного из образцов ДНК при следующих условиях: 1,0 % ага-

розный гель, 0,5x TBE буфер, напряжение — 10 V/см, время = 60 мин. Результаты представлены на рисунке 3.

Предварительный электрофорез анализируемого образца свидетельствует о наличии ясно различимого высокомолекулярного фрагмента ДНК и большого количества низкомолекулярных фрагментов размером от 50 до 1000 п.о. Основные линии маркера четко различимы. Используемые условия электрофоретического разделения прекрасно подходят для оценки качества образца, однако методика определения кластерных повреждений требует более качественного разделения низкомолекулярных фрагментов. В связи с этим были изменены напряжение и время разделения — 3 V/см и 180 мин соответственно. Для электрофореза использовали 80 нг ДНК на 1 лунку. Результаты представлены на рисунке 4.

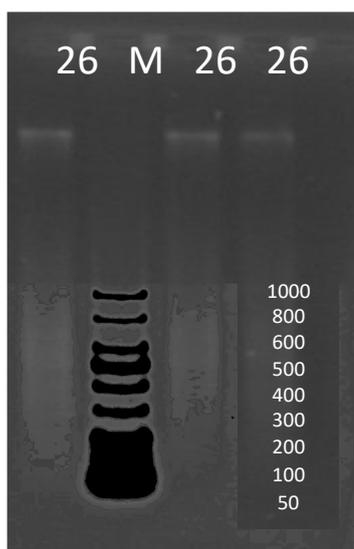


Рисунок 3 — Электрофореграмма образца ДНК № 26 из печени мыши С57В1/6, маркер Low Range DNA Ladder 50–1000 п.о. (Jena Bioscience GmbH, Германия)

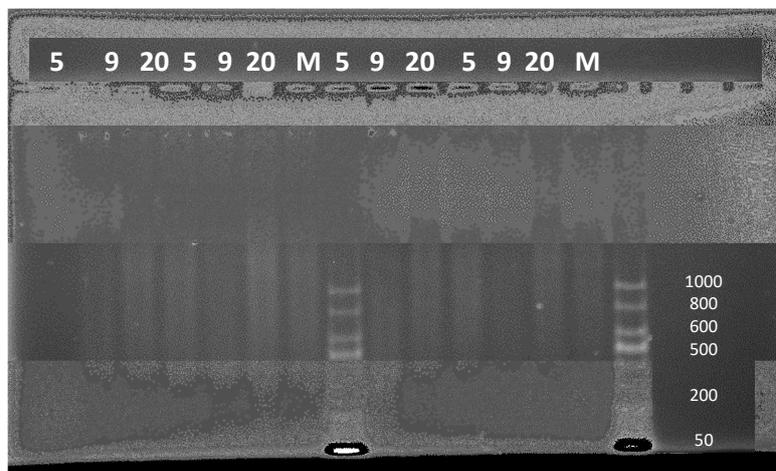


Рисунок 4 — Электрофореграмма образцов ДНК № 5, 9, 20 из печени мыши С57В1/6, маркер Low Range DNA Ladder 50–1000 п.о. (Jena Bioscience GmbH, Германия)

Анализ полученного изображения позволяет сделать вывод о хорошем разделении низкомолекулярных фрагментов ДНК. Однако близкое расположение наиболее легких из них к нижнему краю геля может привести к искажению получаемых результатов из-за большей яркости краев геля. Интенсивность свечения образцов ДНК несколько ниже, чем у маркера. Для улучшения

качества результатов необходимо уменьшить количество маркера и напряжение электрофореза.

На рисунке 5 показаны результаты электрофоретического разделения образцов ДНК в 1% агарозном геле с использованием 0,5x TBE, при напряжении 2,5 V/см в течение 180 минут. Для анализа использовали 100 нг образца ДНК.

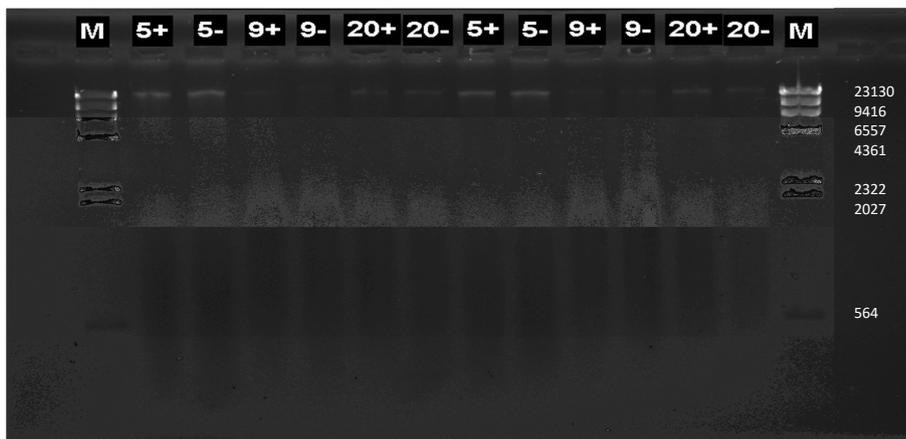


Рисунок 5 — Электрофореграмма образцов ДНК № 5, 9, 20 для последующего анализа кластерных повреждений, «+» и «-» — образцы, обработанные и необработанные эндонуклеазой APE1, маркер λ DNA Hind III Digest 23130–564 п.о. (Thermo Fisher Scientific, США)

Полученная электрофореграмма имеет высокое качество: линии геля, высоко- и низкомолекулярные фрагменты хорошо различимы, отсутствует засветка от маркера и периферических зон агарозного геля. Таким образом, используемые параметры являются наиболее оптимальными для получения первичных данных для последующего расчета количества кластерных повреждений ДНК.

Определение количества APE1-кластеров в образцах ДНК из печени интактных и экспериментальных животных

После проведения электрофоретического разделения обработанных и необ-

работанных эндонуклеазой APE1 образцов ДНК из печени контрольных животных и мышей после введения 30 % р-ра ТХМ были получены данные о средней длине молекул ДНК в указанных пробах. В контроле величина этого параметра колебалась в пределах 760–1187 п.о., в то время как в экспериментальной группе — 787–1278 п.о.

Частоту APE1-кластеров рассчитывали по формуле 3. Количество на 1 миллион п.о. вычислили путем умножения полученного значения на 1×10^6 . Данные представлены на рисунке 6.

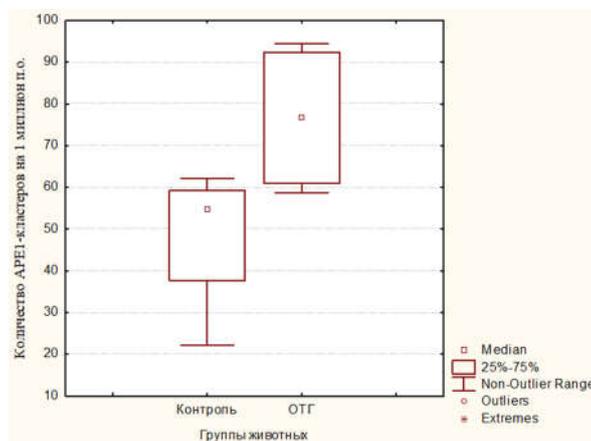


Рисунок 6 — Количество APE1-кластеров в образцах ДНК из печени контрольных животных и мышей с индуцированным острым токсическим гепатитом

Количество кластерных повреждений, которые можно выявить с помощью эндонуклеазы APE1, в образцах ДНК интактных животных статистически значимо меньше, чем в экспериментальной группе, и составляет 54,80 [37,65; 59,24] APE1 кластера/ миллион п.о. (Mann-Whitney U-Test: $Z = -2,02$; $p = 0,043$). Количество двухнитевых разрывов в ДНК животных, которым вводили гепатотоксин, составляет 76,82 [60,95; 92,41] на миллион п.о.

Заключение

Проведена успешная апробация и оптимизация метода OCDL для определения кластерных повреждений в ДНК печени на фоне индуцированного острого токсического гепатита.

Показано увеличение количества APE1-кластеров и двухнитевых разрывов в ДНК лабораторных мышей линии C57Bl из экспериментальной группы по сравнению с контролем, что свидетельствует о значительных нарушениях целостности ДНК и повышении риска развития прогрессирующих заболеваний печени при ее токсическом поражении. Полученные данные важны для разработки дизайна последующих экспериментов, понимания роли кластерных повреждений в патогенезе болезни и репаративной регенерации печени, а также для оценки эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ: вирусный гепатит 2017 [Электронный ресурс]. [Дата доступа: 16.10.2019]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/21-04-2017-new-hepatitis-data-highlight-need-for-urgent-global-response>
2. Ларвинюк Р. Статистика трансплантации РБ на 01.09.2016 [Электронный ресурс]. [Дата доступа: 16.10.2019]. Режим доступа: <https://transplantology.net/statistika/>
3. Подымова СД. Болезни печени: Руководство. Москва, РФ: Медицина; 2005. 768 с.
4. Купша ЕИ. Морфофункциональная характеристика ядер гепатоцитов мышей при свинцовой интоксикации. *Международный Научно-Исследовательский Журнал*. 2017;11(65), Ч.3:27-29.
5. Скуратов АГ, Лызилов АН, Зиновкин ДА, Чешик ИА, Петренев ДР. Морфометрические параметры регенерации печени при частичной гепатэтомии и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте. *Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия Медицинских Наук*. 2016;4:57-65.
6. Кропотов АВ. Оценка генотоксичности тетрахлорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет в пе-

чени крыс. *Тихоокеанский Медицинский Журнал*. 2013;52(2):63-66.

7. Ward JF. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat. Res.* 1981;86(2):185-195.
8. Newsheer S. Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. *Mutat. Res.* 2009;674(1-2):131-136.
9. Sutherland BM. Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiat. Res.* 2002;157(6):611-616.
10. Sutherland BM. Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutat. Res.* 2003;531(1-2):93-107.
11. Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123). Guidelines for Accommodation and Care of Animals. Approved by the multilateral consultation. *Cons.* 123,3.1986: 11p.

REFERENCES

1. ВОЗ: вирусный гепатит 2017 [Elektronnyj resurs]. [Data dostupa: 16.10.2019]. Rezhim dostupa: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/21-04-2017-new-hepatitis-data-highlight-need-for-urgent-global-response> (In Russ.)
2. Larvinjuk R. Statistika transplantacii RB na 01.09.2016 [Elektronnyj resurs]. [Data dostupa: 16.10.2019]. Rezhim dostupa: <https://transplantology.net/statistika/>. (In Russ.)
3. Podymova SD. Bolezni pecheni: Rukovodstvo. Moskva, RF: Medicina; 2005. 768 p. (In Russ.)
4. Kupsha EI. Morfofunkcional'naja harakteristika jader gepatocitov myshej pri svincovoj intoksikacii. *Mezhdunarodnyj Nauchno-Issledovatel'skij Zhurnal*. 2017;65(11), Ch.3:27-29. (In Russ.)
5. Skuratov AG, Lyzikov AN, Zinovkin DA, Cheshik IA, Petrenev DR. Morfometricheskie parametry regeneracii pecheni pri chastichnoj gepatjektomii i transplantacii mezenhimal'nyh stvolovyh kletok v jekspirimente. *Izvestija Nacional'noj Akademii Nauk Belarusi. Serija Medicinskih Nauk*. 2016;4:57-65. (In Russ.)
6. Kropotov AV. Ocenka genotoksichnosti tetrahlormetana i zashhitnogo dejstvija silibinina i haurantina s pomoshh'ju metoda DNK-komet v pecheni krys. *Tihookeanskij Medicinskij Zhurnal*. 2013;52(2): 63-66. (In Russ.)
7. Ward JF. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat. Res.* 1981;86(2):185-195.
8. Newsheer S. Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. *Mutat. Res.* 2009;674(1-2):131-136.
9. Sutherland BM. Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiat. Res.* 2002;157(6):611-616.
10. Sutherland BM. Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutat. Res.* 2003;531(1-2):93-107.
11. Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123). Guidelines for Accommodation and Care of Animals. Approved by the multilateral consultation. *Cons.* 123,3.1986: 11p.

Поступила 18.11.2020

Received 18.11.2020

Принята в печать 22.12.2020

Accepted 22.12.2020

Сведения об авторах:

Скуратов Александр Геннадьевич — к.м.н., доцент, доцент кафедры хирургических болезней № 1 с курсом сердечно-сосудистой хирургии УО «Гомельский государственный медицинский университет»; e-mail: alexskuratov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1994-1156>

Шафорост Александр Сергеевич — научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-6725-5353>

Зяцьков Алексей Александрович — научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0001-9542-3791>

Лызиков Анатолий Николаевич — д.м.н., профессор, профессор кафедры хирургических болезней № 1 с курсом сердечно-сосудистой хирургии УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-4668-6007>

Осипкина Ольга Викторовна — заведующий НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-1931-4224>

Воропаев Евгений Викторович — к.м.н., доцент, проректор по научной работе УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-9435-6109>

Автор, ответственный за переписку:

Скуратов Александр Геннадьевич — e-mail: alexskuratov@mail.ru

Information about authors:

Alexander G. Skuratov — Candidate of Medical Science, Associate Professor (PhD), Associate Professor at the Department of Surgery No.1 with the course of Cardiovascular Surgery of the educational institution «Gomel State Medical University»; e-mail: alexskuratov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1994-1156>

Alexander S. Shaforost — Researcher at the Research Laboratory of the educational institution «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-6725-5353>

Alexey A. Zyatkov — Researcher at the Research Laboratory of the educational institution «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0001-9542-3791>

Anatoly N. Lyzikov — Doctor of Medical Science, Professor, Professor at the Department of Surgery No.1 with the course of Cardiovascular Surgery of the educational institution «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-4668-6007>

Olga V. Osipkina — Head of the Research Laboratory of the educational institution «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-1931-4224>

Evgenii V. Voropaev — Candidate of Medical Science, Associate Professor (PhD), Vice-rector in charge of scientific work of the educational institution «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-9435-6109>

Corresponding author:

Alexander G. Skuratov — e-mail: alexskuratov@mail.ru