

УДК 575.15

О.А. КОВАЛЕВА

Институт агроэкологии
Украинской академии аграрных наук, Киев

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ



Рассматриваются разные типы цитогенетических аномалий, используемые в классической цитогенетике для оценки уровня повреждения хромосомного аппарата. Обсуждаются возможные причины возникновения различных типов цитогенетических аномалий, а также разнообразие методов микроядерного теста. Показано, что разные уровни организации генетического материала (нуклеотидный, хромосомный, надхромосомный) оказывают влияние на процессы реализации дефекта нуклеотидной последовательности в цитогенетическую аномалию.

© О.А. КОВАЛЕВА, 2008

Введение

Первые исследования мутационных спектров в соматических клетках относятся к началу XX века. С тех пор цитогенетические исследования широко используются для оценки мутационных событий, в том числе и у видов млекопитающих.

При анализе мутационных спектров в соматических клетках как у мелких млекопитающих, так и у человека определенную трудность составляет выбор исследуемой ткани. Описаны выраженные различия по стабильности хромосомного аппарата клеток млекопитающих в зависимости от уровня и направления их цитодифференцировки. Так, например, установлено, что В-лимфоциты более чувствительны к радиационным повреждениям, чем Т-лимфоциты [1], а в контрольной популяции Т-лимфоцитов в два раза выше частота сестринских хроматидных обменов, чем у В-лимфоцитов [2]. Выявляются множественные хромосомные аномалии в клетках кожи больных семейной формой меланомы (соответствующий ген локализован в хромосоме 1 человека), но не в лимфоцитах тех же больных [3]. Обнаружены различия в частотах хромосомных аномалий у разных клонов лимфоцитов, полученных от одного и того же донора [4]. Частота встречаемости реципрокных транслокаций после ионизирующего облучения не изменяется со временем в различных тканях мышей, однако через неделю после облучения возрастает в клетках костного мозга, после чего остается постоянной [5].

При отсутствии лабораторных условий в некоторых случаях для быстрой диагностики генетического благополучия удобны экспресс-методы с использованием микроядерного теста. У человека подсчет микроядер проводится среди популяций лимфоцитов и эритроцитов, в клетках эпителиальных тканей. Преимущество микроядерного теста в клетках, например, буккального эпителия заключается в простоте взятия материала в полевых условиях, сравнительно небольших временных и материальных затратах и, следовательно, в возможности обработать достаточно большой массив данных [6, 7]. Микроядерный тест в клетках периферической крови также удобен в полевых условиях при исследовании разных видов животных [8]. Преимущества и недостатки микроядерного теста будут рассмотрены ниже.

Более трудоемкими методами анализа повреждений генетического материала соматических клеток являются цитогенетический анализ периферических лимфоцитов у человека и анализ клеток костного мозга у животных. При таких исследованиях необходимы лабораторные условия: для культивирования клеток исследуемых тканей, периферической крови, забоя животных и выделения костного мозга. В то же время разнообразие рассматриваемых цитогенетических параметров на разных стадиях митоза позволяет получить более объективную по сравнению с микроядерным тестом картину состояния различных характеристик хромосомного аппарата.

Гетерогенность типов хромосомных aberrаций

Хромосомные aberrации возникают в результате повреждений ДНК, которые приводят к разрыву двойной спирали. При изучении процессов репарации ДНК установлено много видов первичных повреждений ДНК, приводящих к появлению одно- и двунитевых разрывов: повреждения оснований, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, алкилирования оснований или фосфатных групп, интеркаляции, тиминовые димеры, апуриновые или апиримидиновые сайты. Эти повреждения могут или репарироваться, или фиксироваться, при этом либо обновляется оригинальная последовательность оснований, либо возникают генные мутации, хромосомные aberrации [9]. Проведенными исследованиями установлено, что более чувствительны к облучению эухроматиновые сегменты, теломеры, а также участки хромосом, в которых локализованы гены, ассоциированные с онкологической патологией [10].

Существует еще теория о том, что для возникновения хромосомной aberrации недостаточно наличия двойного разрыва молекулы ДНК, а необходим также, по-видимому, одновременный разрыв и матриксной белковой осевой структуры или нарушение ее ресинтеза после частичной деполимеризации в ходе подготовки к митозу [11]. Было показано, что воздействие малых доз ионизирующего излучения приводит к увеличению количества ДНК-белковых сшивок, которые представляют собой некоторую форму клеточного ответа на повреждение ДНК [12].

Предполагается, что нарушения непрерывности ДНК могут сохраняться и проявляться в метафазе в виде разрывов. Альтернативой этому является возможность ликвидации разрывов в результате репарационных процессов, и тогда в хромосоме не будут наблюдаться видимые структурные изменения [13]. Если два разрыва ДНК совпадают во времени и пространстве интерфазного ядра, то разорванные участки могут объединяться между собой с возникновением обменных конфигураций [14].

Химические модификации ДНК, которые в процессе метаболических превращений могут реализовываться в структурные aberrации хромосом (САХ), принято называть потенциальными повреждениями (ПП) [14]. Показано, что радиационно-индуцированные ПП реализуются в структурные aberrации хромосом в митозе; превращения ПП в интерфазе, в том числе их репарация, не сопровождаются возникновением САХ — это безабберантные процессы [13]. Установлено, что при действии *in vitro* разных видов ионизирующего облучения индуцируются повреждения хромосом на всех стадиях клеточного цикла и приводят к образованию aberrаций как хромосомного, так и хроматидного типа. Наибольшей радиочувствительностью *in vitro* обладает G_2 -стадия, наименьшей — S-стадия; G_0 - и G_1 -стадии занимают промежуточное положение. За счет блокирования клеток в G_2 -периоде происходит увеличение продолжительности интерфазы [15]. Обнаружены достоверные различия по частоте встречаемости хромосомных aberrаций, анализируемых в интерфазе (после репарации) и метафазе после ионизирующего облучения. Эти различия могут объясняться продолжительностью митоза и/или интерфазной смертью [16].

По мнению Лебедевой [13], индукторами G_2 -блока являются ПП: подобно тому, как репарация ДНК активируется только при наличии химических модификаций в ДНК, так G_2 -блок характерен только для тех клеток, которые имеют ПП, и как внеплановый синтез ДНК, так и задержка вступления в митоз при G_2 -блоке может свидетельствовать о наличии ПП в хромосомах.

При радиационном действии к числу ПП принято относить двунитевые разрывы ДНК

[14]. В этой работе представлены расчеты, позволяющие предполагать, что в клетках мыши они возникают с частотой 0,06 разрыва на 1 рад. Допустив, что двунитевые разрывы ДНК являются индукторами G_2 -блока, можно предвидеть высокую частоту задержки клеток в G_2 -периоде, которая приближается к 100 % при дозах 25–50 сГр. При дальнейшем повышении дозы увеличивается не столько число клеток с ПП, зависящее от пула делящихся клеток, сколько число ПП в одной клетке. Это требует большего времени для освобождения клеток от ПП, и можно ожидать, что в этом диапазоне доз с ростом дозы будет увеличиваться не столько число клеток, блокированных в G_2 -периоде, сколько продолжительность блока.

Точки разрывов хромосом при образовании хромосомных маркеров и структурных перестроек («горячие точки»), как правило, выявляют в G -дисках хромосом. Распределение «горячих точек» в хромосомах является важной характеристикой кариотипа, которая отражает нестабильность отдельных районов хромосом.

Аберрации бывают хроматидного и хромосомного типа: первые затрагивают одну хроматиду, другие — обе хроматиды, причем показано, что как у жителей зоны отчуждения ЧАЭС, так и у жителей «чистого» региона преобладают аберрации хроматидного типа (в среднем до 79 %) [17].

Разрывы отличаются от обменных конфигураций по их физическому виду в метафазе и являются настоящими повреждениями непрерывности хромосомы с четким сдвигом фрагментов, включая также фрагменты, хромосомное происхождение которых иногда невозможно установить. Обменные конфигурации можно разделить на внутривхромосомные, т.е. те, которые возникли внутри хромосомы, и межхромосомные, т.е. обмены участками между двумя хромосомами. Классификация внутренних и межхромосомных обменов применяется в отношении аберраций как хромосомного, так и хроматидного типа. В зависимости от локализации первичного разрыва и характера следующих соединений возможна дальнейшая классификация обменов, которые включают такие варианты, как симметричные и несимметричные, полные и неполные.

Большинство аберраций, которые наблюдаются в первой метафазе после действия генотоксина, летальны для самой клетки или для дочерних клеток. При образовании ацентрических фрагментов всегда возникает генетический дисбаланс. В случае аберраций хромосомного типа обе дочерние клетки гибнут, поскольку повреждение затрагивает обе хроматиды. Показано, что при латентном течении инфекции у беременных отмечается повышение частоты структурных аномалий хромосом с превалированием аберраций хроматидного типа [18].

Сохранить жизнедеятельность могут только клетки, несущие хромосомные или хроматидные обмены, при которых не произошла утрата генетического материала, при этом цитогенетические повреждения передаются следующим поколениям клеток [19]. Аберрации хроматидного типа, которые прошли через первое клеточное деление, превращаются в аберрации хромосомного типа. Сбалансированными стабильными типами аберраций являются реципрокные транслокации и инверсии. Поскольку нет правил без исключений, случайная сбалансированность генетического материала (генных доз) может привести к сохранению жизнедеятельности клетки при различных типах повреждений [19]. Заболевания человека хромосомной природы, такие как синдром кошачьего крика (делеция в хромосоме 5) или болезнь Дауна (трисомия 21), объясняются структурными и численными хромосомными изменениями, т.е. генетическим дисбалансом.

Встречаются и некоторые менее специфические хромосомные изменения, например, так называемые субхроматидные аберрации. Их впервые наблюдали на стадии анафазы (наиболее часто в виде мостов) после действия на делящиеся клетки ионизирующего облучения в стадии профазы [20].

Мосты являются следствием разрывов хромосом и объединения фрагментов, имеющих центромеры, в результате чего возникают дицентрики. При этом ацентрические фрагменты чаще опаздывают в митозе, и в интерфазе из них формируются микроядра. Наличие клеток с дицентриками может свидетельствовать об облучении организма [21].

Ди- и полицентрические хромосомы, растягиваясь между группами ана- или телофаз-

ных хромосом, задерживают наступление цитотомии. Описаны циклы разрыв — слияние — мост в популяциях клеток, которые являются причиной повторно возникающих хромосомных мутаций [22].

Некоторые авторы рекомендуют применять анализ частот встречаемости сестринских хроматидных обменов (СХО) для оценки вызванных облучением повреждений ДНК [23].

Вследствие нехваток хромосомы укорачиваются, и физическое отсутствие участков одного из гомологов приводит к гемизиготному состоянию генов, находящихся в другом гомологе. Если теряются доминантные аллели одного из гомологов гетерозиготы, то наблюдается фенотипическое проявление рецессивных аллелей генов хромосомы, не затронутой абберацией. Поскольку вследствие делеций теряются участки хромосом, у гетерозигот по этим перестройкам наблюдаются характерные нарушения конъюгации гомологов в мейозе. Более длинная нормальная хромосома образует петлю на участке, соответствующем делеции.

Дупликации представляют собой двукратное повторение одного и того же участка хромосомы. Они могут происходить в пределах одной и той же хромосомы или сопровождаться переносом копии участка генетического материала на другую хромосому. Дупликации и делеции часто возникают в результате разрывов хромосом, вызываемых различными повреждающими агентами: ионизирующим облучением, химическими мутагенами, вирусами и т.д.

Изменение чередования генов в хромосоме в результате инверсии — тип перестроек, наиболее часто встречающихся в природных популяциях, в частности у насекомых. Инверсия приводит к изменению сцепления генов, их физического порядка в хромосоме, отличающегося от исходной формы. У гетерозигот по инверсиям на цитологических препаратах мейотических клеток обнаруживаются характерные петли — результат конъюгации структурно измененной и нормальной хромосомы. Если в такой петле произойдет одиночный кроссинговер, то в случае парацентрической инверсии возникает одна хроматида с двумя центромерами, которые ее порвут при расхождении в анафазе. Образующийся бесцентромерный фрагмент будет утерян. В результате из четы-

рех гамет полноценными будут только две. При гетерозиготности по перицентрической инверсии кроссинговер не препятствует нормальному расхождению всех хроматид. Тем не менее полноценными вновь будут только два продукта мейоза из четырех, поскольку две хроматиды несут делеции некоторых генов.

Транслокации представляют собой реципрокный обмен участками негомологичных хромосом. В результате такого обмена у гомозигот по транслокациям изменяется характер сцепления генов. Особый тип транслокаций, так называемые робертсоновские транслокации, или центрические слияния, приводят к изменению числа хромосом. Если две акроцентрические хромосомы сливаются в области центромеры, то образуется одна мета- или субметацентрическая хромосома. Существует классификация X-облученных ассоциаций по типу робертсоновских транслокаций. Первый тип (около 70 %) имеет гетерохроматин только в середине хромосомы и проявляется в виде метацентрических хромосом, в то время как второй тип (около 30 %) имеет два гетерохроматиновых блока и проявляется в виде дицентрических хромосом [24]. Предполагается, что минорные сателлиты перицентромерных районов играют определяющую роль в организации районов кинетохор [25].

Изменение физического состояния перицентрического гетерохроматина, т.е. деконденсация, сопровождается асинхронным расщеплением центромерных районов хромосом. Эта абберация — результат ранней репликации перицентрического гетерохроматина, ассоциированного с активностью центромеры [26], которая может приводить к анеуплоидии [27].

На стадии метафазы можно наблюдать фрагментацию и пульверизацию хромосом. Четких различий между этими двумя феноменами нет, просто эти названия отражают разную степень повреждения хромосом. В случае фрагментации хромосомы разбиты на много мелких фрагментов разной длины. Фрагментированными иногда выявляются только отдельные хромосомы, иногда все, но можно отличить нормальные хромосомы или абберации хроматидного типа. В случае пульверизации хромосомы оказываются разбитыми на массу мелких фрагментов. С фрагментацией или пульвериза-

цией иногда путают феномен преждевременной конденсации хромосом. Однако феномен преждевременной конденсации хромосом имеет вид тонких хромосомных фрагментов и часто возникает в результате вызванного вирусом слияния двух клеток, одна из которых находится в профазе или метафазе деления, а другая — в S-фазе, что приводит к визуализации хромосом, находящихся в процессе репликации [28]. Преждевременная конденсация наблюдалась в клетках костного мозга китайского хомячка после обработки химическими соединениями [29]. В последнем случае это объясняется тем, что основное ядро вступало в митоз, а хроматин в микроядре находился на стадии S-периода [29].

События, изменяющие структуру хромосом в геноме, всегда традиционно связывали с эволюционными преобразованиями генетического материала. Дупликации поставляют материал для создания новых генов в процессе естественного отбора. Инверсии и транслокации способствуют генетической изоляции новых форм в процессе их внутривидовой дивергенции. В то же время механизм возникновения хромосомных перестроек долгое время не был известен, и aberrации хромосом считались нерегулярными событиями.

Связь между двойными разрывами ДНК и хромосомными aberrациями

Одним из важных вопросов является изучение связи между первичными повреждениями ДНК и хромосомными aberrациями. Очевидно, что для возникновения хромосомных aberrаций необходимы двойные разрывы ДНК (dsbs — double strand breaks). Однако имеются противоречия в оценке пропорциональности между хромосомными aberrациями и dsbs — о начальной их индукции, репарации и остаточных unrepaired dsbs, которые определяют частоту встречаемости хромосомных повреждений в метафазных пластинках. Репарированные и остаточные dsbs могут участвовать в возникновении хромосомных повреждений в метафазе при воздействии повреждающих агентов на клетки в G₁-периоде клеточного цикла. Однако при обработке клеток в G₂-периоде частота встречаемости хромосомных повреждений не должна зависеть от репа-

рированных и остаточных dsbs предыдущей интерфазы [30]. Очевидно, что двойные разрывы ДНК являются предпосылкой для возникновения хромосомных aberrаций в первом митозе после обработки ДНК повреждающими агентами, однако неизвестно, какие факторы связаны с реализацией dsbs в видимые хромосомные повреждения [31].

Описанные типы хромосомных aberrаций традиционно рассматривают как единый феномен, поскольку их общей основой является одно- и двухцепочечные разрывы ДНК. Однако очевидно, что эта группа явлений гетерогенна как по времени возникновения, количеству и качеству механизмов, участвующих в реализации в хромосомную aberrацию разрывов ДНК, так и по их дальнейшей судьбе.

События, лежащие в основе появления различных хромосомных aberrаций

Механизмы образования хромосомных aberrаций плохо изучены, несмотря на общепринятое применение частоты их встречаемости для оценки генотоксичности эффектов физических и химических агентов [32]. Так, принято считать, что возникновение хромосомных фрагментов чаще всего отражает повреждения ДНК, возникающие до начала репликации, хроматидные — в ее процессе. Однако фрагменты — это результат «первичного повреждения» без репарации, а возникновение внутри- и межхромосомных обменов — результат «кластерного повреждения» ДНК с «кластерной» репарацией [33], т.е. разные типы хромосомных aberrаций возникают в результате различного количества молекулярно-генетических событий. Так, инверсии, инсерции, делеции, внутри- и межхромосомные обмены требуют не только наличия разрывов ДНК, но и их физического сближения с последующим восстановлением непрерывности ДНК.

Кроме того, разные типы хромосомных aberrаций формируются с вовлечением разных морфологических районов хромосом, существенно отличающихся своими структурно-функциональными особенностями. Так, кольцевые хромосомы образуются при делетировании специфических районов хромосом — теломерных участков. Робертсоновские транслокации возникают при наличии разрывов ДНК

в семействах высоких повторов перичентромерных районов хромосом, физического контакта между ними в интерфазных ядрах с их последующей репарацией, приводящей к новой комбинации плеч хромосом. Известно также, что индивидуальные хромосомы в пределах одного кариотипа могут существенно отличаться друг от друга частотой участия в хромосомных абберациях [34] и распределением сайтов повышенной ломкости по длине хромосом. Наиболее яркий пример — синдром повышенной ломкости хромосомы X. Такая повышенная ломкость отдельных хромосом и их участков традиционно связывается с амплификацией в этих районах различных повторов ДНК и имеет выраженную генетическую компоненту как по локализации такого района в определенном сегменте хромосомы, так и в связи с «генотипической средой» организма, в которой такая амплификация и повышенная ломкость реализуется [35].

Имеются противоречивые данные о связи между размерами хромосом и частотами встречаемости их аномалий. Так, в ряде исследований обнаружено, что количество хромосомных поломок на единицу ДНК линейно повышается с увеличением количества ДНК в хромосомах, причем без изменения частот внутри- и межхромосомных обменов на единицу ДНК [36]. В других исследованиях такие связи выявить не удается [37].

Накоплено большое количество данных об увеличении частот встречаемости хромосомных аббераций под влиянием эндогенных нуклеаз, изменений некоторых биохимических условий клеточного роста. Так, эндонуклеазы AluI, Sau3AI и MboI при относительно низких концентрациях индуцируют примерно одинаковое увеличение частоты встречаемости хромосомных аббераций [32]. Гипертонический раствор (0,5 M NaCl в фосфатном буфере, pH 7,2) видоизменяет воссоединение разрывов ДНК в G₂, образованных после облучения, что приводит к увеличению частоты встречаемости хроматидных аббераций (поломки и обмены) [38].

Таким образом, даже если предполагать, что все типы хромосомных аббераций объединены в один феномен на основании их зависимости от одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, очевидна их внутренняя гетерогенность

в связи с различным временем их возникновения в клеточном цикле, разным вовлечением морфологических структур хромосом (центромерные, теломерные районы), генотипической компонентой участия в хромосомных абберациях отдельных хромосом и их сегментов.

Индукторы хромосомных аббераций, не оказывающие прямого действия на ДНК

Вопрос о правомерности объединения различных типов хромосомных аббераций в один феномен усложняется еще больше, если учитывать зависимость реализации разрывов ДНК в видимые в метафазных пластинках хромосомные аномалии от целого спектра белков и ферментов, участвующих в упаковке первичной последовательности нуклеотидов в структуры хроматина интерфазного ядра, в метафазные хромосомы. Предполагается, что в некоторых условиях часть разрывов ДНК, благодаря белкам хроматина, могут переживать несколько клеточных делений в нерепарируемом состоянии [39]. Таким образом, специфические (генотипические) особенности функциональной активности белков, обслуживающих упаковку первичной последовательности ДНК в наднуклеоидные структуры хроматина и метафазные хромосомы, могут вносить существенный вклад в частоту встречаемости хромосомных аббераций в клеточных популяциях, подвергающихся генотоксическим воздействиям. По-видимому в некоторых моделях последнее обстоятельство может играть ключевую роль в размахе индивидуальной изменчивости хромосомных аббераций в ответ на одно и то же генотоксическое воздействие.

К настоящему времени накоплено большое количество работ, демонстрирующих зависимость частот встречаемости хромосомных аббераций от активности таких ферментов, как топоизомераза I [40], топоизомераза II [9], поли (ADP-рибоза) [41], удерживающих в упаковке ДНК единичные и двойные разрывы на протяжении нескольких клеточных циклов. Ингибирование активности этих ферментов такими веществами (в том числе и антираковыми препаратами), как азатоксин [39], 3-аминобензамид, тимидин [41], камптотетин [42] и т. д., может приводить к дестабилизации упаковки хроматина и многочисленным хромосомным абберациям.

циям. Ингибиторы топоизомеразы II приводят к появлению фрагментов, хромосомных перестроек, анеуплоидии и полиплоидии [43].

Двойные разрывы ДНК могут приводить к хромосомным перестройкам в первом митозе после обработки ДНК повреждающими агентами, однако неизвестно, какие факторы определяют образование индуцированных повреждений. Повреждения могут возникать и при ингибировании некоторых процессов метаболизма клетки, в частности, при ингибировании синтеза ДНК [44]. Некоторые немутагенные химические агенты, так же как и метаболические яды, подавляющие синтез ДНК, индуцируют двойные разрывы ДНК, приводящие к возникновению хромосомных aberrаций. Например, афидиколин – ингибитор ДНК-полимеразы – индуцирует хромосомные повреждения без непосредственного контакта с ДНК. Другие агенты, такие как митомицин С, метилметансульфонат, этилметансульфонат ингибитор топоизомеразы II [45], йодоацетат, ментол [46], индуцируют большое количество хромосомных повреждений при нетоксических дозовых уровнях.

Кроме того, многочисленными работами показано, что после генетического аппарата клетки наиболее чувствительной к хроническому низкоинтенсивному облучению является липидная фаза клеточных мембран. Снижение доли фосфолипидов от общего количества липидов способствует нарушению физико-химических свойств мембраны, изменению ее вязкости и проницаемости, что в свою очередь препятствует нормальному протеканию всех жизненных функций клетки, в том числе и процессов репарации [47]. Нарушение целостности плазматических мембран приводит также к образованию хромосомных aberrаций. Так, например, обработка эмбрионов мышей стрептолизин-О (веществом, повреждающим клеточную мембрану) выявила существенное увеличение количества хромосомных aberrаций при отсутствии прямого повреждения ДНК [25].

Очевидно также, что выраженные отличия в частотах встречаемости хромосомных aberrаций могут быть обусловлены не только полифакторной природой их возникновения, но и не менее сложными процессами их элими-

нации. Весь комплекс событий может иметь тканеспецифические черты, что, по-видимому, может обуславливать и отличия в частотах встречаемости хромосомных aberrаций в разных тканях в пределах одного организма.

Таким образом, хромосомные aberrации – один из признаков дестабилизации кариотипа, активации соматического мутагенеза, традиционно используемый для тестирования генотоксических эффектов, который объединяет группу феноменов, отличающихся по механизмам возникновения. Очевидно, что в общем случае частоты встречаемости хромосомных aberrаций могут не иметь связей с количеством одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, индуцируемых генотоксинами.

Микроядерный тест

Образование микроядер в цитоплазме клеток отличается от хромосомных aberrаций тем, что не всегда требует наличия повреждений первичных последовательностей ДНК, т.е. микроядерный тест является иной оценкой дестабилизации кариотипа, объединяющей часть типов хромосомных aberrаций, а также варианты анеуплоидии клеток [48]. Микроядра формируются из хромосомного материала, задержавшегося на экваторе клетки на стадии метафазы. В ходе митоза этот материал попадает только в одну из дочерних клеток. Он может быть включенным в основное ядро или сформировать одно или несколько мелких ядер, так называемых микроядер, которые могут состоять из ацентрических фрагментов или могут быть образованы целой хромосомой вследствие нерасхождения, вызванного дефектами веретена деления. Отличия между микроядрами, образованными этими разными путями, были продемонстрированы с помощью меченых зондов к центромерным районам различных хромосом [49]. Новые возможности микроядерного теста открываются в связи с использованием меченных флюорохромами антител к кинетохору. Такой методический ход позволяет дифференцировать микроядра, включающие в себя ацентрические фрагменты (результат хромосомных aberrаций) и целые хромосомы, задерживающиеся на экваторе клетки в анафазе (результат изменений взаимодействия хромосом с веретеном деления). По срав-

нению с хромосомным анализом лимфоцитов подсчет микроядер более прост, дешевле, имеет больше шансов на автоматизацию и по чувствительности не уступает метафазному анализу [6], что является достоинством микроядерного теста и открывает перспективы для проведения популяционных исследований с его использованием [7].

В последние годы опубликован ряд работ, в которых представлены результаты изучения мутагенного действия ионизирующей радиации с помощью микроядерного теста. Получены первые кривые зависимости доза—эффект в диапазоне доз 5–300 сГр [5]. Установлено, что выход радиационно индуцированных *in vivo* микроядер при разных дозах облучения, как и выход хромосомных aberrаций, соответствует линейно-квадратичной модели. Вместе с тем кривая доза—эффект для микроядер по сравнению с кривой доза—эффект для хромосомных aberrаций имеет в два раза больший линейный компонент и в два раза меньший квадратичный компонент. Это позволяет предположить, что в определенном диапазоне доз микроядерный тест может быть более чувствительным к действию ионизирующего облучения, чем тест хромосомных aberrаций.

Существуют предположения о недостатках микроядерного теста, связанные с тем, что микроядра формируются из ацентрических фрагментов и отставших хромосом. Клетки же, имеющие мосты, не учитываются с помощью этого теста. Некоторая часть клеток с хромосомными aberrациями, возникающими в анафазе, вероятно, погибает в процессе первого митоза. Главная проблема использования микроядерного теста заключается в отсутствии его унификации. В этой связи обширные популяционные исследования зависимости частоты встречаемости микроядер от возраста человека до сих пор не позволили получить однозначные данные [50]. Это обусловлено отсутствием общепринятого представления о пределах изменчивости спонтанно возникающих микроядер в группах людей одного и того же возраста. Очевидно также, что далеко не все типы хромосомных aberrаций сопровождаются образованием микроядер, поскольку не все связаны с появлением ацентрических фрагментов. Все сказанное хорошо согласуется с тем

фактом, что в контроле (без воздействия генотоксинов) количество клеток с хромосомными aberrациями превышает количество клеток с микроядрами в 6–8 раз [51], т.е. микроядерный тест, так же как и хромосомные aberrации, позволяет выявлять только часть мутационного спектра, имеющегося в клеточных популяциях до и после воздействия генотоксинов. Следует отметить также, что результаты микроядерного теста в существенной степени могут зависеть от специфики клеточных популяций, в которых они рассматриваются.

Микроядра в эритроцитах

Микроядра можно наблюдать в клетках любой пролиферирующей ткани, однако легче всего их выявлять в клетках без основного ядра у большинства видов млекопитающих в эритроцитах (полихроматофильных — молодых и нормохроматофильных — зрелых). Показано, что микроядра в полихроматофильных эритроцитах могут быть результатом реализации, по крайней мере, двух различных механизмов в зависимости от дозы генотоксина. Низкие дозы индуцируют микроядра без изменения возрастного состава эритроцитов, высокие — существенно уменьшая долю юных форм [52]. Кроме того, возникает трудность в интерпретации результатов оценки количества микроядер в эритроцитах в связи с тем, что присутствие в них микроядер связано с их созреванием. «Выталкивание» ядра из эритробласта, задержка в нем небольших фрагментов ядра с последующим их удалением является нормальным процессом созревания этого типа клеток. Соответственно, частота встречаемости микроядер в полихроматофильных эритроцитах, как правило, существенно выше, чем в нормохроматофильных, хотя в отдельных работах таких отличий выявлено не было [53]. В этой связи изменение соотношения юных и зрелых форм эритроцитов (предпочтительная гибель) может существенно влиять на оценку генотоксичности воздействия при их анализе. Так, индукция кровопотери приводит к резкому увеличению юных эритроцитов в периферической крови с большим количеством микроядер [54]. Ряд генотоксинов уменьшают относительную пропорцию юных форм по отношению к зрелым в популяциях клеток костного мозга

[53]. У человека показано, что количество полихроматофильных эритроцитов может широко варьировать в клетках периферической крови, причем эти колебания не связаны с частотой встречаемости микроядер при суммарной оценке [55]. Кроме того, обнаружено, что количество микроядер существенно варьирует в зависимости от анализируемого органа. Некоторые авторы предлагают оценку нестабильности генома осуществлять методом анализа микроядер в эритроцитах костного мозга [56]. Однако известно, что под влиянием ионизирующего облучения у крыс в костном мозге частота встречаемости эритроцитов с микроядрами увеличивается в 8 раз, а в селезенке — в 20 раз [57], т.е. результаты микроядерного теста в юных и зрелых формах эритроцитов могут существенно зависеть от индивидуальной специфики гемопоэза и анализируемой ткани. Нельзя исключить и возможные влияния на частоту встречаемости микроядер в эритроцитах состояний клеточных органелл, ответственных за «выталкивание» из них генетического материала, например, прочность ядерной оболочки, которая также может существенно меняться под действием различных экзогенных факторов. Учитывая сложность оценки микроядер в эритроцитах, зависимость их присутствия от стадии созревания клеток, возможную связь с изменениями гемопоэза, в поисках наиболее адекватного теста генотоксических эффектов исследователи активно развивают приемы анализа микроядер в других клеточных популяциях.

Микроядра в одноядерных лимфоцитах

Для изучения степени влияния генотоксических факторов на организм млекопитающих в качестве тест-системы используют цитогенетические показатели лимфоцитов периферической крови. Подсчет микроядер в одноядерных лимфоцитах применяют как более быстрый и простой по сравнению с анализом хромосомных aberrаций [58]. Их спонтанная частота и корреляция с дозой острого облучения лимфоцитов крови изучены в ряде лабораторий [59]. Так, например, при воздействии X-лучами на культуру лимфоцитов периферической крови человека, мыши и крысы была обнаружена сходная индукция микроядер [60]. По данным некоторых авторов [61], микроядерный тест

чувствителен начиная с дозы 0,05 Гр рентгеновских лучей. В то же время существуют данные о том, что количественные различия в индукции микроядер в лимфоцитах при облучении *in vitro* и *in vivo* не наблюдаются в дозах до 2,5 Гр [59]. Предполагается, что лимфоциты с несколькими микроядрами, обнаруживаемые у профконтингента зоны ЧАЭС через 8–9 лет, несмотря на элиминацию aberrантных клеток из периферической крови, представляют собой либо долгоживущие митотически неактивные клетки, либо клетки, у которых происходит суммация повреждений в геноме на молекулярном уровне, сохраняющихся в ряду поколений клеток лимфоидной ткани, и повреждений, индуцируемых на их фоне *de novo* в условиях облучения [17]. Ожидается, что оценка микроядер в одноядерных лимфоцитах в связи с их относительно большой продолжительностью жизни может вносить существенную ошибку в анализ, поскольку в этом тесте учитываются не только вновь индуцируемые генотоксическим воздействием микроядра, но и предсуществующие, накопленные ранее (например, в связи с возрастом [58]).

Микроядра в двухъядерных лимфоцитах

Для унификации микроядерного теста и идентификации лимфоцитов, которые прошли первый митоз после митогенной стимуляции, с 1985 г. используется ингибитор цитокинеза — цитохалазин Б [55]. Добавление его перед первым митотическим делением приводит к образованию двухъядерных клеток, в которых и выполняется подсчет микроядер. Предполагается, что применение цитохалазина Б должно значительно повысить чувствительность метода. Это привело к его более широкому использованию для изучения индуцированного мутагенеза *in vitro* и *in vivo*. Однако до сих пор результаты использования этой модификации микроядерного теста не привели к формированию однозначных оценок его чувствительности.

В работах Родилла [62] при использовании цитометрии в культуре, обработанной цисплатином, было выявлено, что двухъядерные клетки с микроядрами возникали в результате неполного цитокинеза во время митотического деления клеток с микроядрами. В других публикациях [63] описано появление двухъядер-

ных клеток не в связи с блоком цитокинеза, а с их слиянием. Показано также, что под влиянием ионизирующего облучения в некоторых клеточных популяциях межклеточные слияния являются распространенным явлением [57].

Некоторые клетки несут микроядра на протяжении многих лет и потому образование микроядер не обязательно случается в последнем делении. Динамика двухъядерных клеток или двухъядерных клеток с микроядрами в популяции остается недостаточно исследованной. Ковакс [28] предполагает, что двухъядерные клетки могут возникать как компенсация действия генотоксических агентов для поддержки генетического баланса в популяции. Некоторые авторы объясняют наличие двухъядерных клеток как следствие старения *in vivo* и *in vitro* и естественного удлинения продолжительности цитокинеза [64].

Доказательств наличия разных механизмов возникновения двухъядерных клеток много, однако не исследована до сих пор связь между двухъядерными и одноядерными клетками, несущими микроядра.

Полиплоидия

Полиплоидия — изменение числа хромосом, кратное гаплоидному. Это геномная мутация, она может быть не только следствием отклонения от нормального хода митоза, но и следствием слияния двух клеток.

Высокую частоту встречаемости полиплоидных клеток, как правило, обнаруживают в опухолевых клеточных популяциях. Предполагается, что в формировании полиплоидов могут принимать участие не меньше двух, принципиально различных, механизмов [65]. Один — исключение из клеточного цикла стадии митоза и прямой переход от стадии G_2 к G_0 и в последующем — к G_1 . Такой механизм, в частности, описан при индукции множественных повреждений ДНК, репарация которых в G_2 настолько увеличивает ее продолжительность, что падает внутриклеточная концентрация белка циклина, необходимого для запуска перехода к митозу. В результате из клеточного цикла исключается стадия митоза и формируется полиплоид [43]. Второй — появление полиплоидов в результате межклеточного слияния. Такой механизм, как известно, широко распространен в

культуральных клеточных линиях и различных опухолях [66]. Показано также, что ионизирующее облучение индуцирует высокую частоту межклеточных слияний [45]. В то же время следует отметить, что имеются тканеспецифичные механизмы естественного формирования полиплоидных клеток, как, например, среди гепатоцитов в процессе клеточной дифференцировки у млекопитающих.

Анеуплоидия

Анеуплоидия может возникать в результате различных механизмов, в частности, за счет разрыва метафаз при приготовлении препаратов, однако может быть и следствием как нерасхождения хромосом, так и многополюсных митозов. При нерасхождении лишняя хромосома остается в одной из дочерних клеток. При облучении первичных культур лимфоцитов и фибробластов митотическое нерасхождение представляет собой основной механизм анеуплоидии [67].

Для обнаружения анеуплоидии некоторые исследователи используют метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) конкретных хромосом клеточного ядра, так как эта технология позволяет анализировать на порядок большее число клеток, чем при стандартном цитогенетическом анализе [68]. При помощи этого метода можно получить информацию о частоте анеуплоидии по X-хромосоме у женщин для диагностики как мозаичного варианта X-моносомии (синдрома Шерешевского-Тернера), так и мозаичного варианта трисомии по X-хромосоме (синдром трипло-X), а также различных вариантов полисомии X при синдроме Клайнфельтера у мужчин [69]. В литературе накоплено много данных о различных механизмах, приводящих к возникновению анеуплоидных клеток. Обсуждаются в основном семь механизмов возникновения анеуплоидии в митозе.

1. Нарушение организации клеточных центров деления (центриоли — у животных). Одним из механизмов анеуплоидии при таком повреждении являются многополюсные митозы [70].

2. Дефекты веретена деления. Анеуплоидия может возникать в результате повреждения веретена деления, приводящего к изменениям взаимоотношений с ним хромосом [70]. Ионизирующее облучение также повреждает веретено

тено деления, которое может приводить к анеуплоидии [71].

3. Повреждения кинетохора или его функции. Любые нарушения структурной организации кинетохора, в частности трехмерной, приводят к анеуплоидии без изменения качества и количества компонент, участвующих в упаковке центромерного района [72]. Утрата белков кинетохора приводит к анеуплоидии, но при этом центромерный район может сохраняться [67].

4. Изменения взаимоотношений между веретеном деления и кинетохорами. Имеются белки, определяющие взаимоотношение кинетохора и веретена деления, их изменения приводят к анеуплоидии [73]. Предполагается, что определенную роль в регуляции активности таких белков могут играть отдельные онкогены [74].

5. Дефекты центромерного района. Анеуплоидия может быть вызвана фрагментацией, мутированием или дефектом упаковки центромеры. Например, алкилирование пула нуклеотидов может приводить к анеуплоидии путем индукции нуклеотидных модификаций центромерного района и, как следствие, изменений функционального состояния кинетохора [75]. При использовании азациитидина, инкорпорирующегося в ДНК, показано, что такие агенты также могут приводить к анеуплоидии [67]. Обнаружено, что ускоренная деконденсация хроматина отдельных хромосом, по-видимому, в связи с нарушением организации кинетохоров, также сопровождается анеуплоидией [76]. Анеуплоидия может быть следствием и межхромосомных транслокаций [77].

6. Изменение взаимодействий между центромерными районами сестринских хроматид в процессе митоза. Анеуплоидия может быть вызвана изменениями продолжительности клеточного цикла, нарушением синхронности расщепления центромерных районов сестринских хроматид [67] и нерасхождением хромосом [78].

7. Предполагается, что может существовать дополнительный механизм анеуплоидии, который приводит только к утрате хромосом, но не к их увеличению, т.е. связанный с нарушением пропорциональности распределения хромосом по дочерним клеткам. Так, например, показано, что имеются анеугены, в частности акриламид, индуцирующие только утрату хромосом [76]. Можно ожидать, что такие специфиче-

ские изменения связаны либо с тем, что индуцируемое таким генотоксином нерасхождение хромосом приводит к обязательному их вхождению в микроядра, либо с тем, что такие анеугены индуцируют дестабилизацию плазматической оболочки клеток, что, естественно, сопровождается увеличением частоты утраты хромосом при приготовлении препаратов. Показано также, что анеуплоидия может быть связана с повышенной частотой утраты хромосом при делении полиплоидов [43].

Ранние исследования по идентификации утерянных хромосом в гиподиплоидных лимфоцитах показали, что утрата хромосомы зависит от различных факторов, например таких, как размер хромосомы, возраст и пол организма [67].

Анеуплоидия, как и полиплоидия, является общим признаком популяции опухолевых клеток. Предполагается, что кариотипическая изменчивость может быть основой эволюции опухолевых клеток. Однако до сих пор не исследована взаимосвязь между изменениями разных характеристик кариотипа и эволюцией опухолевой клетки [68].

При анеуплоидии может встречаться утрата одной из половых хромосом. Это частое событие в клетках крови, костного мозга и у людей с разными формами злокачественных новообразований [68].

Можно предположить, что клетки, которые утратили Y- или X-хромосому с большими блоками гетерохроматина и генами, не существенными для жизнедеятельности клеток в культуре, могут получать пролиферативные преимущества по сравнению с исходными клетками, сохранившими полный набор половых хромосом. Несмотря на относительную изученность механизмов возникновения некоторых кариотипических аномалий, разные характеристики изменчивости генома и взаимосвязь между ними до сих пор остаются несистематизированными.

В цитогенетике млекопитающих последние годы ознаменованы стремительным развитием новых методов исследований, в основе которых лежит флюоресцентная *in situ* гибридизация нуклеиновых кислот. Возможности исследователя 10–15 лет назад были практически сведены к изучению морфологии и дифференциальной окрашиваемости хромосом, а также их отдельных районов. Развитие методов,

способных на цитологических препаратах визуализировать интересующие последовательности ДНК, резко изменило ситуацию. Метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) оказался крайне эффективным инструментом изучения генома человека и других видов млекопитающих, реорганизации хромосом в ходе эволюции, анализа хромосомных перестроек как при малигнизации клеток, так и при врожденных патологиях. С его помощью были получены оригинальные данные по организации интерфазного ядра, однако использование этого метода не отменяет рутинных методов выявления фрагментов, хроматидных разрывов и других цитогенетических аномалий в соматических клетках млекопитающих.

Таким образом, существуют выраженные различия по стабильности хромосомного аппарата клеток млекопитающих в зависимости от уровня и направления их цитодифференцировки. Несмотря на выбор исследуемой ткани, нельзя все типы хромосомных aberrаций объединять в единый феномен на основании их зависимости от одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, поскольку очевидна их внутренняя гетерогенность в связи с различным временем их возникновения в клеточном цикле, вовлечением в них разных морфологических структур хромосом (центромерные, теломерные районы), генотипической компонентой участия в хромосомных aberrациях отдельных хромосом и их сегментов. Частоты встречаемости хромосомных aberrаций могут не иметь прямых связей с количеством одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, индуцируемых генотоксинами. На увеличение частот встречаемости хромосомных aberrаций могут оказывать влияние целый спектр белков и ферментов, участвующих в упаковке первичной последовательности нуклеотидов в структуры хроматина интерфазного ядра. Разные уровни организации генетического материала (нуклеотидный, хромосомный, надхромосомный) оказывают влияние на процессы реализации дефекта нуклеотидной последовательности в цитогенетическую аномалию.

SUMMARY. The different types of cytogenetic abnormalities are considered which are used in classic cytogenetics for the estimation of the levels of chromosome appa-

rus damages. The possible causes of cytogenetic anomalies and a number of methods of micronucleus tests are discussed. It was shown that the different levels of genetic material organization influence the realization of DNA defects into cytogenetic abnormality.

РЕЗЮМЕ. Розглядаються різні типи цитогенетичних аномалій, які використовують в класичній цитогенетиці для оцінки рівня пошкодження хромосомного апарату. Обговорюються можливі причини виникнення різних типів цитогенетичних аномалій, а також різноманіття методів мікроядерного тесту. Показано, що різні рівні організації генетичного матеріалу (нуклеотидний, хромосомний, надхромосомний) впливають на процеси реалізації дефекту нуклеотидної послідовності в цитогенетичну аномалію.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wuttke K., Streffer C., Muller W.U. Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes // *Mutat. Res.* — 1993. — **286**. — P. 181–188.
2. Miller K. Sister-chromatid exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin cyclophosphamide and ethyl methanesulfonate // *Mutat. Res.* — 1991. — **247**. — P. 175–182.
3. Hecht F., Bixehman H.A., Cannizzaro L.A. et al. Chromosome instability is found in hereditary malignant melanoma which is linked to Rh in Ip 36,2-p.34 // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1989. — **51**. — P. 1012.
4. Andersson H.S. The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times // *Mutat. Res.* — 1993. — **286**. — P. 281–292.
5. Fenech M., Morley A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei // *Mutat. Res.* — 1985. — **148**. — P. 99–105.
6. Горовая А.И., Климкина И.И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами // *Цитология и генетика.* — 2002. — **36**, № 5. — С. 21–25.
7. Афанасьева Е.С., Безруков В.Ф., Шенета Ю.Б. Изменчивость и динамика частоты микроядер участников трансатлантического перехода VII Украинской антарктической экспедиции // *Цитология и генетика.* — 2004. — **38**, № 4. — С. 37–43.
8. Ковалева О.А., Глазко Т.Т. Проблемы использования цитогенетических характеристик для биоиндикации генотоксических эффектов // *Фактори експерим. еволюції організмів.* — 2004. — **2**. — С. 99–105.
9. Berstrand R., Sarang M., Jenkin J., Kerrigan D., Pommier Y. Differences induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor

- cell lines with amplified c-myc expression // *Cancer Res.* — 1991. — **51**. — P. 6280–6285
10. Шеметун Е.В. Ретроспективное цитогенетическое обследование ликвидаторов аварии на ЧАЭС с использованием дифференциального G-окрашивания метафазных хромосом // Проблемы радиационной генетики на рубеже веков : Тез. докл. Междунар. конф. — Ереван, 2000. — С. 361.
 11. Малиновский Ю.Ю. Молекулярные механизмы образования цитогенетических повреждений : факты и гипотезы // Там же. — С. 64.
 12. Осипов А.Н., Сытин В.Д., Коломийцева Г.Я., Пучков П.В. Влияние облучения в малых дозах на количество ДНК-белковых сшивок в лимфоцитах селезенки мелких млекопитающих // Там же. — С. 49.
 13. Лебедева Л.И., Ахмаметьева Е.М. Возможные механизмы возникновения перестроек хромосом. 8. Цитогенетический анализ динамики репарации и реализации потенциальных повреждений хромосом в клетках костного мозга гамма-облученных мышей // *Генетика.* — 1996. — **32**, № 6. — С. 804–809.
 14. Дубинин Н.П. Потенциальные изменения в ДНК и мутации // Молекулярная цитогенетика. — М.: Наука, 1978. — С. 246.
 15. Лебедева Л.И., Скорова С.В., Ахмаметьева Е.М. Возможные механизмы возникновения перестроек хромосом. 6. Задержка митоза как протекторный механизм происхождения спонтанных разрывов хромосом // *Генетика.* — 1993. — **29**, № 4. — С. 1826–1831.
 16. Durante M., Furusawa Y., George K., Gialanella G., Greco O., Grossi G., Matsufuji N., Pugliese M., Yang T.C. Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. 4. Charged particles // *Radiat. Res.* — 1998. — **149**. — P. 446–454.
 17. Бездробная Л.К., Цыганок Т.В., Курило Л.В., Бухал А.В., Романова Е.П., Дрозд И.П. Частота мутаций и aberrаций хромосом в лимфоцитах крови жителей 30-километровой зоны отчуждения ЧАЭС // Проблемы радиационной генетики на рубеже веков : Тез. докл. Междунар. конф. — Ереван, 2000. — С. 233.
 18. Жадан И.А. Сравнительный анализ частоты и структуры хромосомных aberrаций в соматических клетках при материнско-плодовой инфекции // *Цитология и генетика.* — 2004. — **38**, № 2. — С. 60–64.
 19. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре // *Цитология.* — 1996. — **38**, № 8. — С. 787–814.
 20. Руднев М.И. Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм. — К.: Наук. думка, 1994. — 120 с.
 21. Снигирева Г.П., Новицкая Н.Н., Хазинс Е.Д., Вилкина Г.А. Отдаленные цитогенетические эффекты у участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Проблемы радиац. генетики на рубеже веков : Тез. докл. Междунар. конф. — Ереван, 2000. — С. 331.
 22. Leonard A., Bagniet-Mahieu L., Hoang Hung T., Leonard E.D., Lemaire M., Gerber G. B. Chromosome aberrations in circulating lymphocytes after brachytherapy for uterus carcinoma // *Acta Oncol.* — 1995. — **34**, № 4. — P. 539–542.
 23. Готлиб В.Я., Пелевина И.И., Кудряшова О.В., Серебряный А.М. Индуцированная радиацией нестабильность генома // Проблемы радиац. генетики на рубеже веков : Тез. докл. Международ. конф. — Ереван, 2000. — С. 24.
 24. Boei J.J., Natarajan A.T. Classification of X-ray-induced Robertsonian fusion-like configurations in mouse splenocytes // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1996. — **69**. — P. 421.
 25. Wojcik A., Bonk K., Muller W.U., Obe G., Streffer C. Do DNA double-strand breaks induced by Alu lead to development of novel aberrations in the second and third post-treatment mitoses? // *Radiat. Res.* — 1996. — **145**. — P. 19–27.
 26. Vig B.K., Sternes K.L., Pawletz N. Centromere structure and function in neoplasia // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 1989. — **43**. — P. 151–178.
 27. Акоюн, Г.Р., Гнатейко О.З., Сиренко А.Г., Полищук Р.С., Логинський В.Є., Новак В.Л. Передчасне розділення центромер метафазних хромосом при гострій лімфобластній лейкемії у дітей // *Онкологія.* — 1999. — № 4. — С. 283–289.
 28. Kovaks G.B., Sadah, Hoene E. Binucleate cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 1988. — **31**. — P. 211–216.
 29. Allen J.W., Collins B.W., Setzer R.W. Spermatid micronucleus analysis of aging effects in hamsters // *Mutat. Res.* — 1996. — **316**. — P. 261–266.
 30. Bryant P.E. DNA damage, repair and chromosomal damage // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1997. — **71**. — P. 675–680.
 31. Nesterova E.V., Durnev A.D., Seredenin S.B. Verapamil contributes to the clastogenic effects of acrylamide, cyclophosphamide, and dioxidine on somatic cells of BALB/C and C57BL/6 mice // *Mutat. Res.* — 1999. — **440**. — P. 171–179.
 32. Harvey A.N., Costa N.D., Savage J.R., Thacker J. Chromosomal aberrations induced by defined DNA double-strand breaks: the origin of achromatic lesions // *Somat. Cell Mol. Genet.* — 1997. — **23**. — P. 211–219.
 33. Greinert R., Volkmer B., Virsik-Peuckert R.P., Harder D. Comparative study of the repair kinetics of chromosomal aberrations and DNA strand breaks in proliferating and quiescent CHO cells // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1996. — **70**. — P. 33–43.
 34. Ковальова О., Бойко Г., Бурдо О., Глазко Т. Цитогенетичні характеристики клітин кісткового мозку у різних видів полівок // *Наук. вісн. Ужгор. у-ту.* — 2005. — Вип. 17. — С. 190–194.
 35. Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. Double-

- strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations // *Genes. Dev.* — 1998. — **15**. — P. 3831–3842.
36. *Pandita T.K., Gregoire V., Dhingra K., Hittelman W.N.* Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence in situ hybridization // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1994. — **67**. — P. 94–101.
 37. *Boei J.J., Vermeulen S., Natarajan A.T.* Differential involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after X-irradiation // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1997. — **72**. — P. 139–145.
 38. *Kosaka T., Tsukahara M., Kaneko I., Nakano K., Tanaka S., Koide F.* Alteration of gamma-ray-induced chromosome aberration by 0,5 M NaCl in Chinese hamster cells // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1995. — **67**. — P. 687–691.
 39. *Leteurtre F., Madalengoitia J., Orr A., Cuzi T., Lehnert F., Macdonald T., Pommier Y.* Rational design and molecular effect of a new topoisomerase II inhibitor, azatoxin // *Cancer Res.* — 1992. — **52**. — P. 4478–4483.
 40. *Tanizawa A., Pommier Y.* Topoisomerase I alteration in a camptothecin-resistant cell line derived from Chinese hamster DC3F cells in culture // *Cancer Res.* — 1992. — **52**. — P. 1848–1854.
 41. *Ding R., Pommier Y., Kang V., Smulson M.* Depletion of poly (ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression result in a delay in DNA strand break rejoining // *Biol. Chem.* — 1992. — **267**. — P. 12804–12812.
 42. *Andoch T., Ikeda H., Oguro M.* Molecular biology of DNA topoisomerases and its application to chemotherapy // *Internat. Symp. on DNATopo in Chemoterapy.* — Japan, 1991. — Nov. 18–20.
 43. *Ferguson L.R., Whiteside G., Holdaway K.M., Baguley B.C.* Application of fluorescence in situ hybridisation to study the relationship between cytotoxicity, chromosome aberrations, and changes in chromosome number after treatment with the topoisomerase II inhibitor amsacrine // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1996. — **27**. — P. 255–262.
 44. *Morgan W.F., Corcoran J., Hartmann A., Kapan M.I., Limoli C.L., Ponnaiya B.* DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability // *Mutat. Res.* — 1998. — **404**. — P. 125–128.
 45. *Galloway S.M., Miller J.E., Armstrong M.J., Bean C.L., Skopek T.R., Nichols W.W.* DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens // *Mutat. Res.* — 1998. — **25**. — P. 169–186.
 46. *Hilliard C.A., Armstrong M.J., Bradt C.I., Hill R.B., Greenwood S.K., Galloway S.M.* Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1998. — **31**. — P. 316–326.
 47. *Башлыкова Л.А., Шевченко О.Г.* Цитогенетические и биохимические изменения в тканях полевок-экономок из районов с повышенной естественной радиоактивностью // *Проблемы радиационной генетики на рубеже веков : Тез. докл. Международ. конф. — Ереван, 2000. — С. 76.*
 48. *Глазко Т.Т., Ковальова О.А., Якименко Л.П.* Мікроядерний тест у великих та дрібних ссавців // *Вісн. ДАУ.* — 2003. — № 2. — С. 77–85.
 49. *Migliore L., Barale R., Bulluomini D.* Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamycin and vincristine a comarison between micronucleus and chromosomal aberration assays // *Toxicol. In vitro.* — 1997. — **1**, № 2. — P. 247–254.
 50. *Paul P.W. van Buul, Tuinenburg-Bolraap A., Searle A.G., Natarajan A.T.* A search for radiosensitive mouse mutants by vise of the micronucleus technique // *Mutat. Res.* — 1987. — **191**. — P. 163–169.
 51. *Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А.* Действие малых доз облучения на клетки китайского хомячка // *Радиаци. биология.* — 1998. — **38**, вып. 6. — С. 841–847.
 52. *Milvia C.C., Nesti C., Muzzoli M., Pasetti P., Pinamonti S.* Correlation between age and DNA damage detected by FADU in human peripheral blood lymphocytes // *Mutat. Res.* — 1996. — **316**. — P. 201–208.
 53. *Cllet I., Melcion C., Cordier A.* Lack of predictivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens // *Mutat. Res.* — 1993. — **292**. — P. 105–111.
 54. *Henderson L., Fedyk J., Windebank S., Smith M.* Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine // *Mutat. Res.* — 1993. — **291**. — P. 79–85.
 55. *Veskova T.V., Malashenko A.M.* Clastogenic effect of thiophosphamide in spermatogonia of inbred strains of mice // *Genetika.* — 1991. — **27**. — P. 285–289.
 56. *Фоменко Л.А., Газиев А.И.* Повышенная частота микроядер в эритроцитах костного мозга у потомства самцов мышей, подвергнутых хроническому гамма-облучению в малых дозах // *Проблемы радиационной генетики на рубеже веков : Тез. докл. Международ. конф. — Ереван, 2000. — С. 204.*
 57. *Kosmos C., Koteles G.* Micronuclei in x-irradiated human lymphocytes // *Mutat. Res.* — 1988. — **199**. — P. 31–35.
 58. *Романова Е.П., Бездробная Л.К., Дрозд И.П.* Первичный скрининг людей, подвергающихся хроническому облучению в малых дозах // *Проблемы радиационной генетики на рубеже веков : Тез. докл. Международ. конф. — Ереван, 2000. — С. 315.*
 59. *Ganguly, Bandana B.* Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age // *Mutat. Res.* — 1993. — **295**. — P. 135–148.
 60. *Erexson G.L., Kligerman A.D., Bryant M.F., Sontag M.R., Halperin E.C.* Induction of micronuclei by x-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes // *Mutat. Res.* — 1991. — **253**. — P. 193–198.

61. *Fenech M., Morleu A.* Cynokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes effect of in vivo ageing and low dose x-irradiation // *Mutat. Res.* — 1986. — **126**. — P. 193–198.
62. *Rodilla V., Rellicer J.A., Sevrano A., Pertusa J.* Possible relationship between micronucleated and binucleated cells induced by cisplatin in cultured CHO cells // *Mutat. Res.* — 1993. — **291**. — P. 35–41.
63. *Pertusa J., Rellicer J.A., Alcober V.* Binucleate cells in the Ehrlich ascites tumor : Autoradiographic labelling // *Biol. Cell.* — 1965. — P. 75–77.
64. *Pellicer J.A., Pertusa J., Alcober V.* Binuclear cells in the Ehrlich ascites tumor. Action of 5-fluorouracil // *Biol. Cell.* — 1987. — **60**. — P. 255–258.
65. *Matsuoka A., Yamazaki N., Suzuki T., Hayashi M., Sofuni T.* Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test // *Mutat. Res.* — 1993. — **272**. — P. 223–236.
66. *Domingues I., Panneerselvam N., Escalza P., Natarajan A.T., Cortes F.* Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique // *Mutat. Res.* — 1993. — **301**. — P. 135–141.
67. *Kirchner S., Stopper H., Papp T., Eckert I., Yoo H.J., Vig B.K., Schiffmann D.* Cytogenetic changes in primary, immortalized and malignant mammalian cells // *Toxicol. Lett.* — 1993. — **67**. — P. 283–295.
68. *Назаренко С.А., Тимошевский В.А.* Анализ частоты спонтанной анеуплоидии в соматических клетках человека с помощью технологии интерфазной цитогенетики // *Генетика.* — 2004. — № 2. — С. 195–204.
69. *Пилинская М.А.* Цитогенетические эффекты в соматических клетках лиц, пострадавших вследствие Чернобыльской катастрофы, как биомаркер действия ионизирующих излучений в малых дозах // *Радиация. медицина.* — 1999. — **2**. — С. 60–66.
70. *Eichenlaub-Ritter U., Baart E., Yin H., Betzendahl I.* Mechanisms of spontaneous and chemically-induced aneuploidy in mammalian oogenesis: basis of sex-specific differences in response to aneugens and the r-r necessity for further tests // *Mutat. Res.* — 1996. — **372**. — P. 279.
71. *Parry E.M., Sharp D.C., Parry J.M.* The observation of mitotic division aberrations in mammalian cells exposed to chemical and radiation treatments // *Mutat. Res.* — 1985. — **150**. — P. 369–381.
72. *Brinkley B.R., Tousson A., Valdivia M.M.* The kinetochore of mammalian chromosomes: structure and function in normal mitosis and aneuploidy // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1995. — **26**. — P. 226–233
73. *Sorger P.K., Dobles M., Tournebize R., Hyman A.A.* Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1997. — **9**. — P. 807–814.
74. *Nigro S., Geido E., Infusini E., Orecchia R., Giaretti W.* Transfection of human mutated K-ras in mouse NIH-3T3 cells is associated with increased cloning efficiency and DNA aneuploidization // *Int. J. Cancer.* — 1996. — **67**. — P. 871–875.
75. *Kallio M., Landetie J.* Fragmentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis in vivo by the topoisomerase II inhibitor etoposide // *Mutagenesis.* — 1996. — **11**. — P. 435–443.
76. *Gassner P., Adier I.D.* Induction of hypoploidy and cell cycle delay by acrylamide in somatic and germinal cells of male mice // *Mutat. Res.* — 1996. — **367**. — P. 195–202.
77. *Stopper H., Korber C., Schiffmann D., Caspary W.J.* Cell-cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells // *Mutat. Res.* — 1993. — **300**. — P. 165–177.
78. *Dyban A.P., Noniashvili E.M., Freidin M.I.* Cytogenetic analysis of sister chromosome sets in the second polar body and in pronuclei of unicellular mouse embryos. 1. Frequency and origin of aneuploidy in embryos heterozygous for the reciprocal chromosome translocation T [14;15]6Ca // *Ontogenez.* — 1998. — **29**. — P. 113–122.

Поступила 26.06.06