© Ф. И. Ингель

ГУ НИИ ЭЧиГОС
им А. Н. Сысина РАМН

❀ **В публикации продолжается анализ современного состояния исследований в микроядерном тесте на лимфоцитах периферической крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. На базе данных литературы и собственных исследований рассматриваются возможности применения теста для изучения связи между показателями нестабильности генома и генотипом, адаптивным ответом и выраженностью эмоционального стресса. Проводится анализ перспектив использования дополнительных показателей теста — частоты клеток с ядерными почками и хроматиновыми мостами. В заключительной части описаны результаты международных исследований по гармонизации протокола и международные рекомендации по использованию теста для оценки генотоксичности химических соединений *in vitro*.**

❀ **Ключевые слова:** микроядерный тест с цитохалазином В на культуре клеток периферической крови человека, ядерная почка, хроматиновый мост, эмоциональный стресс, адаптивный ответ к действию радиации, генетический полиморфизм

# ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА НА ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ ЦИТОКИНЕТИЧЕСКОГО БЛОКА

## ЧАСТЬ 2. ФАКТОРЫ СРЕДЫ И ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ В СИСТЕМЕ ОЦЕНКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ТЕСТА. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

### *СТРЕСС И ЕГО СВЯЗЬ С НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ ГЕНОМА*

По определению Г. Селье, стресс (синонимы — стресс-ответ, стресс-реакция, общий адаптационный синдром) — это неспецифический ответ всего организма на любое воздействие — стрессор, влияние которого не обязательно является опасным либо травмирующим для индивидуума [68, 11, 64]. Эта реакция — первая по времени от начала воздействия — проявляется на всех уровнях функционирования организма, в том числе — эмоциональном [18].

Анализ нестабильности генома у людей в разном эмоциональном состоянии показал, что как острый, так и хронический неадаптивный стресс индуцируют хромосомные аберрации и модифицируют чувствительность генома к мутагенам различной природы [3, 4, 5, 30, 63, 27]. Понятно, что эффекты, выявленные в тесте на индукцию хромосомных аберраций, должны также проявляться и в микроядерном тесте, однако в доступной литературе нам не удалось найти описания подобных исследований, поэтому для иллюстрации в этом разделе будут приведены собственные данные.

Анализ связи между показателями нестабильности генома и выраженностью эмоционального стресса (табл. 8) проводили в группах детей 5–8 лет из Казахстана и взрослых мужчин из разных городов России, имевших (либо нет) производственный контакт с высокотоксичными химическими соединениями (характеристика всех групп приведена в ч.1 этой статьи). Для этого в каждом обследовании людей тестировали с помощью стандартных психологических тестов [4, 16] и по результатам этого тестирования подразделяли на 2 подгруппы: «Норма» — люди, находившиеся в состоянии психологического комфорта и «Дезадаптация». Статистический анализ ни в одном случае не выявил различий между соответствующими подгруппами по частоте двуядерных клеток с МЯ. В то же время у людей, находившихся в состоянии эмоциональной дезадаптации, — по сравнению с подгруппой «Норма» — было отмечено увеличение пролиферативного пула (как спонтанно, так и при облучении клеток в дозе 1,0 Гр). В культурах крови детей это сопровождалось почти двукратным повышением частоты асимметрично делящихся 3-ядерных клеток, а для взрослых подобная закономерность достоверно проявлялась только без облучения *in vitro*. Для нас важно, что эти наблюдения были сделаны на когортах разного пола и возраста, поскольку они доказывают, что вне зависимости от особенностей экспозиции, наличия либо отсутствия дополнительных генотоксичес-

ких воздействий на культуру клеток, эффекты стресса у человека проявляются, кроме прочего, в особенностях пролиферации клеток в культуре, где при хронической эмоциональной дезадаптации донора чаще возникают несимметрично делящиеся клетки (табл. 8). Кроме отмеченных различий, в культурах крови детей, находившихся в состоянии эмоциональной дезадаптации, были выше спонтанные частоты ускоренно делящихся клеток и митотический индекс. Снижение частоты апоптоза было обнаружено во всех вариантах культивирования клеток крови детей, находящихся в состоянии эмоциональной дезадаптации, но не взрослых.

И сразу возникает вопрос о существовании подобных эффектов в популяциях низкодифференцированных клеток, поскольку тогда риск развития опухолей как у людей, долго живущих в состоянии эмоциональной дезадаптации (дистресса), так и у леченых с использованием их стволовых клеток должен значительно возрастать. К сожалению, в литературе нет не только данных, но отсутствуют сведения о подобных исследованиях.

Для завершения этой темы хочется отметить два момента.

1. В крови обследованных нами детей из Казахстана были обнаружены полихлорированные бифенилы PCB [34]. Важно, что содержание PCB180 коррелировало по критерию Спирмена со спонтанной частотой 3-ядерных клеток в культуре крови (к=0,49; р=0,028), а с частотами 3-х и 4-ядерных клеток в однократно облученных культурах крови было связано содержание PCB 153 и PCB 180 (к=0,58; р=0,015 и к=0,40; р=0,013, соответственно). Кроме того, частота 3-х ядерных клеток в культурах крови, облученных в дозе 1,0 Гр, коррелировала с содержанием DDE — канцерогенного метаболита ДДТ (к=0,34; р=0,0096). Интересно, что степень тревожности детей коррелировала с содержанием в плазме крови PCB 153 (к=0,388; р=0,0020) и PCB 180 (к=0,34; р=0,03). Результаты биохимических анализов позволяют реконструировать картину развития эффектов нестабильности и чувствительности генома обследованных детей во взаимосвязи со стрессом. Известно, что диоксиноподобные PCB (а все обнаруженные в крови детей PCB принадлежат к этой группе соединений), обладают гормоно-подобным действием, одной из мишеней которого являются рецепторы эстрогенов [22]. Поэтому их присутствие в организме может вызывать гормональный дисбаланс, одним из проявлений и последствий которого является эмоциональная дезадаптация (повышенная тревожность, как один из способов ее проявления). Это означает, что начало цепи негативных изменений генома обследованных детей могло быть положено токсическими воздействиями, которые, помимо прочих эффектов, усиливали эмоциональную де-

*Таблица 8*

**Показатели пролиферации и повреждения генома клеток в культуре крови детей и взрослых, находящихся в различном эмоциональном состоянии**

| Выраженность стресса / Пролиферация и повреждения генома клеток в культуре (на 1000 клеток) | Дети (N = 78) | | | | Взрослые (N=60) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Спонтанный фон (M±m1) | | 1,0 Гр (M±m1) | | Спонтанный фон (M±m1) | | 1,0 Гр (M±m1) | |
| | Норма | Дезадаптация | Норма | Дезадаптация | Норма | Дезадаптация | Норма | Дезадаптация |
| Пролиферативный пул | 612,7±69,8 | 681,4±48,8* | 489,3±39,8 | 594,7±59,2* | 361,5±44,6 | 460,9±53,4* | 291,4±26,2 | 388,6±51,9* |
| Частота 3-ядерных клеток [2)] | 33,5±7,6 | 51,4±11,8* | 31,3±5,6 | 53,0±10,7* | 8,9±3,9 | 13,2±6,3* | 8,4±5,4 | 11,9±8,7 |
| Частота 4-ядерных клеток [2)] | 119,9±23,0 | 142,7±23,2 | 64,9±12,6 | 89,5±18,3 | 33,8±25,1 | 48,2±33,3 | 22,8±15,5 | 39,6±42,3 |
| % ускоренно делящихся клеток среди делящихся | 19,6±3,1 | 28,6±3,7* | 19,6±2,4 | 24,0±2,9 | 12,6±3,2 | 13,8±5,0 | 12,7±17,4 | 14,1±32,7 |
| Апоптоз | 7,5±2,6 | 2,7±1,2* | 7,7±3,0 | 3,9±2,8* | 10,6±10,4 | 16,5±14,6 | 7,6±5,9 | 12,0±10,2 |
| МИ | 33,2±6,2 | 44,9±8,4* | 42,3±19,8 | 48,4±9,1 | 27,0±8,6 | 25,6±8,7 | 18,3±5,6 | 22,7±8,2 |

Примечание: [*)] различия с группой «Норма» значимы, $p \leq 0,05$
[1)] стандартная ошибка
[2)] частоты, определяемые при анализе спектра делящихся клеток, (см.рис.1 в части 1 этой публикации)

задаптацию, связанную с социальными причинами, что, создавая порочный круг, увеличивало нестабильность и повышало чувствительность генома.

2. У мужчин, контактировавших с высокотоксичными химическими соединениями на производстве (и группы сравнения), содержание токсических соединений в крови не определяли, но психологическое тестирование показало, что степень выраженности стресса у них была значимо выше, чем в группе сравнения [3]. То есть, как и у детей, степень эмоциональной дезадаптации коррелировала с экспозицией химическими соединениями. Это, однако, не позволяет сказать, что во всех случаях только химическое воздействие является индуктором состояния неадаптивного стресса у человека. Так, контингентом, стандартно используемым для изучения эффектов стресса, являются родители детей-инвалидов и больные шизофренией [30, 63].

Заключая этот раздел, хочется отметить, что степень эмоциональной адаптации может серьезно влиять на стабильность и чувствительность генома человека, причем эти эффекты проявляются, видимо, во всех цитогенетических исследованиях. Именно поэтому эмоциональное состояние людей следует обязательно учитывать при формировании групп для обследования. Понятно также, что важную, если не решающую, роль степень выраженности эмоционального стресса играет при подборе доноров для тестирования на генотоксичность *in vitro*.

## ЭФФЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА

В последние десятилетия началось активное изучение связи генетического полиморфизма с индивидуальной чувствительностью генома человека. В основном, эти исследования посвящены трем проблемам:

1. полиморфизму генов, кодирующих ферменты детоксикации ксенобиотиков (для этого чаще всего изучаются различные производства);
2. полиморфизму онкогенов и генов предрасположенности к развитию опухолей — часто одни и те же ферментные системы ответственны за оба эффекта [42];
3. изучению нестабильности генома у людей с наследственными заболеваниями.

Как правило, подобные исследования связаны с изучением эффектов таких генов, частоты полиморфизма которых высоки. Например, полиморфизм семейства генов глютатионсульфотрансфераз (GST) в разных популяциях может достигать 50% [23, 45].

Приведем несколько примеров исследований, в которых применялся микроядерный тест на культуре лимфоцитов человека.

1. Guven et al. (2005) изучали нестабильность генома людей разного возраста — носителей нормального аллеля гена глютатионсульфотрансферазы M1 (GSTM1+) и гена с концевой делецией (GSTM1 0). Всего было обследовано 2 группы — 30 человек 26–30 лет и столько же людей в возрасте 66–87 лет, причем в группах было равное количество добровольцев с каждым аллелем GSTM1. Для оценки индивидуальной чувствительности генома параллельные культуры от каждого донора в течение 48 часов обрабатывали 30 мкМ гидроперекиси кумола (ГПК). Авторы не обнаружили различий в спонтанном уровне повреждений между молодыми и пожилыми людьми, однако частота ГПК-индуцированных микроядер в двуядерных клетках была значительно выше в культурах клеток пожилых людей. Связи частоты микроядер с генотипом выявлено не было.

Silva et al. (2004) на культурах лимфоцитов 15 здоровых некурящих доноров изучали эффекты гидрохинона (генотоксичный метаболит бензола, эффекты которого связывают с развитием миелопластического синдрома и острой миелогенной лейкемии). У добровольцев определяли аллельность генов детоксикации ксенобиотиков семейства GST — M1, T1 и P1, причем исследование проводили параллельно в нескольких тестах. Генотоксические эффекты гидрохинона были выявлены в культуре лимфоцитов крови человека с ЦХВ и при оценке частоты сестринских хроматидных обменов (СХО) в культуре крови — люди с генотипом GSTM1(0) имели значимо большую гидрохинон-индуцированную частоту микроядер в двуядерных клетках по сравнению с носителями нормального аллеля этого гена. В то же время спонтанные и гидрохинон-индуцированные частоты СХО с генотипом связаны не были.

В культуре лимфоцитов крови полицейских Рима Leopardi et al. (2003) изучали связь генотоксических эффектов автотранспорта с генотипом. Группы, сбалансированные по полу, возрасту и курению — 134 человека регулировщиков движения и 58 служащих офисов, различались по экспозиции бензином — 9,5 и 3,8 мкг/м$^3$, соответственно (присутствие других соединений в воздухе не анализировали). У всех обследованных определяли аллельность генов CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1 и DT-диафоразы. У людей с аллелем GSTM1(0) частота микроядер в двуядерных клетках была несколько ниже, чем у носителей нормального аллеля. В этой работе также была выявлена связь повреждений генома с возрастом и полом доноров — более высокие уровни были отмечены у людей старшего возраста и женщин, но не были связаны с экспозицией бензином и курением. Для анализа связи индивидуальной чувствительности генома с полиморфизмом изученных генов параллельные культуры 44 регулировщиков и 32 служащих офисов были в течение первых 16 часов культивирования экспонированы ингибитором репарации ДНК цитозин-арабинозидом. В этих культурах частота двуядерных клеток с микроядрами также не была связана с экспозицией и курением, но была выше у женщин.

Сравнительный анализ связи генотипа с генотоксическими эффектами в лимфоцитах крови работниц обувных фабрик в Болгарии (32 и 20 человек в экспериментальной и контрольной группах, соответственно) был проведен в исследовании Pitarque et al. (2002). Большая частота двуядерных клеток с микроядрами была обнаружена в экспериментальной группе у носителей аллеля GSTM1(0) как у курящих, так и некурящих, по сравнению с частотами у носителей нормального аллеля в контрольной группе. У некурящих работниц с нормальным аллелем гена GSTM1 также было отмечено значимое повышение частоты двуядерных клеток с микроядрами по сравнению с контролем. Для аллелей гена GSTT1 различий выявлено не было.

Отсутствие связи полиморфизма генов GSTM1, GSTT1 и GSTP1 с частотой микроядер в двуядерных клетках крови 6 здоровых доноров было показано при экспозиции 0,05–0,5 мкг/мл Thimerosal (консервант, часто используемый в фармацевтической промышленности для стабилизации вакцин) [76]. Отсутствие связи частоты микроядер в двуядерных клетках с полиморфизмом генов GSTM1, GSTP1, GSTT1 было также продемонстрировано у 30 пациентов с опухолями щитовидной железы [46]. Обследование проводили до и после терапии препаратами радиоактивного йода. В то же время, использование еще одного маркера предрасположенности к развитию опухоли — гена N-ацетилтрансферазы (NAT) показало, что присутствие аллеля NAT2*7 было связано с небольшим, но значимым повышением частоты микроядер.

В собственных исследованиях мы изучали связь между показателями нестабильности генома в клетках крови мужчин, экспонированных комплексом токсических и генотоксических факторов химического производства, и полиморфизмом генов CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1 (характеристика групп приведена в ч.1 этой работы). Анализ показал, что спонтанные и радиоиндуцированные (1,0 Гр $Co^{60}$) частоты двуядерных клеток с микроядрами не были ассоциированы с генотипом. В то же время, в облученных культурах крови людей с делецией в гене GSTM1(0) наблюдалось значимое снижение численности фракций ускоренно делящихся клеток. Однако частота этих клеток с микроядрами была значимо выше, чем в культурах крови людей с нормальным аллелем этого гена. Для остальных изученных генов связи с чувствительностью генома выявлено не было. Интересно, что среди носителей делеции в гене GSTM1 (но не GSTT1), контактировавших на производстве с высокотоксичными соединениями, состояние эмоциональной дезадаптации (в зависимости от использованного психологического теста) имели 70–73% обследованных, а среди носителей нормального аллеля — 26–43% доноров. Экспериментальное обнаружение этой связи позволяет еще раз подчеркнуть, что только многопараметровые исследования, в которых всесторонне учитываются индивидуальные особенности доноров, позволяют достаточно точно описать картину развития эффектов нестабильности генома.

2. Эффекты нестабильности генома в двуядерных клетках крови 6 здоровых доноров и 6 гетерозиготных носителей гена атаксии-телеангиэктазии изучали Scott D. et al. (1996). Во многом эта работа носила методический характер. В 9 повторностях эксперимента сравнивали спонтанные и радиоиндуцированные ($Co^{60}$, 3,0 Гр) эффекты при облучении с большой и малой мощностями дозы. В культурах крови здоровых доноров была обнаружена значительная вариабельность частоты двуядерных клеток с микроядрами между экспериментами во всех вариантах постановки, хотя эффекты при малой мощности облучения были всегда ниже, чем при большой. Кроме того, были выявлены существенные индивидуальные различия между донорами, которые проявлялись только при облучении большой мощностью дозы. Важно, что 5 из 6 культур крови гетерозиготных носителей гена атаксии-телеангиэктазии вне зависимости от различий между экспериментами при облучении с малой мощностью содержали меньше микроядер в двуядерных клетках, чем культуры людей группы контроля.

На сегодня уже проведено более сотни исследований связи генетического полиморфизма и показателей нестабильности генома. Как показывает даже небольшой обзор, изучение эффектов полиморфизма одной и той же системы генов приводит разных исследователей к различным заключениям относительно существования связи с нестабильностью генома. Однако это противоречие, по всей видимости, кажущееся, поскольку корректные заключения можно делать только в случае точного соответствия экспозиции и ферментных систем, отвечающих за эффекты (например, детоксикации). Поэтому общий вывод, который можно сделать при анализе исследований связи генетического полиморфизма с нестабильностью генома, заключается в том, что феномен генетической предрасположенности к повышенной чувствительности генома существует, но проявляется, как правило, в сочетании с другими факторами — экспозицией генотоксикантами *in vivo* или *in vitro*, носительством других генов, связанных с повышением нестабильности генома, возрастом, курением, эмоциональной дезадаптацией и пр. Несмотря на то, что в геноме человека содержится около 24,5 тыс. генов, а продукты одних генов могут модифицировать активность других, все-таки представляется возможным использовать анализ генетического полиморфизма для качественного прогноза индивидуальной чувствительности генома к определяемым факторам. Его точность значительно повышается в тех случаях, когда известен химический состав экспозиции и ферментные системы, отвечающие за детоксикацию именно этих соединений. По всей видимости, только в таких случаях анализ генетического полиморфизма может стать весьма полезным

инструментом профессионального отбора для работы в конкретных вредных условиях. В подобной ситуации культивирование клеток крови в присутствии цитохалазина В и с дополнительной генотоксической нагрузкой *in vitro* представляется одним из лучших способов проверки корректности прогноза, сделанного по результатам ПЦР-анализа.

## АДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ

Адаптивный ответ — общебиологическая реакция, выработанная в процессе эволюции, заключается в том, что воздействие радиации или другого повреждающего агента в малой дозе повышает резистентность к последующему воздействию того же либо иного агента в высокой дозе. В лимфоцитах периферической крови человека адаптивный ответ был обнаружен Olivieri с соавторами (1984) и с тех пор подтвержден на многих объектах [7–10, 1, 67, 78]. При исследовании механизма этого феномена Д. М. Спитковский с соавторами (2002) показали, что под действием малых доз ионизирующей радиации в течение нескольких часов в интерфазной клетке происходит сближение центромер гомологичных хромосом, которое, видимо, должно облегчать рекомбинантное восстановление целостности хромосом. Сравнение этих эффектов в клетках здоровых доноров, пациентов с анемией Фанкони и носителей гена BRCA2 показало, что при одинаковом уровне воздействия у здоровых доноров расстояние между центромерами гомологичных хромосом было значительно меньше, чем у носителей мутаций. Эта работа, с нашей точки зрения, является одним из доказательств давно существующего среди радиобиологов, генетиков, врачей и экологов мнения, что направленность и выраженность адаптивного ответа можно считать показателем защитной реакции организма на экстремальные воздействия окружающей среды.

В работах группы И. И. Пелевиной предлагается выделить 4 типа адаптивного ответа: положительный, который принято считать нормальным (статистически значимое снижение суммарного эффекта по сравнению с действием только большой дозы); тенденция к нормальному адаптивному ответу; тенденция к увеличению радиочувствительности и инверсия эффекта (увеличение повреждения при предобработке низкой дозой). На рисунке 8 приведены данные из статьи И. И. Пелевиной с соавторами (1996), посвященной сравнительному анализу микроядер в лимфоцитах цельной крови людей, живущих на территориях, затронутых следом аварии на ЧАЭС.

Как видно на этом рисунке, группа жителей Москвы отличалась от других по доле людей с разными видами адаптивного ответа. Так, в популяциях, проживающих в регионах, загрязненных радионуклидами, доля людей с проявлением нормального адаптивного ответа была ниже, чем в Москве. Кроме того, среди московских доноров не было людей с повышением радиочувствительности культур крови после предоблучения в дозе 0,05 Гр. Авторы пришли к заключению, что хроническое облучение в малых дозах, которому подвергаются жители Брянской обл., не вызывает само по себе адаптивной реакции, т. е. не является адаптирующим фактором.

Комментируя результаты цитированной работы, хотелось бы отметить, что действие низкой дозы облучения может вызывать снижение суммарного эффекта только в том случае, когда клетка или организм в течение всей жизни сохранили высокий адаптивный потенциал [12, 13]. Поэтому Д. М. Спитковский предположил, что роль адаптирующего воздействия в реальной жизни могут играть, например, проживание на загрязненной территории или производственный контакт с токсикантами и генотоксикантами. В подобных случаях можно ожидать снижения или отсутствия адаптирующего действия малых доз и, следовательно, относительного повышения радиочувствительности клеток в системе экспериментальной оценки адаптивного ответа. По нашему мнению, позиция Д. М. Спитковского весьма корректно отражает суть адаптивного ответа как биологического феномена и близка по своему подходу к концепции Г. Селье о стрессе. Более того, список дезадаптирующих факторов и ситуаций, приведенный в работах Д. М. Спитковского, можно дополнить событиями или состояниями, связанными с постоянным или временным снижением адаптационного потенциала организма. Это — болезнь, в том числе, наследственная, операция или терапевтическое воздействие, а также серьезная эмоциональная травма или дезадаптация — во всех подобных случаях можно ожидать либо отсутствие адаптивного ответа, либо его инверсию. В литературе имеются сведения о подобных эффектах. Например, Цховребова и Македонов (2004) изучали адаптивный ответ в клетках крови здоровых доноров и больных с синдромом Марфана и гомоцистинурией, для которых характерно снижение активности систем репарации ДНК. В тесте на индукцию хромосомных аберраций было установлено, что у здоровых доноров и доноров с синдромом Марфана наблюдался нормальный адаптивный ответ к разным типам воздействий — ионизирующей радиации или 3Н-тимидину в качестве адаптирующих воздействий на стадии G1клеточного цикла и 8-метоксипсоралена, активированного УФ-светом, как разрешающего агента. В то же время, клетки больных с гомоцистинурией не проявили адаптивного ответа к обоим видам воздействия. Отсутствие адаптивного ответа к ионизирующей радиации у детей с трисомией (47, XX or XY, +21) обнаружили I. Kalina с соавторами (1994). Monsieurs и Thierens в микроядерном тесте с ЦХВ определяли адаптивный ответ лимфоцитов крови к действию ионизирующей радиации (0,05 Гр+ 1,0 Гр $Co^{60}$) у здоровых доноров и у людей с заболеваниями щитовидной железы — непосредственно перед и через неделю после приема препаратов радиоактивного йода [57]. Результаты показали, что до лечения у всех 20 пациентов

наблюдалось увеличение числа микроядер в двуядерных клетках после предоблучения в малой дозе. Однако после лечения у 8 пациентов было отмечено уменьшение радиочувствительности — нормальный адаптивный ответ. В культурах клеток еще 8 человек не было реакции на предоблучение и только у 4 доноров сохранился эффект повышения радиочувствительности клеток после предоблучения в малой дозе. Авторы сделали заключение, что для 40 % больных йодотерапия имела характер адаптирующего воздействия.

При анализе адаптивного ответа в собственных исследованиях и после консультации с И. И. Пелевиной и А. М. Серебряным мы несколько изменили критерии оценки адаптивного ответа — единственным отличием от цитированной работы является объединение всех незначимых различий между эффектами облучения в большой дозе и облучения в большой дозе с предоблучением, в одну категорию, которую назвали «нет различий». Результаты анализа адаптивного ответа у мужчин, экспонированных химическими генотоксикантами (характеристика групп приведена в ч. 1 этой публикации), показаны на рисунке 9. Эксперименты проводили по схеме И. И. Пелевиной [7]. Анализ полученных данных показал, что наиболее тяжелая ситуация наблюдалась среди пациентов терапевтического отделения больницы (позитивный контроль), где не было людей со снижением радиочувствительности клеток крови при предоблучении малой дозой ионизирующей радиации (нормальным адаптивным ответом). Самую благоприятную ситуацию, как не странно, мы наблюдали в группе инвалидов, которые на момент обследования были пациентами профилактория.

В обследовании детей из Казахстана (рис. 10) клетки крови культивировали и облучали в тех же условиях. Анализ результатов показал, что доля детей с нормальным адаптивным ответом в регионе сравнения (поселок Акчи) была почти в 3 раза больше, чем в Аральске, а доля детей с инвертированным адаптивным ответом, когда предоблучение культур крови в малой дозе приводило к увеличению числа клеток с МЯ, была выше в Аральске. Для сравнения следует отметить, что в Москве среди здоровых детей того же возраста около 20 % имели нормальный адаптивный ответ [8]. В нашем обследовании сходная частота нормального адаптивного ответа была характерна для детей из Акчи.

Анализируя причины обнаруженных эффектов, следует иметь в виду, что хотя химический анализ проб крови и мочи обследованных детей обнаружил присутствие низких концентраций токсических соединений, но различий между поселками по этим показателям выявлено не было [34]. В то же время, социоэкономические показатели качества жизни [16] — бедность и недостаточность питания, низкий социальный статус родителей, эмоциональная напряженность и пр. — вдвое чаще встречались в Аральске, чем в Акчи. Мы полагаем, что негативное действие социальных факторов на фоне длительной экспозиции малыми дозами токсических соединений могли исчерпать адаптивный потенциал организма детей из Аральска, что проявилось в значительной распространенности инвертированного адаптивного ответа в этой группе.

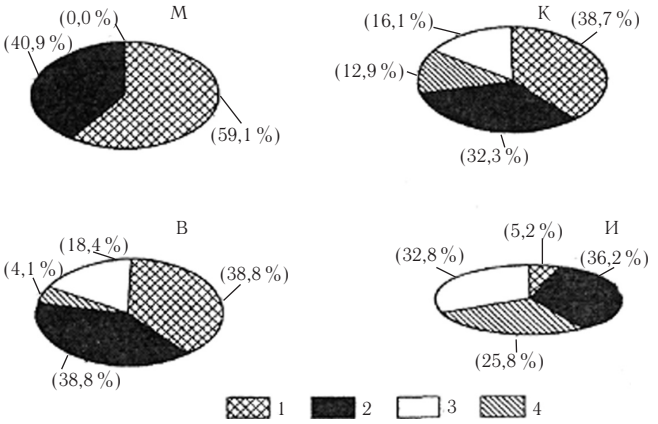


***Рис. 8.*** *Проявление адаптивного ответа в лимфоцитах крови (предварительное облучение in vitro в дозе 0,05 Гр и последующего в дозе 1 Гр) у московских доноров (М) и жителей загрязненных районов — Клинцов (К), Вышкова (В) и детей из Новозыбкова (И). Доля людей (%), у которых: проявление адаптивного ответа достоверно (/), тенденция к проявлению адаптивного ответа (2), достоверное повышение радиочувствительности (3), тенденция к повышению радиочувствительности (4). По данным сайта: «Ситуация на загрязненных в результате Чернобыльской аварии территориях (http://www.wdcb.ru/mining/obzor/Radsit.htm), ссылающегося на Роскомгидромет, на 1992 г. уровни загрязнения почвы цезием-137 составили: Клинцы — 5–15 Ки/км²; Новозыбков — 15–45 Ки/км²; Клинцы — ок 28 Ки/км²*

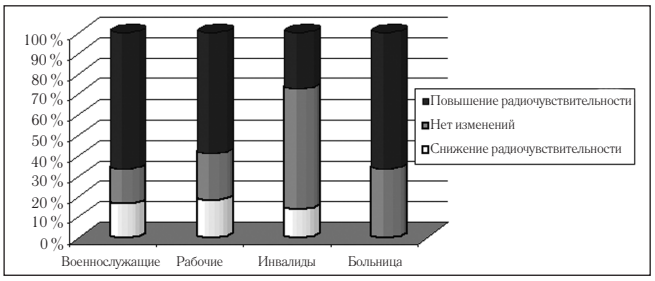


***Рис. 9.*** *Адаптивный ответ в культуре лимфоцитов взрослых мужчин (описание групп приведено в подписях к таблице 4). По оси абсцисс: доля обследованных (%) с разными типами адаптивного ответа*

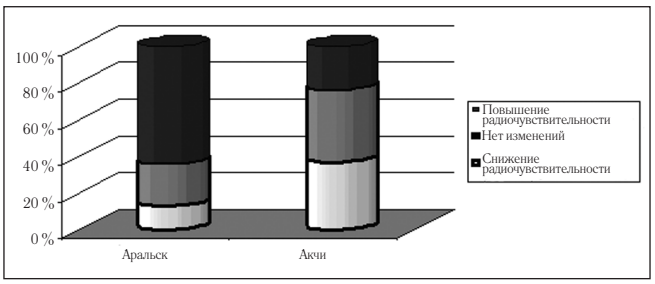


***Рис. 10.*** *Доля детей (%) в Аральске и Акчи с различными типами адаптивного ответа*

Bosi и Olivieri (1989) высказали предположение, что феномен адаптивного ответа генетически детерминирован и повышение радиочувствительности при предоблучении клеток в малой дозе указывает на нарушения в геноме человека. В пользу этого предположения косвенно могут свидетельствовать результаты исследования Coleman et al. (2005), которые в системе адаптивного ответа анализировали транскрипционные профили 145 генов из различных клеточных линий. Результаты показали, что в ответ на действие адаптирующей дозы облучения увеличивалась активность белок-синтезирующих генов, но до 10 раз снижалась активность генов, связанных с клеточным метаболизмом и передачей сигнала, ассоциированных с такими последствиями как репарация ДНК, стресс-ответ, контроль клеточного цикла и апоптоз. В итоге происходило либо снижение эффекта облучения в разрешающей дозе (в этой работе — 2 Гр), либо его повышение.

Таким образом, данные, приведенные в этом разделе, указывают на то, что адаптационный потенциал организма играет существенную роль в реализации эффектов адаптивного ответа лимфоцитов крови человека, а культивирование этих клеток с ЦХВ может с успехом использоваться как основной инструмент этого анализа.

## *СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА НА КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ДРУГИХ ТЕСТОВ НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ*

Несмотря на короткую историю обсуждаемого теста, эффективность его применения для оценки нестабильности генома человека доказывается в более чем 300 публикациях. Однако до сих пор ученых волнует вопрос о сравнительной чувствительности этого теста. Поэтому оценку генотоксических эффектов у одной и той же группы доноров часто проводят параллельно в нескольких тестах. Так, в цитированном выше сравнительном исследовании Pitarque et al. (2002) для анализа генотоксических эффектов производства обуви параллельно в пробах периферической крови работниц определяли число микроядер в двуядерных клетках, частоту сестринских хроматидных обменов (СХО) и длину хвостов в Comet-assay. Различия между экспонированной и контрольной группами были выявлены только в микроядерном тесте. При этом частоты двуядерных клеток с микроядрами отрицательно коррелировали с уровнем гемоглобина в крови обследованных женщин — его снижение характерно для экспозиции комплексом факторов производства обуви.

При сравнении эффектов двух пестицидов — 1-(6-хлор-3-пиридилметил)-N-нитроимидазолин-2-илидениамина и 2'-бензоил-1'-трет-бутилбензоилгидразина на лимфоцитах крови здоровых доноров [40] в тесте на индукцию СХО и микроядерном тесте на лимфоцитах крови с ЦХВ были обнаружены идентичные генотоксические эффекты. Однако, отмечая более широкий диапазон варьирования показателей в тесте на индукцию СХО, авторы рекомендуют использовать оба теста для оценки потенциальной генотоксичности факторов окружающей среды. Более критично относиться к результатам анализа СХО из-за возможности получения ложнопозитивных результатов призывают Abou-Eisha et al. (2004), которые анализировали генотоксические эффекты сульфаметоксазола в микроядерном тесте с ЦХБ и при учете СХО. Дозозависимые генотоксические эффекты были выявлены в обоих тестах, но различия с контролем были более значимы при оценке СХО. В цитированном исследовании Garaj-Vrhovac и Zeljezic (2001), при анализе эффектов производственного контакта с пестицидами у рабочих со стажем не менее 8 лет, а затем у тех же людей через 8 месяцев после окончания работы на этом заводе, обнаружили снижение всех показателей нестабильности генома. При этом частота хромосомных аберраций снизилась, в среднем, в 2 раза, частота микроядер в двуядерных клетках — в 2–3 раза, длина хвостов ДНК в Comet-assay в 2–6 раз, а уровень СХО сократился только на 20–50%. Авторы предполагают, что повышенная частота СХО и их стабильность могли быть связаны с возрастом обследованных людей. Следует отметить, что подобную связь обнаружили Donbak et al. (2005).

В нескольких тестах изучали эффекты нестабильности генома рабочих заводов пластмасс, расположенных в одном регионе [74]. В обследовании, в котором группы формировали с учетом экспозиции и социоэкономических показателей качества жизни, принимали участие 86 человек, экспонированных стиролом, и 42 человека входили в группу сравнения. Генотоксические эффекты в лимфоцитах крови определяли в тестах на индукцию хромосомных аберраций и в микроядерном тесте с ЦХВ, а также оценивали активность репарации ДНК при облучении клеток в дозе 5 Гр (Comet-assay), содержание 8-оксигуанина в крови, концентрацию стирола в воздухе рабочей зоны и его метаболитов в крови. В группе рабочих уровень хромосомных аберраций был, практически, вдвое выше, чем в группе сравнения, прямо коррелировал с возрастом обследованных людей, но не был связан с экспозицией, как и результаты Comet-assay. Частота двуядерных клеток с микроядрами также была выше у рабочих, но, кроме того, коррелировала с концентрацией стирола в воздухе рабочей зоны и содержанием его метаболитов в крови обследованных людей, а также с их возрастом.

При обследовании 20 рабочих завода по производству пестицидов в Хорватии и 20 неэкспонированных доноров в группах, сбалансированных по полу, возрасту, курению и употреблению алкоголя [41, 79] были проанализированы частоты разных типов хромосомных аберраций, частоты микроядер в двуядерных клетках, частоты (СХО)

и повреждения ДНК в Comet-тесте. Все использованные методы анализа выявили генотоксические эффекты экспозиции, однако сравнительная чувствительность генома была определена следующим образом: СХО ≥ микроядерный тест с ЦХБ > индукция хромосомных аберраций > Comet-assay.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ТЕСТА

Несомненным преимуществом метода культивирования клеток с ЦХБ [38] является возможность выявлять не только микроядра, но и такие генетические повреждения, как межъядерные мосты и ядерные почки (синонимы: микроядра типа «разбитое яйцо», протрузия).

Исследования последнего времени [62, 36] показали, что при культивировании клеток с ЦХБ межъядерные мосты образуются из дицентрических хромосом, центромеры которых прикрепляются к разным ядрам в анафазе митоза, что позволяет выявлять такие эффекты как ошибочная репарация, хромосомные перестройки и сегрегация хромосом. Разрывы и поломки межъядерных мостов в митозе могут приводить к образованию микроядер. Этот механизм предполагает высокую прогностическую значимость выявления межъядерных мостов при оценке эффектов радиации и радиомиметиков, для которых характерна повышенная частота обменных аберраций. Действительно, Maluf et al. (2001) изучали нестабильность генома 22 здоровых медсестер и врачей-радиологов, у которых действие радиации контролировалось дозиметрами. Группу сравнения, сбалансированную по полу, возрасту и курению, также составляли 22 человека. Авторы работы обнаружили большую частоту межъядерных мостов в двуядерных клетках у медсестер и врачей-радиологов, причем частоты микроядер в двуядерных клетках между группами не различались. В этом обследовании параллельно оценивали эффекты в Comet-assay, где большая длина хвостов ДНК также была характерна для экспонированной группы. Однако ни один из изученных показателей не коррелировал и данными индивидуальной дозиметрии. Maluf и Erdtmann (2000) выявили связь между частотами межъядерных мостов в двуядерных клетках и экспозицией противоопухолевыми препаратами. В этом обследовании, проведенном параллельно в микроядерном тесте и Comet-assay на 10 экспонированных и 10 контрольных донорах, все показатели были связаны с экспозицией.

На стадии прогрессии опухоли часто происходят такие процессы, как амплификация генов, потеря нормального аллеля онкогена и потеря супрессорного гена [15]. Одним из механизмов, с помощью которого клетка избавляется от избыточно амплифицированной ДНК является образование ядерных почек [36, 75]. Установлено, что избыточно амплифицированная ДНК локализована в специфических участках ядерной периферии, из которых элиминируется в S-фазе клеточного цикла путем образования ядерных почек. Другой механизм ее элиминации — рекомбинация между гомологичными участками внутри амплифицированных последовательностей, что приводит к образованию ацентрических и ателомерных колец, которые также локализованы в определенных участках ядра [54]. С нашей точки зрения, понимание этого механизма важно для осознания ценности показателя «ядерная почка» как одного из самых серьезных прогностических критериев нестабильности генома. Так, например, El-Zein et al. (2006) культивировали с ЦХВ лимфоциты крови пациентов с опухолями легких, впервые обратившихся в медицинские учреждения. У 23 % обследованных (против 2,0 % в контроле) были обнаружены микроядра типа «ядерные почки». Кроме того, у всех пациентов наблюдалась повышенная частота микроядер и хроматиновых мостов в двуядерных клетках. По мнению авторов, полученные данные свидетельствуют о возможности прогноза некоторых типов опухолевых заболеваний по наличию ядерных почек, микроядер и хроматиновых мостов в культивированных лимфоцитах периферической крови. Следует отметить, что повышение частоты ядерных почек в клетках опухоли традиционно считается одним из морфологических признаков злокачественности [50].

Весьма интересны исследования, направленные на оценку эффектов анеуплоидии, поскольку, в частности, они связаны с возможностью выявления негенотоксичных канцерогенов (анеугенов). Например, анеуплоидия в культуре лимфоцитов человека в комбинации с FISH-мечением центромер при действии метилметансульфоната, колхицина, сульфатов винкристина и винбластина, циклофосфамида, гексаметилфлсфорамида, 2- и 4-ацетиламинофлюоренов была продемонстрирована в исследовании, проведенном под руководством A. T. Natarajan [29]. Анеуплоидия по 21 и 13 хромосомам, проявившаяся в повышенной частоте FISH-позитивных микроядер в двуядерных клетках, была обнаружена в лимфоцитах крови людей с болезнью Альцгеймера, культивированных в условиях цитокинетического блока [56]. Rosefort et al. (2004) показали, что анеугенный эффект, в отличие от кластогенного, можно также определять по числу микроядер в одноядерных клетках. Эти авторы с использованием флуоресцентного мечения центромер показали, что действие 80 мкМ диэтилстилбестрола, 25 мкг/мл гризеофулвина и 15 мкг/мл сульфата винкристина *in vitro* приводило к увеличению частоты микроядер как в одноядерных, так и в двуядерных клетках, в то время как такие кластогенные агенты, как митомицин С (500 нг/мл), блеомицин (6 мкг/мл) и доксорубицин (20 мкг/мл) повышали частоту микроядер только в двуядерных клетках культур крови здоровых доноров. В качестве позитивного контроля в этой работе использовали лекарственный препарат беренил (300 мкг/мл), обладающий способностью к деконденсации гетерохромати-

на Y-хромосомы. Оказалось, что беренил индуцировал микроядра как в одноядерных, так и в двуядерных клетках, что, по мнению авторов, доказывает его анеугенное действие.

Еще одним преимуществом оценки микроядер в клетках крови человека является возможность анализа регуляторных процессов. Так, например, эффекты гипометилирования ДНК, связанные либо с особенностями питания, либо с ингибированием метилтрансферазы, которые также являются одним из источников образования микроядер, были продемонстрированы McRobbie и Newell (1985), Fenech и Crott (2002), а также Wang и Fenech (2003). В этих работах было показано, что при гипометилировании ДНК возможна реализация двух альтернативных механизмов повреждения — потери одной или нескольких хромосом или возникновение поломок хромосом. При оценке эффектов радиации и дефицита фолиевой кислоты [36, 75] была выявлена четкая корреляция между частотами микроядер в двуядерных клетках, ядерных почек и межъядерных мостов ($к=0,75-0,77$; $p \leq 0,001$), что согласуется с единым генезом этих повреждений. Аналогичные эффекты были выявлены многими исследователями, работающими в микроядерном тесте на клетках крови человека (см., например, [54]). В собственных исследованиях [2], мы тоже обнаружили высокозначимую ($к=0,76-0,88$; $p \leq 10^{-5}$) корреляционную связь между частотой микроядер, хроматиновых мостов и частотой ядерных почек.

Международный протокол также рекомендует оценивать такие виды клеточной гибели, как апоптоз и некроз, хотя анализ апоптоза и его использование в системе оценки нестабильности генома до сих пор вызывает много споров. Так, например, оптимальным для выявления микроядер в двуядерных клетках при культивировании с ЦХВ считается фиксация культуры на 72 часа [39], а максимальная частота апоптоза выявляется при культивировании клеток в течение 12 часов [66]. Понятно, что разные методические приемы, в принципе, могут привести к получению качественно различных результатов. Например, лимфоциты человека в культуре способны к фагоцитозу [58], поэтому анализ апоптоза при фиксации результатов на 72 часу от начала культивирования может показывать заниженные эффекты. Еще одной причиной различий в уровне апоптоза при культивировании либо цельной крови, либо суммарной фракции лимфоцитов в присутствии ЦХВ, может стать вариабельность численности клеточных популяций лимфоцитов, всегда различающихся между людьми. Так, Wilkins et al. (2002) изучали спонтанный и радиоиндуцированный апоптоз в отдельных фракциях клеток крови здоровых доноров — гранулоцитах, В-лимфоцитах, природных киллерах (NK), а также CD4(+) и CD8(+) Т-лимфоцитах. Наиболее чувствительными к действию ионизирующей радиации оказались CD4(+) и CD8(+) Т-клетки, которые имели самый низкий спонтанный уровень апоптоза. Поэтому иммунный статус организма может существенно влиять на результаты оценки эффектов радиации, а, может быть, и других факторов. Понятно, что эта проблема нуждается в детальном изучении, но уже сегодня можно сказать, что иммунологический статус организма следует учитывать при формировании групп для обследования.

Связь между частотой двуядерных клеток с микроядрами иапоптозом на 3 линиях клеток опухолей человека и 2 опухолевых линиях грызунов изучали Guo et al. (1998). Дозозависимые эффекты и высокий уровень прямой корреляций между этими параметрами был обнаружен для клеток SHIN-3, DU-145 и CHO-K1, в то время как на клетках F9 и COLO 320DM подобные эффекты не наблюдались. Авторы объясняют обнаруженные эффекты разницей в радиочувствительности использованных клеточных линий. Различия в радиочувствительности апоптоза между 5 клеточными линиями продемонстрировали Akudugu и Bohm (2001). Возникновение подобных эффектов вполне понятно, и различий может быть обнаружено столько, сколько существует клеточных линий.

Теоретически, процессы апоптоза и образования клеток с микроядрами у людей с нормальным уровнем адаптации и нормальными аллелями генов апоптоза при воздействии, не превышающем адаптивный потенциал клеток, должны иметь разнонаправленные тренды и, следовательно, отрицательно коррелировать между собой. В литературе можно встретить как подтверждение, так и опровержения этого предположения. Например, в культуре с ЦХВ клеток подростков, постоянно находящихся под воздействием низких доз облучения, Мельнов и Лебедева (2004) выявили высокодостоверную прямую корреляцию между частотой двуядерных клеток с микроядрами и апоптозом. В то же время Joksic и Petrovic (2004) продемонстрировали отрицательную корреляцию между частотой двуядерных клеток с микроядрами и апоптозом в культуре клеток крови рабочих, контактирующих с радиоактивным излучением в течение 9–19 лет. Дозозависимое увеличение частоты двуядерных клеток с микроядрами, сопровождавшееся снижением апоптоза, продемонстрировали Argentin и Cicchetti (2004) при изучении эффектов разных концентраций никотина на культурах лимфоцитов здоровых доноров.

Причины обнаружения как положительных, так и отрицательных корреляций между количеством микроядер в двуядерных клетках (либо частотой двуядерных клеток с микроядрами) и частотой апоптоза, пока неизвестны и эта проблема требует дальнейшего изучения. Однако в литературе имеются указания на некоторые возможные причины подобных различий. L. D. Tomei et al. в цикле исследований обнаружили зависимость частоты апоптоза в лейкоцитах крови человека от физиологического состояния организма [24], возраста обследованных людей [72], их эмоционального состояния (снижение

а-поптоза у студентов во время сессии [71]), а также модификацию апоптоза и некроза под действием γ-интерферона [60]. Следует отметить, что изменение частоты микроядер в двуядерных клетках в зависимости от пола и возраста, а также от физического состояния организма и эмоционального статуса уже было продемонстрировано в данном обзоре.

В собственных исследованиях мы обнаружили, что у детей из Казахстана спонтанные и радиоиндуцированные частоты апоптоза отрицательно коррелировали со степенью эмоциональной дезадаптации (к = −0,40; р=0,001 и к = −0,31; р=0,02, соответственно), но прямо коррелировали с частотой двуядерных клеток с микроядрами (к=0,54; р=0,008 и к=0,61; р=0,042, соответственно).

Приведенные данные еще раз свидетельствуют о том, что при планировании исследований и трактовке их результатов с учетом апоптоза в микроядерном тесте на культуре крови человека следует обращать внимание на особенности выбора доноров для проведения обследования.

Очень перспективным и интересным направлением исследований в микроядерном тесте представляется использование комбинаций различных методических подходов. Так, применение центромерных FISH-меток на индивидуальные хромосомы позволяет достаточно надежно оценивать эффекты анеуплоидии [73]. Комбинированные технологии выявления различных типов повреждений стали незаменимым инструментом для изучения механизмов образования генетических повреждений, репарации, апоптоза и пр. Например, Ponsa et al. (2001) при использовании центромер-специфических флуоресцентных маркеров к 4, 7 и 18 хромосомам на облученных клетках человека показали, что частота хромосомных мостов в участках мечения была выше в ядерном материале, чем в микроядрах. Это означает, что не все существующие повреждения хромосом локализуются в микроядра. Авторы предположили, что этот эффект связан с действием ЦХБ, присутствующего в культуре. Однако приведенные данные, по нашему мнению, также свидетельствуют о возможности реализации этих повреждений в микроядра в тех случаях, если клетка, их содержащая, пройдет еще один митоз. Действительно, во всех наших исследованиях частоты межъядерных мостов в ускоренно делящихся клетках — как спонтанные, так и радиоиндуцированные — были значительно выше, чем в двуядерных.

Большой интерес представляют данные, полученные с использованием FISH-мечения отдельных хромосом вместе с CREST-окрашиванием (антитела к кинетохорам). В работе M.Schuler et al. (2003) такой методический прием был использован в микроядерном методе с ЦХБ и 5-бром-2-дезоксиуридином для выявления численных аномалий хромосом (нон-дизъюнкция), а также отношений между индукцией потерь хромосом и полианеуплоидией при действии известного лекарственного препарата гидрохлорида носкапина. Подобных исследований становится все больше.

## МЕТОДИКА АНАЛИЗА МИКРОЯДЕР В ПРАКТИКЕ ОЦЕНКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Для культивирования лимфоцитов человека в исследовательской практике обычно используют как цельную кровь, так и выделенные лимфоциты. Сравнение этих двух способов проводили, экспонируя клетки циклофосфамидом, бенз(а)пиреном и метилметансульфонатом в присутствии микросомальной фракции S9 и без нее [32]. Результаты этого эксперимента оказались неожиданными. Циклофосфамид и бенз(а)пирен в присутствии S9 дозозависимо индуцировали микроядра в выделенных лимфоцитах, в то время как в культуре цельной крови эффекты выявлены не были. В то же время, метилметансульфонат (позитивный контроль), показал дозозависимые эффекты в обоих типах культур. Поэтому влияние эритроцитов затем исследовали отдельно. Для этого культуры изолированных лимфоцитов обрабатывали одновременно циклофосфамидом и S9 в присутствии очищенного концентрата эритроцитов. Результаты этой серии экспериментов показали значимое снижение частоты микроядер в двуядерных клетках по сравнению с эффектами, обнаруженными при культивировании фракции лимфоцитов. Авторы делают вывод о том, что культура выделенных лимфоцитов является более чувствительной системой для оценки генотоксического действия химических соединений, но культивирование цельной крови отражает эффекты, наблюдаемые в реальной жизни.

В Вашингтоне 25–26 марта 1999 года состоялось второе заседание «Международной рабочей группы по оценке генотоксичности», на котором обсуждалась методология и результаты оценки микроядер *in vitro* в лимфоцитах человека, культивируемых в присутствии ЦХВ. Отдельно обсуждалась проблема использования различных линий клеток. В результате были разработаны некоторые руководящие принципы для проведения испытаний, которые затем были обсуждены и утверждены 28–29 июня 2002 года в Плимуте на третьем заседании Международной рабочей группы (приводятся ниже). Для подготовки международных рекомендаций были использованы данные Французского общества по генетической токсикологии, японских международных исследований, данные, полученные в лабораториях фармацевтической промышленности в Европе и исследовательских лабораториях Lilly Research Laboratories [49].

Основные рекомендации касались следующего:

1. Оценка пролиферации клеток — как лимфоцитов, так и любых клеточных линий — является необходимой частью каждого исследования.
2. Для заключения о наличии генотоксичности могут быть использованы только исследования, проведенные в диапазоне доз с учетом пролиферации (индекса репликации, индекса пролиферации или митотического ин-

декса). В подобных экспериментах рекомендуется учитывать такие показатели, как некроз и апоптоз, которые могут дать полезную информацию.

3. Для экспозиции в отсутствии S9 рекомендовано использовать 2 типа позитивных контроля: кластоген (митомицин С или блеомицин) и анеуген (колхицин). Для экспериментов с использованием S9 в качестве позитивного контроля рекомендуется использовать диметилнитрозамин или циклофосфамид.
4. Для повышения точности анализа рекомендуется использовать дублирующие культуры и кратное их числу увеличение числа проанализированных клеток. Также рекомендуется ставить повторные эксперименты. Например, для оценки генотоксичности *in vitro* на лимфоцитах крови человека рекомендуется использовать параллельные культуры клеток 2 молодых здоровых некурящих доноров, эффекты в которых следует сравнить после завершения микроскопического анализа. При использовании клеточных линий эксперименты следует повторять в том случае, когда в первом получен отрицательный результат.
5. Выбор статистических методов анализа должен определяться характером распределения. Эксперты особо отметили, что статистическая значимость не должна быть единственным фактором для определения положительных результатов — директивой должен быть биологический смысл обнаруженного явления.

Хочется добавить, что пол, возраст, физиологический и эмоциональный статус обследуемых людей, а также диета и вредные привычки могут иметь серьезное влияние на результаты, получаемые в этом тесте. Поэтому эти факторы следует учитывать как при формировании групп для обследования, так и при трактовке результатов.

Следует отметить, что микроскопический анализ микроядер представляет достаточно серьезную проблему — в литературе имеется много данных, демонстрирующих, что фоновые частоты клеток с микроядрами значительно варьируют как в экспериментах *in vitro*, так и в исследованиях на добровольцах. Для ее решения были предприняты международные исследования, участниками которых стали 34 лаборатории из 21 страны [37]. План и анализ результатов заслуживают подробного описания не только потому, что такая работа была проведена впервые в исследовательской практике, но еще и благодаря удивительной продуманности деталей постановки и корректности анализа полученных результатов. Итак:

— из 100 мл крови здорового мужчины 30 лет были выделены лимфоциты [35], которые разделили на 3 порции: для оценки спонтанного фона и эффектов радиации в дозах 1,0 и 2,0 Гр. Затем ФГА-стимулированные клетки в концентрации $10^6$ кл./мл культивировали 72 часа в среде RPMI 1640 с 10 % сывороткой. ЦХВ (4,5 мкг/мл) вводили на 44 часа от начала культивирования. По окончании культивирования клетки осаждали и из каждой культуры готовили препараты для цитогенетического анализа. Для этого на каждое стекло помещали 2 капли клеточной суспензии, которые сушили на воздухе, фиксировали метанолом и шифровали. Затем половину препаратов окрасили Diff-Quick [35] и заключили в бальзам, а остальные (неокрашенные) хранили при 4°С. Все препараты разослали экспресс-почтой по лабораториям, причем в каждую лабораторию, кроме окрашенных и неокрашенных стекол, были направлены подробные инструкции, цитогенетические критерии и протокол анализа микроядер, микрофотографии всех возможных повреждений, а также стандартный пакет программ Excel для обработки результатов. Исследователи, принимавшие участие в работе, могли самостоятельно выбрать окраску для чистых препаратов, а также использовать одного или несколько счетчиков для проведения цитогенетического анализа. В случае возникновения трудностей и/или вопросов, всех участников просили консультироваться с руководителем исследования M. Fenech. По окончании анализа участников просили вернуть заполненные протоколы с указанием числа счетчиков (с протоколом анализа каждого из них), их опыта работы в данном тесте, типа микроскопа, на котором проводили анализ, а также описать возникшие трудности и прислать микрофотографии типичных и нетипичных повреждений, которые учитывали (или нет) при микроскопическом анализе.

Все счетчики на каждом стекле в каждом пятне клеток анализировали по 1000 двуядерных клеток, определяя (табл. 9):

— число клеток с одним и более микроядрами (МЯкл);
— число микроядер на 1000 двуядерных клеток (МЯ);
— число двуядерных клеток, содержащих межъядерные мосты (Мост).

Дополнительно при подсчете 500 клеток на всех препаратах во всех пятнах определяли индекс пролиферации (ИП).

После сбора всех протоколов организаторы эксперимента составили общую базу данных, для обработки которой была построена специальная математическая модель. Анализ всех полученных данных показал, что разница в оценках оказалась весьма значительной (табл. 9).

Однако, несмотря на различия, которые хорошо видны на этой таблице, анализ базы данных продемонстрировал устойчивое увеличение частоты всех типов повреждений клеток с дозой облучения, которое обнаружили все счетчики ($p \leq 0{,}001$). Для ИП уровень значимости корреляций с облучением составил $p \leq 0{,}01$, но этот показатель определялся с минимальными ошибками и различиями между счетчиками. Показатель «число микроядер на 1000 двуядерных клеток» оказался более чувствителен к действию радиации, чем «число клеток с одним и более микроядрами». Важно, что практически для всех счетчиков соблюдалась почти одинаковая кратность увеличения числа повреждений между фоном облучения, что гарантирует пригодность микроядерного теста для проведения цитогенетического анализа.

*Таблица 9*

**Результаты анализа микроядер и пролиферативной активности культуры лимфоцитов, полученные в международных исследованиях**

| Показатель | Доза облучения (Гр) | Окраска Diff-Quick (51 счетчик) | | | Окраска произвольная, преимущественно азурэозин по Гимзе-Романовскому (44 счетчика) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Медиана | Ст. отклон. | Мин.-макс. | Медиана | Ст. отклон. | Мин.-макс. |
| Клеток с МЯ | 0 | 8,0 | 4,3 | 2–28 | 7,0 | 3,3 | 1–19 |
| | 1 | 116,5 | 29,8 | 59–217 | 95,0 | 33,5 | 35–200 |
| | 2 | 305,9 | 69,9 | 165–563 | 257,5 | 77,6 | 63–564 |
| Всего МЯ | 0 | 9,0 | 4,9 | 2–28 | 7,6 | 3,7 | 1–23 |
| | 1 | 138,5 | 37,1 | 61–265 | 105,0 | 39,5 | 26–230 |
| | 2 | 401,4 | 104,8 | 191–753 | 345,5 | 109,6 | 78–763 |
| Клеток с мостами | 0 | 2,0 | 13,5 | 1–125 | 2,0 | 15,0 | 0–121 |
| | 1 | 18,0 | 18,1 | 3–124 | 16,8 | 16,0 | 0–93 |
| | 2 | 41,5 | 36,7 | 9–300 | 32,6 | 29,0 | 1–191 |
| Индекс пролиферации | 0 | 1,95 | 0,18 | 1,56–2,47 | 1,92 | 0,19 | 1,49–2,39 |
| | 1 | 1,89 | 0,19 | 1,44–2,37 | 1,86 | 0,19 | 1,43–2,21 |
| | 2 | 1,77 | 0,15 | 1,45–2,19 | 1,73 | 0,15 | 1,39–2,12 |

Анализ вариативности показал, что межлабораторные различия составили 26,6 %. Организаторы исследования, отмечая высокую квалификацию всех счетчиков, указали, что одной из наиболее существенных причин обнаруженных различий в результатах анализа могли быть реальные различия между клетками на разных препаратах, поскольку различия, связанные с типом окраски составили 0,3–0,5 %, с номером пятна клеток на препарате — 0,4 %, а различия между счетчиками — 4 %. Невыясненные причины ошибок составили 22,2 %.

Обсуждая полученные данные, организаторы работы сделали заключение о возможности получения сравнимых результатов экспериментов *in vitro* только при использовании внутрилабораторных позитивных и негативных контролей.

По материалам этого исследования в том же журнале была опубликована еще одна статья [39], в которой приводится детальное описание критериев для анализа всех показателей, используемых в микроядерном тесте, а также микрофотографии пригодных и непригодных для анализа клеток. Кроме того, существует сайт HUMN (международный проект по изучению эффектов в микроядерном тесте) ***http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn***, на котором публикуются и обсуждаются исследования, связанные с оценкой нестабильности генома в этом тесте.

## *ЗАКЛЮЧЕНИЕ*

Тест на индукцию микроядер в лимфоцитах человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока, позволяет оценивать 3 группы показателей:

— пролиферативную, репликативную и митотическую активности клеток в культуре,
— уровень и тип повреждения генома,
— варианты клеточной гибели — апоптоз и некроз.

Каждая группа этих показателей характеризует неспецифические генетические изменения, связанные, тем не менее, с опухолевой трансформацией клетки. Благодаря возможности одновременного выявления всего комплекса эффектов нестабильности генома, микроядерный тест является уникальным цитогенетическим методом. Его прогностическую ценность значительно повышает возможность моделирования разнообразных воздействий *in vitro*, а также возможность оценки индивидуальной чувствительности генома. Последнее может быть особенно важным для анализа эффектов лекарственных препаратов, а также для отбора персонала для работы во вредных условиях. Результаты, полученные в данном тесте, могут быть использованы для выявления как межиндивидуальных, так и межгрупповых различий, а также для оценки эффектов экспозиции и влияния факторов среды.

Поскольку индукция большинства генетических повреждений является неспецифическим ответом на действие генотоксикантов, с помощью этого теста, по всей видимости, невозможно верифицировать источник генотоксической активности, хотя правомочным является сравнение между собой производств, регионов и пр.

Автор выражает искреннюю благодарность к. м. н. В. В. Юрченко за полезные замечания, сделанные при обсуждении этого обзора, а также Н. А. Юрцевой за помощь в подготовке рукописи к печати.

**Литература**


1. *Бондарчук И. А.* Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиоиндуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих / Бондарчук И. А. // Радиационная биология и радиоэкология. — 2003. — Т. 43, № 1. — С. 19–28.
2. *Ингель Ф. И.* Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока / Ингель Ф. И., Юрченко В. В., Гуськов А. С. [и др.] // Вестник РАМН. — 2006. — № 4. — С. 41–46.
3. *Ингель Ф. И.* Качество жизни и индивидуальная чувствительность генома человека. Есть ли выход из порочного круга / Ингель Ф.И. // Экологическая генетика. — 2005. — Т. 3, № 3. — С. 38–46.
4. *Ингель Ф. И.* Оценка глубины стресса и ее использование при проведении генетико-токсиколо-гических исследований на людях / Ингель Ф. И., Прихожан А. М., Цуцман Т. Е., Ревазова Ю. А. // Вестник Академии медицинских наук. — 1997. — № 7. — С. 24–28.
5. *Ингель Ф. И.* Модификация эмоциональным стрессом мутагенных эффектов ксенобиотиков у животных и человека / Ингель Ф. И., Ревазова Ю. А. // Исследования по генетике. Вып. 12. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 1999. — С. 86–103.
6. *Мельнов С. Б.* Молекулярно-генетический статус подростков, живущих в условиях постоянного воздействия низких доз радиации / Мельнов С. Б., Лебедева Т. Б. // Радиационная биология и радиоэкология. — 2004. — Т.44, № 6. — С. 627–631.
7. *Пелевина И. И.* Нестабильность генома после воздействия радиации в малых дозах (в 10-километровой зоне аварии на ЧАЭС и в лабораторных условиях / Пелевина И. И., Готлиб В. Я., Кудряшова О. В. // Радиационная биология и радиоэкология. — 1996. — Т. 36, Вып. 4. — С. 546–559.
8. *Пелевина И. И.* Радиоиндуцированный адаптивный ответ у детей в зависимости от факторов среды и состояния здоровья / Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алещенко А. В. [и др.] // Радиационная биология и радиоэкология. — 1999. — Т. 39, № 1. — С. 106–112.
9. *Пелевина И. И.* Повышение радиочувствительности после облучения лимфоцитов в адаптивной дозе / Пелевина И. И., Алещенко А. В., Готлиб В. Я. [и др.] // Радиационная биология и радиоэкология. — 2000. — Т. 40, № 5. — С. 544–548.
10. *Пелевина И. И.* Спонтанные и радиоиндуцированные уровни цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови детей в зависимости от возраста и качества жизни / Пелевина И. И., Алещенко А. В., Антощина М. М. [и др.] // Радиационная биология и радиоэкология. — 2001. — Т. 41, № 5. — С. 573–579.
11. *Селье Г.* На уровне целого организма / Селье Г. — Москва: Наука, 1972. — 122с.
12. *Спитковский Д. М.* Концепция влияния низких доз ионизирующей радиации на клетки и ее применение для анализа медико-биологических последствий Чернобыльской катастрофы / Спитковский Д. М. // Радиационная биология и радиоэкология. — 1992. — Т. 32, Вып. 3. — С. 382–400.
13. *Спитковский Д. М.* Теоретический и экспериментальный подходы к проблеме функциональной активности клеток в условиях адаптирующих доз ионизирующего излучения / Спитковский Д. М., Кузьмина И. В. // Радиационная биология и радиоэкология. — 2001. — Т. 41, № 5. — С. 599–605.
14. *Спитковский Д. М.* Перемещение локусов интерфазных хромосом при действии малых доз радиации / Спитковский Д. М., Кузьмина И. В., Макаренков А. С. [и др.] // Радиационная биология и радиоэкология. — 2002. — Т. 42, № 6. — С. 604–607.
15. *Худолей В. В.* Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия / Худолей В. В. — Санкт-Петербург, 1999. — 419 с.
16. *Хусаинова Ш. Н.* Оценка состояния здоровья детей Приаралья / Хусаинова Ш. Н., Ингель Ф. И., Петрова И. В. [и др.] // Гигиена и санитария. — 2004. — № 5. — С. 35–38.
17. *Цховребова Л. Б.* К механизму адаптивного ответа в клетках человека / Цховребова Л. Б., Македонов Г. П. // Радиационная биология и радиоэкология. — 2004. — Т. 44, № 6. — С. 657–661.
18. Эмоциональный стресс. Физиологические и психологические реакции. Медицинские, индустриальные и военные последствия стресса / Под ред. Л. Леви. — Ленинград: Медицина, 1970. — С. 327.
19. *Abou-Eisha A.* Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes / Abou-Eisha A., Marcos R., Creus A. // Mutat Res. — 2004. — Vol. 564, N 1. — P. 51–66.
20. *Akudugu J. M.* Micronuclei and apoptosis in glioma and neuroblastoma cell lines and role of other lesions in the reconstruction of cellular radiosensitivity / Akudugu J. M., Bohm L. // Radiat Environ Biophys. — 2001. — Vol. 40, N 4. — P. 295–300.
21. *Argentin G.* Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts / Argentin G., Cicchetti R. // Toxicol Sci. — 2004. — Vol .79, N 1. — P. 75–81.
22. *Augustowska K.* Polichlorinated biphenyls (PCB126 and PCB153) action on proliferation and progesterone secretion by cultured *in vitro* porcine luteal cells / Augustowska K., Wojtowicz A., Kajta M. [et al.] // Exp Clin Endocrinol Diabetes. — 2001. — Vol. 109, N 8. — P. 416–418.
23. *Barnes P. J.* Reactive oxygen species and airway inflammation / Barnes P. J. // Free Rad Biol Med. — 1990. — N 9. — P. 235–243.

24. *Barr P. J.* Apoptosis and its role in human disease / Barr P. J., Tomei L. D. // Biotechnology (NY). — 1994. — Vol. 12, N 5. — P. 487–493.
25. *Bosi A.* Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans / Bosi A., Olivieri G. // Mutat. Res. — 1989. — Vol. 211, N 1. — P. 13–17.
26. *Bosh K.* Evaluation of the toxicological properties of ground- and surface-water samples from the Aral Sea Basin / Bosh K., Erdinger L., Ingel F. [et al.] // Science of the total Environment. — 2007. — N 374. — P. 43–50.
27. *Cohen L.* DNA repair capacity in healthy medical students during and after exam stress / Cohen L., Marshall G. D. Jr., Cheng L. [et al.] // J. Behav. Med. — 2000. — Vol. 23, N 6. — P. 531–544.
28. *Coleman M. A.* Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response / Coleman M.A., Yin E., Peterson L.E. [et al.] //Radiat Res. — 2005. — Vol. 164, N 4, Pt 1. — P. 369–382.
29. *Darroudi F.* Detection of aneugenic and clastogenic potential of X rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe / Darroudi F., Meijers C. M., Hadjidekova V., Natarajan A. T. // Mutagenesis. — 1996. — Vol. 11, N 5. — P. 425–433.
30. *Dimitroglou E.* DNA damage in a human population affected by chronic psychogenic stress / Dimitroglou E., Zafiropoulou M., Messini-Nikolaki N. [et al.] // Int. J. Hyg. Environ. Health. — 2003. — Vol. 206, N 1. — P. 39–44.
31. *Donbak L.* The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey / Donbak L., Rencuzogullari E., Yavuz A., Topaktas M. // Mutat Res. — 2005. — Vol. 588, N 2. — P. 82–87.
32. *Elhajouji A.* Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo[a]pyrene / Elhajouji A., Santos A.P., Van Hummelen P., Kirsch-Volders M. // Mutagenesis. — 1994. — Vol. 9, N 4. — P. 307–313.
33. *El-Zein R. A.* Cytokinesis blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk / El-Zein R. A., Schabath M. B., Etzel C. J. [et al.] // Cancer Res. — 2006.— Vol. 66, N 12. — P. 6449–6456.
34. *Erdinger L.* The Aral Sea disaster — human biomonitoring of Hg, As, HCB, DDE, aans PCBs in children living in Aralsk and Akchi, Kazakhstan / Erdinger L., Eckl P., Ingel F. [et al.] // International Journal of Hygiene and Environmental Health.— 2004.— Vol. 207, N 4.— P. 541–547.
35. *Fenech M.* A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division / Fenech M. // Mutagenesis. — 2000.— Vol.15, N 4.— P. 329–336.
36. *Fenech M.* Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage fusion bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay / Fenech M., Crott J. W. // Mutat.Res. — 2002.— Vol. 504, N 12. — P. 131–136.
37. *Fenech M.* Human MicroNucleus project. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project / Fenech M., Bonassi S., Turner J. [et al.] // Mutat Res.— 2003.— Vol. 534, N 1–2.— P. 45–64.
38. *Fenech M.* Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death / Fenech M. // Mut. Res. — 2006.— Vol. 600, N 1–2.— P. 58–66.
39. *Fenech M.* HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures / Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M. [et al.[ // Mut Res.— 2003.— Vol. 534.— P. 65–75.
40. *Feng S.* Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests / Feng S., Kong Z., Wang X. [et al.] // Ecotoxicol Environ Saf. — 2005. — Vol. 61, N 2. — P. 239–246.
41. Garaj-Vrhovac V. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides / Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. // Toxicology.— 2001.— Vol.165, N 2–3.— P. 153–162.
42. *Garcia-Closas M.* NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta analyses / Garcia-Closas M., Malats N., Silverman D. // Lancet. — 2005. — Vol. 366, N 9486. — P. 610–612.
43. *Guo G. Z.* Simultaneous evaluation of radiation induced apoptosis and micronuclei in five cell lines / Guo G. Z., Sasai K., Oya N. [et al.] // Int J Radiat Biol. — 1998.— Vol. 73, N 3. —P. 297–302.
44. *Guven G. S.* Enhanced sensitivity to oxidant-induced micronucleus frequency in elderly individuals is not associated with glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null genotype in lymphocytes / Guven G. S., Guven M., Onaran I. [et al.] // Gerontology. — 2005. — Vol. 51, N 1. — P. 29–33.
45. *Hayes J. D.* Potential contribution of the glutathione-S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress / Hayes J. D., Strange R. C. // Free Rad Res Commun. — 1995. — N 22. — P. 193–207.
46. *Hernandez A.* Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST

and NAT2 genetic backgrounds / Hernandez A., Xamena N., Gutierrez S. [et al.] // Mutat Res. — 2006. — Vol. 606, N 12. — P. 12–15.
47. *Joksic G.* Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed *in vivo* to low doses of ionizing radiation / Joksic G., Petrovic S. // J Environ Pathol Toxicol Oncol. — 2004. — Vol. 23, N 3. — P. 195–206.
48. *Kalina I.* Adaptive response to ionizing radiation in normal and aneuploid human lymphocytes / Kalina I., Konecna H., Nemethova G., Racekova N. // Folia Biol (Praha). — 1994. — Vol. 40, N 3. — P. 119–123.
49. *Kirsch-Volders M.* Report from the *in vitro* micronucleus assay working group / Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M. [et al.[ // Mutat Res. — 2004. — Vol. 564, N 1. — P. 97–100.
50. *Koss L. G.* Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases / Koss L. G. — Philadelphia-Toronto.: J B Lippincott Co. – 1979. — ed 3, Vol. 1,2.
51. *Leopardi P.* Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair *in vitro* by ARA-C / Leopardi P., Zijno A., Marcon F. [et al.] // Environ Mol Mutagen. — 2003. — Vol. 41, N 2. — P. 126–130.
52. *Maluf S.W.* Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay / Maluf S.W., Erdtmann B. // Mutation Research. — 2000. — Vol. 471. — P. 21–27.
53. *Maluf S. W.* Assessment of DNA damage in Lymphocytes of Workers Exposed to X-radiation Using the Micronucleus Test and the Comet Assay / Maluf S. W., Ferreira Passos D., Bacelar A. [et al.] // Environmental and Molecular Mutagenesis. — 2001. — N 38. — P. 311–315.
54. *Maluf S. W.* Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis / Maluf S. W. // Clinica Chimica Acta. — 2004. — N 347. — P. 15–24.
55. *McRobbie S. J.* Effects of cytochalasin B on cell movements and chemoattractant elicited actin changes of Dictyostelium / McRobbie S. J., Newell P. C. // Exp. Cell Res. — 1985. — Vol. 160, N 2. — P. 275–286.
56. *Migliore L.* Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients / Migliore L., Botto N., Scarpato R. [et al.] // Cytogenet Cell Genet. — 1999. — Vol. 87, N 1– 2. — P. 41–66.
57. *Monsieurs M. A.* Adaptive response in patients treated with 131I / Monsieurs M. A., Thierens H. M., Vral A. M. [et al.] // J Nucl Med. — 2000. — Vol. 41, N 1. — P. 17–22.
58. *Moreno Ramiez E.* Study of immunoglobulins, proinflammatory cytokines, lymphoproliferation and phagocytosis in peripheral blood of healthy young people exposed to different levels of atmospheric pollution / Moreno Ramiez E., Hernandez Urzua M. A., Gonzalez Villegas A. C. [et al.] //Rev Alerg Mex. — 2006. — Vol. 53, N 1. — P. 3–8.
59. *Olivieri G.* Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine / Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. // Science. — 1984. — Vol. 223, N 4636. — P. 594–597.
60. *Ossina N. K.* Interferon gamma modulates a p53 independent apoptotic pathway and apoptosis related gene expression / Ossina N. K., Cannas A., Powers V. C. [et al.] //J Biol Chem. — 1997. — Vol. 272,N 6. — P. 351–357.
61. *Pitarque M.* Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents / Pitarque M., Vaglenov A., Nosko M. [et al.] // Environ Health Perspect. — 2002. — Vol.110, N 4. — P. 399–404.
62. *Ponsa I.* Non disjunction and chromosome loss in gamma irradiated human lymphocytes: a fluorescence in situ hybridization analysis using centromere specific probes / Ponsa I., Barquinero J. F., Miro R. [et al.] // Radiat Res. — 2001. — Vol. 155, N 3. — P. 424–426.
63. *Psimadas D.* DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients / Psimadas D., Messini-Nikolaki N., Zafiropoulou M. [et al.] // Cancer Lett. — 2004. — Vol.204, N 1. — P. 33–40.
64. *Ridner S.* Psychological distress: concept analysis (Nursing theory and concept development or analysis) / Ridner S. // J. Advanced Nursing. — 2004. — Vol. 45, N 5. — P. 536–545.
65. *Rosefort C.* Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay / Rosefort C., Fauth E., Zankl H. // Mutagenesis. — 2004. — Vol. 19, N 4. — P. 277–284.
66. *Sakami S.* Psychological stress increases human T cell apoptosis *in vitro* / Sakami S., Nakata A., Yamamura T., Kawamura N. // Neuroimmunomodulation. — 2002–2003. — Vol. 10, N 4. — P. 224–231.
67. *Sasaki M. S.* DNA damage response pathway in radioadaptive response / Sasaki M.S., Ejima Y., Tachibana A. [et al.] // Mutat Res. — 2002. — Vol. 504, N 1–2. — P.101–118.
68. *Selye H.* Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication / Selye H. // British Journal of Experimental Pathology. — 1936. — N 17. — P. 234–248.
69. *Schuler M.* Noscapine hydrochloride induced numerical aberrations in cultured human lymphocytes: a comparison of FISH-detection methods and multiple end points / Schuler M., Muehlbauer P., Guzzie P., Eastmond D. A. // Mutagenesis. — 2003. — Vol.18, N 3. — P. 235–242.

70. *Silva Mdo C.* GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes and the genotoxicity of hydroquinone in human lymphocytes / Silva Mdo C., Gaspar J., Duarte Silva I. [et al.] // Environ Mol Mutagen. — 2004. — Vol. 43, N 4. — P. 258–264.
71. *Tomei L. D.* Psychological stress and phorbol ester inhibition of radiation-induced apoptosis in human peripheral blood leukocytes / Tomei L. D., Kiecolt-Glaser J. K., Kennedy S., Glaser R. // Psychiatry Res. — 1990. — Vol. 33, N 1. — P. 59–71.
72. *Tomei L. D.* Aging and apoptosis control / Tomei L. D., Umansky S.R. // Neurol Clin. — 1998. — Vol.16, N 3. — P. 735–745.
73. *Vlastos D.* Effects of cetirizine dihydrochloride on human lymphocytes *in vitro*: micronucleus induction. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using CREST and FISH assays / Vlastos D., Stephanou G. // Arch Dermatol Res. — 1998. — Vol. 290, N 6. — P. 312–318.
74. *Vodicka P.* Cytogenetic Markers, DNA Single-Strand Breaks, Urinary Metabolites, and DNA Repair Rates in Styrene-Exposed Lamination Workers / Vodicka P., Tuimala J., Stetina R. [et al.] // Environmental Health Perspectives. — 2004. — Vol. 112, N 8. — P. 867–871.
75. *Wang X.* A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes *in vitro* / Wang X., Fenech M. // Mutagenesis. — 2003. — Vol. 18, N 1. — P. 81–86.
76. *Westphal G. A.* Thimerosal induces micronuclei in the cytochalasin B block micronucleus test with human lymphocytes / Westphal G. A., Asgari S., Schulz T. G. [et al.] // Arch Toxicol. — 2003. — Vol. 77, N 1. — P. 50–55.
77. *Wilkins R. C.* Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells / Wilkins R. C., Wilkinson D., Maharaj H. P. [et al.] // Mutat Res. — 2002. — Vol.513, N 1–2. — P. 27–36.
78. *Wolff S.* Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA / Wolff S., Afzal V., Wiencke J. K. [et al.] // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. — 1988. — Vol. 53, N 1. — P. 39–46.
79. *Zeljezic D.* Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation / Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. // Toxicology. — 2004. — N 200. — P. 39–47.

**Part 2. Environmental factors and individual features in system of evaluation of human genome instability. Additional capability of the test.**

**The technique for cytogenetic analysis.**

*F. Ingel*

❀ **SUMMARY: The publication is the 2-nd and the last part of the review analyzing modern trends of the researches in micronuclear test on human blood lymphocytes, cultivated with cytochalasin B. Using data of literature and own results the opportunities of application of the test for study association between parameters of genome instability and genetic polymorphism, adaptive response to gamma-irradiation and emotional stress expression are considered. The analysis of additional capability of the test — frequencies of cells with nuclear buds and nucleoplasmic bridge are presents. Finally, results of the international researches on harmonization of the data of the test and guidelines for evaluation genotoxicity of chemical compounds in vitro are described.**

❀ **KEY WORDS: micronuclear test with cytochalasin B on culture of human peripheral blood cells, nuclear bud, nucleoplasmic bridge, emotional stress, adaptive response to gamma-irradiation, genetic polymorphism**