



© Ф. И. Ингель

ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина РАМН, Москва

✿ **Культирование клеток периферической крови в условиях цитокинетического блока создает уникальную возможность проанализировать весь спектр изменений, характеризующих нестабильность генома. Задачей настоящей публикации является анализ современного состояния, возможностей и перспектив использования микроядерного теста на культуре лимфоцитов периферической крови человека. Особое внимание уделяется тем направлениям исследований, которые относительно редко представлены в литературе — закономерностям пролиферации клеток, существованию физиологической обусловленности и генетической предрасположенности к развитию эффектов нестабильности генома; эффектам эмоционального стресса и адаптивному ответу к действию ионизирующей радиации. Материал представлен в 2-х последовательных публикациях. Его завершает обсуждение методических особенностей постановки культуры, результатов микроскопического анализа и идеологии получения конечного результата исследования.**

✿ **Ключевые слова:** цитохалазин В; микроядро; хроматиновый мост; пролиферативный пул; нормально и ускоренно делящиеся клетки; связь пролиферации с биохимическими показателями крови; нестабильность и индивидуальная чувствительность генома человека; цитотоксичность; индекс репликации

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

#### ЧАСТЬ 1. ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК

Микроядра (МЯ) — это небольшие ДНК-содержащие тельца, существующие в клетке отдельно от основного ядра (ядер) или связанные с ними хроматиновым мостом. Их возникновение связывают, как правило, с такими типами повреждения генома как ацентрические фрагменты хромосом или целые хромосомы, отставшие в ана-телофазе митоза от веретена деления и не вошедшие в дочерние ядра. Строго такой механизм образования МЯ был доказан *in vivo* для проэритробластов мыши (Schmid W., 1976) и *in vitro* для лимфоцитов человека (Huber R., et al., 1989). В то же время в исследованиях группы под руководством N. Shimizu (1998, 2000, 2003, 2005) на разных клеточных линиях было показано, что образование микроядра — это не всегда только постмитотическое событие. Например, МЯ могут образовываться в фазе синтеза ДНК из ядерных почек (подробнее будут рассмотрены ниже), а также, видимо, во всех тех случаях, когда клетка избавляется от избытка ДНК (избыточная амплификация, реверсия культур клеток опухоли путем экскреции онкогенов). Таким образом, микроядро — это свидетельство количественных изменений ДНК в живой клетке.

Микроядерный тест с цитохалазином В основан на анализе тех же типов генетических повреждений, что и оценка хромосомных aberrаций, и обладает достоинствами как метафазного, так и ана-телофазного анализов. Но от этих методов его выгодно отличает возможность накапливать клетки, содержащие генетические повреждения.

В современной постановке — с цитокинетическим блоком в присутствии цитохалазина В метод был разработан относительно недавно — в середине 80-х годов прошлого века (Fenech, Morley, 1985; Yager, et al., 1988; Pascoe, Stemp, 1990; Kocisova, Sram, 1990). Однако за это время было накоплено достаточно сведений о релевантности его использования при оценке генетических эффектов радиации (Slonina, et al., 2000; Joksic, et al., 2000; Swain, Mill, 2000; He, et al., 2000; Tanaka, et al., 2000; Boreham, 2000; Chang, et al., 1999; Kryscio, et al., 2001), пестицидов (Pastor, et al., 2001; Garaj-Vrhovac, Zeljezic, 2001), лекарственной и радиотерапии (Andreassi, et al., 2001; Elsendoorn, et al., 2001) тяжелых металлов и их солей (Vaglenov, et al., 1999; Zenzen et al., 2001), органических генотоксических соединений (Gonzalez Borroto, et al., 2001; Bozsakyova, et al., 2001), космической радиации (Heimers, 1999), СВЧ (Garaj-Vrhovac, 1999) и других воздействий. Доказана связь спонтанного уровня микроядер с полом и возрастом доноров (Bukvic et al., 2001), наличием опухолей (Venkatachalam, et al., 1999), а также с экспозицией генотоксическими факторами окружающей среды и производства (Lee, et al., 1999; Touil et al., 2000; Thierens et al., 1999).

Поэтому задачей настоящей публикации, в которой обобщены как данные литературы, так и результаты собственных исследований, является демонстрация относительно мало изученных возможностей теста и анализ перспектив его применения с позиций системного подхода к организму человека.

В собственных исследованиях изучали:

А) нестабильность генома детей 5–8 лет (78 человек), проживающих в Казахстане в регионе Аральского моря — город Аральск.

Район г. Аральска представляет собой зону экологической катастрофы. Этот регион характеризуется резким изменением климата, происходящим в последние 40–70 лет: объем Арала сократился на 90%, снизилась влажность, возросла запыленность воздуха, аккумулируются пестициды и промышленные токсиканты (полихлорбифенилы и соединения тяжелых металлов).

До середины прошлого века Аральское море было одним из 4 самых больших озер мира. Однако еще в 1930-е началось масштабное строительство оросительных каналов, которое особенно интенсифицировалось в начале 1960-х, и за последующие 30 лет площадь орошаемых земель увеличилась практически, вдвое. Требования на воду за это время возросли в 3 раза — до 120 км<sup>3</sup> в год, причем 90% — на орошение. Начиная с 1961, уровень моря понижался с возрастающей скоростью от 20 до 80–90 см/год. В результате, к 1990 году объем озера уменьшился на 90%, поверхность зеркала воды сократилась более чем в 2 раза — с 66 400 км<sup>2</sup> до 31 500 км<sup>2</sup>, а озеро распалось на два практически изолированных водоёма. При этом солёность воды увеличилась до 30 г/л, что привело к массовой гибели рыбы. Климат в районе Аральского моря стал более континентальным и засушливым, зимы — более холодными. На месте дна отступившего моря образовалась соляная пустыня. Промышленные токсиканты, такие как ПХБ и соединения тяжелых металлов, также как пестициды, используемые для борьбы с паразитами и сорняками в сельском хозяйстве, не только аккумулированы в неизвестных количествах в воде и почве, но и разнесены атмосферным транспортом на большие расстояния. Содержание пыли, загрязненной пестицидами, в воздухе региона Аральского моря, чуть не самое большое в мире. Все эти изменения характеризуют ситуацию, сложившуюся в регионе, как экологическую катастрофу.

В результате обмеления Аральского моря рыболовецкие поселки, такие как Аральск, прежде находившиеся непосредственно на берегу, оказались более чем в 100 км от воды. Ранее весьма активный рыболовецкий промысел сейчас практически отсутствует, также как и все остальные виды промышленной и крупной хозяйственной деятельности, существовавшие в Аральске в середине прошлого века.

Сегодня установлено, что в историческую эпоху происходили существенные колебания уровня Аральского моря. Так, на отступившем дне были обнаружены остатки деревьев, росших давно. Тем не менее, с начала систематических наблюдений в XIX веке тенденция изменения уровня Арала практически не менялась.

К началу 21 века исследователи располагали лишь очень небольшим количеством сведений о здоровье людей, особенно, детей, проживающих в регионе Аральского моря.

Так, например, было установлено, что регион, помимо высокого уровня детской смертности, отличался от других территорий Казахстана более высокой общей и хронической заболеваемостью детей, а также их замедленным физическим и психическим развитием. Для уточнения ситуации со здоровьем детей и прогноза ее возможных изменений в связи с изменением состояния окружающей среды было предпринято международное многопараметровое обследование, включающее, в том числе, анализ нестабильности и индивидуальной чувствительности генома. Для сравнения взята выборка из поселка Акчи (Центральный Казахстан).

Б) нестабильность генома взрослых людей, для чего методом простой бесповторной выборки были сформированы когорты, состоящие:

— из 15 здоровых, курящих, стресс-устойчивых и хорошо физически развитых мужчин 22–25 лет, находящихся в одинаковых условиях режима дня, работы и питания и не имевших контакта с токсическими и генотоксическими факторами производства. Эти люди в течение 25 дней были экспонированы легкими отрицательными аэроионами (люстра Чижевского, 45 мин./день). До начала курса аэроионизации (фоновый уровень), через сутки после его начала (точка 1К), а затем через 10 и 25 суток (соответственно, точки 2К и 3К) у них определяли до 200 физиологических, биохимических и иммунологических показателей с параллельной оценкой нестабильности генома в культуре клеток крови, чувствительности генома к действию 0,07 мМ N'-нитро- N'-нитрозогуанидина (МННГ) *in vitro*, а также степень выраженности стресса (Гуськов и др., 2005; Ингель и др. 2006).

В других когортах, сформированных из людей, имевших (либо нет) производственный контакт с высокотоксичными химическими соединениями, определяли нестабильность генома, адаптивный ответ культуры клеток крови к действию ионизирующей радиации, степень выраженности стресса и полиморфизм некоторых генов детоксикации ксенобиотиков:

— Военнослужащие — мужчины 40–55 лет (20 человек), имевшие отдаленный по отношению к проведению обследования контакт (6,0 ± 3,2 лет) с высокотоксичными соединениями;

— Инвалиды — мужчины 49–66 лет (22 человека), имевшие длительный производственный контакт (22,2 ± 7,9 лет) с высокотоксичными соединениями;

— Рабочие-механики — группа сравнения — мужчины 20–66 лет (32 человека), не имевшие контакта с высокотоксичными химическими соединениями;

— Персонал медицинских лечебно-профилактических учреждений — мужчины 45–65 лет (22 человека), не имевшие контакта с высокотоксичными химическими соединениями;

— Пациенты больницы — группа позитивного контроля — мужчины 41–67 лет (7 человек), не имевшие контакта с высокотоксичными химическими

соединениями. Из них 6 человек обследовались в стационаре по поводу обострения хронических (в основном сердечно-сосудистых) заболеваний; 1 пациент поступил с диагнозом острый инфаркт миокарда.

При анализе результатов использовали стандартные методы математической статистики.

\*\*\*

В исследовательской практике метод культивирования лимфоцитов крови в условиях цитокинетического блока используют, в основном, в нескольких вариантах постановки:

- 1) для выявления генотоксических эффектов и изучения механизмов действия как отдельных физических, химических или биологических факторов, так и их сочетаний — на клетках крови здоровых доноров *in vitro*;
- 2) для оценки эффектов нестабильности генома, связанных с действием комплексов производственных факторов и факторов окружающей среды;
- 3) для изучения особенностей и механизмов формирования индивидуальной чувствительности генома человека в норме и при различных патологиях.

Цитохалазин В (ЦХВ) — представитель группы родственных по химической структуре продуктов метаболизма некоторых плесневых грибов (Mante, et al., 1978) — является одним из наиболее токсичных представителей класса цитохалазинов, однако традиционно для культивирования клеток в условиях цитокинетического блока используется именно он. Биологические эффекты ЦХВ, как и эффекты всей группы этих соединений, обусловлены образованием ковалентной связи с оперенным (быстро растущим) концом актинового филамента, что практически полностью блокирует как дальнейший рост, так и деградацию филамента на этом конце нити (Bonder, Mooseker, 1986; Mooseker, et al., 1986; Brown, Spudich, 1981; MacLean-Fletcher, Pollard, 1980). В результате возникает блок цитокинеза за счет разрушения образующегося фрагмента. Важно, что цитохалазины разрушают актиновые нити и предотвращают полимеризацию глобулярного G-актина, однако на процесс элонгации актинового филамента с острого (медленно растущего) конца эти соединения не влияют (Bonder, Mooseker, 1986; MacLean-Fletcher, Pollard, 1980).

Функционально цитохалазины напоминают кэпирующие белки, сходство с которыми подтверждается тем, что ряд белков конкурирует с ними за связывание с актиновыми филаментами. Цитохалазины широко используются для исследования живых клеток, т.к. они способны проникать через клеточную мембрану. Имеются сведения, что помимо связывания с актином цитохалазины ингибируют транспорт моносахаридов через плазматическую мембрану (Small, 1989), что может тормозить деление клетки. При попадании в живую клетку, способную к пролиферации и/или стимулированную к делению, цитохалазины блокируют расхождение дочерних ядер,

образовавшихся в результате ее деления. В этом случае нарушается только цитокинез, но не предшествующие стадии деления, поэтому живая клетка в среде с цитохалазином становится двуядерной, сохраняя потенцию к дальнейшему делению. Именно поэтому присутствие цитохалазина в культуральной среде с быстро делящимися клетками может привести к образованию полиядерных клеток — содержащих 4 и более ядер. Однако без специальных исследований нельзя сказать, одинаково ли содержание ДНК во всех ядрах такой полиядерной клетки.

В соответствии с международным протоколом, разработанным для использования этого теста на ФГА-стимулированных лимфоцитах крови человека (Fenech, et al, 2003), цитохалазин В вводится на 44 часу от начала культивирования клеток и присутствует в культуре в течение 28 часов до начала фиксации. Поэтому, в зависимости от продолжительности клеточного цикла (в принципе, индивидуальной для каждой клетки, а в целом, зависящей как от возраста донора, так и от воздействий, которым он подвергался и/или воздействий на культуру клеток), в каждой культуре всегда можно обнаружить набор клеточных фракций с различным числом ядер (рис. 1). При этом важно понимать, что число ядер в клетке отражает скорость их пролиферации в культуре (Rosefort, et al, 2004).

Так, присутствие в культуре одноядерных клеток свидетельствует либо о том, что клетка не ответила на митогенный сигнал, либо — особенно если в ней обнаруживается микроядро или внутренний хроматиновый мост — о прохождении ею митоза до добавления цитохалазина В. Поэтому международный протокол микроядерного теста рекомендует определять частоту одноядерных клеток с микроядрами как один из признаков нестабильности генома. Эта проблема представляет специальный интерес. Математическая модель (Fenech, 2000), построенная для предсказания генотоксических эффектов в популяциях одно- и двуядерных клеток показала, что цитогенетический анализ без подсчета численности популяции одноядерных клеток может давать ложнонегативные результаты при оценке эффектов *in vitro*, поскольку микроядра могут просуществовать в тех клетках, которые либо не среагировали на митогенный стимул, либо разделились до введения цитохалазина. Через год после этой публикации M.Kirch-Volders и M. Fenech опубликовали статью, в которой проанализировали результаты нескольких исследований, проведенных на разных группах людей (Kirch-Volders, Fenech, 2001). В этой работе авторы приходят к заключению, что анализ одноядерных клеток может представлять собственный интерес, например, для оценки анеуплоидии, но только в тех случаях, когда обе популяции клеток — одноядерные и двуядерные — анализируются отдельно.

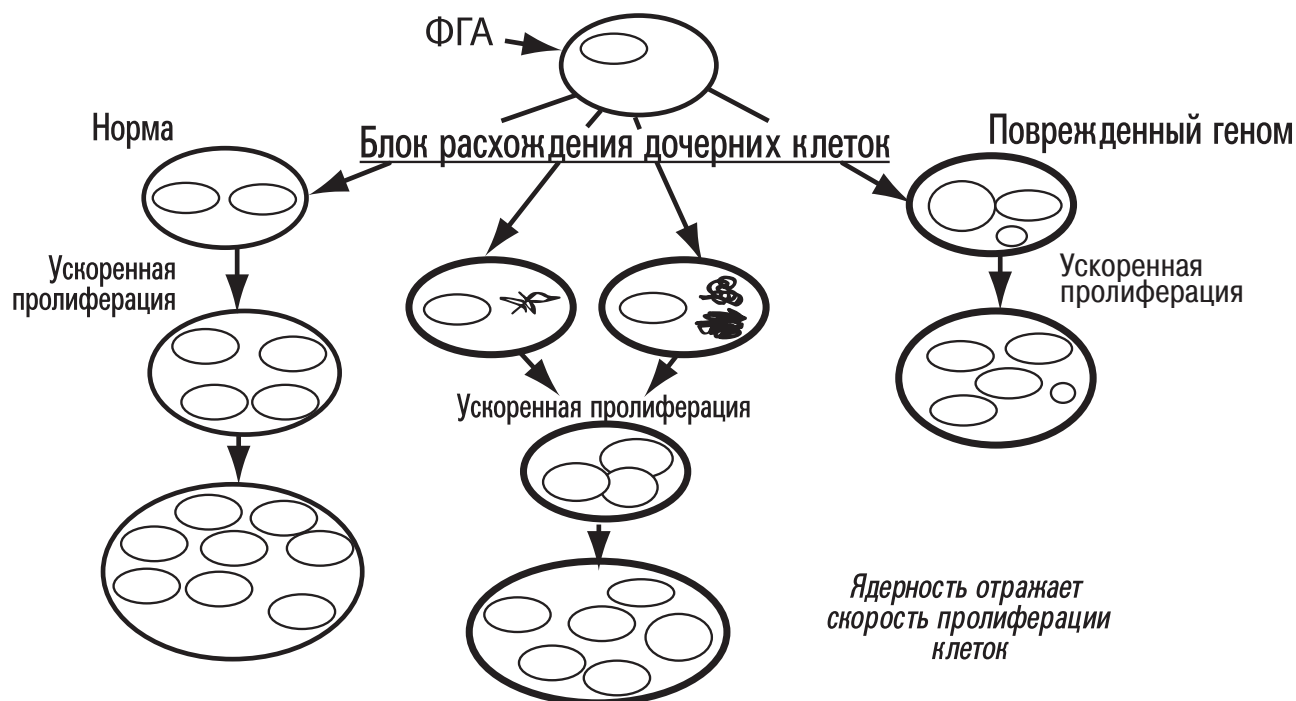


Рис. 1. Принципиальная схема пролиферации клеток в культуре с цитокинетическим блоком

В результате проведенного анализа авторы предложили для определения микроядер в одноядерных клетках фиксацию культуры на 24 часа после обработки ФГА.

Основную часть пролиферативного пула на момент фиксации культуры обычно составляют двуядерные клетки — прошедшие только один митоз за все время культивирования с ЦХВ. Анализ именно этой популяции клеток чаще всего используется для оценки генотоксических эффектов.

В доступной литературе нам не удалось найти сведений о корреляциях между физиологическими показателями организма и генетическими повреждениями в двуядерных клетках ни для животных, ни для человека. В собственных исследованиях группы из 15 здоровых, курящих, стресс-устойчивых и хорошо физически развитых добровольцев-мужчин 22–25 лет, находящихся в одинаковых условиях режима дня, работы и питания и не имевших контакта с токсическими и генотоксическими производственными факторами, мы выявили следующие связи с физиологическим состоянием организма (табл. 1).

Как показывают приведенные данные, частота образования двуядерных клеток в культуре с ЦХВ и повреждения в них не случайны. Так, спонтанная частота двуядерных клеток отражает физиологическое состояние организма, а частоты двуядерных клеток с повреждениями связаны с концентрацией ферментов антиоксидантной защиты и иммунным статусом организма (IgM играет важную роль в элиминации возбудителя из кровеносного русла, Гомес,

1989). Приведенные данные еще раз подчеркивают важность корректного выбора доноров как для формирования групп при изучении эффектов средовых факторов, так и для проведения исследований *in vitro*.

Продолжительность культивирования клеток для использования ЦХВ разработчиками теста рассчитана таким образом, чтобы на момент фиксации (72 часа от введения ФГА) максимальное количество клеток, способных к делению, прошло 1 митоз и, следовательно, содержало 2 ядра. В то же время, в присутствии ЦХВ в каждой культуре лимфоцитов человека и животных, вне зависимости от вида культуры (цельная кровь или фракция лимфоцитов), всегда в значительном количестве присутствуют клетки, содержащие больше 2-х ядер, что свидетельствует о прохождении ими больше, чем 1 митоза за время культивирования с ЦХВ. Это означает, что продолжительность цикла у таких клеток меньше, чем у содержащих на момент фиксации 2 ядра. Международный протокол не учитывает повреждения в таких клетках при оценке генотоксичности, однако рекомендуется определять их частоту при расчете индекса репликации ядер (ИР), являющегося одним из важных показателей пролиферации клеток в культуре.

Индекс репликации в литературе определяется двумя способами. Так, Titenko-Holland с соавторами (1998) приводят следующую формулу:

$$\text{ИР} = [(1 \times \% \text{ одноядерных кл.}) + (2 \times \% \text{ двуядерных кл.}) + (3 \times \% \text{ 3-ядерных кл.}) + (4 \times \% \text{ 4-ядерных кл.})] / 100$$

В то же время, J. Parry (Parry, 1998) рекомендует использовать анализ численности популяций клеток в культуре с цитокинетическим блоком не только для оценки репликации, но и для сравнительной оценки цитотоксичности:

**Цитотоксичность** =  $100 - 100\{(\text{индекс пролиферации тест} - 1) / (\text{индекс пролиферации контр-1})\}$ ,

где:

**индекс пролиферации** =  $(\text{число 1-яд. кл.} + 2 \times \text{число 2-яд. кл.} + 3 \times \text{число полияд. кл.}) / \text{число проанализированных клеток}$ ;

**тест** — эффект в культуре клеток экспонированной популяции или тестируемого соединения;

**контр** — в культуре клеток группы сравнения или в контроле

Оценка цитотоксичности по приведенной формуле в литературе используется редко (Abou-Eisha, et al., 2004). В то же время, в доступной литературе имеются сведения о том, что индекс репликации для здоровых доноров не превышает 2,0 (Titenko-Holland, et al., 1998; Slameneva, et al., 1997; 1999), а оценка этого показателя мало различается между исследователями.

Titenko-Holland с соавторами (1998) впервые показали, что 3-х и 4-ядерные клетки могут содержать больше микроядер, чем двуядерные. В этой публикации проанализированы пробы крови от 10 женщин в возрасте 52–63 лет. Авторы обнаружили, что численность фракций 3-х и 4-ядерных клеток составляла 20–50 штук на 400 просмотренных клеток, причем их частоты больше различались между донорами, чем частота двуядерных клеток. Эта особенность, по мнению авторов, делает

анализ численности разных клеточных фракций мало пригодным для целей генетической токсикологии.

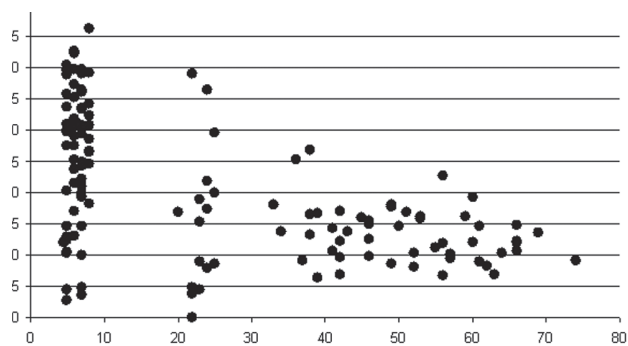
В то же время, A. Martelli с соавторами (2000) проанализировали частоты микроядер как в двуядерных, так и в полиядерных клетках культур крови 103 жителей курортной и 203 жителей промышленной зон Италии. Подсчет численности клеточных популяций проводили отдельно, анализируя 500 клеток на каждого человека. Оказалось, что в промышленной зоне частота микроядер в двуядерных клетках была даже несколько ниже ( $3,46 \pm 4,04$  против  $4,93 \pm 2,61$  на 1000), чем в курортной. Но в промышленной зоне частота МЯ в полиядерных клетках ( $23,54 \pm 35,3714$  против  $14 \pm 24,04$ ) была значительно выше, чем в курортной. Поэтому авторы сделали вывод о необходимости учета МЯ в полиядерных клетках при изучении связи между загрязнением окружающей среды и нестабильностью генома человека.

Сведения о возможных механизмах возникновения полиядерных клеток, образовавшихся в результате аномальных полифокальных митозов, приведены в работе Stavropoulou с соавторами (2005). Изучая особенности пролиферации и апоптоза в модифицированных культурах эмбриональных фибробластов человека при различных способах стимуляции экспрессии с-тус онкогена, авторы выявили прямые корреляции этого эффекта с ускорением пролиферации клеток, появлением множественных структурных аномалий центромер, образованием полиядерных клеток, полифокальных митозов и другими видами нестабильности генома. Несмотря на то, что это исследование не включало анализ микроядер в клетках, культивированных в условиях цитокинетического блока, его результаты могут служить одним из обоснований правомочности учета полиядерных клеток

Таблица 1

Связь между физиологическими показателями организма, спонтанной частотой двуядерных клеток в культуре цельной крови и генетическими повреждениями в них

Показатели теста	Физиологический показатель (содержание в крови)	Коэффициент корреляции Пирсона, уровень значимости
Частота двуядерных клеток	Глюкоза (плазма)	K = 0,57; p = 0,015
	Креатининфосфаткиназа	K = - 0,57; p = 0,0128
	Нейтрофилы	K = - 0,46; p = 0,040
	Эозинофилы	K = - 0,53; p = 0,019
	Моноциты	K = 0,45; p = 0,047
Частота двуядерных клеток с микроядрами	Лимфоциты	K = 0,54; p = 0,018
	Иммуноглобулин М (IgM)	K = 0,45; p = 0,045
	Диеновые конъюгаты	K = 0,56; p = 0,014
	АОА	K = 0,51; p = 0,027
Частота двуядерных клеток с хроматиновыми мостами	Супероксиддисмутаза	K = - 0,52; p = 0,022
	Общая ЛДГ	K = - 0,52; p = 0,023
	Глюкоза	K = - 0,47; p = 0,039



**Рис. 2.** Изменение доли ускоренно делящихся клеток среди всех делящихся с возрастом доноров. Анализ результатов 3-х обследований людей обоего пола (всего 153 человека)  
По оси ординат — % ускоренно делящихся клеток от всех делящихся

и повреждений в них при анализе эффектов нестабильности генома. Доказательство того, что гигантские полиядерные HeLa клетки, часто содержащие микроядра и обладающие ускоренной пролиферацией, являются одним из сигналов повышенной экспрессии с-H-ras онкогена приведены в работе Miranda с соавторами (1996). На основании этих данных можно предположить, что образование полиядерных клеток в культуре с цитохалазином В также является одним из признаков нестабильности генома и, следовательно, этот феномен заслуживает внимательного рассмотрения.

Одной из основных причин отказа от анализа популяций полиядерных клеток исследователи называют

отсутствие видимых закономерностей их образования в культуре (Titenko-Holland et al., 1998). Однако опыт собственных исследований показал, что образование полиядерных клеток в культуре крови человека в присутствии ЦХВ физиологически обусловлено. Поскольку, кроме цитированных публикаций, нам неизвестны другие исследования на эту тему, далее в этом разделе будут приведены только собственные данные.

Для определенности клеток, содержащие больше 2-х ядер, будем называть ускоренно делящимися.

Прежде всего, следует отметить, что спонтанные частоты ускоренно делящихся клеток заметно варьируют в популяциях человека, хотя можно проследить зависимость их образования от разных факторов, в частности, от возраста донора (рис. 2). Высокая частота полиядерных клеток у детей и ее снижение у пожилых людей согласуется с изменением продолжительности клеточного цикла, которая может изменяться от 18–20 часов у младенцев до 37–38 часов у пожилых людей (Ganguly, 1995).

В уже упоминавшемся обследовании группы добровольцев 22–25 лет мы анализировали по 500 клеток для определения численности фракций ускоренно делящихся клеток. Это позволило выявить физиологическую обусловленность образования ускоренно делящихся клеток в культуре крови (табл. 2).

Как видно, пул полиядерных клеток закономерно образуется в культуре крови человека в условиях цитокинетического блока. Численность фракций этих клеток

Таблица 2

**Связь между спонтанной частотой ускоренно делящихся клеток в культуре цельной крови доноров 22–25 лет и физиологическим состоянием организма**

Показатель	Физиологический показатель (содержание в крови)	Коэффициент корреляции Пирсона, уровень значимости
Частота 3-ядерных клеток	Креатининфосфаткиназа	$K = -0,63; p = 0,0058$
Частота 5-ядерных клеток	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = 0,45; p = 0,042$
	$Ca^{2+}$	$K = -0,44; p = 0,049$
Частота 6-ядерных клеток	Билирубин	$K = 0,747; p = 0,00068$
	Триглицериды	$K = 0,59; p = 0,01$
	Общий белок	$K = -0,45; p = 0,045$
	Иммуноглобулин G (Ig G)	$K = -0,46; p = 0,04$
Частота 8-ядерных клеток	Билирубин	$K = 0,8; p = 0,00016$
	Кератинин	$K = 0,53; p = 0,020$
	Холестерин	$K = 0,46; p = 0,046$
	Триглицериды	$K = 0,65; p = 0,003$
	Общ. белок	$K = -0,49; p = 0,032$
	Альфа-глобулин	$K = 0,54; p = 0,018$
	Гамма-глобулин	$K = -0,507; p = 0,026$
	Альбумин	$K = 0,48; p = 0,03$

в той же мере отражает физиологическое состояние организма, как и частоты двуядерных клеток (значения коэффициентов корреляции Пирсона с физиологическими показателями для двуядерных — табл. 1 и ускоренно делящихся клеток — табл. 2 — близки).

В экспонированной популяции пул ускоренно делящихся клеток был, как правило, больше, чем в неэкспонированной, и его численность уменьшалась под воздействием *in vitro*. Для иллюстрации этого феномена в таблице 3 приведены результаты анализа частот делящихся клеток в культурах крови детей 5–8 лет из Казахстана. Обследование проводили в 2002 году в Аральске — зоне экологической катастрофы и Акчи — регионе сравнения (Центральный Казахстан). Группы были рандомизированы по полу, а также социально-экономическим и психологическим показателям семьи обследованных детей.

Следует отметить, что у обследованных детей содержание диоксино-подобных полихлорированных бифенилов и ДДЕ (2,2'-дихлордиэтилового эфира — канцерогенного метаболита ДДТ) в плазме крови прямо коррелировало с различными цитогенетическими показателями, в том числе — с численностью фракции ускоренно делящихся клеток ( $k = 0,42$ ,  $p = 0,028$ ).

Полиядерные клетки чаще всего содержат четное число ядер. По нашим данным, частоты 4-ядерных клеток (образовавшихся в результате второго митоза) в культурах лимфоцитов крови взрослых людей могут составлять до 20 %, а у детей — до 45 % от частоты двуядерных клеток, хотя среднепопуляционные частоты полиядерных клеток обычно составляют не более 25 % от частоты двуядерных.

Интересно, что в каждой культуре клеток крови человека всегда присутствует заметное количество клеток с тремя ядрами, также образовавшимися в результате 2 митоза, и, кроме того, небольшая фракция полиядерных клеток — содержащих пять и больше ядер. По нашим данным, у здоровых людей спонтанная частота 3-ядерных клеток обычно невелика — не превышает 25 % от пула 4-ядерных клеток. Под

действием генотоксической нагрузки *in vitro* или в экспонированной популяции представленность 3-ядерных клеток в спектре клеточных популяций, как правило, значительно увеличивается, и при сильном воздействии на чувствительный геном может превышать частоту 4-ядерных клеток. Частоты клеток с пятью и более ядрами как спонтанные, так и индуцированные генотоксикантами, обычно очень малы и, по нашим данным, составляют не более 1–2 % от всех делящихся клеток. В таблице 4 и 5 представлены результаты подсчета численности популяций делящихся клеток при анализе 1000 клеток всех типов на 1 человека.

Как видно из таблицы 4 и 5, частоты ускоренно делящихся клеток значительно варьировали в изученных популяциях, но эффекты экспозиции, в основном, проявлялись в увеличении частот несимметрично делящихся 3-ядерных клеток. При облучении *in vitro* в дозе 1,0 Гр в экспонированных группах частоты ускоренно делящихся клеток были значительно выше, чем в группах сравнения (дети из Акчи и рабочие).

Приведенные данные подтверждают гипотезу Miranda с соавторами о том, что образование полиядерных клеток в культуре в присутствии цитохалазина В является одной из важных характеристик нестабильности генома, что делает их учет весьма полезным при оценке генотоксических эффектов *in vivo* и *in vitro*. По аналогии с этой работой мы оценивали частоты микроядер и межъядерных мостов не только в двуядерных, но и в ускоренно делящихся клетках крови всех обследованных детей и взрослых.

Результаты этого анализа, прежде всего, выявили связь частот микроядер и межъядерных мостов с физиологическими показателями организма. Так, в таблице 6 представлены результаты корреляционного анализа для группы мужчин 22–25 лет (характеристика группы дана перед таблицей 1).

Как видно на этой таблице, генетические повреждения в ускоренно делящихся клетках были столь же неслучай-

Таблица 3

Среднегрупповые спонтанные и радиоиндуцированные частоты делящихся клеток в культурах крови детей из Казахстана (облучение *in vitro* в дозе 1,0 Гр  $Co^{60}$  на 24 часу от начала культивирования) и относительная радиочувствительность

Условия культивирования	Поселок	Численность группы	Пул делящихся клеток при анализе 1000 клеток	
			2-яд.клеток	Ускоренно делящихся клеток
Спонтанный уровень	Аральск	44	464,10*	217,5*
	Акчи	34	356,45	97,03
Облучение 1,0 Гр	Аральск	44	422,57*	165,63*
	Акчи	34	298,77	60,75
Относительная радиочувствительность	Аральск	44	0,91	0,76
	Акчи	34	0,84	0,62

\* — различия с группой детей из Акчи значимы ( $p \leq 0,05$ )

Таблица 4

Характеристика пролиферативной активности всех типов клеток в культурах цельной крови мужчин — спонтанные уровни, эффекты однократного облучения в дозе 1 Гр ( $Co^{60}$ ) на 24 часу от начала культивирования и относительная радиочувствительность

Условия	Группа	Спектр делящихся клеток (на 1000 клеток)				Всего ускоренно делящихся клеток на 1000
		2-яд.кл.	3-яд.кл.	4-яд.кл.	Поляяд.кл.	
Спонтанный уровень	Военнослужащие	358,0 ± 19,2	10,8 ± 1,3	43,9 ± 5,3	2,5 ± 0,6	58,4 ± 6,0
	Инвалиды	217,5 ± 24,0*	9,8 ± 1,8	21,1 ± 4,5*	2,1 ± 0,7*	33,1 ± 5,7*
	Рабочие	350,8 ± 20,8	13,0 ± 1,2	46,7 ± 5,9	3,8 ± 0,5	63,5 ± 6,8
	Пациенты больницы	397,64 ± 35,3	12,52 ± 2,0	45,95 ± 9,3	3,3 ± 0,8	61,77 ± 7,1
1,0 Гр	Военнослужащие	316,8 ± 21,0	10,7 ± 1,6	35,8 ± 7,4	5,1 ± 2,5	51,6 ± 8,5
	Инвалиды	240,6 ± 21,2	9,3 ± 2,4	18,4 ± 3,2	7,1 ± 4,2	34,8 ± 6,3
	Рабочие	235,3 ± 26,0	11,2 ± 2,0	35,9 ± 9,3	2,5 ± 0,4	49,6 ± 11,2
	Пациенты больницы	355,2 ± 19,4*	14,9 ± 3,1	52,2 ± 15,7	1,2 ± 0,6	68,3 ± 19,0*
Относительная радиочувствительность	Военнослужащие	0,91	1,26	0,97	2,47*	1,50*
	Инвалиды	1,31*	1,23	2,39*	2,32*	1,44*
	Рабочие	0,83	0,91	1,11	0,71	1,02
	Пациенты больницы	0,95	1,50*	1,84*	0,29*	1,36*

\* — различия с группой рабочих (группа сравнения) значимы ( $p \leq 0,05$ )

Таблица 5

Представленность всех типов клеток в культурах цельной крови детей Казахстана — спонтанные уровни, эффекты однократного облучения в дозе 1 Гр ( $Co^{60}$  на 24 часу от начала культивирования) и относительная радиочувствительность

Условия культивирования	Поселок	Численность группы	2-яд.кл.	3-яд.кл.	4-яд.кл.	поляяд.кл.
Спонтанный уровень	Аральск	44	464,10*	57,17*	152,35*	7,98
	Акчи	34	356,45	16,01	73,22	7,80
Облучение 1,0 Гр	Аральск	44	422,57*	53,68*	103,67*	8,28*
	Акчи	34	298,77	20,65	34,72	5,38
Относительная радиочувствительность	Аральск	44	0,91	0,94	0,68*	1,04*
	Акчи	34	0,84	1,29	0,47	0,69

ны, как и образование самих этих клеток при культивировании крови в присутствии ЦХВ — наличие повреждений в них коррелировало с результатами биохимических и иммунологических исследований, а также с данными социопсихологического тестирования. Поэтому представляло интерес оценить ассоциированность генотоксических повреждений в ускоренно делящихся клетках с экспозицией. Ниже будут представлены некоторые результаты уже упоминавшихся 3 обследований детей и взрослых.

Добровольцы 22–25 лет подвергались облучению легкими аэроионами, генерируемыми люстрой Чижевского (45 мин./день, непрерывно в течение 25 дней). Взятие крови производили до начала обследования, через 24 часа, а затем на 10-й и 25-й дни экспозиции. Клетки крови культивировали в присутствии ЦХВ. От каждого донора в каждый день взятия крови ставили 2 культуры — для оценки эффектов в норме и при 6-часовом действии 0,07 мМ N-метил-N-нитронитрозогуанидина (МННГ),



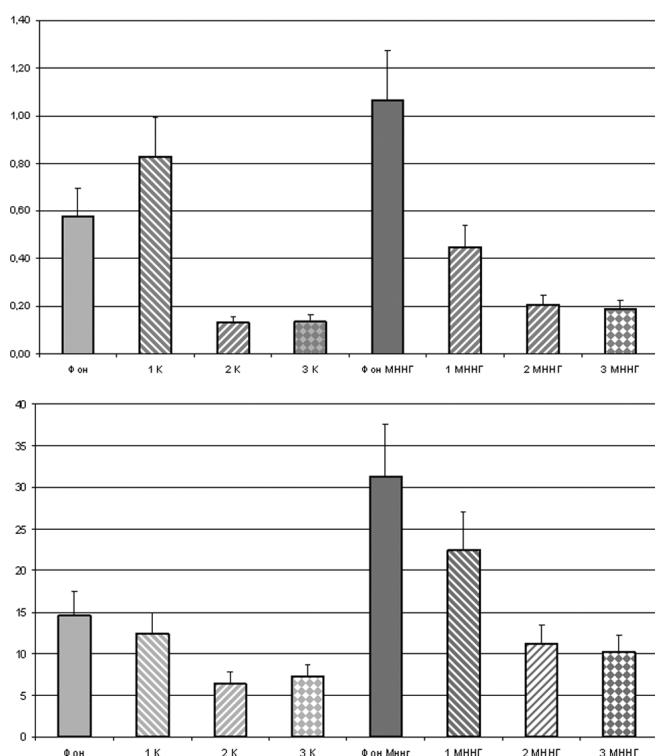
который вводили на 24 часу от начала культивирования на 6 часу — для выявления скрытых повреждений ДНК.

На рисунке 3 показаны результаты оценки повреждений в 2-ядерных и ускоренно делящихся клетках.

Как видно на рисунке 3, при идентичной динамике повреждений в разных клетках их частоты различались в десятки раз — максимальный уровень повреждений в двуядерных клетках составлял 3,23%, а в ускоренно делящихся — 68%.

Аналогичные результаты мы получили при анализе эффектов в других группах. Так, например, для взрослых мужчин, экспонированных на производстве комплексом токсических и генотоксических химических соединений (инвалиды) и группы сравнения (рабочие) были получены следующие результаты (рис. 4).

Как видно на этих рисунках, спонтанные частоты микроядер в ускоренно делящихся клетках были выше, чем в двуядерных. Особенно следует обратить внимание на спонтанные частоты микроядер в 3 и полиядерных клетках, которые в среднем были в 7–10 раз выше, чем в двуядерных. Следует отметить, что радиочувствительность ускоренно делящихся клеток была также выше, чем двуядерных.

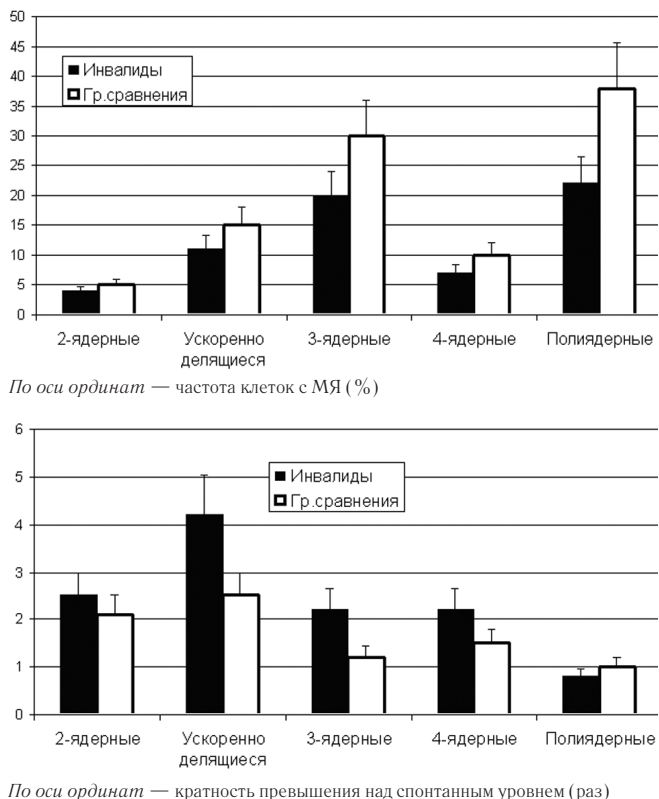


**Рис. 3.** Суммарные частоты генетических повреждений (%) в двуядерных (верхний график) и ускоренно делящихся (нижний график) клетках крови молодых мужчин, экспонированных аэроионами.  
 По оси абсцисс — спонтанные уровни, определенные: до начала курса аэроионизации (фон), через сутки после его начала (1К), через 10 суток (2К), через 25 суток (3К);  
 — эффекты — N'-нитро-N'-нитрозогуанидина (МННГ), определенные: до начала курса аэроионизации (фон МННГ), через сутки после его начала (1МННГ), через 10 суток (2 МННГ), через 25 суток (3 МННГ).  
 По оси ординат — частота клеток с повреждениями (%)

Приведенные данные заставляют задуматься над общим подходом к анализу генетических повреждений при культивировании клеток крови человека, а возможно, и животных, в условиях цитокинетического блока. Например, в таблице 7 показаны результаты анализа микроядер в клетках крови детей из Казахстана.

Это исследование проводили для сравнительной оценки генотоксических эффектов в крови детей, живущих в регионе Аральского моря — зоне экологической катастрофы (Аральск). Как видно в таблице 7, учет микроядер только в двуядерных клетках как по спонтанному уровню, так и при облучении, должен был привести к заключению, что в Аральске состояние генома детей лучше, чем в регионе сравнения пос. Акчи. Однако учет микроядер в полиядерных клетках показал необоснованность этого вывода, поскольку суммарные частоты клеток с микроядрами как фоновые, так и после облучения *in vitro* в клетках крови детей из Аральска были значительно выше, чем в Акчи. Напомним, что частоты 3-, 4- и полиядерных клеток прямо коррелировали с содержанием диоксинов (138, 153 и 180) и ДДЕ в плазме крови обследованных детей. Эта связь наблюдалась как для фоновых значений, так и после облучения культур крови в дозе 1,0 Гр.

Таким образом, анализ пула делящихся клеток позволяет выявить один из важнейших признаков нестабильности генома — ускорение пролиферации, обычно ха-



**Рис. 4.** Спонтанные частоты микроядер в разных клеточных популяциях и относительная радиочувствительность клеток к облучению в дозе 1,0 Гр ( $Co_{60}$ , на 24 часу от начала культивирования)  
 По оси ординат — кратность превышения над спонтанным уровнем (раз)

Таблица 6

Результаты корреляционного анализа связей между спонтанными повреждениями в ускоренно делящихся клетках, физиологическими показателями организма и социопсихологическим статусом мужчин 22–25 лет

Показатели теста	Физиологический показатель (содержание в крови)	Коэффициент корреляции Пирсона, уровень значимости
3-ядерные клетки с хроматиновыми мостами	АОА	$K = 0,50; p = 0,027$
	Базофилы	$K = 0,48; p = 0,034$
3-ядерные клетки с микроядрами	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = -0,44; p = 0,049$
	Тревожность (баллы)	$K = 0,68; p = 0,002$
4-ядерные клетки с микроядрами	КФК	$K = -0,51; p = 0,024$
	Гамма глобулин	$K = -0,48; p = 0,033$
	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = -0,46; p = 0,048$
	Тревожность (баллы)	$K = 0,45; p = 0,045$
4-ядерные клетки с хроматиновыми мостами	АОА	$K = 0,57; p = 0,012$
	Ig E	$K = 0,58; p = 0,01$
	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = 0,44; p = 0,047$
	Тревожность (баллы)	$K = 0,505; p = 0,027$
5-ядерные клетки с хроматиновыми мостами	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = 0,45; p = 0,042$
	Ca <sup>2+</sup>	$K = -0,47; p = 0,039$
5-ядерные клетки с МЯ	Общий белок	$K = -0,48; p = 0,032$
	Гамма-глобулин	$K = -0,51; p = 0,02$
	Альбумин	$K = 0,48; p = 0,034$
	Субъективное восприятие груза социальных факторов	$K = 0,68; p = 0,002$
	Индекс социальной адаптации	$K = 0,68; p = 0,002$
	Психологическая депрессия (баллы)	$K = 0,45; p = 0,044$
	Степень переутомления	$K = 0,60; p = 0,009$
Всего повреждений в ускоренно делящихся клетках	Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	$K = -0,45; p = 0,046$
	АОА	$K = 0,58; p = 0,011$
	Фосфор	$K = 0,50; p = 0,01$
	Тревожность (баллы)	$K = 0,555; p = 0,017$

Таблица 7

Спонтанные и радиоиндуцированные частоты клеток с микроядрами в культурах крови детей Казахстана. Облучение клеток в дозе 1,0 Гр (Co<sub>60</sub>) проводили на 24 часу от начала культивирования

Показатель	Спонтанный уровень		1,0 Гр	
	Аральск	Акчи	Аральск	Акчи
Двухядерных клеток с МЯ (%)	1,54**	3,52	15,40*	18,40
Ускоренно делящихся клеток с МЯ (%)	10,86**	1,49	16,17**	5,71
Всего клеток с микроядрами (%)	12,40**	5,01	31,57**	24,11
* — различия значимы ( $p \leq 0,05$ )				
** — различия значимы ( $p \leq 0,01$ )				

рактерное для опухолевых клеток (Kollmar, et al., 2006). До недавнего времени одним из сигналов повышенной нестабильности генома считалось снижение пролиферации, в частности, митотической активности (Cloos, et al., 1999). Однако уже давно существуют публикации, в которых четко продемонстрирована связь ускорения пролиферации с нестабильностью генома. Так, Feuerstein с соавторами показали ускоренное деление NIH/3T3 фибробластов, JB-6 эпителиальных клеток мыши и ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови человека при действии опухолевого промотора форбол-13-ацетата (Feuerstein, et al., 1984). Ускорение пролиферации Т- и В-лимфоцитов при системной красной волчанке, связанное с увеличением теломеразной активности, характерной для опухолевых клеток, описано в работе Klarner с соавторами (2004). Stavropoulou с соавторами (2005) показали, что повышенная частота полиядерных клеток может являться серьезным прогностическим признаком опухолевой трансформации, особенно если в этих клетках обнаруживается высокое содержание микроядер.

Таким образом, анализ фракций делящихся клеток — их численности и уровня повреждений дает новую и весьма важную информацию для оценки нестабильности генома человека.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. Ю. А. Ревазовой, проф. И. Е. Зыковой, проф. Ш. Н. Хусаиновой, к.м.н. А. С. Гуськову и Г. Е. Щербаченко за организацию обследований, Е. К. Кривцовой и Г. А. Батуриной за помощь в микроскопическом анализе, Н. А. Юрцевой за помощь в подготовке и проведении экспериментов, а также к.м.н. В. В. Юрченко и проф. А. М. Серебряному за полезные обсуждения.

## Литература

1. Гомес Л. А., Ярцев М. Н., Хахалин Л. Н. и др. Клинико-иммунологическая характеристика некоторых иммунодефицитных синдромов с ведущей Т-клеточной недостаточностью // *Вопр. охр. мат. и дет.* — 1989. — № 2. — С. 13–16.
2. Гуськов А. С., Ингель Ф. И., Малышева А. Г. и др. Аэроионификация и ее влияние на состояние здоровья работающих // *Гигиена и санитария.* — 2005. — № 4. — С. 32–34
3. Ингель Ф. И., Юрченко В. В., Гуськов А. С. и др. Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока // *Вестник РАМН.* — 2006. — № 4. — С. 41–46
4. Хусаинова Ш. Н., Ингель Ф. И., Петрова И. В. и др. Оценка состояния здоровья детей Приаралья // *Гигиена и санитария.* — 2004. — № 6. — С. 35–38.
5. Abou-Eisha A., Marcos R., Creus A. Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes // *Mutat Res.* — 2004. — Vol. 564, N 1. — P. 51–66.
6. Andreassi M. G., Picano E., Del Ry S., et al. Chronic long-term nitrate therapy: possible cytogenetic effect in humans? // *Mutagenesis* — 2001. — Vol. 16, N 6. — P. 517–521.
7. Bonder E. M., Mooseker M. S., Cytochalasin B. slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament // *J. Cell Biol.* — 1986. — Vol. 102, N 1. — P. 282–288.
8. Boreham D. R., Dolling J. A., Maves S. R., Siwarungsun N., Mitchel R.E. Dose-rate effects for apoptosis and micronucleus formation in gamma-irradiated human lymphocytes // *Radiat Res.* — 2000. — Vol. 153, N 5 (Pt. 1). — P. 579–586.
9. Bozsakyova E., Chalupa I., Sebova L., Slamenova D. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced by pentoxifylline in *in vitro* cultivated Chinese hamster cells (V79) and human blood lymphocytes // *Mutat Res.* — 2001. — Vol. 18; 497(1–2). — P. 63–70.
10. Brown S. S., Spudich J. A. Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends // *J Cell Biol.* — 1981. — Vol. 88, N 3. — P. 487–491.
11. Bukvic N., Gentile M., Susca F., et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. // *Mutat Res.* — 2001. — V. 498, № 12. — P. 159–167.
12. Chang W. P., Tsai M.S., Hwang J. S., et al. Follow-up in the micronucleus frequencies and its subsets in human population with chronic low-dose gamma-irradiation exposure // *Mutat Res.* — 1999. — Vol. 428, N 1–2. — P. 99–105.
13. Cloos J., Reid C. B., van der Sterre M. L. et al. A comparison of bleomycin induced damage in lymphocytes and primary oral fibroblasts and keratinocytes in 30 subjects. // *Mutagenesis.* — 1999. — V. 14, № 1. — P. 87–93.
14. Elsendoorn T. J., Weijl N. I., Mithoe S., et al. Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo // *Mutat Res.* — 2001. — Vol. 498, N 1–2. — P. 145–158.
15. Erdinger L., Eckl P., Ingel F., et al. The Aral Sea disaster-human biomonitoring of Hg, As, HCB, DDE, and PCBs in children living in Aralask and Akchi, Kazakhstan // *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* — 2004. — Vol. 207. — P. 541–547.
16. Fenech M., Bonassi S., Turner J., et al. Human Micro Nucleus 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 // *Mutat Res.* — 2003. — Vol. 534, N 1–2. — P. 45–64.
17. Fenech M., Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay // *Cytobios.* — 1985. — Vol. 43, N 172–173. — P. 233–246.
18. 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 // *Mutagenesis.* — 2000. — N. 4. — P. 329–336.
19. Feuerstein N., Sahai A., Anderson W. B., et al. Differential

- phosphorylation events associated with phorbol ester effects on acceleration versus inhibition of cell growth. // *Cancer Res.* — 1984. — Vol. 44, N 11. — P. 5227–33.
20. *Ganguly B. B.* Age-related alterations in cell division and cell cycle kinetics in control and trimethyltin-treated lymphocytes of human individuals // *Biometals.* — 1995. — Vol. 8, N 3. — P. 263–269.
  21. *Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D.* Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides // *Toxicology.* — 2001. — Vol. 165, N 2–3. — P. 153–162.
  22. *Gonzalez Borroto J. I., Creus A., Marcos R.* Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes // *Mutat Res.* — 2001. — Vol. 497, N 1–2. — P. 177–184.
  23. *He J. L., Jin H. Y., Jin L. F., Gao S. Y.* Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay // *Biomed Environ Sci.* — 2000. — Vol. 13, N 11. — P. 32–66.
  24. *Heimers A.* Cytogenetic analysis in human lymphocytes after exposure to simulated cosmic radiation which reflects the inflight radiation environment // *Int J Radiat Biol.* — 1999. — Vol. 75, N 6. — P. 691–698.
  25. *Huber R., Braselmann H., Bauchinger M.* Screening for interindividual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes // *Radiat Environm Biophys.* — 1989. — Vol. 28, N 2. — P. 113–120.
  26. *Joksic G., Petrovic S.* Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed *in vivo* to low doses of ionizing radiation // *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* — 2004. — Vol. 23, N 3. — P. 195–206.
  27. *Kirch-Volders M., Fenech M.* Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes // *Mutagenesis.* — 2001. — Vol. 16, N 1. — P. 51–58.
  28. *Kocisova J., Sram R. J.* The micronucleus test in human peripheral lymphocytes // *Cesk Farm.* — 1990. — Vol. 39, N 3. — P. 131–133.
  29. *Kollmar O., Menger M. D., Schilling M. K.* Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth // *World J Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12, N 6. — P. 858–867.
  30. *Kryscio A., Ulrich Muller W. U., Wojcik A., et al.* A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay // *Int J. Radiat Biol.* — 2001. — Vol. 77, N 11. — P. 1087–1093;
  31. *Lee T. K., O'Brien K., Eaves G. S., et al.* Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes // *Mutat Res.* — 1999. — Vol. 444, N 1. — P. 201–206.
  32. *MacLean-Fletcher S., Pollard T. D.* Mechanism of action of cytochalasin B on actin // *Cell.* — 1980. — Vol. 20, N 2. — P. 329–341.
  33. *Mante S. D., Flashner M., Tanenbaum S. W.* Effects of cytochalasin A on the morphology of plasmodia and sclerotia of *Physarum polycephalum* // *Cytobiologie.* — 1978. — Vol. 17, N 1. — P. 10–22.
  34. *Martelli A., Robbiano L., Cosso M., et al.* Comparison of micronuclei frequencies in mono-, bi- and poly-nucleated lymphocytes from subjects of a residential suburb and subjects living near a metallurgical plant // *Mutat. Res.* — 2000. — Vol. 470, — P. 211–219.
  35. *Mooseker M. S., Coleman T. R., Conzelman K. A.* Calcium and the regulation of cytoskeletal assembly, structure and contractility // *Ciba Found Symp.* — 1986. — Vol. 122. — P. 232–249.
  36. *Parry J. M.* A proposal for a new OECD Guideline for the in vitro micronucleus test. <http://www.oecd.org/dataoecd>.
  37. *Pascoe S. A., Stemp G.* A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using *cytochalasin B* // *Mutat Res.* — 1990. — Vol. 234, N 3–4. — P. 253–255.
  38. *Pastor S., Gutierrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S., Marcos R.* Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells // *Mutagenesis.* — 2001. — Vol. 16, N 6. — P. 539–545.
  39. *Rosefort C., Fauth E., Zankl H.* Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay // *Mutagenesis.* — 2004. — Vol. 19, N 4. — P. 277–284.
  40. *Schmid W.* The micronucleus test for cytogenetic analysis // In: *Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection.* (Ed. Hollaender A.) N-Y-L. — 1976. — Vol. 4, — P. 31–53.
  41. *Shimizu N., Iton N., Utiyama H., Wahl G. M.* Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase // *J. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 140, N 6, — P. 1307–1320.
  42. *Shimizu N., Hashizume T., Shingaki K., Kawamoto J.* Amplification of plasmids containing a mammalian replication initiation region is mediated by controllable conflict between replication and transcription // *Cancer research.* — 2003. — Vol. 63. — P. 5281–5290.
  43. *Shimizu N., Kamezaki F., Shigematsu Sh.* Tracing of microinjected DND in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material // *Nucleic Acid Research.* — 2005. — Vol. 33, N 19. — P. 6296–6307.
  44. *Shimizu N., Shimura T., Tanaka T.* Selective elimination of acentric double minutes from cancer cell through the extrusion of micronuclei // *Mutation Research.* — 2000. — Vol. 448, N 1. — P. 81–90.
  45. *Slonina D., Klimek M., Szpytma T., Gasinska A.* Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy // *Int J Radiat Biol.* — 2000. — Vol. 76, N 9. — P. 1255–1264.
  46. *Small J. V.* Microfilament-based motility in non-muscle cells // *Curr Opin Cell Biol.* — 1989. — Vol. 1, N 1. — P. 75–79.

47. Stavropoulou V., Xie J., Henriksson M., et al. Mitotic Infidelity and Centrosome Duplication Errors in Cells Overexpressing Tripeptidyl-Peptidase II // *Cancer Research*. — 2005. — Vol. 65. — P. 1361–1368.
48. Swain D. E., Mill A. J. An 11 year follow-up of individual radiation responses as assessed by micronuclei induction in peripheral blood lymphocytes // *J. Radiol Prot.* — 2000. — Vol. 20, N 2. — P. 189–196.
49. Tanaka K., Tchajunusova N. J., Takatsuji T., et al. High incidence of micronuclei in lymphocytes from residents of the area near the Semipalatinsk nuclear explosion test site // *J. Radiat Res (Tokyo)*. — 2000. — Vol. 41, N 1. — P. 45–54.
50. Thierens H., Vral A., de Ridder L., Touil N., Kirsch-Volders M., Lambert V., Laurent C. Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers // *Int J Radiat Biol.* — 1999. — Vol. 75, N 1. — P. 34.
51. Titenko-Holland N., Jacob R. A., Shang N. et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in filate // *Mat. Res.* — 1998. — Vol. 417. — P. 101–114.
52. Touil N., Elhajouji A., Thierens H., Kirsch-Volders M. Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation // *Mutagenesis*. — 2000. — Vol. 15, N 1. — P. 1–7.
53. Vaglenov A., Nosko M., Georgieva R., et al. Genotoxicity and radioresistance in electroplating workers exposed to chromium // *Mutat Res.* — 1999. — Vol. 446, N 1. — P. 23–34.
54. Venkatachalam P., Solomon F. D., Prabhu B. K., et al. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes // *Mutat Res.* — 1999. — Vol. 429, N 1. — P. 1–12.
55. Yager J. W., Sorsa M., Selvin S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs // *IARC Sci Publ.* — 1988. — Vol. 89. — P. 213–216.
56. Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation // *Toxicology*. — 2004. — Vol. 200. — P. 39–47.
57. Zenzen V., Fauth E., Zankl H., et al. Mutagenic and cytotoxic effectiveness of zinc dimethyl and zinc diisononyldithiocarbamate in human lymphocyte cultures // *Mutat Res.* — 2001. — Vol. 497, N 1–2. — P. 89–99.

**Perspectives of micronuclear test in human lymphocytes cultivated in cytogenetic block conditions. Part 1: Cell proliferation**  
*F. I. Ingel*

✎ **SUMMARY:** Cultivation of human blood lymphocytes under the conditions of cytokinetic block with cytochalasin B creates unique opportunity to analyze the total spectrum of the changes describing genome instability. The main task of the present publication is the analysis of a modern state, opportunities and outlooks of the micronuclear test on human blood lymphocytes. The special attention is given those directions of researches which are rather seldom present in the literature - to laws of cellular proliferation, to existence of physiological conditionality and genetic predisposition to development of effects of genome instability; to effects of emotional stress and the adaptive response to action of ionizing irradiation, etc. The material is presented in 2 consecutive publications. It is finished with discussion of methodical features of statement of culture, results of the microscopic analysis and ideology of creation of the conclusions of the study.

✎ **KEY WORDS:** Cytochalasin B, micronucleus, chromatin bridge, proliferative pool, normal and accelerated cellular division, association of proliferation with biochemical parameters of blood, human genome - instability and individual susceptibility, cytotoxicity, an index of replication