

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ МУТАГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ УЧЕТА ЧИСЛОВЫХ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ

В.А. Тимошевский, С.А. Назаренко

ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН, Томск, Россия,
e-mail: timv@img.tsu.ru

Рассматриваются современное состояние, возможности и перспективы использования интерфазной цитогенетики в оценке геномных мутаций в соматических клетках человека и животных для целей генетической токсикологии и анализа генетической нестабильности. Обсуждаются возможные механизмы действия мутагенов, вызывающих числовые хромосомные нарушения, а также эндогенные причины повышения уровня анеуплоидии в клетках человека.

Введение

Изменение численного состава хромосом, характерных для клеток биологического вида, относят к разряду геномных мутаций. Это особый класс мутаций, который подразделяется на изменение числа отдельных хромосом – анеуплоидию и варианты избыточной представленности в клетке основного (гаплоидного) набора хромосом – полиплоидию. Анеуплоидия (АЕ) играет существенную роль в патологии, являясь одной из основных причин врожденных пороков развития и эмбриональной смертности. Несовместимость АЕ гаметического происхождения с нормальным онтогенезом связана, очевидно, с дисбалансом дозы генов, ответственных за ключевые этапы эмбриогенеза и органогенеза. Это в свою очередь подразумевает совместимость с живорождением и даже с постнатальным развитием анеуплоидий по тем хромосомам, которые не несут ключевых генов жизнеобеспечения клетки в контексте ее тканевого окружения и на уровне организма. Полиплоидия, являясь крайним проявлением дисбаланса хромосом, у человека приводит к остановке онтогенеза на ранних этапах. Таким образом, значимость АЕ, возникающей в гаметах и приводящей к появлению зигот с числовыми хромосомными нарушениями, не вызывает принципиальных вопросов в отношении аномалий развития,

которые обуславливаются изменением числа хромосом. Это утверждение с поправкой на глубину патологических эффектов может быть отнесено и к соматическим мутациям в раннем онтогенезе, которые приводят к мозаичным вариантам той или иной АЕ. Что же можно сказать в отношении появления анеуплоидных клеток под действием эндогенных или экзогенных причин среди соматических клеток взрослого организма? Патологическая значимость таких изменений остается неясной. Однако, экстраполируя наблюдаемые в раннем онтогенезе эффекты АЕ в область соматических мутаций, индуцируемых уже в постнатальном периоде, можно предположить, что числовые хромосомные нарушения могут оказаться более значимыми для развития патологических состояний человека, чем, скажем, индуцируемые генные мутации или структурные хромосомные аберрации. Следует также отметить, что события, которые могут привести к АЕ, отличаются большим разнообразием, чем индуцирующие клас-тогенные и генные нарушения. По этой причине спектр агентов, способных вызвать числовые хромосомные нарушения, будет отличаться от известного набора мутагенов, действие которых заключается в способности повреждать цепь ДНК. Так сложилось, что именно последний класс агентов вызывал наибольший интерес исследователей, и токсикологические тесты

были в большинстве своем сосредоточены на выявлении ДНК-повреждающих эффектов исследуемых физических, химических и биологических агентов. В последнее время ситуация изменилась и внимание многих исследовательских групп сосредоточено на изучении механизмов, которые определяют поддержание сбалансированного набора хромосом в клетках, а также причин разной этиологии, способных вызвать нарушение этого баланса (Kirsch-Volders *et al.*, 2002). Скорее всего, к факторам, приводящим к числовым хромосомным нарушениям помимо мутагенных агентов внешней среды следует отнести и эндогенные причины, а именно: статус генов, от работы которых зависит распределение хромосом в ходе митоза. Чем обусловлен резко возросший интерес к числовым хромосомным нарушениям? Прежде всего, следует отметить, что появились молекулярно-цитогенетические методы исследований, которые отличаются довольно высокой чувствительностью в отношении детекции числовых хромосомных нарушений. По этой причине стало возможным исследовать агенты, вызывающие АЕ, которые и получили соответствующее название – анеугены или анеуплоидогены. Это большой класс преимущественно химических мутагенов, которые могут и не вызывать генных мутаций и структурных хромосомных aberrаций, а действуют в иной манере, затрагивая различные компоненты аппарата сегрегации хромосом. Кроме того, с развитием молекулярно-цитогенетических технологий появилась возможность исследовать большое количество солидных опухолей, это в свою очередь показало, что АЕ является основным цитогенетическим нарушением, характерным для опухолевых клеток и играющим ключевую роль в клональной эволюции (Sen, 2000; Rajagopalan, Lengauer, 2004). В последнее время рядом ученых активно развивается гипотеза, в соответствии с которой рак рассматривается как многоступенчатый процесс анеуплоидизации (Duesberg, Li, 2003). Предполагаемой движущей силой этого процесса является автокаталитическое развитие генетической нестабильности в результате дисбаланса сотен и тысяч нормальных генов, который возникает при АЕ (Duesberg *et al.*, 1998, 2000; Duesberg, Rasnick, 2000). С этой точки зрения АЕ можно считать геномным

нарушением, достаточным как для инициализации, так и для прогрессии рака. Другими словами, АЕ может являться не только следствием генетической нестабильности, которая возникает в результате генной соматической мутации (протоонкогенов или опухолесупрессоров), а и непосредственной ее причиной. С другой стороны, к генетической нестабильности могут predisposing мутации, приводящие к аномальной экспрессии генов, ответственных за протекание ключевых событий клеточного цикла: сверхочных точек клеточного цикла, генов кинетохорных и центросомных белков, митотических киназ и ферментов репарации ДНК (Cahill *et al.*, 1998; Rajagopalan, Lengauer, 2004). Как бы ни решился в будущем вопрос о причине возникновения и прогрессии новообразований, явно представляется нежелательным игнорирование анеугенных свойств мутагенных агентов. В пользу этого свидетельствует и то, что многие вещества с выраженным канцерогенным действием являются анеугенами, не обладая при этом генотоксичными свойствами. Ввиду этого стоит внимательно рассмотреть механизмы возникновения АЕ, а также возможности и ограничения технологий детекции АЕ в соматических клетках как в организме человека, так и в модельных системах.

Анеугены и механизмы индукции геномных мутаций

Как известно, АЕ возникает в результате неправильной сегрегации удвоенных хроматид при делении клетки. Распределение наследственного материала по дочерним клеткам обеспечивается целым рядом клеточных структур и контролируется сложными биохимическими путями, следовательно, не существует единого механизма возникновения ошибок сегрегации хроматид. Причиной возникновения числовых хромосомных нарушений может быть любое нарушение нормального протекания стадий клеточного цикла, особенно М-фазы. Основной клеточной структурой, отвечающей за сегрегацию хромосом, является аппарат веретена деления. Его главными структурно-функциональными компонентами являются микротрубочки (МТ), центросомы и кинетохоры. Нормальное функционирование веретена деления обеспе-

чивают его мембранное окружение, ферменты киназы, осуществляющие фосфорилирование белков, участвующих в расхождении хромосом, а также ионы кальция. Нарушение функций любого из перечисленных компонентов может приводить к нерасхождению или «отставанию» хромосом в анафазе.

Рассматривая агенты, обладающие явной анеугенной способностью, в первую очередь следует обратить внимание на соединения, влияющие на полимеризацию/деполимеризацию цитоплазматического глобулярного белка тубулина, входящего в состав МТ. Тубулин может специфически связываться с производными некоторых алкалоидов (винкристина, винбластин, колхицина и его аналогов – колцемида и подофиллотоксина). Связывание анеугенов с тубулином может приводить к нескольким событиям, наиболее значимым из которых является ингибирование его полимеризации, в результате чего происходит нарушение формирования МТ (колхицин, карбендазим). Винбластин связывается с участками тубулина, отличающимися от сайтов связывания колхицина, и вызывает его кристаллизацию (Wilson, Morse, 1978). Противоопухолевый препарат таксол, связываясь с тубулином, усиливает степень его полимеризации, что приводит к остановке митоза и, возможно, к АЕ через нарушение динамики формирования МТ (Schiff *et al.*, 1979). АЕ могут вызвать агенты, взаимодействующие с тубулин-ассоциированными белками, например, фунгицид гризеофульвин блокирует соединение МТ с соответствующими белками, играющими важную роль в функции «скольжения» МТ, что нарушает анафазное движение хромосом в ходе клеточного деления (Oshimura, Barrett, 1986). Индуцировать АЕ могут также агенты, модифицирующие ключевые белки митоза, в частности, р-флуорофенилаланин (р-ФРА), а также ртуть-содержащие соединения. Органические соединения ртути, такие, как тимерозал (мертиолят), применяемый в малых концентрациях в качестве дезинфицирующего средства, обладают способностью связывать сульфгидрильные группы в белках и таким образом препятствуют сборке МТ (Aardema *et al.*, 1998). Рентгеновское и гамма-облучение могут индуцировать образование свободных радикалов, разрушающих дисульфидные

связи в белках, важных для сборки МТ. Так, установлено, что при высоких дозах облучения радиационный лизис белков, содержащих SH- и S-S-группы, приводит к фрагментации пептидных цепей (Schuessler, Schilling, 1984). По-видимому, подобный механизм способен индуцировать АЕ и при более низких дозах облучения (Touil *et al.*, 2000).

Важную роль в нормальном функционировании аппарата веретена деления играют центриоли, которые могут повреждаться некоторыми химическими соединениями. Установлено, например, что диазепам, применяемый в качестве транквилизатора, способен ингибировать деление центриолей, в результате чего клетки останавливаются на стадии метафазы (Lafit *et al.*, 1987). Некоторые химические агенты способны нарушать специфические внутриклеточные процессы и структуры, способствуя, таким образом, возникновению АЕ. Так, противоопухолевый антибиотик митомицин С может повреждать кинетохоры, интеркалирующие агенты; митомицин D – увеличивать сцепление или повреждение хроматид; закись азота – нарушать выравнивание хромосом в экваториальной плоскости метафазной пластинки, а этанол и дезоксихолат натрия – повреждать клеточную или ядерную мембрану (Aardema *et al.*, 1998).

Полипloidия, с одной стороны, может рассматриваться как крайняя степень проявления повреждений аппарата сегрегации хромосом, поэтому механизмы возникновения АЕ имеют прямое отношение и к индукции полипloidных клеток. С другой стороны, полипloidия может быть следствием специфических событий, приводящих к кратному увеличению гаплоидного набора хромосом. Причинами возникновения полипloidии могут быть блокирование цитокинеза или эндоредупликация. В последнем случае в клетке осуществляются два цикла синтеза ДНК без ее последующего деления. Вызывают полипloidию также соединения, блокирующие клетки в постсинтетической фазе, например, некоторые ингибиторы топоизомераз, мышьяк, митомицин С и актиномицин С (Aardema *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 2003).

До настоящего времени остается неясным характер зависимости «доза–эффект» в отношении индукции числовых хромосомных нарушений, а также наличие порога в ответ на

воздействие анеугенов. В отношении индукции числовых хромосомных нарушений активно разрабатывается концепция нелинейной пороговой зависимости анеугенного эффекта от дозы мутагенного агента (Lovell, 2000). Вероятно, она окажется справедливой для большинства известных химических соединений, вызывающих числовые хромосомные нарушения. Это связано с тем обстоятельством, что влияние анеугенов проявляется в виде «многоударного» механизма, т. е. их эффект чаще проявляется не путем прямого воздействия на хромосому, а посредством взаимодействия со множеством мишеней, прямо или косвенно контролирующей сегрегацию хромосом. Следствием таких событий является отсутствие видимого эффекта при концентрации агента ниже пороговой, а превышение порога приводит к нелинейному нарастанию частоты числовых хромосомных нарушений с увеличением концентрации анеугена (Elhajouji *et al.*, 1997; Bentley *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2000). Возможными механизмами, определяющими пороговый анеугенный эффект действия генотоксических химических соединений, могут являться: 1) нарушения деления клетки и сегрегации хромосом, связанные с повреждением клеточных структур, таких, как веретено деления, кинетохоры и клеточные мембраны; 2) ингибирование синтеза ДНК; 3) изменение клеточного метаболизма в результате подавления функции ферментов топоизомераз или дисбаланса нуклеотидного пула; 4) истощение резервов гомеостатической защиты клетки, например, антиоксидантных защитных механизмов и др. (Henderson *et al.*, 2000). Логично объяснить наличие порогового анеугенного эффекта может нарушение сегрегации хромосом в клетках в результате действия соединений, взаимодействующих с МТ веретена. Для проявления видимого анеугенного эффекта необходимо взаимодействие этих агентов со многими молекулами тубулина. Наличие порога в этом случае ожидаемо с теоретической точки зрения и хорошо подтверждается экспериментальными данными (Parry *et al.*, 2000).

Вопрос об индукции АЕ в соматических клетках стоит в тесной взаимосвязи с вопросом о канцерогенных свойствах анеуплоидогенов. До недавнего времени были известны всего три анеугена, для которых показана канцероген-

ность, – это асбест, кадмий и его соединения, а также диэтилстильбэстрол (Aardema *et al.*, 1998). Однако благодаря применению в исследованиях молекулярно-цитогенетических технологий список агентов с анеугенными свойствами быстро пополняется за счет известных канцерогенов (Duesberg, Rasnick, 2000). Прежде всего, в него вошли полициклические ароматические углеводороды – очень сильные канцерогены и эффективные анеугены, но обладающие слабым мутагенным эффектом на генном уровне (Duesberg *et al.*, 2001). Действие полициклических углеводородов, как правило, основано на их способности связываться с белками и вызывать их коагуляцию. Применительно к индукции АЕ мишенями «канцерогенов-анеугенов» могут быть моторные и регуляторные белки митоза. Дальнейшие исследования генетических эффектов хромосомного дисбаланса, вероятно, помогут углубить наше понимание кинетики канцерогенеза, что может дать основание для разработки терапевтических стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями.

Поскольку индукция некоторых анеусомий может привести к злокачественной трансформации, а фенотип опухоли определяется специфичностью характерных для нее геномных нарушений (Fabarius *et al.*, 2002), то очень интригующим является вопрос о возможности избирательного действия химических агентов на отдельные хромосомы набора. Некоторыми авторами было показано существование предпочтительного вовлечения определенных хромосом набора в процессы анеугенеза при внешнем воздействии химическими мутагенами. Такая тенденция была показана для хромосомы 7 при исследовании микроядер (МЯ), индуцированных колхицином (Wuttke *et al.*, 1997). Более подверженной к нерасхождению при воздействии беномила и карбендазима в культивированных лимфоцитах человека оказалась X-хромосома (Bentley *et al.*, 2000). Интересно, что X-хромосома чаще теряется в культивированных женских клетках, что, вероятно, связано с ее инактивацией, а это каким-то образом предрасполагает ее к формированию МЯ (Surralles *et al.*, 1996). Метаболиты 1,3-бутиадиена вызывают дозозависимое повышение частоты гиперплоидии хромосом 12 и X, однако при этом не оказывают эффекта на хромосомы

7 и 8 (Xi *et al.*, 1997). Метаболиты бензола индуцируют хромосомоспецифические числовые и структурные aberrации, затрагивающие хромосомы 5, 7, 8 и 21 в культурах лимфоцитов человека (Chung, Kim, 2002). Пока трудно судить о достоверности существования феномена специфического воздействия анеугенов на отдельные хромосомы набора. Возможно, здесь имеет место селективное преимущество клеток с анеусомиями, хотя вряд ли это каким-либо образом может оказаться справедливым в отношении краткосрочных культур клеток. С другой стороны, хромосомоспецифическое действие анеугенов может объясняться особенностями конденсации хроматина отдельных хромосом и их преимущественным вовлечением в процессы индукции АЕ. В одном из последних исследований было показано, что к потере чаще подвержены хромосомы X, 17 и аутосомы, несущие крупные гетерохроматиновые блоки, – 1, 16, 9 (Leach *et al.*, 2001). Архитектура конденсированных хромосом действительно способна повлиять на выход числовых нарушений по тем или иным хромосомам. Так, было показано, что при дефиците фолатов в среде для культивирования наблюдается значимое возрастание частоты АЕ по хромосомам 17 и 21 в лимфоцитах периферической крови (Wang *et al.*, 2004). Причина такой индукции АЕ – гипометилирование ДНК, которое приводит к структурным дефектам центромерного окружения, что может вызвать ошибки сегрегации реплицированных хромосом в ходе клеточного деления. В этой связи следует подчеркнуть, что индуцировать АЕ могут не только воздействия мутагенных агентов, но и эндогенные причины, в частности, дефицит фолатов. Возможно, к этой же категории следует отнести способность некоторых гормонов влиять на повышение уровня АЕ (Shuler *et al.*, 1998). К эндогенным причинам также может быть отнесено возраст-зависимое увеличение уровня АЕ по хромосомам (Guttenbach *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2000), причем можно провести параллель между репликативным старением клеток *in vitro* и возрастными изменениями, происходящими в отношении индукции АЕ в организме (Назаренко, Тимошевский, 2005). В этой связи примечательно, что была обнаружена достоверная корреляция между частотой

потери отдельной хромосомы и длиной ее теломеры, т. е. чем меньше был теломерный блок, тем чаще эта хромосома терялась (Leach *et al.*, 2001). Таким образом, вопрос о прямой корреляции частоты АЕ с возрастом индивида (или длительностью культивирования клеток) все больше проясняется.

Использование FISH-анализа для оценки уровня анеуплоидии

Мнения многих исследователей по вопросу использования интерфазного анализа для детекции АЕ сходятся в том, что данный подход является полезным инструментом, применимым для изучения воздействий мутагенных факторов среды и производственных факторов на наследственный аппарат клеток. Следует, однако, иметь в виду, что на оценку АЕ с помощью интерфазного FISH-анализа могут повлиять особенности архитектуры хроматина ядра и гибридизационные артефакты, в силу которых полученные результаты могут быть неправильно интерпретированы (Eastmond *et al.*, 1995). Однако эти ограничения носят в основном технический характер. При оптимизации условий гибридизации, а также при использовании качественных ДНК-зондов и цитологических препаратов большую часть артефактов можно избежать. В ходе FISH-анализа прежде всего следует учитывать морфологию сигналов, выявляемых при гибридизации ДНК-зондов с хроматином трехмерного клеточного ядра, поскольку она напрямую связана с точностью оценки результатов гибридизации. При выборе критериев анализа гибридизационных сигналов следует помнить о возможности перекрывания районов гибридизации разных гомологичных хромосом, что может приводить к искусственному завышению уровня детектируемой гипоплоидии (Rupa *et al.*, 1997). При использовании строгого подхода к анализу гибридизационных сигналов можно обеспечить более точную оценку результатов гибридизации (Тимошевский, Назаренко, 2005).

Повысить точность интерфазного FISH-анализа за счет уменьшения вероятности ложнопозитивной детекции гипоплоидии позволяет учет МЯ с наличием в них центромерных сигналов, что свидетельствует об отставании данных хро-

мосом в анафазе и является показателем уровня гипоплоидии в исследуемой ткани. Сходным подходом для оценки уровня хромосомных потерь является анализ МЯ, несущих кинетохоры, которые выявляются с помощью иммуноцитохимических методов (Caria *et al.*, 1995). Однако сам по себе микроядерный тест не способен выявлять АЕ, возникшую в результате нерасхождения хромосом, поскольку в этом случае МЯ вообще не появляются. Наиболее перспективным подходом к анализу анеугенного действия мутагенов является определение нерасхождения и анафазного «отставания» хромосом с помощью FISH-техники в двуядерных клетках, цитокинез в которых блокирован с помощью цитохалазина В – токсина из плесневых грибов, обладающего способностью блокировать сборку белковых микрофиламентов, формирующих цитоскелет клетки. Вероятность ошибки в таких исследованиях очень низка, так как события, приводящие к потере или приобретению хромосом в двуядерных клетках, регистрируются достаточно просто. В случае нерасхождения исследуемой хромосомы в одном из ядер присутствует один сигнал, а в другом – три. Потеря хромосомы в результате анафазного «отставания» приводит к появлению в цитоплазме двуядерной клетки МЯ с FISH-сигналом (центромеропозитивное МЯ), отсутствующим в одном из ядер. Для блокирования цитокинеза должны применяться низкие концентрации цитохалазина В, так как этот агент сам способен индуцировать появление клеток с АЕ. Для культур цельной крови концентрация цитохалазина В не должна превышать 6 мкг/мл, а для культур изолированных лимфоцитов 3–6 мкг/мл (Bentley *et al.*, 2000). Наряду с МЯ, содержащими центромеры, при анализе двуядерных клеток могут встречаться МЯ без центромерного сигнала, которые являются результатом кластогенной активности исследуемого соединения (Pargy *et al.*, 2002).

Одновременный анализ гипоплоидии и кластогенного эффекта исследуемых агентов можно осуществить с помощью анализа МЯ в клетках с заблокированным цитокинезом и идентификацией хромосомного происхождения ДНК в составе МЯ в результате одно- или многоцветного окрашивания индивидуальных хромосом при использовании хромосомоспе-

цифичных ДНК-библиотек, меченных разными флуорохромами (Wuttke *et al.*, 1997; Fauth *et al.*, 1998; Fauth, Zankl, 1999). Очевидно, чем больше хромосом вовлекается в анализ, тем выше информативность такого подхода для определения хромосомного происхождения ДНК в МЯ. Расширение возможностей идентификации хромосомного материала в МЯ для всех хромосом набора было реализовано сочетанием спектрального кариотипирования (SKY) и FISH с панцентромерными ДНК-пробами (Leach, Jackson-Cook, 2001). Однако если принять во внимание высокую стоимость и малую доступность таких методов, то последний подход можно отнести к разряду экзотических и малопригодных для широкого применения. В настоящее время для оценки комплексного анеугенного и кластогенного действия мутагенных факторов различной природы получает все более широкое применение технология, основанная на сочетании анализа двуядерных клеток с заблокированным цитокинезом и менее дорогих способов молекулярно-цитогенетической идентификации хромосомного материала в ядрах и МЯ.

Если действие анеугенного агента проявляется в результате «многоударного» механизма, то возникает вопрос о чувствительности интерфазного FISH-анализа для определения порога безопасной в отношении индукции АЕ концентрации того или иного химического соединения. Для этой цели вполне подходит метод анализа нерасхождения хромосом в двуядерных клетках с заблокированным цитокинезом. С помощью данного подхода были установлены пороговые концентрации для нерасхождения хромосом при воздействии на лимфоциты человека двух ингибиторов веретена деления – беномила и его активного метаболита карбендазима, которые для большинства изученных хромосом составили 1100 и 800 нг/мл соответственно. Более низкие концентрации анеугенов не вызвали заметного эффекта (Bentley *et al.*, 2000). Авторы данной работы также показали, что оценка нерасхождения хромосом оказывается более чувствительной для определения порога действия изученных анеугенов, чем оценка их отставания, поскольку при более низких концентрациях этих соединений частота нерасхождения хромосом (распределение сигналов в

двух ядрах в соотношении 3 : 1) была заметно выше, чем частота центромеропозитивных МЯ. Этот факт свидетельствует о том, что сам по себе микроядерный тест не является достаточно чувствительным методом выявления анеугенного эффекта. Для такого утверждения имеются, по крайней мере, две причины: во-первых, невозможность регистрации с помощью микроядерного теста событий нерасхождения хромосом, которая является основной причиной возникновения АЕ, во-вторых, в результате того, что часть МЯ возникает в результате клас-тогенной активности соединений. Кроме того, регистрация анафазного отставания хромосом, выявляемого с помощью подсчета МЯ, несущих центромеры, является менее чувствительным методом для определения порогового эффекта анеугенов, поскольку число повреждаемых мишеней для возникновения потери хромосомы является более высоким, чем для индукции нерасхождения (Elhajouji *et al.*, 1997).

Таким образом, при изучении действия анеугенов как *in vitro*, так и *in vivo* следует принимать во внимание механизм их действия и строить методологию исследования в соответствии с предполагаемой моделью зависимости «доза–эффект». Кроме того, следует учитывать, какое именно событие, приводящее к АЕ, – нерасхождение или отставание хромосом (или оба события вместе) – изучает исследователь в конкретном эксперименте. Следует также принимать во внимание и другой немаловажный факт – эффект анеугена проявляется только в пролиферирующих клетках. Это было показано при исследовании действия препаратов растительного происхождения (противокашлевого – носкапина и противоопухолевых – винкристина и винбластина) на лимфоциты и гепатоциты крыс *in vitro* и *in vivo* (Balakrishnan *et al.*, 2002). Повышение частоты гиперплоидии отмечалось только в делящихся клетках с включенным бромдезоксисуридином, в то время как подобный эффект отсутствует в клетках, находящихся в стадии G₀. Нами также было обнаружено, что эффект повреждающих агентов проявляется только после прохождения клетками хотя бы одного цикла деления. При исследовании влияния на организм человека факторов ядерно-химического производства мы показали, что значимое возрастание уровня АЕ по шести ис-

следованным хромосомам (7, 11, 12, 17, X и Y) проявляется только в культивированных лимфоцитах, что говорит об экспрессии накопленных повреждений аппарата сегрегации хромосом после прохождения клетками митотического деления (Назаренко, Тимошевский, 2005).

Оценка анеугенного эффекта вредных производственных факторов

В последнее время изучение анеугенного эффекта соединений, загрязняющих окружающую среду, и производственных факторов вызывает вполне закономерный интерес. Исследования индукции числовых хромосомных нарушений при вредных внешних воздействиях с помощью технологии интерфазной цитогенетики проводятся на различных контингентах лиц, подверженных тем или иным внешнесредовым воздействиям. Так, интерфазный FISH-анализ с центромероспецифичными ДНК-зондами на хромосомы 7, 11, 18 и X был использован для детекции гиперплоидии и анализа МЯ у обслуживающего персонала бензолаправочных станций в Италии (Carere *et al.*, 1998). Работники бензоколонок не имели повышенного уровня гиперплоидии и формирования МЯ по сравнению с контрольной группой, однако, авторы обнаружили положительную корреляцию между выходом числовых нарушений хромосом и возрастом индивидов. Кроме того, они обнаружили сильную межиндивидуальную вариабельность частоты анеуплоидных клеток как в экспериментальной группе, так и в контроле, которая, возможно, и не позволила выявить анеугенный эффект.

В другом исследовании авторы оценивали влияние бензола на частоту разрывов хромосом в сегменте 1q12 и уровень гиперплоидных клеток по хромосомам 1 и 9 у работников нефтехимического производства (Marson *et al.*, 1999). В некультивированных клетках крови (гранулоциты на стадии G₀) рабочих не было обнаружено заметных отличий от соответствующих показателей контрольной группы лиц. Однако после 48 часов культивирования клеток в экспериментальной группе отмечалось увеличение повреждений хромосом в сегменте 1q12 по сравнению с контролем, а уровень гиперплоидии в обеих группах оказался сходным,

хотя авторы отметили тенденцию к повышению гиперплоидии в группе работников, подвергающихся воздействию бензола. Отсутствие различий могло быть обусловлено небольшой выборкой (16 работников), большими различиями дозы воздействия (стаж работников от 8 месяцев до 19 лет) и возраста индивидов (19–54 года). Учитывая пороговый эффект действия анеугенов и возрастную изменчивость частоты числовых хромосомных нарушений, не удивительно, что авторы не нашли различий по частоте гиперплоидных клеток между контрольной и опытной группами, в то время как кластогенный эффект, проявляющий линейную беспороговую зависимость от дозы воздействия, был отчетливо выражен. Справедливость этого предположения поддерживается результатами исследования действия бензола *in vivo*, в котором статистически значимое увеличение частоты гиперплоидии по хромосоме 9 было обнаружено только для группы рабочих с высокой экспозицией указанным агентом (Zhang *et al.*, 1996). Авторы отметили наличие положительной корреляции между частотой гиперплоидии по хромосоме 9 и уровнем фенола в моче и высказали мнение о существовании причинной зависимости между анеугенным действием бензола и возникновением бензол-индуцированной лейкемии. Повышение уровня хромосомных нарушений, в том числе и частоты МЯ, несущих центромеры (наличие которых свидетельствует о потерях хромосом), было отмечено в лимфоцитах периферической крови алкоголиков (Maffei, 2000).

Особенности действия анеугенов как мутагенов с пороговым эффектом и недостаточно чувствительные методы их детекции могут быть причиной невыявленного анеугенного воздействия вредных для здоровья соединений. С другой стороны, повышение частоты МЯ в периферической крови некоторых контингентов людей, которые в процессе своей профессиональной деятельности подвергаются воздействию вредных химических или физических агентов, не всегда может свидетельствовать о наличии анеугенного влияния вредных факторов производства. Так, в группе рентгенологов были выявлены повышение частоты только центромерно-негативных МЯ и отсутствие статистических различий по уровню

центромерно-позитивных МЯ по сравнению с контрольной группой (Sari-Minodier *et al.*, 2002). Такой результат вполне ожидаем, так как ионизирующее излучение, прежде всего, обладает кластогенным эффектом и в меньшей степени анеугенным. По результатам исследований, в которых ведется мониторинг профессиональных вредных воздействий с использованием простого микроядерного теста, без комбинации с FISH, очень трудно сделать заключение о дифференциальном анеугенном и кластогенном влиянии тестируемых факторов среды.

В заключение следует отметить, что в настоящее время имеются все основания для цитогенетического исследования мутагенов не только на кластогенную активность, но и на анеугенный эффект. Современные методы молекулярной цитогенетики позволяют проводить подобные исследования как в экспериментальных системах, так и при воздействии производственных и средовых факторов на организм человека. Детекция АЕ расширяет список биомаркеров для оценки мутагенных эффектов и существенно увеличивает возможности генотоксикологических исследований с целью объективной оценки генетического риска различных ксенобиотиков и загрязнителей окружающей среды в отношении их мутагенной и канцерогенной активности.

Литература

- Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Критерии оценки частоты анеуплоидии в интерфазных ядрах клеток с помощью FISH-анализа // Цитология. 2005. Т. 47. № 6. С. 526–532.
- Назаренко С.А., Тимошевский В.А. Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешнесредовых факторов // Генетика. 2005. Т. 41. № 3. С. 391–395.
- Aardema M.J., Albertini S., Arni P. *et al.* Aneuploidy: a report of an ECETOC task force // Mutat. Res. 1998. V. 410. P. 3–79.
- Balakrishnan S., Payawal J., Schuler M.J. *et al.* Enhancing the *in vitro* and *in vivo* detection of aneuploidy by fluorescence *in situ* hybridization with the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker // Mutat. Res. 2002. V. 521. P. 81–89.
- Bentley K.S., Kirkland D., Murphy M., Marshall R. Evaluation of thresholds for benomyl- and carben-dazim-induced aneuploidy in cultured

- human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization // *Mutat. Res.* 2000. V. 464. P. 41–51.
- Cahill D.P., Lengauer C., Yu J. *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers // *Nature.* 1998. V. 392. P. 300–303.
- Carere A., Antocchia A., Cimini D. *et al.* Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants // *Environ. Mol. Mutagen.* 1998. V. 32. P. 130–138.
- Caria H., Chaveca T., Laires A., Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes // *Mutat. Res.* 1995. V. 343. P. 85–94.
- Chung H.W., Kim S.Y. Detection of chromosome-specific aneusomy and translocation by benzene metabolites in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes for chromosomes 5, 7, 8, and 21 // *J. Toxicol. Environ. Health.* 2002. V. 65. P. 365–372.
- Cortes F., Pastor N., Mateos S., Domingues I. Role of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis // *Mutat. Res.* 2003. V. 543. P. 59–66.
- Duesberg P., Li R. Multistep carcinogenesis a chain reaction of aneuploidizations // *Cell Cycle.* 2003. V. 2. № 3. P. 202–210.
- Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own // *Cell Motility and Cytoskeleton.* 2000. V. 47. P. 81–107.
- Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to degree of aneuploidy // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 13692–13697.
- Duesberg P., Li R., Rasnick D. *et al.* Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000. V. 119. P. 83–93.
- Duesberg P., Stindl R., Li R. *et al.* Aneuploidy versus gene mutation as cause of cancer // *Current Sci.* 2001. V. 81. P. 490–500.
- Eastmond D.A., Shuler M., Rupa D.S. Advantages and limitation of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells // *Mutat. Res.* 1995. V. 348. P. 153–162.
- Elhajouji A., Tibaldi F., Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes // *Mutagenesis.* 1997. V. 12. P. 133–140.
- Fabarius A., Willer A., Yerganian G. *et al.* Specific aneusomies in Chinese hamster cells at different stages of neoplastic transformation, initiated by nitrosomethylurea // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6778–6783.
- Fauth E., Scherthan H., Zankl H. Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting // *Mutagenesis.* 1998. V. 13. P. 235–241.
- Fauth E., Zankl H. Comparison of spontaneous and idoxuridine-induced micronuclei by chromosome painting // *Mutat. Res.* 1999. V. 440. P. 147–156.
- Guttenbach M., Koschorz B., Bernthaler U. *et al.* Sex chromosome loss and aging: *in situ* hybridization studies on human interphase nuclei // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. P. 1143–1150.
- Henderson L., Albertini S., Aardema M. Thresholds in genotoxicity responses // *Mutat. Res.* 2000. V. 464. P. 123–128.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., De Boeck T.S.M., Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations // *Mutat. Res.* 2002. V. 504. P. 137–148.
- Lafi A., Parry E.M., Parry J.M. The effects of benzodiazepines upon the fidelity of mitotic cell division in cultured Chinese hamster cells // *Mutat. Res.* 1987. V. 189. P. 319–332.
- Leach N.T., Jackson-Cook C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei // *Mutat. Res.* 2001. V. 495. P. 11–19.
- Lovell D.P. Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design // *Mutat. Res.* 2000. V. 464. P. 87–95.
- Maffei F., Fimognari C., Castelli E. *et al.* Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics // *Mutagenesis.* 2000. V. 15. P. 517–523.
- Marcon F., Zijno A., Crebelli R. *et al.* Chromosome damage and aneuploidy detected by interphase multicolour FISH in benzene-exposed shale oil workers // *Mutat. Res.* 1999. V. 445. P. 155–166.
- Oshimura M., Barrett J.C. Chemically-induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms of biological significance in cancer // *Environ. Mol. Mutagen.* 1986. V. 8. P. 129–159.
- Parry E.M., Parry J.M., Corso C. *et al.* Detection and characterization of mechanisms of action aneugenic chemicals // *Mutagenesis.* 2002. V. 17. P. 509–521.
- Parry J.M., Jenkins G.J., Haddad F. *et al.* *In vitro* and *in vivo* extrapolations of genotoxin exposures: consideration of factors which influence dose-response thresholds // *Mutat. Res.* 2000. V. 464. P. 53–63.
- Rajagopalan H., Lengauer C. Aneuploidy and cancer // *Nature.* 2004. V. 432. P. 338–341.
- Rupa D.S., Shuler M., Eastmond D.A. Detection of hyperploidy and breakage affecting the 1cen-1q12

- region of cultured interphase human lymphocytes treated with various genotoxic agents // *Environ. Mol. Mutagen.* 1997. V. 29. P. 161–167.
- Sari-Minodier I., Orsière T., Bellon L. *et al.* Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay // *Mutat. Res.* 2002. V. 521. P. 37–46.
- Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol // *Nature.* 1979. V. 22. P. 665–667.
- Schuessler H., Schilling K. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. II. BSA // *Int. J. Radiat. Biol.* 1984. V. 45. P. 267–281.
- Sen S. Aneuploidy and cancer // *Curr. Opinion Oncology.* 2000. V. 12. P. 82–88.
- Shi Q., Chen J., Adler I.-D. *et al.* Increased non-disjunction of chromosome 21 with age in human peripheral lymphocytes // *Mutat. Res.* 2000. V. 452. P. 27–36.
- Shuler M., Hasegawa L., Parks R. *et al.* Dose-response studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence *in situ* hybridization // *Environ. Mol. Mutagen.* 1998. V. 31. P. 263–273.
- Surralles J., Falck G., Norppa H. *In vivo* cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes // *Cytogen. Cell. Genet.* 1996. V. 75. P. 151–154.
- 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. V. 15. P. 1–7.
- Wang X., Thomas Ph., Xue J., Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes *in vitro* – evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21 // *Mutat. Res.* 2004. V. 551. P. 167–180.
- Wilson L., Morse A.N.C. Characterization of acetyl-3H-labeled vinblastine binding to vinblastine–tubulin crystals // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 121. P. 255–268.
- Wuttke K., Streffer C., Muller W.-U. Detection of chromosome 2 and chromosome 7 within X-ray- or colchicine-induced micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization // *Mutagenesis.* 1997. V. 12. P. 55–59.
- Xi L., Zhang L., Wang Y., Smith M.T. Induction of chromosome-specific aneuploidy and micronuclei in human lymphocytes by metabolites of 1,3-butadiene // *Carcinogenesis.* 1997. V. 18. P. 1687–1693.
- Zhang L., Rothman N., Wang Y. *et al.* Interphase cytogenetics of workers exposed to benzene // *Environ. Health. Perspect.* 1996. V. 104. Suppl. 6. P. 1325–1329.

BIOLOGICAL INDICATION OF THE MUTAGENIC INFLUENCES AND GENETIC INSTABILITY IN HUMAN USING EVALUATION OF NUMERICAL CHROMOSOME ABERRATIONS

V.A. Timoshevsky, S.A. Nazarenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk Scientific Center, SB RAMS, Tomsk, Russia,
e-mail: timv@img.tsu.ru

Summary

The review considers the current state, possibilities, and perspectives of using interphase cytogenetic analysis in the estimation of genomic mutations in human and animal somatic cells for aims of genetic toxicology and genetic instability analysis. Possible mechanisms underlying action of mutagens causing numeric chromosome aberrations and endogenous factors causing increase aneuploidy level in human cells are discussed.