

UDC 575.224.2

## Нехромосомный цитогенетический анализ соматических клеток млекопитающих

О. А. Ковалева, Н. А. Безденежных, Ю. И. Кудрявец

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины  
Ул. Васильковская, 45, Киев, Украина, 03022

strukov2002@mail.ru

*В обзоре рассмотрены мутационные события, происходящие в соматических клетках млекопитающих под влиянием различных эндо- и экзогенных факторов. Нехромосомный метод исследования позволяет учитывать совокупность характеристик клетки без трудоемкого анализа непосредственно самих хромосом. В результате получают информацию о митотическом (фазы митоза, количество ядер на клетку, микроядра, патологии митоза) и витальном (митотический индекс, апоптоз) статусах клетки, а также о состоянии целостности хромосом (наличие нуклеоплазматических мостов, ядерных протрузий, фрагментации хромосом, микроядер). В зависимости от изучаемого материала (эритроциты и лимфоциты периферической крови, клетки буккального эпителия, постоянные клеточные линии и т. п.) можно выбрать комплекс цитогенетических характеристик, наиболее информативный в каждом отдельном случае для определения мутационных спектров в соматических клетках млекопитающих.*

*Ключевые слова: мутагенез, соматическая клетка, цитогенетический анализ, патология.*

Изучение влияния факторов окружающей среды на генетический аппарат млекопитающих является одной из основных проблем экологической генетики. Хромосомный аппарат очень чутко реагирует на любое воздействие, начиная от электрических приборов, вирусной инфекции и заканчивая загрязнением окружающей среды. Повышенная цитогенетическая нестабильность может быть причиной бесплодия и развития онкологических заболеваний. Оценка уровня соматического мутагенеза в настоящее время является наиболее обоснованным и перспективным подходом к формированию групп высокого канцерогенного риска. Традиционно мутационный процесс в соматических клетках человека оценивают методом учета хромосомных aberrаций, являющихся общепризнанным индикатором разного рода мутагенных влияний, однако их подсчет требует высокого профессионализма исследователя и занимает много времени.

Нехромосомный метод исследования «цитома» предполагает возможность определения частоты микроядер, уровня клеточной гибели и митотической дисфункции [1, 2]. Под «цитомом» подразумевается совокупность характеристик клетки, включающая ее витальный (некроз, апоптоз) и митотический (микроядра, метафазы, анафазы, одно- и двуядерность) статусы, а также состояние хромосомной целостности (наличие микроядер, нуклеосомных мостов, ядерных почеч, распределения хромосомоспецифичных сигналов). В данном обзоре представлены всевозможные варианты цитогенетических нарушений, которые можно учитывать при оценке генетического благополучия у лиц, подвергшихся влиянию неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе на производстве. Естественно, в зависимости от изучаемой ткани (эритроциты и лимфоциты периферической крови, клетки буккального эпителия и т. д.) исследователь может выбрать цитогенетические характеристики, наиболее информативные для каждого отдельного случая.

Данная информация может быть полезна и для цитогенетиков, работающих с постоянными клеточными культурами.

**Патологии митоза.** В литературе описаны три критерия для выявления нарушений митотической активности в соме: 1) непрекращающееся деление; 2) многополюсность анафазы и 3) изменение содержания ДНК. Каждое событие можно проследить, используя методы световой микроскопии [3]. Процесс митотического деления клеток очень чувствителен к действию самых разнообразных факторов. Возникающие патологические митозы включают в себя фрагментацию хромосом, хроматидные мосты, отставание хромосом в метакинезе, отставание хромосом при расхождении к полюсам, рассеивание гиперспирализованных хромосом, многополюсные митозы, полые метафазы.

Фрагментация и пульверизация хромосом являются основной формой митотической смерти клетки, которая идентифицируется общим цитогенетическим анализом (рис. 1, см. вклейку – все клеточные линии, использованные в экспериментах, получены из Клеточного банка линий из тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины). Об отличии этой патологии от апоптоза свидетельствуют различные исследования, в том числе и биохимические [4].

Морфологически эту патологию можно разделить, по крайней мере, на три группы: ранняя фрагментация хромосом, при которой разрушены несколько хромосом; средняя стадия дробления, на которой фрагментировано значительное число хромосом; поздняя стадия дробления, когда все или большинство хромосом фрагментированы. Исходя из этого можно предположить, что хромосомная фрагментация – это прогрессивный процесс постепенной деградаци хромосом [4]. При пульверизации хромосомы распадаются на очень мелкие фрагменты, причем большинство из них лишены кинетохора и поэтому остаются неподвижными. Способностью к индукции пульверизации хромосом обладают вирусы кори, паротита, истинной чумы птиц, болезни Ньюкасла, аденовирус 12-го типа, простого герпеса и клещевого энцефалита [5]. Инкубация культуры клеток HeLa и Lu-106 с  $H^3$ -тимидином

позволила установить, что пульверизация возникает на S-стадии клеточного цикла. Хромосомы, на момент воздействия вируса прошедшие период репликации, не подвергаются пульверизации [6]. В литературе имеются данные, позволяющие считать, что пульверизация является следствием локальной конденсации хромосом. Стенман и Саксела [7] полагают, что пульверизацию правильнее было бы называть преждевременной конденсацией хромосом.

В других случаях патологии митоза в результате объединения двух поврежденных хромосом формируется дицентрическая хромосома. Под воздействием обоих митотических центров хромосома растягивается между ними и образует мост, что влияет на течение заключительных стадий митоза и задерживает цитотомиию (рис. 2, см. вклейку).

Отставание хромосом в метакинезе и при расхождении к полюсам возникает при повреждении кинетохора и/или веретена деления (рис. 3, см. вклейку).

Наиболее часто встречается остановка митоза на стадии метафазы. Это происходит в результате изменений веретена деления. Многие вещества, блокирующие митоз, среди которых такие цитостатики, как колхицин и колцемид, препятствуют полимеризации тубулинов. Вследствие этого новые микротрубочки веретена не образуются, а готовые полностью разбираются. При этом митотические хромосомы собираются в центре клетки, но не формируют метафазной пластинки, а располагаются без всякого порядка (K-митоз).

К сходным выводам приводит действие на клетку ингибиторов синтеза АТФ (нитрофенол, олигомицин) и ряда ядовитых веществ (меркаптоэтанол). Если действие этих факторов кратковременно, то возможны восстановление микротрубочек веретена и клеточное деление. При умеренных воздействиях клетки могут не погибнуть, а без митоза вступить в следующий клеточный цикл. В этом случае неразшедшие хромосомы деконденсируются, образуются новая ядерная оболочка и новое, но уже тетраплоидное ядро.

Так возникают полиплоидные клетки под влиянием колхицина. Восстановление нормального митоза после его блокирования колхицином связано с дополнительными стадиями синтеза белка (рефор-

мирование микротрубочек веретена деления). Вероятно, активность процессов реформирования и сборки микротрубочек во время восстановления зависят от степени их разрушения и характера повреждающего агента [8]. К одному из видов К-митоза относятся беспорядочное рассеивание гиперспирализованных хромосом в метафазе.

К аномалиям деления клеток принадлежат и многополюсные митозы. В этом случае в метафазе образуется не биполярное веретено, а веретено с тремя или четырьмя полюсами. Такая аномалия обусловлена нарушениями функций центриолей: диплосома распадается на две активные моноцентриоли. Эти изменения могут происходить спонтанно (что характерно для опухолевых клеток) или после воздействия различных ингибиторов митотического деления. Указанные аномальные многополюсные митотические фигуры (рис. 4, см. вклейку) способны вступать в анафазу и участвовать в расхождении хромосом к полюсам, вслед за чем может наступить цитотомия с образованием трех, четырех и более клеток. В этих случаях равномерного распределения хромосом не происходит, а образовавшиеся клетки содержат случайные и уменьшенные наборы хромосом. Сформировавшиеся анеуплоидные клетки обычно быстро погибают.

Фигуры, представленные на рис. 4, свидетельствуют не только о «расщеплении веретена» (центриолей), но и о нарушениях отдельных нитей веретена или центромер хромосом, в результате чего отдельные хромосомы не входят в образовавшиеся группы.

Многополюсный митоз можно рассматривать двояко: как способ снижения ploидности клеточной популяции в норме (при контролируемом распределении хромосомных наборов) [9] или как одну из причин нарастания анеуплоидии, например, опухолевых клеток (при отсутствии контроля распределения хромосомных наборов) [10]. Поэтому исследование закономерностей образования многополюсного митотического аппарата имеет как общебиологическое, так и практическое значение.

Аномалии митотического деления могут определяться нарушениями цитотомии. В этом случае возникают двуядерные и многоядерные клетки, что связано с подавлением образования актиновых мик-

рофиламентов, участвующих в образовании клеточной перетяжки в конце телофазы (рис. 5, см. вклейку).

Полая метафаза имеет вид кольца хромосом, которые собираются в метафазную пластинку, располагаясь по периферии клетки (рис. 6, см. вклейку).

Нередко встречаются комбинированные формы патологии митоза (например, многополюсные митозы с отставанием хромосом или с мостами и т. д.) (рис. 7, см. вклейку).

Вследствие патологических митозов возникают мутации, появляются хромосомные aberrации, играющие весьма существенную роль в неопластической трансформации клеток. Патологические митозы в нормальных тканях встречаются в 2–3 % клеток, в то время как в опухолевых – в 30–46 % клеток. Установлено, что чем более выражена морфологическая анаплазия опухолевых клеток и чем выше митотическая активность клеток, тем чаще встречаются патологические митозы.

**Многоядерные клетки и амитоз.** Многоядерные клетки регистрируют при патологических процессах, обуславливающих развитие многих заболеваний [11, 12]. Разработка перспективных методов диагностики и коррекции заболеваний зависит от понимания сути механизмов образования многоядерных клеток и от их связи с причинами, лежащими в основе патологического процесса. Формирование полинуклеаров происходит за счет реализации четырех механизмов: в результате слияния одноядерных клеток [13], в случае блокады цитокинеза [14], вследствие многополюсных митозов [15] и при амитотическом делении ядра [16].

В отличие от первых трех хорошо изученных механизмов амитоз достаточно редко выступает в качестве объекта исследования и объем информации по этому вопросу крайне ограничен. Амитоз отмечен в клетках различного происхождения [17–19], в интактных клетках, культивируемых *in vitro* [18], и в клетках опухолей [19]. Он имеет важное значение для формирования многоядерных клеток [16] и представляет собой стадийный процесс [20], в ходе которого последовательно происходят растяжение ядра, инвагинация кариолеммы и перетяжка ядра на части [21] (рис. 8, см. вклейку).

Хотя объем достоверной информации о молекулярных и субклеточных механизмах амитоза не-

Figures to article by O. A. Kovalova et al.

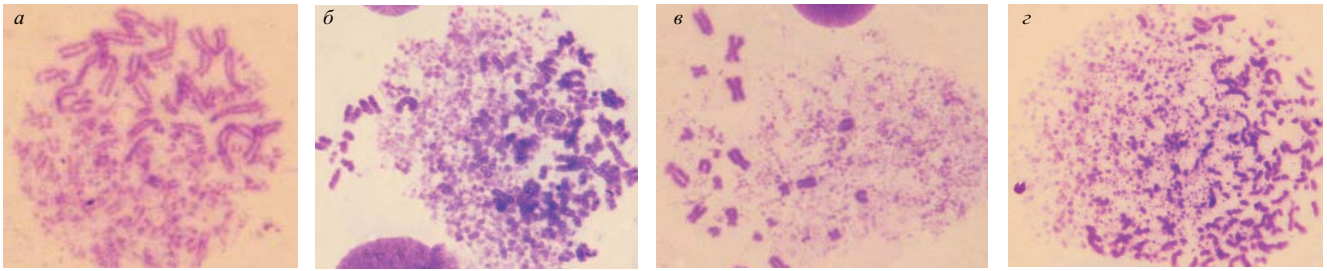


Рис. 1. Разные варианты фрагментации и пульверизации хромосом: *а, б* – средняя стадия дробления (фрагментации); *в, з* – поздняя стадия дробления с мелкими фрагментами – пульверизация. Клеточная линия K562 (хроническая миелоидная лейкемия человека).  $\times 1000$

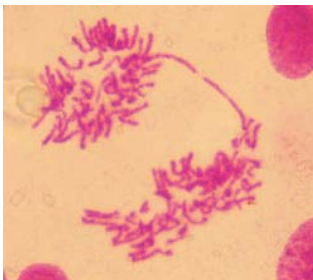


Рис. 2. Хроматидный мост. Клеточная линия А-549 (карцинома легкого человека).  $\times 1000$

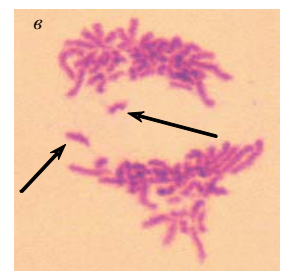
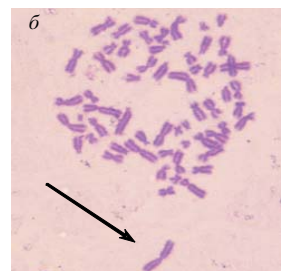
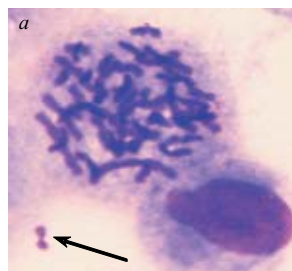


Рис. 3. Отставание хромосом в метафазе (*а* – клеточная линия А-549; *б* – клеточная линия Du-145 – карцинома простаты человека) и в анафазе (*в* – клеточная линия МКС – рак молочной железы крысы).  $\times 1000$

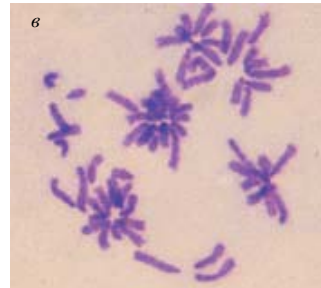
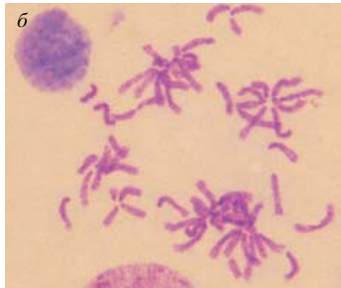
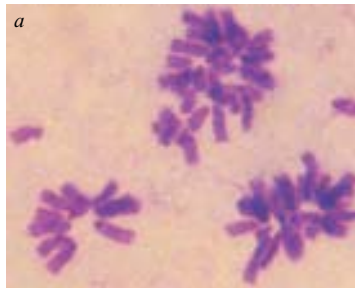


Рис. 4. Многополюсные митотические фигуры: *а* – трехгрупповая фигура; *б, в* – многогрупповые фигуры. Клеточная линия SMS-180, полученная из опухолевого штамма S-180 – спонтанная карцинома мыши.  $\times 1000$

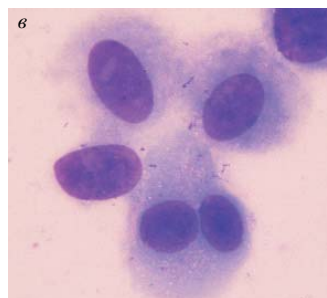
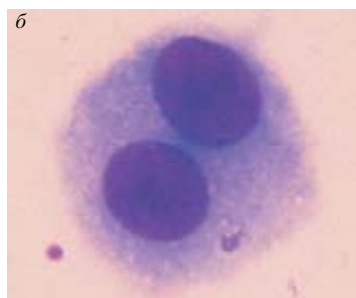
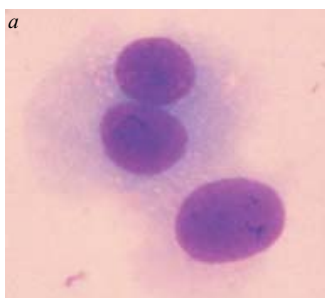


Рис. 5. Двухядерные клетки: *а, в* – без микроядра; *б* – с микродром. Клеточная линия А-549.  $\times 1000$



Рис. 6. Полая метафаза. Клеточная линия А-549.  $\times 1000$



Рис. 7. Многополюсный митоз с хроматидным мостом. Клеточная линия МКС.  $\times 1000$

достаточен, все же имеются сведения об участии клеточного центра в реализации данного процесса. Также известно, что если ядра сегментируются под действием микрофиламентов и микротрубочек, то роль элементов цитоскелета не исключена и в амитотическом делении.

В литературе есть также данные о том, что немитотическое деление ядра – это процесс, благодаря которому клетки избавляются от избыточно амплифицированной ДНК и что такие дефекты клеток приводят к формированию микроядер [22] (рис. 9, см. вклейку).

О фундаментальном значении амитоза в реализации внутриклеточных процессов свидетельствует факт его существования во многих типах клеток и при разных условиях. Так как роль амитотического деления полиплоидных ядер в образовании полинуклеаров считается доказанной, то основной смысл амитоза состоит в установлении оптимальных ядерно-цитоплазматических отношений, позволяющих клеткам адекватно осуществлять разнообразные функции [16].

**Микроядерный тест.** В начале 70-х гг. XX века Хеддл и Шмид независимо друг от друга предложили микроядерный тест, основанный на учете микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга [23, 24]. Первоначально он был разработан для эритроидных клеток костного мозга, а позже его стали применять для учета микроядер в ранних сперматидях, печени плода при изучении трансплацентарной активности химических соединений, в клетках слизистой рта, лимфоцитах человека, в клетках печени и толстой кишки животных. К настоящему времени учет микроядер стал возможен в большинстве популяций делящихся клеток. Показано, что микроядерный тест по чувствительности не уступает тесту по выявлению хромосомных аберраций в клетках костного мозга животных, являясь одновременно гораздо менее трудоемким.

Микроядра образуются в процессе клеточных делений из отстающих ацентрических фрагментов, возникших при разрыве хромосом (кластогенный эффект), и отстающих хромосом (анеугенный эффект). Микроядра могут также формироваться за счет немитотической экструзии хроматина из интерфазного ядра [22]. Они не содержат ядерной обо-

лочка, способны к лизису или могут включаться в ядро при последующем митозе [5] (рис. 10, см. вклейку).

Микроядерный тест является общепринятым цитогенетическим способом оценки мутагенного действия агентов различной природы. С его помощью на мутагенную активность проверено большое количество химических, физических и биологических агентов [25–27], тест применяют уже на первом этапе выявления потенциальных мутагенов и канцерогенов. К его преимуществам следует отнести быстроту исследования независимо от кариотипа вида, нередко характеризующегося значительным количеством мелких и плохо различимых хромосом, надежность, а также возможность проведения тестирования в тканях с низкой митотической активностью. Микроядерный анализ проводят в клетках эмбрионов, в сперматидях, ооцидах, что особенно важно при прогнозе последствий для будущего потомства.

Использование микроядерного теста в слушающихся клетках человека – самый чувствительный и быстрый метод выявления действия мутагена/карциногена, так же как и антимутагена/антикарциногена на человеческий организм *in vivo* [28]. Исследование клеток буккального эпителия – наиболее удобный способ учета цитогенетических аномалий для людей, проживающих на неблагоприятных территориях или работающих на вредных производствах [29].

Анализ микроядер в полихроматофильных эритроцитах – менее распространенный тест, однако не менее информативный [26]. Например, увеличение количества эритроцитов с микроядрами в периферической крови у больных атопической бронхиальной астмой прямо пропорционально степени тяжести заболевания. Образование микроядер может быть связано с повышением уровня эндомутагенеза в организме больных и, вероятно, выполняет определенную роль в регуляции процесса апоптоза [25].

Микроядерный тест в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) в последние десятилетия использовали для оценки влияния генотоксических агентов на человека. Концептуальной основой этого подхода стала гипотеза, что генетические повреждения в ЛПК отражают критические события

Figures to article by O. A. Kovalova et al.

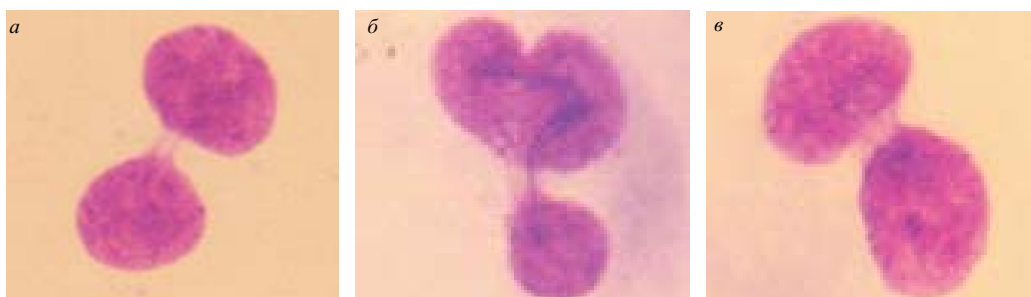


Рис. 8. Амитоз с образованием межядерного моста: а, в – ядра с разной степенью расхождения; б – ядро с начальной стадией образования второго моста. Клеточная линия А-549. × 1000

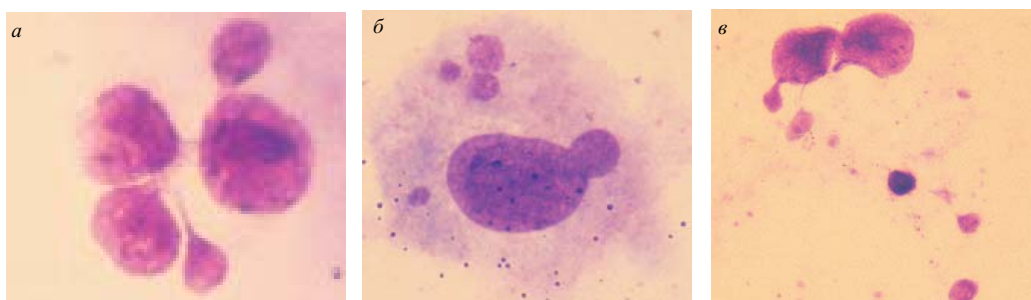


Рис. 9. Амитоз с формированием микроядер: а, б – клеточная линия А-549; в – клеточная линия МКС. × 1000

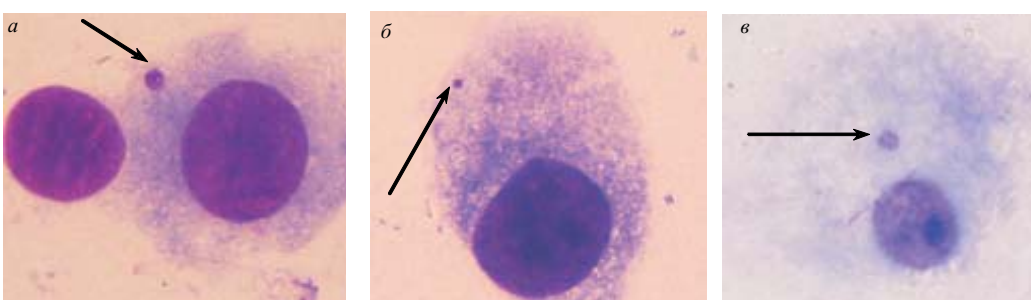


Рис. 10. Микроядра в одноядерных клетках: а, б – клеточная линия А-549; в – клеточная линия МКС. × 1000

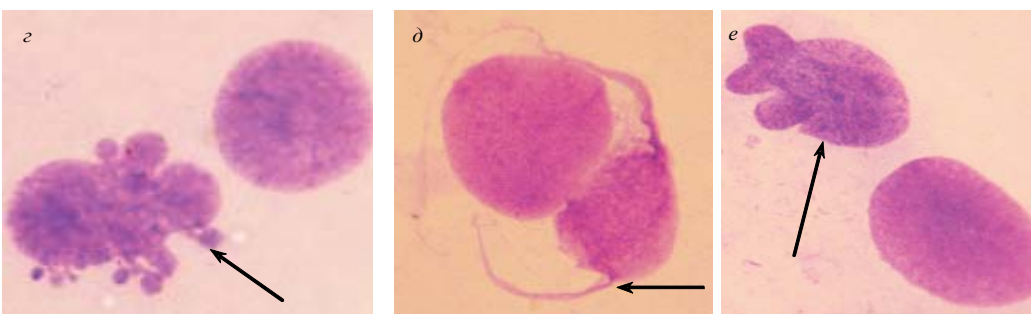
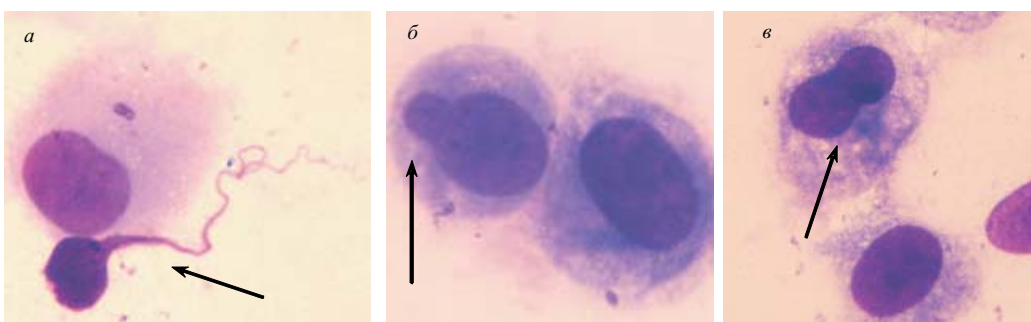


Рис. 11. Различные ядерные протрузии (указаны стрелками): а – ядро с «хвостом»; б – ядерная почка; в – двойное ядро; г – множественные протрузии; д – ядро с двумя «хвостами»; е – ядро с несколькими почками. Клеточная линия А-549. × 1000

для канцерогенных процессов в тканях-мишенях [30]. По данным Коллюбаевой [31], микроядерный тест целесообразно использовать при определении уровня облучения больших групп людей в дозе до 1 Гр. Применение в качестве показателя клеток с тремя и более микроядрами может стать дополнительным свидетельством факта облучения, поскольку такие формы аномалий не встречаются у здоровых лиц.

Кроме того, учет микроядер в ЛПК людей широко применяют в качестве биомаркера онкологического риска. Высокая частота клеток с микроядрами ассоциирована с наличием разных онкологических заболеваний, в том числе мочевого пузыря и желудочно-кишечной систем [27, 32].

#### **Микроядерный тест в двуядерных клетках.**

В мировой практике определения генетических повреждений часто используют анализ двуядерных цитокинез-блокированных лимфоцитов с возможностью выявления частоты микроядер, уровня клеточной гибели и митотической дисфункции [1, 33].

Изначально метод совершенствовался для измерения частоты микроядер, однако затем параллельно его стали применять для учета хромосомных мостов, ядерных аномалий, некротических, апоптических и делящихся клеток. Хромосомные мосты происходят от дицентрических хромосом, у которых центромеры размещаются на противоположных полюсах клетки в анафазе, их наличие свидетельствуют о хромосомных перестройках или теломерных ассоциациях. Повреждение хромосомного моста приводит к формированию микроядер.

Гибридизация с использованием флуоресцентных ДНК-зондов на двуядерных клетках позволяет определять частоту анеугенных событий – нерасхождения и отставания отдельных хромосом [2]. Необходимость детекции анеугенной компоненты воздействия продиктована колоссальным мутагенным потенциалом анеуплоидии как генетического нарушения, играющего ключевую роль в злокачественной трансформации клеток и клональной эволюции неоплазии [34].

Микроядерный анализ в цитокинез-блокированных клетках – это всесторонний тест, он дает возможность учитывать все клетки, в том числе некротические и апоптические, а также количество

ядер на клетку для выявления цитотоксической и митотической активности [1].

Как правило, наряду с учетом микроядер ведут подсчет различных морфологических изменений структуры ядра – всех видов ядер, имеющих форму, отличающуюся от округлой или овальной, и содержащих различного вида лопасти и «выбухания», так называемых ядерных протрузий.

**Ядерные аномалии.** Ядерные протрузии (protrusions, broken eggs, nucleoplasmic bridges, nucleus buds) – ДНК-содержащие образования, расположенные вне ядра, шаровидной, нитевидной или иной формы в цитоплазме, четко ограниченные от ядра и соединяющиеся с ним перемычкой. К ядрам атипичной формы относят также клетки со сдвоенным ядром (клетки с двумя неразозшедшимися ядрами). Другие названия – ядро с перетяжкой, ядро с насечкой.

Среди разновидностей морфологических ядерных аномалий можно выделить ядра с выростами в пространство цитоплазмы, так называемые «хвостатые ядра» [35] (рис. 11, см. вклейку).

Основным механизмом возникновения атипичных ядер и протрузий, возможно, является не кластогенное, а анеугенное действие токсикантов, связанное с повреждением белков веретена деления клетки [36]. Сдвоенные ядра могут образовываться в результате незавершенного митоза [37].

Ядерные аномалии, по-видимому, указывают не только на дегенеративные процессы в клетках, в которых они наблюдаются, но и на факт предшествующих хромосомных aberrаций, вследствие которых они сформировались. Например, основной пул дицентрических хромосом в облученных *in vitro* и культивированных с добавлением цитохалазина Б лимфоцитах человека трансформируется в гантелевидные ядра [38]. Появление клеток с определенными видами морфологических аномалий ядер может быть ассоциировано с кольцевыми хромосомами, являющимися надежными цитогенетическими маркерами лучевых воздействий [35, 39].

Различные ядерные выросты связывают также с механизмами избавления клеткой от избыточно амплифицированной ДНК. Известно, что амплификация генов – это стадия прогрессии опухолевых процессов в клетке [39].

Figures to article by O. A. Kovalova et al.

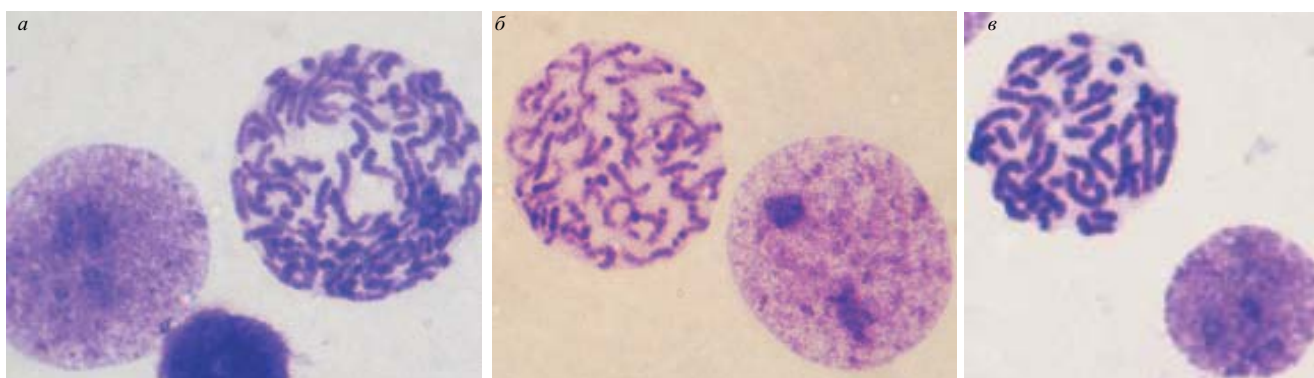


Рис. 12. Преждевременная конденсация хромосом (РСС): *a* – полиплоидная клетка с РСС; *б* – начальная стадия конденсации; *в* – диплоидная клетка с РСС. Клеточная линия МКС.  $\times 1000$

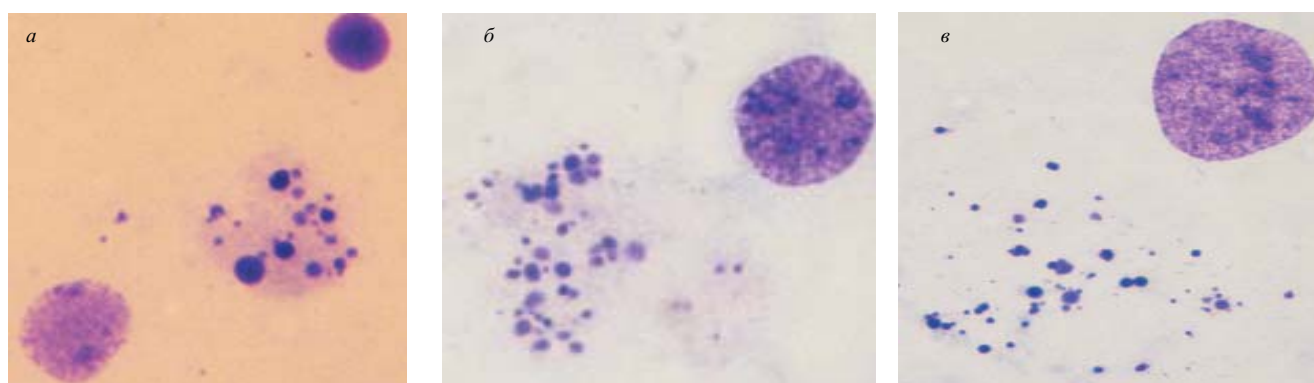


Рис. 13. Апоптоз: *a-в* – разные степени распада ядра. Клеточная линия А-549.  $\times 1000$



К появлению клеток с аномально измененными ядрами приводит также воздействие ионизирующей радиации на клеточные популяции [38], которые в клинической цитологии относят к проявлению лучевых патоморфозов [40]. Наличие повышенной частоты клеток с ядерными протрузиями в лимфоцитах людей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, считается негативным цитогенетическим показателем [41].

**Преждевременная конденсация хромосом.** У млекопитающих конденсация хромосом тесно связана с разрушением ядерной оболочки в ранней профазе митоза и с формированием веретена деления. В некоторых случаях такая конденсация происходит до вступления клеток в митоз. Этот феномен получил название «преждевременная конденсация хромосом» (РСС – premature chromosome condensation) (рис. 12, см. вклейку).

РСС впервые описана в 1970 году Джонсон и Рао при использовании метода межклеточного слияния [42]. Было показано, что РСС происходит в том случае, когда одна из слившихся клеток вступает в митоз. Первоначально это событие связывали с применением УФ-инактивированного вируса Сендай [42], впоследствии были разработаны методы слияния клеток с использованием химических веществ, например, полиэтиленгликоля [43].

При РСС хромосомы могут иметь различную морфологию, что определяет стадию индуцирования клетки. По Стевенсу [44], при РСС в G2-фазе хромосомы морфологически сходны с нормальными митотическими хромосомами с сестринскими хроматидами и без пробелов, хотя хроматиды у них длиннее, чем у метафазных хромосом, т. е. как у хромосом в начале профазы. При РСС в G1-фазе в результате незапущенной репликации ДНК присутствуют несестринские хроматиды. В S-фазе преждевременно конденсированные хромосомы выглядят, как конденсированные части хроматина, появляются также хромосомы с множественными пробелами, количество которых зависит от степени репликации ДНК [45].

К преждевременной конденсации ограниченно количества хромосом может приводить присутствие многоядерных клеток с асинхронной репликацией [44].

Высокая частота встречаемости спонтанной РСС, типичная для опухолевых клеток, связана с дефектом «точки проверки» на стадии G2/M клеточного цикла (дисфункции белка P53, накопления циклина B1, активации cdc2 – циклин-зависимой киназы) и является одним из источников генетической гетерогенности, иммортализации и адаптации клеточных популяций к разным условиям химио- и радиотерапии опухолей [46, 47].

Эта патология клеточного цикла может вызывать увеличение доли анеу- и полиплоидных клеток, появление которых, очевидно, способствует ускорению злокачественной трансформации клеток [48]. Учет клеток с РСС можно использовать при цитогенетическом анализе покоящихся и стареющих клеток. Такой анализ имеет большое значение при оценке кариотипического разнообразия, на его основе можно прогнозировать клиническое течение различных заболеваний, включая микроцефалию и умственную отсталость [49], а соотношение между клетками с РСС и общим пулом делящихся клеток может служить дополнительной цитогенетической характеристикой при оценке вероятности генетической нестабильности клеточных популяций [48].

Обнаружено, что увеличение частоты встречаемости интерфазных клеток с РСС тесно связано с клеточной гибелью [50]. Предполагают, что РСС предшествует одному из вариантов клеточной гибели – «митотической катастрофе» (МС), осуществляемой с участием иных, чем при апоптозе, внутриклеточных механизмов [51].

**Митотическая катастрофа** наблюдается после действия ряда факторов стресса, включая тепловой шок, химические агенты, ионизирующее облучение, и характеризуется измененной клеточной морфологией [46]. РСС является ранним этапом этого процесса. Далее такие клетки либо не достигают цитокинеза, либо делятся и почти сразу после этого сливаются, образуя фигуры, типичные для гибели по типу МС. В то же время показано, что часть клеток переживает МС и в их потомстве с высокой частотой обнаруживаются анеу- и полиплоиды [46, 47].

Понятие «митотическая катастрофа» введено для обозначения гибели клеток, в которых проявляются признаки патологии митоза. В последние годы дискутируется вопрос о том, что следует назы-

вать митотической катастрофой. Согласно одним представлениям, МС – это реализация апоптической программы собственно в процессе митоза [52]. При этом сегрегация хромосом отсутствует и клетка блокируется в одной из фаз митоза. Как правило, блокирование осуществляется в так называемом К-митозе (колхицино-подобном митозе), когда в митотической клетке нарушены организация веретена и выстраивание хромосом в виде метафазной пластинки. Далее происходят активация каспаз и последующие деструктивные события по типу апоптических. Митохондриальный путь активации программы апоптоза считают преобладающим при гибели клеток собственно в митозе.

Вторым подтипом МС является гибель клеток, перешедших после аномального митоза в следующую G1-фазу без нормальной сегрегации хромосом и образования дочерних клеток [53], т. е. постмитотическая гибель полиплоидных клеток. При общей эуплоидности полиплоидной клетки ее отдельные ядра являются в основном анеуплоидными. Данный подтип МС можно назвать апоптозом клетки, прошедшей полиплоидизирующий митоз.

Причиной МС считают изменение процессов контроля в клетках, в которых могли произойти повреждения ДНК или нарушения сборки веретена [52]. Ключевым моментом в блокировании клеточного цикла и в индукции в этих клетках апоптоза является экспрессия белка p53, выполняющего функцию фактора транскрипции для p21 – ингибитора G1-фазы клеточного цикла – и ряда проапоптических белков.

**Апоптоз.** Клетки с цитогенетическими нарушениями являются дефектными и могут удаляться из популяции за счет интенсификации апоптоза. Программа апоптической гибели состоит из следующих главных этапов: 1) индукция программы апоптоза; 2) активация проапоптических белков; 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени; 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка; 5) фрагментация клетки на апоптические тельца; 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками.

В запуске апоптоза участвуют разнообразные органеллы, однако в первую очередь – это плазматическая мембрана и митохондрии.

Индукция апоптоза и проапоптических белков активируют каспазы (цистеиновые протеазы). Выделяют инициаторные и эффекторные каспазы, функционирующие как протеолитические каскады. Под влиянием эффекторных каспаз разрушается большинство белков, участвующих в поддержании гомеостаза и репарации компонентов клетки, белков – регуляторов клеточного цикла, структурных белков и т. д. В результате действия эффекторных каспаз и активированных ими ферментов (эндонуклеаз, гелизолина и др.) разрушается также внутриядерная ламина, нарушается целостность ДНК, происходит специфическая компактизация хроматина, наблюдается распад элементов цитоскелета, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и т. п. Кроме каспазного, выделяют некаспазный механизм апоптической смерти, для которой характерны выход из митохондрий и миграция в ядро флавопротеина AIF и эндонуклеазы G, вызывающих распад ядерной ДНК на крупные фрагменты. При этом наблюдается конденсация хроматина и экспозиция фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны [54].

Морфологические превращения в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза являются уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптических телец, содержащих фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т. д. (рис. 13, см. вклейку).

Частота встречаемости апоптических клеток в качестве единственного показателя, очевидно, не может служить адекватным критерием генотоксических эффектов, поскольку она контролируется целым ансамблем генов, а также тканеспецифической активностью макрофагальных клеточных элементов, элиминирующих апоптические клетки.

Таким образом, исследование цитотома позволяет всесторонне оценить состояние клеточной популяции. Об анеугенных событиях, таких как повреждение белков веретена деления клетки и нарушение цитотомии, свидетельствует увеличение частоты клеток с микроядрами (если микроядра образованы отстающими хромосомами), с различными ядерными протрузиями, амитотическими ядрами, с двумя

или более ядрами, а также многополюсные митозы. Кластогенные повреждения выражаются в формировании микроядер (при разрыве хромосом), хроматидных и/или хромосомных мостов. Необратимые события – изменение процессов контроля в клетке, в которой произошло повреждение ДНК или нарушение сборки веретена, – приводят к программированной клеточной гибели. Нехромосомный анализ позволяет выявить комплекс цитогенетических характеристик в соматических клетках млекопитающих, наиболее информативный для каждого отдельного случая.

O. A. Kovalova, N. A. Bezdeneznykh, Y. I. Kudryavets

Nonchromosomal cytogenetic analysis of mammal somatic cells

R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology  
45, Vasylykivska Str., Kyiv, Ukraine, 03022

#### Summary

*The mutational events that take place in mammalian somatic cells influenced with different endogenous and exogenous factors are presented in this review. The nonchromosomal method of research allows taking into account the complex cell characteristics without time-consuming analysis of the chromosomes as such. As a result, the information can be obtained about the mitotic (phases of mitosis, the number of nuclei per cell, micronuclei, pathology of mitosis) and vital (mitotic index, apoptosis) cell statuses, as well as about the state of chromosomal integrity (the presence of nucleoplasmic bridges, nucleus protrusions, chromosome fragmentation, micronuclei). Depending on the material studied (erythrocytes and lymphocytes of peripheral blood, buccal cells, permanent cell lines etc.), a complex of cytogenetic characteristics can be selected for each case which is the most informative for determination of the mutational spectra in mammalian somatic cells.*

*Keywords: mutagenesis, somatic cells, cytogenetic analysis, pathology.*

O. A. Ковальова, Н. О. Безденежных, Ю. И. Кудрявец

Нехромосомний цитогенетичний аналіз соматичних клітин ссавців

#### Резюме

*В огляді розглянуто мутаційні події, які відбуваються в соматичних клітинах ссавців під впливом різних ендо- та екзогенних факторів. Нехромосомний метод дослідження дозволяє враховувати сукупність характеристик клітини без трудомісткого аналізу безпосередньо самих хромосом. У результаті можна отримати інформацію про мітотичний (фази мітозу, кількість ядер на клітину, микроядра, патології мітозу) і вітальний (мітотичний індекс, апоптоз) статуси клітини, а також про стан цілісності хромосом (наявність нуклеоплазматичних мостів, ядерних протрузій, фрагментації хромосом, микроядер). Залежно від досліджуваного матеріалу (еритроцити і лімфоцити периферійної крові, клітини букального епітелію, постійні клітинні лінії тощо) можна обрати комплекс цитогенетичних характеристик, які є найінформативнішими для кожного окремого випадку при виявленні мутаційних спектрів у соматичних клітинах ссавців.*

*Ключові слова: мутагенез, соматична клітина, цитогенетичний аналіз, патологія.*

#### REFERENCES

1. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a «cytome» assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // *Mutat. Res.*—2006.—**600**, N 1–2.—P. 58–66.
2. Timoshevsky V. A., Lebedev I. N., Vasiliev S. A., Sukhanova N. N., Yakovleva Y. S., Torkhova N. B., Puzyrev V. P. Chromosomal and cytomal analysis of somatic cell in workers of radiochemical industry with incorporated <sup>239</sup>Pu // *Radiation Biology. Radioecology.*—2010.—**50**, N 6.—P. 672–680.
3. Steinbeck R. G. Pathologic mitoses and pathology of mitosis in tumorigenesis // *Eur. J. Histochem.*—2001.—**45**, N 4.—P. 311–318.
4. Stevens J. B., Liu G., Bremer S. W., Ye K. J., Xu W., Xu J., Sun Y., Wu G. S., Savasan S., Krawetz S. A., Ye C. J., Heng H. H. Mitotic cell death by chromosome fragmentation // *Cancer Res.*—2007.—**67**, N 16.—P. 7686–7694.
5. Ilyinskikh N. N., Novitsky V. V., Vanchugova N. N., Ilyinskikh I. N. Micronucleus test and cytogenetic instability.—Tomsk: Univ. press, 1992.—272 p.
6. O'Neill F. J., Miles C. P. Origin of nuclei in spontaneous HeLa cell chromosome pulverization // *J. Natl. Cancer Inst.*—1971.—**46**, N 5.—P. 1085–1092.
7. Stenman S., Saksela E. The relationship of Sendai virus-induced chromosome pulverization to cell cycle in HeLa cells // *Hereditas.*—1971.—**69**, N 1.—P. 1–14.
8. Alov I. A., Aspiz M. E., Zapara O. M. Mechanism of reversibility of colchicine mitosis induced by colcemid // *Bull. Exp. Biol. Med.*—1976.—**82**, N 7.—P. 874–876.
9. Goyanes-Villaescusa V. Cycles of reduplication in megakaryocyte nuclei // *Cell Prolif.*—1969.—**2**, N 2.—P. 165–168.
10. Pan H., Zhou F., Gao S. J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of chromosome instability in primary human endothelial cells // *Cancer Res.*—2004.—**64**, N 12.—P. 4064–4068.
11. Paoli J., Smedh M., Wennberg A. M., Ericson M. B. Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics // *J. Invest. Dermatol.*—2008.—**128**, N 5.—P. 1248–1255.
12. Tashiro T., Kawakita C., Takai C., Yoshida T., Sakiyama S., Kondo K., Sano N. Primary pulmonary malignant peripheral nerve sheath tumor: a case report // *Acta Cytol.*—2007.—**51**, N 5.—P. 820–824.
13. Murch A. R., Grounds M. D., Marshall C. A., Papadimitriou J. M. Direct evidence that inflammatory multinucleate giant cells form by fusion // *J. Pathol.*—1982.—**137**, N 3.—P. 177–180.
14. Zhu J., Beattie E. C., Yang Y., Wang H. J., Seo J. Y., Yang L. X. Centrosome impairments and consequent cytokinesis defects are possible mechanisms of taxane drugs // *Anticancer Res.*—2005.—**25**, N 3B.—P. 1919–1925.
15. Yun C., Cho H., Kim S. J., Lee J. H., Park S. Y., Chan G. K., Cho H. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway // *Mol. Cancer Res.*—2004.—**2**, N 3.—P. 159–169.
16. Walen K. H. Spontaneous cell transformation: karyoplasts derived from multinucleated cells produce new cell growth in senescent human epithelial cell cultures // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*—2004.—**40**, N 5–6.—P. 150–158.
17. Kuhn E. M., Therman E., Susman B. Amitosis and endocycles in early cultured mouse trophoblast // *Placenta.*—1991.—**12**, N 3.—P. 251–261.
18. Arkhipov S. A., Shkurupiy V. A., Ijine D. A., Ignatovich N. V., Akhromenko E. S., Arkhipova V. V. Formation and some cytophysiological characteristics of polynuclear macrophages in primary cultures of peritoneal cells // *Bull. Exp. Biol. Med.*—2008.—**146**, N 6.—P. 838–841.

19. *Elias H., Fong B. B.* Nuclear fragmentation in colon carcinoma cells // *Hum. Pathol.*—1978.—**9**, N 6.—P. 679–684.
20. *Chen Y. Q., Wan B. K.* A study on amitosis of the nucleus of the mammalian cell. I. A study under the light and transmission electron microscope // *Acta. Anat. (Basel).*—1986.—**127**, N 1.—P. 69–76.
21. *Kuhn E. M., Therman E., Susman B.* Amitosis and endocycles in early cultured mouse trophoblast // *Placenta.*—1991.—**12**, N 3.—P. 251–261.
22. *Manskih V. N.* On the question the about mechanism of micronuclei formation in normal conditions and under the influence of N-nitroso-N-metilkarbamid // *Bull. Exp. Biol. Med.*—2006.—**141**, N 2.—P. 217–220.
23. *Schmid W.* The micronucleus test // *Mutat. Res.*—1975.—**31**, N 1.—P. 9–15.
24. *Heddle J. A.* A rapid *in vivo* test for chromosome damage // *Mutat. Res.*—1973.—**18**, N 2.—P. 187–190.
25. *Vodunon A. S., Ponomareva N. A., Abramova Z. I.* Cytogenetic changes in erythrocytes of patients with atopic bronchial asthma // *Scientific notes of the Kazan State University. A series of nature science.*—2008.—**150**, N 2.—P. 101–105.
26. *Kovalova O., Kobozeva N., Burdo O., Glazko T.* Micronuclei test as method of definition the seasonal alteration of cytogenetic characteristics in mammals // *Rare theriofauna and its conservation. Series Proc. Theriological.*—Luhansk, 2008.—Vol. 9.—P. 266–269.
27. *Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W., Holland N., Kirch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M. P., Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M. R., Zijno A., Norppa H., Fenech M.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans // *Carcinogenesis.*—2007.—**28**, N 3.—P. 625–631.
28. *Nersesian A. K.* The micronucleus test in human exfoliative cells as a method for studying the action of mutagens/carcinogens // *Tsitol. Genet.*—1996.—**30**, N 5.—P. 91–96.
29. *Rajkokila K., Shajithanoop S., Usharani M. V.* Nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of petrol station attendants in Tamilnadu, South India // *J. Med. Genet. Genom.*—2010.—**2**, N 2.—P. 18–22.
30. *Lando C., Hagmar L., Bonassi S.* Biomarkers of cytogenetic damage in humans and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH) // *Med. Lav.*—1998.—**89**, N 2.—P. 124–131.
31. *Koliubaeva S. N.* Chromosomal aberrations, micronuclei and apoptosis in lymphocytes at radiation and other pathological states: dis. ... Doctor of Science: 01.03.01 – radiobiology.— St. Petersburg, 2010.—261 p.
32. *Nersesyan A. K.* Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview // *Tsitol. Genet.*—2007.—**41**, N 5.—P. 64–66.
33. *Pejchal J., Vasilieva V., Hristozova M., Vilasova Z., Vavrova J., Alyakov M., Tichy A., Zarybnicka L., Sinkorova Z., Tambor V., Kubelkova K., Dresler J.* Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay/CBMN cyto assay in human lymphocytes after *in vitro* irradiation and its use in biodosimetry // *Mil. Med. Sci. Lett. (Rev. sanitaire militaire).*—2011.—**80**, N 1.—P. 28–37.
34. *Williams B. R., Amon A.* Aneuploidy: cancer's fatal flaw // *Cancer Res.*—2009.—**69**, N 13.—P. 5289–5291.
35. *Nikiforov A. M., Fedortseva R. F., Monosova E. K., Iartseva N. M., Kravtsov V. Iu.* Nuclei with protrusions – «tailed» nucleus and radiation cytogenetic markers in culture of lymphocytes after X-ray irradiation // *Radiation Biology. Radioecology.*—2000.—**40**, N 3.—P. 299–304.
36. *Sycheva L. P.* Biological significance, criteria and limits of the full range of karyological variation in the evaluation of man cytogenetic status // *Med. Genetics.*—2007.—**6**, N 11.—P. 3–11.
37. *Sycheva L. P., Lovacheva O. V., Stanuk T. A., Yevtushenko G. V., Kovalenko M. A.* Cytogenetic lesions of bronchial epitheliocytes in patients with pulmonary tuberculosis // *Tuberkulez i Bolezni Legkikh.*—2008.—N 7.—P. 35–38.
38. *Ibragimova N. V.* Investigation of nuclei anomalies of somatic cells populations exposed to radiation exposure *in vitro* and *in vivo* // *Dissertation of the candidate biological sciences 14.00.46.*—St. Petersburg, 2004.—122 p.
39. *Khudoley V. V.* Carcinogens: a characteristic, pattern, mechanisms of action.—St. Petersburg, 1999.—256 p.
40. *Agamova K. A.* Clinical cytology in the study of radiation pathomorphism of breast cancer // *News of Clinical Cytology of Russia.*—1997.—**2**, N 2.—P. 52–58.
41. *Madonova Y. B., Trofimov V. A.* Morphological abnormalities of interphase nucleus in donor lymphocytes at the chronic ionizing radiation at low doses // *Morphological newsletter.*—2009.—N 3–4.—P. 52–57.
42. *Johnson R. T., Rao P. N.* Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei // *Nature.*—1970.—**226**, N 5247.—P. 717–722.
43. *Lau Y. F., Brown R. L., Arrighi F. E.* Induction of premature chromosome condensation in CHO cells fused with polyethylene glycol // *Exp. Cell Res.*—1977.—**110**, N 1.—P. 57–61.
44. *Stevens J. B., Abdallah B. Y., Regan S. M., Liu G., Bremer S. W., Ye C. J., Heng H. H.* Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation // *Mol. Cytogenet.*—2010.—**3**—P. 20.
45. *Sperling K.* Cell cycle and chromosome cycle: Morphological and functional aspects // *Premature chromosome condensation application in basic, clinical and mutation research / Eds P. Rao, R. Johnson, K. Sperling.*—New York: Acad. press Inc., 1982.—P. 43–75.
46. *Ianzini F., Bertoldo A., Kosmacek E. A., Phillips S. L., Mackey M. A.* Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells // *Cancer Cell Int.*—2006.—**6**—P. 11.
47. *Erenpreisa J., Kalejs M., Ianzini F., Kosmacek E. A., Mackey M. A., Emzish D., Cragg M. S., Ivanov A., Illidge T. M.* Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe // *Cell Biol. Int.*—2005.—**29**, N 12.—P. 1005–1011.
48. *Kovaleva O. A., Glazko T. T., Kochubey T. P., Lukash L. L., Kudryavets Y. I.* Spontaneous premature condensation of chromosomes in normal and transformed mammal cells // *Exp. Oncol.*—2007.—**29**, N 1.—P. 18–22.
49. *Neitzel H., Neumann L. M., Schindler D., Wirges A., Tonnies H., Trimborn M., Krebsova A., Richter R., Sperling K.* Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition // *Am. J. Hum. Genet.*—2002.—**70**, N 4.—P. 1015–1022.
50. *Mackey M. A., Morgan W. F., Dewey W. C.* Nuclear fragmentation and premature chromosome condensation induced by heat shock in S-phase Chinese hamster ovary cells // *Cancer Res.*—1988.—**48**, N 22.—P. 6478–6483.
51. *Ricci M. S., Zong W. X.* Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways // *Oncologist.*—2006.—**11**, N 4.—P. 342–357.
52. *Castedo M., Perfettini J. L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition // *Oncogene.*—2004.—**23**, N 16.—P. 2825–2837.
53. *Roninson I. B., Broude E. V., Chang B. D.* If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells // *Drug Resist. Updat.*—2001.—**4**, N 5.—P. 303–313.
54. *Hong Q., Hsu L. J., Schultz L., Pratt N., Mattison J., Chang N. S.* Zfra affects TNF-mediated cell death by interacting with death domain protein TRADD and negatively regulates the activation of NF-kappaB, JNK1, p53 and WOX1 during stress response // *BMC Mol. Biol.*—2007.—**8**—P. 50.

Received 12.11.12