

ДЕТАЛИЗАЦИЯ КЛАССИФИКАЦИИ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ С НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ ОКРАШИВАНИЕМ ДЛЯ УЧЕТА КЛАСТОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДИОНУКЛИДНЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

© 2019 г. В. В. Столбова^{1,*}, С. В. Мамихин¹, А. Д. Котельникова^{1,2},
С. А. Прохорова¹, М. В. Зайцева¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, Россия

² Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, Россия

* E-mail: vstol@bk.ru

Поступила в редакцию 30.05.2018 г.

Рассмотрены примеры использования в качестве диагностических показателей различных видов хромосомных aberrаций для решения практических задач радиоэкологии. Проанализированы классификации хромосомных aberrаций, используемые для оценки кластогенного воздействия факторов радиационной и химической природы по результатам цитогенетических исследований с равномерным окрашиванием хромосом. Выявлена некоторая терминологическая несогласованность и неоднозначность при обозначении различных видов и категорий хромосомных aberrаций, отражающих кластогенный эффект. Показано, что данная несогласованность может затруднять использование таких цитогенетических показателей в радиоэкологической практике. По результатам Allium-теста с использованием системы цифровой визуализации получены оригинальные микроизображения, демонстрирующие конфигурации aberrантных хромосом, используемые в классификациях.

Ключевые слова: радиационный и химический мутагенез, кластогенное действие, генотоксичность, aberrации хромосомного и хроматидного типа, двойные и одиночные мосты и фрагменты, Allium-тест

DOI: 10.1134/S0869803119040118

Цитогенетические показатели биодиагностики традиционно используются в радиобиологических и радиоэкологических исследованиях для решения научных и прикладных задач: изучению молекулярных механизмов действия ионизирующей радиации, эффектов адаптации и эволюционных процессов в условиях острого и хронического облучения, оценке уровней радионуклидного и комплексных загрязнений техногенных территорий [1]. Способность ионизирующих излучений и ряда химических мутагенов оказывать кластогенное воздействие на хромосомы, вызывая разрывы молекулы ДНК, может быть обнаружена стандартными методами цитогенетического исследования в форме метафазного или ана-телофазного анализа. Наиболее простой и универсальной процедурой является анализ структурных мутаций хромосом с использованием недифференцированного окрашивания генетического материала без остановки деления на стадии метафазы [2]. Анафазный метод находит широкое применение в радиоэкологии, особенно с использованием растительных тест-организмов и

биоиндикаторов-представителей фитоценозов, характеризующихся крупными хромосомами. При этом в качестве тест-функций используются такие интегральные показатели, как общая частота патологий митоза (мейоза) и/или частота хромосомных aberrаций. С учетом особенностей механизма радиационного воздействия из общей частоты aberrаций информативно выделять ту часть спектра нарушений, которая отражает кластогенный эффект. На стадии анафазы легко выделяются фрагменты и мосты, которые и представляют реализованные в разрывы хромосом воздействия на генетический материал. В зависимости от фазы возникновения разрыва выделяют хроматидные или хромосомные фрагменты и мосты [3], которые относят к aberrациям хроматидного или хромосомного типа соответственно. Эти же структурные нарушения хромосом по другому признаку — морфологии анафазной конфигурации, упоминаются как одиночные фрагменты и мосты, в противопоставление парным конфигурациям [4].

Поскольку в работах по изучению цитогенетических эффектов факторов радиационной и химической природы выявлены различия в спектрах хромосомных aberrаций, отражающих кластогенное воздействие на хромосомы [5], то закономерно использование в радиоэкологических исследованиях соотношения хромосомных aberrаций разного типа в качестве индикатора природы мутагена. Так, преобладание aberrаций хромосомного типа в общем спектре структурных мутаций хромосом отражает приоритетную роль фактора радиационной природы в генотоксическом эффекте сочетанного воздействия мутагенов. Однако существуют определенные противоречия и терминологические разночтения при обозначении aberrаций в различных классификациях, что отмечено еще в работах по изучению особенностей химического и радиационного мутагенеза. “В литературе при обозначении структурных мутаций хромосом имеет место некоторая терминологическая неточность. Часто термином хромосомные перестройки обозначают все типы изменений. Более правильно в этом случае использовать термин перестройки хромосом, тогда как выражения хромосомные перестройки и хроматидные перестройки будут иметь самостоятельное значение” (цит. по [6]). В некоторой степени это связано с различием в спектрах хромосомных нарушений, выявляемых при разных формах цитогенетического исследования. Спектр нарушений структуры хромосом, выявляемый при метафазном анализе и положенный в основу основных классификаций, значительно шире и отличается от видов aberrаций, доступных к учету при цитогенетическом исследовании без останова митоза на стадии метафазы [7]. Отсутствие унифицированного общепринятого подхода к обозначению видов хромосомных aberrаций, выявляемых на стадии анафазы, и определенная субъективность при выборе классификаций значительно затрудняют сравнение результатов исследователей и обобщение полученных данных.

Целью работы являлось сравнение классификаций хромосомных aberrаций, выявляемых в цитогенетических исследованиях с недифференцированным окрашиванием хромосом и отражающих эффекты кластогенного воздействия, а также анализ использования спектра хромосомных нарушений в качестве биоиндикационного и тестовых показателей в практике радиоэкологических исследований.

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ЦИФРОВЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ АБЕРРАНТНЫХ ХРОСОМ

Процедура получения микрофотографий, документально фиксирующих соответствующие классификациям конфигурации aberrантных

хромосом, выполнялась на основе результатов серии Allium-тестов без останова митоза на стадии метафазы. Фитотестером служили луковички и семена лука репчатого *Allium cepa* L. сорт Штуттгартен Ризен. Для проведения цитогенетического анализа участок корня с апикальной меристемой размером около 1.5 см помещали в фиксатор Кларка на срок от 2 до 14 дней. При необходимости долгосрочного хранения биоматериал переводили в 70%-ный (v/v) этиловый спирт с предварительной отмывкой от фиксатора раствором спирта такой же концентрации. Подготовку к микроскопированию проводили по стандартной методике приготовления препаратов из корневой меристемы [8], отмывая материал от спирта в дистиллированной воде в небольших емкостях. Препараты окрашивали 2%-ным ацетоорсеином (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин, по истечении которых корни отмывались в течение 15 мин от красителя в 45%-ной уксусной кислоте. Для приготовления стандартных давленных препаратов брали от окрашенного корня апикальный участок не менее 2 мм длиной. Анализ клеток производится с помощью светопольной микроскопии в проходящем свете при увеличении 10×40 с использованием синего светофильтра. Цифровые микроизображения хромосомных aberrаций получены с помощью системы визуализации на основе микроскопа Микмед-6 с тринокулярной насадкой (ОАО “ЛОМО”, Россия), оптико-механического адаптера (“НПК “Зенит”, Россия), цифрового фотоаппарата Canon EOS 1100 D (“Canon Inc.”, Япония) и программного обеспечения, поставляемого в пакете с комплектом визуализации EOS Utility версии 2.10.00 (“Canon Inc.”) [9]. Преобразование цифровых изображений проводилось в блоке компьютера с использованием фоторедактора Microsoft Office Picture Manager.

ХРОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛАСТОГЕННОГО ЭФФЕКТА РАДИОНУКЛИДНЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

В радиоэкологических исследованиях общая частота хромосомных нарушений в соматических и генеративных клетках растений служила дозозависимым индикатором уровня радиационного воздействия как в острый, так и в отдаленные периоды Чернобыльской радиационной аварии [10, 11]. Частота хромосомных aberrаций использовалась в ходе цитогенетического биомониторинга техногенных территорий с радионуклидным и химическим загрязнением [12, 13] как показатель уровня комплексного загрязнения.

Однако в работах последних лет все чаще принимаются попытки дифференцированного

использования цитогенетических показателей. Из общей частоты хромосомных aberrаций с диагностическими целями выделяют те части спектра, которые связываются с представлениями о разных механизмах реализации кластогенного эффекта, выявляя таким образом ведущую роль в генотоксичности либо химических мутагенов, либо факторов радиационной природы. При этом классификация хромосомных aberrаций может опираться на морфологию анафазной конфигурации хромосом – одиночные или двойные мосты и фрагменты. Или же в основу кладется фаза клеточного цикла, на которой произошел разрыв хромосомы с последующей реализацией его в aberrацию в цикле “разрыв – слияние – структурная мутация” с выделением подгрупп aberrаций хроматидного или хромосомного типа.

Например, спектр цитогенетических нарушений с выделением подгрупп aberrаций хромосомного и хроматидного типа у растений лука *Allium schoenoprasum*, в течение года произрастающих на техногенно загрязненной почве, использовался в работе [14] как индикатор природы мутагена, приоритетного для генотоксичности почв нескольких пробных площадок с различным содержанием ТЕРН, тяжелых металлов и мышьяка. Преобладание в спектре цитогенетических эффектов нарушений хроматидного типа (одиночных хроматидных фрагментов и мостов) позволило высказать предположение о ведущей роли химического мутагенеза, связанного с высокими концентрациями металлов в почве. При этом, как признак радиационного воздействия ионизирующих излучений от ТЕРН, рассматривалось увеличение частоты парных мостов и фрагментов, относящихся к хромосомному типу повреждений хромосом.

Сходным образом анализировали результаты оценки генотоксичности подземных вод с промплощадки центра по обращению с радиоактивными отходами в условиях комбинированного загрязнения. По результатам биотестирования с *Allium cepa* выявлен незначительный вклад aberrаций хромосомного типа (двойные мосты и фрагменты), что позволило авторам выделить ведущую роль в генотоксичности образцов химического фактора загрязнения (вещества 3-го класса опасности) на фоне загрязнения ^{137}Cs и ^{90}Sr [15].

Часть спектра хромосомных aberrаций в виде двойных мостов рекомендована авторами как биологический индикатор, диагностирующий уровень воздействия радиации на природные растительные популяции в условиях радиоактивного загрязнения Семипалатинского полигона. При изучении цитогенетических показателей доминантного вида тонконога *Koeleria gracilis* детальный анализ спектра выявил разную интенсивность роста частоты для aberrаций разного вида.

Рост числа одиночных мостов и фрагментов и двойных фрагментов не зависел от величины удельной активности Sr^{90} в биоматериале. Напротив, изменение частоты двойных мостов показывало линейную дозовую зависимость до величины 10 МБк/кг [16].

Несколько иной способ использования показателя частоты хромосомных aberrаций применяли исследователи [17], анализируя характер распределения aberrаций хромосом по клеткам индикаторов-гидробионтов в экспериментальных условиях мутагенеза. Воздействие только ионизирующей радиации или ее ведущей ролью в условиях сочетанного воздействия с химическими мутагенами характеризовалось распределением хромосомных aberrаций по клеткам согласно закономерностям Пуассона, тогда как при химическом мутагенезе или его ведущей роли в сочетанном воздействии – распределением, близким к геометрическому. Выявив различия типа клеточного распределения хромосомных aberrаций в зависимости от роли в повреждениях химических мутагенов или ионизирующей радиации, авторы проанализировали природные популяции гидробионтов для оценки эффективности реальных действующих факторов загрязнения и учета их вклада в повреждения хромосом при комплексном загрязнении. Были подтверждены выявленные в модельном эксперименте закономерности и сделан вывод о том, что тип распределения хромосомных aberrаций может использоваться для индикации цитогенетического действия ионизирующего излучения и химических мутагенов при сочетанном действии.

В целом видно, что при попытке выявить природу мутагена, оказывающего ведущее воздействие в условиях комплексного загрязнения мутагенами химической и радиационной природы, информативно использовать как анализ вида клеточного распределения хромосомных aberrаций, так и соотношение aberrаций хромосом разного типа в спектре. По мнению авторов, эти особенности могут указывать на ведущую роль факторов либо радиационной, либо химической природы в генотоксичности природных сред [14–17].

АНАФАЗНЫЕ КОНФИГУРАЦИИ АБЕРРАНТНЫХ ХРОМОСОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ

Сравнивая вклад в кластогенный потенциал химических мутагенов или факторов радиационной природы, исследователи предпочитают использовать классификации, основанные на морфологии метафазных/анафазных хромосом или опираться на представления о стадии возникновения разрыва и различных молекулярно-генетических событиях, приводящих к реализации его в структурные мутации хромосом. Как известно, в

зависимости от фазы клеточного цикла возникновения разрыва нити ДНК выделяют aberrации хромосомного типа, возникшие на предсинтетической стадии G_1 , и хроматидного типа, образование которых возможно как во время, так и после репликации в фазе S и G_2 соответственно. В фазе G_1 хромосома представлена однонитевой структурой, поэтому, возникнув на этой стадии, после фазы S синтеза ДНК хромосомные нарушения удваиваются и морфологически в метафазе и анафазе представлены двойными структурами. Aberrации хроматидного типа возникают после репликации и затрагивают изменением одну из хроматид, что на стадии метафазы и анафазы морфологически проявляется одиночными aberrациями как конечной формой нарушений только одной из двух сестринских хроматид [4, 5, 18–20].

В табл. 1 обобщены данные о видах aberrантных хромосом, используемых для классификации по результатам анафазного исследования и подразделяемых на основании:

– стадии (S -синтетическая, G_1 и G_2 – пред- и постсинтетическая соответственно) клеточного цикла возникновения разрыва хромосомы;

– морфологии анафазной конфигурации хромосом в митозе. На рис. 1 представлены микрофотографии, демонстрирующие конфигурации aberrантных хромосом, используемые в классификациях и полученные по результатам Allium-теста с недифференцированным окрашиванием.

Достаточно часто цитируется описание анафазных мостов по классификации [18], с разделением их по морфологии на хромосомные (обычно двойные) и хроматидные (обычно одиночные) мосты. Хромосомный двойной мост рассматривается как результат воссоединения двух разорванных хромосом, а хроматидный одиночный мост (табл. 1, № 1; рис. 1, а, 1, б) образуется при сестринском соединении хроматид изолюкусного разрыва одной хромосомы и часто обозначается как дицентрическая хроматида или равноплечий анафазный мост. Второй возможный механизм образования одиночного (неравноплечего) моста хроматидного типа – асимметричный межхромосомный обмен (хроматидная транслокация) в результате слияния проксимальных концов после разрыва хроматид двух разных хромосом (табл. 1, № 2).

Признается не всеми исследователями [4] возможность в анафазе конфигурации “одиночный мост” как aberrации хромосомного типа при возникновении разрыва в не реплицированной хромосоме фазы G_1 клеточного цикла с последующим удвоением и последующим слиянием проксимальных фрагментов [19] (табл. 1, № 3).

Двойные анафазные мосты (табл. 1, № 4 и 5) относятся всеми исследователями к aberrациям хромосомного типа, формирующимся на основе асимметричного межхромосомного обмена [7] после разрывов в двух нерасщепленных хромосо-

мах с последующей репликацией. В метафазной конфигурации это дицентрические хромосомы – маркеры радиационного воздействия, в анафазе же хроматиды могут идти к разным полюсам, образуя перекрещивающийся двойной мост или конфигурацию параллельных мостов, обозначаемую как “двойной мост” [4, 19], без указания конкретной формы (рис. 1, в–з). Хотя в классификациях чаще упоминается только перекрестный мост как возможная анафазная судьба дицентрика [20, 21].

При анализе двойных мостов необходимо упомянуть также анафазную судьбу кольцевых центрических хромосом метафаз – маркеров радиационного воздействия. Известно, что кольцеобразные хромосомные анафазные мосты образуются в цикле “разрыв – слияние (ошибки репарации) – структурное нарушение” и предваряются существованием кольцевых хромосом [7, 22]. Разделяясь в анафазе, центрические кольца могут распрямиться по типу ленты Мёбиуса, образуя большую дицентрическую петлю (табл. 1, № 7; рис. 1, л) или переплестись двумя кольцами меньшего размера и сцепиться по типу звеньев цепи, что напоминает форму “восьмерки” [20] (табл. 1, № 6; рис. 1, и, 1, к). Механизмом этой перестройки хромосомного типа является асимметричный внутривнутрихромосомный обмен на базе межплечевой делеции на стадии G_1 клеточного цикла с последующим удвоением при репликации.

Хроматидные перестройки на основе изолюкусного разрыва (изохроматидной делеции) двух хроматид и различных вариантов слияния фрагментов проявляются в анафазе одиночным мостом или дицентрической хроматидой (сестринское слияние проксимальных фрагментов (табл. 1, № 1), а также одиночным или двойным фрагментом (табл. 1, № 8 и 10; рис. 1, о, 1, п) при слиянии/не слиянии дистальных концов, соответственно.

При этом описан другой механизм образования одиночного фрагмента (табл. 1, № 9), позволяющий отнести его к aberrациям хромосомного типа, признаваемый, однако, не всеми исследователями [4]. Это хромосомный разрыв или терминальная делеция на стадии G_1 (по терминологии автора “концевая нехватка в нерасщепленной” хромосоме) с последующей репликацией и слиянием дистальных фрагментов после репликации [19]. Аналогично морфологически двойная конфигурация “два непарных фрагмента” по механизму возникновения относится к aberrациям хроматидного типа, поскольку представляет собой асимметричный межхромосомный обмен (хроматидная транслокация) в результате неслияния дистальных фрагментов после разрыва хроматид двух разных реплицированных хромосом (табл. 1, № 10).

Таблица 1. Виды хромосомных aberrаций, используемые для оценки кластогенного действия факторов радиационной и химической природы по данным простого цитогенетического исследования с недифференцированным окрашиванием хромосом

Table 1. Types of chromosomal aberrations used to assess the clastogenic effect for factors of radiation and chemical nature according to a simple cytogenetic study with solid chromosome staining

№	Схема анафазной конфигурации	Механизм структурной перестройки	Тип aberrации	
			Морфология анафазной хромосомы	Стадия появления разрыва
1	[Изохроматидная терминальная делеция на основе изолюкусного разрыва при слиянии проксимальных фрагментов сестринских хроматид	Одиночный мост (равноплечий)	G ₂ Хроматидного типа
2	L	Асимметричный межхромосомный обмен (хроматидная транслокация) в результате слияния проксимальных фрагментов после разрыва хроматид двух различных хромосом	Одиночный мост (часто неравноплечий)	То же
3	[Терминальная делеция с последующей репликацией и слиянием проксимальных фрагментов сестринских хроматид	Одиночный мост (равноплечий)	G ₁ Хромосомного типа
4	X	Асимметричный межхромосомный обмен (хромосомная транслокация) в результате слияния проксимальных фрагментов разных хромосом до их репликации	Двойной перекрестный мост – анафазная конфигурация метафазной дицентрической хромосомы	G ₁ Хромосомного типа
5		То же	Двойной параллельный мост – анафазная конфигурация дицентрической метафазной хромосомы (дицентрика)	То же
6	8	Асимметричный внутривхромосомный обмен на базе межплечевой делеции	Двойной мост в виде сцепленных кольцеобразных хроматид – анафазная конфигурация кольцевой центрической метафазной хромосомы (центрического кольца)	То же
7	O	То же	Двойной мост в виде дицентрического кольца, образованный из кольцевой центрической метафазной хромосомы (центрического кольца)	То же
8	—	Изохроматидная терминальная делеция на основе изолюкусного разрыва при слиянии дистальных фрагментов сестринских хроматид	Одиночный ацентрический фрагмент	G ₂ Хроматидного типа
9	—	Терминальная делеция с последующей репликацией и слиянием дистальных фрагментов	То же	G ₁ Хромосомного типа
10	=	Асимметричный межхромосомный обмен (хроматидная транслокация) в результате неслияния дистальных фрагментов после разрыва хроматид двух различных хромосом	Два непарных фрагмента	G ₂ Хроматидного типа
11	=	Изохроматидная терминальная делеция на основе изолюкусного разрыва при неслиянии дистальных фрагментов сестринских хроматид	Парный фрагмент	То же
12	=	Терминальная делеция с последующей репликацией и неслиянием дистальных фрагментов	То же	G ₁ Хромосомного типа

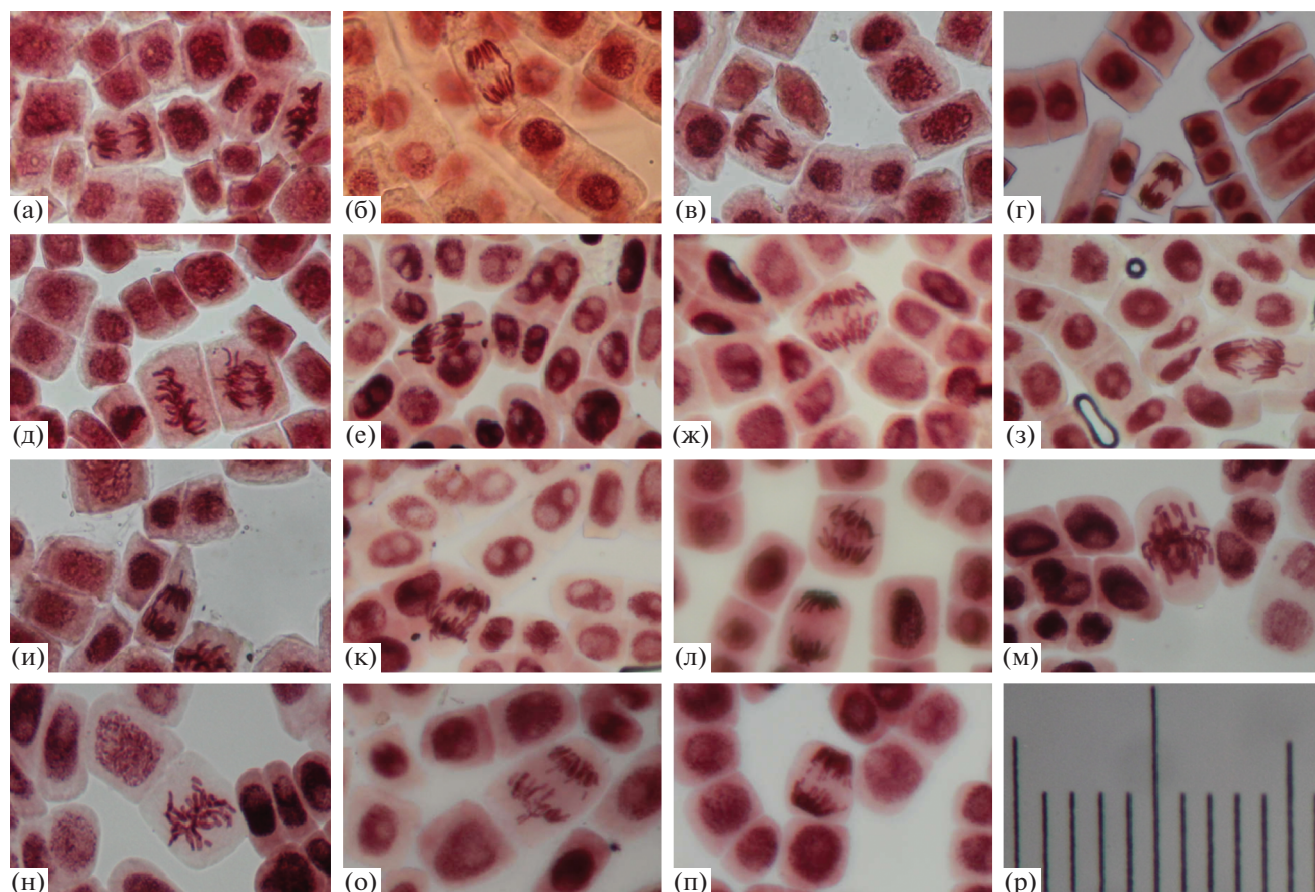


Рис. 1. Цифровые микроизображения (увеличение 10×40) патологий митоза в клетках апикальной меристемы корней лука репчатого *Allium cepa*, связанные с кластогенным воздействием на хромосомы при биотестировании: 1) почв с максимальной активностью ^{137}Cs 7.1 ± 5.9 ; $\text{Ra}^{226} - 44.3 \pm 15.2$; $\text{Th}^{232} - 27.6 \pm 16.0$; $\text{K}^{40} - 420 \pm 151$ Бк/кг и содержанием суммы полициклических ароматических углеводородов 91–297, в том числе 3,4-бензпирена – 1–15 мкг/кг (а, в, г, д, и); 2) γ -излучения от загрязненных ^{137}Cs почв мощностью эквивалентной дозы 0.3–1.53 мкЗв/ч (б, е, з, к, л, н); 3) излучения мобильного телефона интенсивностью 1.5–2.5 мкВт/см² (ж, м, о, п); (а, б) – одиночный мост в анафазе; (в) – пара одиночных мостов в анафазе одной клетки; (г) – двойной параллельный мост в анафазе; (д) – конфигурация одиночного и двойного перекрещенного моста с парой длинных фрагментов в анафазе одной клетки; (е, ж, з) – двойной перекрещенный мост в анафазе; (и, к) – двойной мост в виде двух сцепленных по типу звеньев в цепи хроматид; (л) – двойной мост в виде большого дицентрического анафазного кольца; (м, н) – множественная фрагментация хромосом в aberrantную метафазу с неявной природой фрагментов; (о, п) – множественная фрагментация хромосом в анафазу с неявной одиночной природой фрагментов; (р) – микрошкала (цена деления 10 мкм).

Fig. 1. Digital microimages (magnification 10×40) of pathological mitosis in *Allium cepa* root apical meristem cells, associated with clastogenic effect on chromosomes under biotesting: 1) soils with a maximum activity of ^{137}Cs 7.1 ± 5.9 ; $\text{Ra}^{226} - 44.3 \pm 15.2$; $\text{Th}^{232} - 27.6 \pm 16.0$; $\text{K}^{40} - 420 \pm 151$ Bq/kg and the amount of polycyclic aromatic hydrocarbons 91–297, including 3,4-benzopyrene – 1–15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (a, c, d, e, i); 2) γ -radiation from ^{137}Cs contaminated soils with an equivalent dose rate of 0.3–1.53 $\mu\text{Sv}/\text{h}$ (b, f, h, j, k, m); 3) mobile phone radiation intensity of 1.5–2.5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (g, l, n, o); (a, b) – single bridge in anaphase; (c) – a pair of single bridges in anaphase of a cell; (d) – double parallel bridge in anaphase; (e) – configuration of a single and double crossed bridge with a pair of long fragments in anaphase of a single cell; (f, g, h) – double cross bridge in anaphase; (i, j) – double bridge in the form of two linked chromatid rings; (k) – double bridge in the form of a large dicentric anaphase ring; (l, m) – multiple fragmentation of chromosomes into an aberrant metaphase with an implicit dual nature of fragments; (n, o) – multiple fragmentation of chromosomes into anaphase with an implicit single nature of fragments; (p) – microscale (scale division 10 μm).

АНАЛИЗ КЛАССИФИКАЦИИ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ДЛЯ УЧЕТА ОСОБЕННОСТЕЙ КЛАСТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ

По современным представлениям о механизме радиационного воздействия непосредственно двунитевые разрывы ДНК (и/или суперпозиция

однонитевых) являются базовыми событиями радиационно-индуцированных повреждений хромосом, которые реализуются в aberrации в цикле “разрыв – сшивка (ошибки репарации) – структурная мутация” и могут быть выявлены обычными методами цитогенетики. Аналогичное кластогенное действие на хромосомы способны оказывать некоторые мутагены химической природы,

имитируя эффекты ионизирующей радиации. При этом описана более сложная последовательность молекулярно-генетических событий, связанная с формированием “первичных, начальных” повреждений одной нити, реализуемых при определенных условиях и фазах клеточного цикла в истинные повреждения (двунитевые разрывы) хромосом [23, 24].

Подходы к классификации хромосомных aberrаций для учета кластогенного действия факторов могут базироваться на различной типологической основе. В зависимости от используемой классификации и целей цитогенетического исследования выделяют стабильные и нестабильные типы хромосомных aberrаций, симметричные и асимметричные структурные перестройки, aberrации хромосомного или хроматидного типа, на основе меж- и внутрихромосомных обменов и т.п. При этом спектр хромосомных aberrаций может включать различные формы, выявляемые соответственно технике цитогенетического исследования и представлениям о задействованных механизмах реализации двойного разрыва в микрокопируемую структурную перестройку [25, 26].

При метафазном анализе доступны к учету центрические кольца (внутрихромосомные обмены, когда интерстициальный фрагмент замкнут в кольцо после двух разрывов по различным сторонам от центромеры и слиянии липких концов центрического фрагмента между собой) и ацентрические кольца (результат внутрихромосомных обменов при слиянии в кольцо ацентрических участков одного плеча хромосомы); дицентрические хромосомы (результат асимметричных транслокаций при межхромосомном обмене, образующихся после разрывов в разных хромосомах и последующим объединением их центромерных фрагментов); а также парные терминальные или интерстициальные фрагменты, образованные в результате одного или двух разрывов соответственно в не реплицированной хромосоме [2, 4, 18, 19]. С диагностическими целями предложено использовать, например, соотношение aberrаций хромосомного типа на основе меж- и внутрихромосомных обменов для характеристики качества (по величине линейной передачи энергии) излучения [27]. При этом техника простого равномерного окрашивания хромосом не позволяет различать симметричные внутрихромосомные обмены (пара- и перичентрические инверсии) при анализе метафазного спектра [25, 27].

При анафазажном методе недоучитывается около 40% метафазных нарушений. При этом судьба метафазных хромосомных изменений в анафазе проявляется другим набором aberrаций, фиксируемых с использованием недифференцированного окрашивания хроматина [7, 19, 20]. При использо-

вании анафазажного метода в радиоэкологических исследованиях к aberrациям хроматидного типа традиционно относят одиночные мосты и одиночные фрагменты ($m'-f'$), к aberrациям хромосомного типа — двойные мосты и двойные фрагменты ($m''-f''$) [14–16]. Хотя некоторая неоднозначность распределения анафазных aberrаций по этим подтипам отмечалась еще в работе [6], когда при анализе анафаза выделили семь типов нарушений: хроматидные: 1) одиночный фрагмент (—); 2) парные фрагменты (= как частично хромосомные перестройки); 3) мосты с одним фрагментом ([-); 4) мосты с парой фрагментов ([=); 5) мосты без фрагментов ([как результат ухода одного или пары фрагментов с массой хромосом к полюсу клетки), а также хромосомные: 1) транслокации с парой фрагментов (X=); 2) транслокации без фрагментов (X как результат ухода фрагментов к полюсу клетки). Как видно, хроматидные двойные фрагменты (символ =) частично относили к хромосомным перестройкам и отмечали возможность их недоучета при уходе к полюсам клетки.

При этом aberrации хроматидного типа возможны на основе изолюкусного разрыва, который возникает в реплицированной хромосоме в фазе S или G₂. По этому признаку одиночный мост и сопутствующие одиночные фрагменты относятся к aberrациям хроматидного типа. Однако в классификации [19] выделяется одиночный мост как анафазная фигура, проявляющая aberrации хромосомного типа на основе хромосомного разрыва (концевая нехватка) в “нерасщепленной” хромосоме с последующим удвоением без слияния разорванных концов. После репликации на ряде объектов показана возможность слияния уже сестринских хроматид (аналогично слиянию проксимальных концов после изолюкусного разрыва), с образованием дицентрической хроматиды, образующей в анафазе мостик. В этом случае, исходя из морфологии анафазной фигуры, данный вид следует отнести к хроматидному типу aberrаций как “одиночный мост”. Однако по стадии возникновения разрыва в фазу G₁ — к хромосомному. Также допускается механизм образования анафазажного одиночного фрагмента как aberrации хромосомного типа [19], возникшего в результате терминальной делеции (концевая нехватка в “нерасщепленной” хромосоме) с последующей репликацией и слиянием дистальных фрагментов (табл. 1, № 9). Хотя ряд авторов считает маловероятным слияние дистальных фрагментов хроматид с образованием одиночного фрагмента: “...маловероятно предположение, что одиночный фрагмент может происходить из-за слияния сестринских хроматид парного фрагмента и развертывания их по длине” (цит. по [2]).

На основе изохроматидных разрывов, когда изменение произошло после репликации и затрагивает сестринские хроматиды, возможны aberrации хромосом в виде парных терминальных или интерстициальных фрагментов, морфологически идентичных aberrациям хромосомного типа (двойные), но возникших в реплицированной хромосоме, следовательно — хроматидного типа. Так, по морфологии двойной фрагмент (результат не слияния дистальных фрагментов) относят к aberrациям хромосомного типа, хотя разрыв возник на стадии *S* или G_2 (табл. 1, № 11). Поэтому парные фрагменты могут быть как изохроматидного, так и хромосомного происхождения (табл. 1, № 11 и 12).

Таким образом, при использовании методики обычной светопольной микроскопии морфологическими маркерами кластогенного действия и последующих транслокаций являются характерные конфигурации хромосом метафазных пластинок и анафаз митоза. При этом aberrации хромосомного типа чаще описываются как двойные, сходным образом затрагивающие обе хроматиды реплицированной хромосомы, а aberrации хроматидного типа — как одиночные фигуры, хотя при использовании техники недифференцированного окрашивания ядерного хроматина признается трудно различимой по ширине фрагмента его одиночная или парная природа (рис. 1м—1п). Аналогичные инструментальные ограничения недифференцированное (равномерное) окрашивание анафазных хромосом накладывает на процесс распознавания природы мостов и соответственно механизма образования предшествующих им метафазных дицентриков [25]. На схемах хроматидный мост или дицентрическая хроматида обозначается как одиночный, однако при микроскопировании препаратов “...по толщине моста нельзя судить о его хромосомном или хроматидном характере..., не всегда можно дифференцировать характер моста и поэтому вряд ли целесообразно проводить такое разделение при использовании тотального метода окрашивания хромосом, не позволяющего идентифицировать отдельные хроматиды” (цит. по [2]).

ВЫВОДЫ

1. Для ряда aberrаций выявлены терминологические противоречия и неоднозначное соотношение анафазного морфологического вида с хроматидным или хромосомным типом, отражающим особенности кластогенного действия факторов радиационной или химической природы и использующимся в качестве биоиндикационного или тестового показателя.

2. Используя анафазный спектр хромосомных aberrаций с диагностическими целями, информативно представлять результаты не только с разде-

лением нарушений на типы хромосомной или хроматидной природы, но и давать более дифференцированную морфологическую характеристику анафазной конфигурации как для мостов, так и для фрагментов.

3. Техника тотального окрашивания хромосом при простом варианте цитогенетического исследования без останковки деления на стадии метафазы неоднозначно диагностирует одиночную или парную природу фрагментов, что затрудняет отнесение их к хромосомному или хроматидному типу.

4. Для анафазных мостов желательно представлять не только описание их двойной или одиночной природы, но и характеризовать способ пересечения нитей, включая описание кольцеобразных структур. Это дает информацию о механизме возникновения и предшествующей метафазной морфологии хромосомы, которая используется как маркер радиационного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Esnault M.-A., Legue F., Chenal Ch.* Ionizing radiation: Advances in plant response // *Environ. Experim. Botany*. 2010. V. 68. P. 231–237.
2. *Калаев В.Н., Карпова С.С.* Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнений окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. 80 с. [*Kalaev V.N., Karpova S.S.* Citogeneticheskij monitoring: metody ocenki zagryaznenij okruzhayushchej sredy i sostoyaniya geneticheskogo apparata organizma. Voronezh: Izdatel'stvo VGU, 2004. 80 s. (in Russian)]
3. *McClintock B.* The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. // *Genetics*. 1940. V. 26. P. 234–282.
4. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. 304 с. [*Pausheva Z.P.* Praktikum po citologii rastenij. M.: Kolos, 1988. 304 s. (in Russian)]
5. *Дубинин Н.П.* Радиационный и химический мутагенез. М.: Наука, 2000. 465 с. [*Dubin N.P.* Radiacionnyj i himicheskij mutagenez. M.: Nauka, 2000. 465 s. (in Russian)]
6. *Дубинин Н.П., Дубинина Л.Г., Нестерова Н.И.* Доза облучения и ядерные изменения в клетках человека в культуре ткани по разным фазам клеточного цикла // *Радиобиология*. 1964. Т. 4. Вып. 5. С. 713–725. [*Dubin N.P., Dubinina L.G., Nesterova N.I.* Doza oblucheniya i yadernye izmeneniya v kletkah cheloveka v kul'ture tkani po raznym fazam kletchnogo cikla // *Radiobiologiya*. 1964. T. 4. Vyp. 5. S. 713–725. (in Russian)]
7. *Nicoloff H., Gecheff K.* Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley // *Mutat. Res.* 1976. V. 34. P. 233–244.
8. *Барыкина Р.П. и др.* Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М., 2004. [*Barykina R.P. i dr.* Spravochnik po botanicheskoj mikrotekhnike. Osnovy i metody. M., 2004. (in Russian)]
9. *Столбова В.В., Манахов Д.В., Щеглов А.И.* Регистрация результатов Allium-теста с помощью ком-

- плекса визуализации на основе микроскопа Микмед-6 для оценки генотоксичности почв // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2016. № 2. С. 40–44. [Stolbova V.V., Manahov D.V., Shcheglov A.I. Registraciya rezul'tatov Allium-testa s pomoshch'yu kompleksa vizualizacii na osnove mikroskopa Mikmed-6 dlya ocenki genotoksichnosti pochv // Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 17. Pochvovedenie. 2016. № 2. S. 40-44. (in Russian)]
10. Kal'chenko V.A., Fedotov I.S. Genetic effects of acute and chronic ionizing irradiation on *Pinus sylvestris* L. inhabiting the Chernobyl Meltdown Area // Russ. J. Genet. 2001. V. 37. № 4. P. 341–350.
 11. Geraskin S.A., Dikarev V.G., Zyablitskaya Y.Y., Oudalova A.A., Spirin Y.V., Alexakhin R.M. Genetic consequences of radioactive contamination by the Chernobyl fallout to agricultural crops // J. Environ. Radiat. 2003. V. 66. P. 155–169.
 12. Geraskin S.A., Kim J.K., Oudalova A.A., Vasiliyev D.V., Dikareva N.S., Zimin V.L., Dikarev V.G. Bio-monitoring the genotoxicity of populations of Scotspine in the vicinity of a radioactive waste storage facility // Mutat. Res. 2005. V. 583. P. 55–66.
 13. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Michalik B., Dikareva N.S., Dikarev V.G. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test // Chemosphere. 2011. V. 83. № 8. P. 1133–1146.
 14. Бельх Е.С., Майстренко Т.А. Цитогенетические эффекты у растений *Allium schoenoprasum*, произрастающих на техногенно загрязненной почве // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 1. С. 5–15. [Belykh E.S., Majstrenko T.A. Citogeneticheskie efekty u rastenij Allium schoenoprasum, proizrastayushchih na tekhnogenno zagryaznennoj pochve // Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya. 2015. V. 55. № 1. S. 5–15. (in Russian)]
 15. Удалова А.А., Пяткова С.В., Гераськин С.А., Киселёв С.М., Ахромеев С.В. Оценка цито- и генотоксичности подземных вод, отобранных на промплощадке Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 2. С. 208–219. [Udalova A.A., Pyatkova S.V., Geras'kin S.A., Kiselyov S.M., Ahromeev S.V. Ocenka cito- i genotoksichnosti pozemnykh vod, otrabrannykh na promplohchadke Dal'nevostochnogo centra po obrashcheniyu s radioaktivnymi othodami // Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya. 2016. V. 56. № 2. S. 208–219. (in Russian)]
 16. Минкенова К.С., Байгазинов Ж.А., Лукашенко С.Н., Мамырбаева А.Н., Каримбаева К.С. Цитогенетические изменения тонконога (*Koeleria gracilis Pers*), произрастающего в местах испытания боевых радиоактивных веществ на Семипалатинском испытательном полигоне // Тез. докл. VII Междунар. науч.-практ. конф. Павлодар: Дом печати, 2016. С. 69–70. [Minkenova K.S., Bajgazinov Zh.A., Lukashenko S.N., Mamyrbayeva A.N., Karimbaeva K.S. Citogeneticheskie izmeneniya tonkonoga (*Koeleria gracilis Pers*), proizrastayushchego v mestah ispytaniya boevykh radioaktivnykh veshchestv na Semipalatinskoye ispytatel'nom poligone // Tez. dokl. VII Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. Pavlodar: Dom pečati, 2016. S. 69–70. (in Russian)]
 17. Поликарпов Г.Г., Цыцугина В.Г. Закономерности распределения аббераций хромосом по клеткам гидробрионтов при действии ионизирующего излучения и химических мутагенов среды // Радиационная биология. Радиоэкология. 1993. Т. 33. № 2. С. 205–213. [Polikarpov G.G., Cysugina V.G. Zakonomernosti raspredeleniya aberracij hromosom po kletkam gidrobiontov pri dejstvii ioniziruyushchego izlucheniya i himicheskikh mutagenov sredy // Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya. 1993. V. 33. № 2. S. 205–213. (in Russian)]
 18. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с. [Alov I.A. Citofiziologiya i patologiya mitoz. M.: Medicina, 1972. 264 s. (In Russian)]
 19. Ли Д.Е. Действие радиации на живые клетки / Пер. с англ. М.: ГосАтомИздат, 1963. 288 с. [Li D.E. Dejstvie radiacii na zhivye kletki: Perevod s angl. M.: GosAtomIzdat, 1963. 288 s. (in Russian)]
 20. Коггл Дж. Биологические эффекты радиации / Пер. с англ. под ред. А.Н. Деденкова. М.: Энергоатомиздат, 1986. 184 с. [Koggl Dzh. Biologicheskie efekty radiacii: Per. s angl. / Pod red. A.N. Dedenkova. M.: Energoatomizdat, 1986. 184 s. (in Russian)]
 21. Gisselson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer // Chromosoma. 2008. V. 117. Issue 6. P. 511–519.
 22. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant behavior of ring-shaped chromosomes // Genetics. 1938. V. 23. P. 215–237.
 23. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. 2008. Т. 42. № 1. С. 58–72. [Kovaleva O.A. Citogeneticheskie anomalii v somaticheskikh kletkah mlekopitayushchih // Citologiya i genetika. 2008. V. 42. № 1. S. 58–72. (in Russian)]
 24. Дубинин Н.П. Потенциальные изменения в ДНК и мутации. Молекулярная цитогенетика. М.: Наука, 1978. 236 с. [Dubinin N.P. Potencial'nye izmeneniya v DNK i mutacii. Molekulyarnaya citogenetika. M.: Nauka, 1978. 236 s. (in Russian)]
 25. Obe G., Pfeiffer P., Savage J.R.K. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution // Mutat. Res. 2002. V. 504. P. 17–36.
 26. Durante M., Bedford J.S., Chen D.J. et al. From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break // Mutat. Res. 2013. V. 756. P. 5–13.
 27. Cornforth M.N., Durante M. Radiation quality and intra-chromosomal aberrations: Size matters // Mutat. Res. Gen. Tox. En. 2018. V. 836. P. 28–35.

Clarification for Classification of Chromosome Aberrations with Solid Staining to Account for Clastogenic Effects of Radionuclide and Complex Contamination

V. V. Stolbova^{a,#}, S. V. Mamikhin^a, A. D. Kotelnikova^{a,b}, S. A. Prohorova^a, and M. V. Zaitseva^a

^a *Lomonosov Moscow State University, Soil Science Faculty, Moscow, Russia*

^b *Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia*

[#] *E-mail: vstol@bk.ru*

Examples of using various types of chromosome aberrations as diagnostic indicators for solving practical problems of radioecology are considered. Classifications of chromosome aberrations used to assess the clastogenic effect of radiation and chemical factors and based on cytogenetic studies with solid chromosome staining are analyzed. A certain terminological inconsistency and ambiguity is revealed in the designation of various types and categories of chromosome aberrations that reflect the clastogenic effect. It is shown that inconsistency can hinder the use of cytogenetic indicators in radioecological practice. The original micro-images were obtained according to Allium-test with a digital visualization system as examples of aberrant chromosome configuration used for classifications.

Keywords: Radiation and chemical mutagenesis, clastogenic action, genotoxicity, aberrations of chromosome and chromatid type, double and single bridges and fragments, Allium-test