

УДК 575.043 : 575.11

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНЕУГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ ПАНЦЕНТРОМЕРНЫХ ЗОНДОВ В УСЛОВИЯХ РЕЗИДЕНТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДОНА

© 2018 А.В. Ларионов., В.П. Волобаев, Е.С. Сердюкова

Кемеровский государственный университет

Статья поступила в редакцию 10.12.2018

Низкодозовое воздействие включает ряд непрямых радиационных эффектов в том числе «эффект свидетеля» и феномен увеличения генетической нестабильности. В представленной работе предпринята попытка оценить хроническое влияние сверхмалых доз радона при хроническом облучении на формирование анеугенных эффектов, являющихся признанным маркером действия плотниоизирующего излучения. Для проведения исследования использовался метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с панцентромерными зондами, специфически связывающимися с областью центромеры. Одновременно проводилось измерение радиационных параметров: объемной активности радона (ОА  $^{222}\text{Rn}$ ) в воздухе жилого помещения и показатель бета- и гамма-фона. Установлено, что средняя частота двуядерных клеток с микроядром составляет 15,4%. Доля С+ составляет 23,9%. При этом значимых различий в частоте показателей между группой мужчин и женщин не обнаружено. Обнаруженное увеличение частоты микроядер с увеличением ОА радона может быть вызвано дополнительным хроническим экспонированием радоном. В то же время тенденция к увеличению доли центромер-позитивных микроядер в группе с наибольшим уровнем радона не получила статистического подтверждения.

*Ключевые слова:* Микроядерный тест, радон, панцентромерные зонды.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-34-60069\15 мол\_а\_дк).*

### ВВЕДЕНИЕ

Современные подходы к радиационной безопасности предусматривают наиболее полный учет всех источников ионизирующего излучения (ИИ) в среде обитания человека. Риски, связанные с воздействием относительно высоких доз (более 0,1 Гр), определяются по современной консенсусной оценке 5% на Зиверт. В то же время данная оценка, предусмотренная линейной беспороговой концепцией, не характеризует в полной мере долговременное воздействие низких доз ИИ [1]. Низкодозовое воздействие включает ряд непрямых радиационных эффектов, в том числе «эффект свидетеля» и феномен увеличения генетической нестабильности. Данные риски нашли отражение в концепции наименьшего из возможных достижимых радиационных воздействий (ALARA) [2]. При этом низкоинтенсивные источники являются крайне сложными с точки зрения оценки биологических эффектов, но крайне важными, учитывая глобальные масштабы радоновой проблемы. Проблеме радона в современных исследованиях справедливо уделяется большое внимание как проблеме основного

радиационного фактора непрофессионального (резидентного) облучения населения Земли.

Радон – радиоактивный газ, признанный одним из наиболее опасных канцерогенов, действующих на организм человека. Его выделение в атмосферу происходит постоянно в результате распада природного изотопа урана-238. Очаги выделения радона расположены неравномерно на земной поверхности; их расположение зависит от географического положения объекта, форм микрорельефа, состава материнской горной породы, а также дефектов конструкции строений, используемых строительных материалов и т.д. В природных условиях радиоактивный газ быстро рассеивается в атмосфере и достаточно быстро распадается (период полураспада изотопа  $\text{Rn}222=3,82$  суток), поэтому данный радиационный фактор не играет большой роли на открытой местности. Однако, закрытые пространства – жилые и производственные помещения – являются своеобразными «ловушками», которые способны накапливать радон, и его концентрация может в 10 раз превышать таковую на открытом воздухе. Это становится причиной серьезного радиоактивного облучения людей, находящихся в таких помещениях в течение длительного времени. Таким образом, радоновое облучение составляет не менее 50% от общего радиационного облучения современного человека.

Установлено, что облучение радоном может приводить к развитию рака легкого в условиях как профессионального, так и бытового облуче-

*Ларионов Алексей Викторович, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.*

*E-mail: alekseylarionov09@gmail.com*

*Волобаев Валентин Павлович, ассистент кафедры биотехнологии. E-mail: volobaev.vp@gmail.com*

*Сердюкова Екатерина Сергеевна, студент, кафедра генетики. E-mail: katty.serdyukova.1997@mail.ru*

ния людей. В настоящее время обсуждается роль низкодозового облучения радоном в индукции лейкемии [3], немеланомного рака кожи [4] и злокачественных образований желудочно-кишечного тракта [5].

Микроядерный тест в условиях цитокинетического блока признан простым и эффективным методом, который позволяет выявить хромосомные нарушения в результате воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. В настоящее время он является одним из основных методов биологической дозиметрии, также как и метод оценки частоты дицентрических хромосом [6,7]. Оба метода показывают наличие стабильной корреляции с суммарной поглощенной дозой ионизирующего излучения, накопленной объектом.

Информативность метода микроядерного теста была повышена за счет дискриминации между спонтанными и кластоген-индуцированными микроядрами (МЯ) [8,9] – современная методика флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с панцентромерными зондами, которые связываются специфически с областью центромеры. Микроядра (МЯ), содержащие метки, обозначаются С+, не содержащие С-, соответственно.

Этот же метод позволяет провести косвенный анализ потерь хромосом и их фрагментов в клетках. По сравнению с ним, обычная рутинная окраска не дает возможности различить микроядра, вызванные поломками в хромосомном материале, и микроядра, вызванные анеуплоидией. Кроме того, рутинные методы не позволяют оценить степень тяжести хромосомного повреждения, так как невозможно определить, содержится в ядре целая хромосома или только ее часть.

Однако, данный метод делает цитоплазму трудно различимой при микроскопировании вследствие специфики подготовки препаратов. Поэтому стандартный подход подсчета числа микроядер в фиксированном количестве клеток, основанный на дифференцировке двуядерных клеток от клеток других типов, не представляется возможным. Вследствие этого, ряд исследователей предпочитают подход, основанный на подсчете определенного числа микроядер, с последующим расчетом доли центромер-позитивных МЯ [10, 11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Обследованная выборка*

Материалом для исследования послужили образцы биоматериала, полученные у 52 жителей г. Кемерово, не занятых на вредных производствах. Одновременно проводилось измерение радиационных параметров: объемной активности радона (ОА  $^{222}\text{Rn}$ ) в воздухе жилого помещения и показатель бета- и гамма-фона.

Всего было обследовано 26 мужчин (средний возраст – 30 лет, от 24 до 41 года) и 26 женщин (средний возраст 36 лет, от 24 до 50 лет).

Исследование проводили, руководствуясь требованиями Комиссии по этике Кемеровского государственного университета. Протокол заседания комиссии по этике утвержден на заседании Комиссии № 4 от 10.10.2016 г. Участники исследования подписывали форму информированного согласия, содержащую информацию о целях исследования.

### *Микроядерный тест*

Образцы венозной крови собирались в гепарин-содержащие вакутейнеры объемом 4 мл и хранились при температуре 4 °С не более 24 часов до культивирования. Образец цельной крови объемом 200 мкл переносился в культуральный флакон площадью 25см<sup>2</sup> (ТРР, Швейцария). Культуральная среда включала 3 мл RPMI-1640 (Панэко, Москва), 0,8 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 55 ЕД/мл пенициллина-стрептомицина. Фитогемагглютинин добавлялся в концентрации 30 мг\флакон, и культуры инкубировались в течение 44 часов при 37% в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. На 44-м часу добавлялся цитохалазин В (Aplichem, США) в концентрации 6 мг\мл. Затем клетки культивировались еще 24 часа, после чего переносились в пробирки и обрабатывались 0,125М KCl в течение 30 с. Затем добавлялся 1 мл свежего фиксатора Карнуа (3 части метанола на 1 часть ледяной уксусной кислоты). После 3 смен фиксатора (5 мл фиксатора Карнуа), клеточные суспензии помещались на хранение при –20 °С [12]. Супернатант при этом удалялся после центрифугирования, объем клеточного осадка не превышал 200 мкл. Суспензии раскапывались на холодные сухие стекла, окрашивались азури-эозином и анализировались с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i в проходящем свете при увеличении 1000х с использованием масляной иммерсии. Для каждого препарата исследовалась 1000 двуядерных клеток, учитывались клетки с микроядрами согласно протоколу, разработанному M.Fenech, 2000 [13].

### *Флуоресцентная гибридизация (FISH)*

Для приготовления препаратов использовали сухие стекла, на которые раскапывалась клеточная суспензия. Полученные препараты отмывались трехкратно в 2х SSC (высокосолевой цитратный буфер) по 5 минут в 3-х кюветках Шиффердеккера. Далее на 5 минут предметные стекла помещались в раствор пепсина для гидролиза белков (0,01% пепсина (70 мл воды + 70 мкл 10% пепсина + 70 мкл HCl (к)), раствор применяется теплым при 37 °С). Затем препараты фиксировались в течение 10 минут в параформальдегиде (0,5 г сухого параформальдегида + 50 мл 1х PBS + 5 мкл 5 М NaOH) и отмывались 5 минут в 1х PBS буфере (Amresco, США).

После этого стекла высушивались в батарее спиртов (70%, 80%, 96/100%) по 5 минут в каждом из сосудов. После стекла просушивали на нагревательном столике. Наносили по 10 мкл зондов на стекло, убирали пузыри, накрывали покровным стеклом, после чего заклеивали края стекла быстрозатвердевающим клеем. Препараты с нанесенными зондами помещались в гибридаizer (Termobrite, США) в условиях влажной среды на 5 мин при 75 градусах, от 16 до 24 часов при 37 градусах. Режим Denat and Hyb. После гибридизации флуоресцентные зонды надежно связывались с маркерным участком, для предотвращения быстрого выцветания флуорофора проводили обработку. Готовили WT1 (2 мл 20x SSC + 98 мл воды + 300 мкл Nonidet) и WT2 (10 мл 20x SSC + 90 мл воды + 100 мкл Nonidet), NONIDET P-40 (NP40) – мягкий неионный неденатурирующий детергент [14].

С предметных стекол снимали покровные и помещали в разогретый до 72 °С раствор WT1. Дальнейшие операции с препаратами проводились в темноте. Стекла экспонировались в растворе WT2 в течение 5 минут. После просушивания препаратов от остатков воды добавляли каплю реактива Prolong Gold antifade with DAPI. Затем на препараты наносили быстросохнущий лак.

Полученные препараты просматривались на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Imager 2 при увеличении 1000. Критерии отбора двуядерных лимфоцитов и учет микроядер проводили согласно стандартной методике. Учитывалась 1000 двуядерных лимфоцитов на каждом препарате. Микроядро со светящейся меткой содержит центромеру.

*Статистические методы*

Статистический анализ данных проводили с

использованием пакета Statistica 10.0. Для количественных показателей рассчитывались средние значения и пределы 95% доверительного интервала (ДИ 95). Сравнение групп выполняли с использованием U-теста Манна-Уитни. Уровень значимости был принят на уровне 5%. Корреляцию между показателями для случая непараметрических данных рассчитывали с использованием коэффициента корреляции Пирсона для рангов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Среднее значение объемной активности (ОА) радона в воздухе помещений составило 113,5 Бк/м<sup>3</sup>, значение МАЭД гамма-фона составило 0,11 мкЗв/ч, плотность потока бета-излучения 0,5 с<sup>-1</sup>.

Установлена средняя частота двуядерных клеток с микроядром (15,4‰). Доля С+ составила 23,9% (табл. 1). При этом значимых различий в частоте показателей между группой мужчин и женщин не обнаружено.

Частота клеток с микроядром увеличивалась с возрастанием ОА радона в воздухе помещений. Доля центромер-позитивных микроядер также возрастала в группе обследованных с уровнем ОА более 200 Бк/м<sup>3</sup> в сравнении с первой группой (менее 50 Бк/м<sup>3</sup>) (табл. 2).

Также была рассчитана возможная корреляция между исследованными показателями и ОА радона (рисунок 1). Отмечена корреляция между долей 2-ядерных клеток с МЯ и ОА радона в воздухе (p=0,0026), в то же время доля С+МЯ несколько увеличивалась с возрастанием ОА, однако данная тенденция не подтверждена при расчете коэффициента корреляции (p=0,48). Не было найдено корреляции между частотой

**Таблица 1.** Частота микроядер и доля центромер-позитивных микроядер в обследованной группе

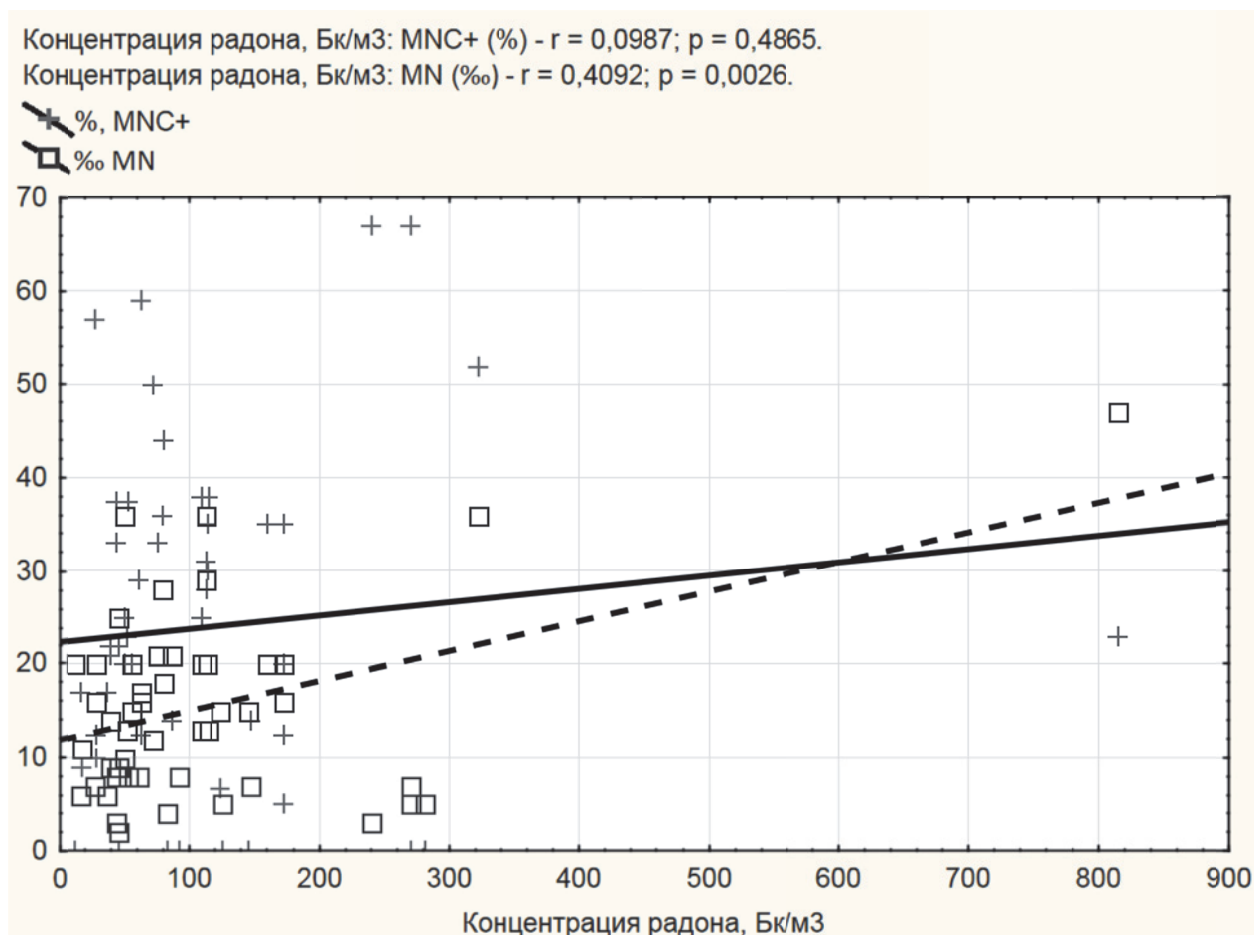
MN ‰, [95% ДИ]		с+ MN, %, [95% ДИ]	
Муж	Жен	Муж	Жен
14,0 [10,2-17,8]	16,9 [13,1-20,7]	21,3 [14,2-28,3]	26,6 [19,6-33,7]
N=26	N=26	N=26	N=26

Примечание. Приведено значение частоты двуядерных лимфоцитов с микроядром (‰), а также доля центромер-позитивных микроядер (%) и 95% доверительный интервал (ДИ)

**Таблица 2.** Частота 2-ядерных клеток с микроядром и доля центромер-положительных микроядер (С+МЯ/С-МЯ) в условиях разного уровня радона в помещении

ОА радона в воздухе помещения, Бк/м <sup>3</sup>	N	Частота 2-яд. с МЯ, ‰ (95% ДИ)	Доля С+ МЯ, % (95% ДИ)
<50 Бк/м <sup>3</sup>	14	11,1 [6,0 – 16,2]	18,4 [8,9 – 28,0]
50 - 100 Бк/м <sup>3</sup>	16	15,9 [11,2 – 20,7]	26,5 [17,6 – 35,4]
100 - 200 Бк/м <sup>3</sup>	16	18,1 [13,3 – 22,8]	22,1 [13,2 – 31,0]
>200 Бк/м <sup>3</sup>	6	17,2 [9,4 – 24,9]	34,7 [20,2 – 49,3]
Всего	52	15,4 [8,0 – 11,9]	23,9 [15,1 – 22,3]

Примечание. Приведена частота микроядер (‰) и доля центромер-позитивных микроядер (%) и 95% доверительный интервал (ДИ)



**Рис. 1.** Корреляция частоты 2-ядерных клеток с микроядром и доли центромер-положительных микроядер (С+МЯ/С-МЯ) с ОА радона в помещении

микроядер в двуядерных лимфоцитах и долей центромер-позитивных микроядер и возрастом обследованных.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели цитогенетических повреждений считается чувствительным к воздействиям различных факторов, включая накопленную дозу радиации. Накопленная доза радиации может приводить к формированию разрывов ДНК, нерепарированные разрывы могут приводить к формированию цитогенетических аномалий. Микроядра формируются в результате отставания фрагментов хромосом или целых хромосом в анафазе деления. Данный метод показал хорошие перспективы в качестве средства оценки биологического эффекта накопленной дозы радиации, в частности отмечена чувствительность на уровне 0,25 Гр для показателя спонтанных микроядер. Данный подход показал эффективность при обследовании пострадавших в Чернобыльской аварии [15] и Стамбульской аварии (декабрь 1998 – январь 1999) [16].

Подавляющее большинство случаев формирования МЯ связано с их формированием

в результате потери и не включения в дочерние ядра крупных фрагментов: ацентрических хромосомных фрагментов, ацентрических хроматидных фрагментов или целых хромосом. Подобные крупные фрагменты не прикрепляются к веретену деления во время сегрегации ядер [17]. Вокруг таких хромосом и их участков формируется ядерная мембрана, что придает микроядрам морфологическое сходство (за исключением размеров) с ядрами клеток после проведения окрашивания.

В дальнейшем микроядра могут провоцировать нарушение деления клетки вследствие активации путей репликации или репарации ДНК. Клетка может закончить свое существование путем апоптоза [18]. Возможно, процесс образования микроядер занимает важное место в геномной пластичности опухолевых клеток [19]. Высказывалось мнение, что вскоре после формирования микроядра в клетке, уничтожаются или вытесняются [20]. Более полное описание судьбы микроядер и содержащих их клеток, является приоритетным направлением будущих исследований.

Если процесс деления все же осуществляется, то содержащаяся в микроядре хромосома

способна к нормальной репликации. При нормальной сегрегации в последующем митозе возможно образование двух нормальных диплоидных клеток. Также в некоторых случаях, в микроядре могут наблюдаться дефекты сегрегации и репликации, что может приводить к формированию двух дочерних клеток, одна из которых содержит сохранившееся микроядро. Если микроядро способно реплицироваться, но не может быть сегрегировано должным образом в последующем митозе, то клеточное деление ингибируется с формированием двуядерной клетки [21].

Образование ацентрических хромосомных фрагментов может быть обусловлено несколькими механизмами. Несколько десятилетий назад было установлено, что к симметричным и несимметричным хроматидным и хромосомным обменам могут приводить ошибки репарации разрывов двойной спирали ДНК. Таким образом образуются как хроматидные, так и хромосомные фрагменты. Небольшое количество хромосомных фрагментов может образоваться в результате ошибок процесса репарации разрывов молекулы ДНК. Это происходит в том случае, когда нагрузка, ведущая к повреждению ДНК, превосходит репаративный потенциал клетки. Вероятность ошибок репарации увеличивается при наличии ошибок гомологичной рекомбинации ДНК, в которой нарушения связаны с дефектами в соответствующих генах, таких как BRCA1 и BRCA2. Также известно, что разрывы ДНК, приводящие к образованию МЯ, могут быть неотрепарированы в связи с дефектами ферментов, связанных с репарацией по типу негомологичного слияния концов [22].

К формированию микроядер также могут приводить такие механизмы, как одновременное повреждение эксцизионной репарации (например, 8-оксо-диоксогуанозин), минорные ошибочные основания, включаемые в состав нити ДНК (например, урацил), в том случае, если они находятся в непосредственной близости и на противоположной комплементарной нити ДНК. Действуя одновременно, эти события эксцизионной репарации приводят к разрывам двойной спирали ДНК и образованию МЯ, особенно в случаях, когда разрыв не заполняется (репарируется).

Знание этих процессов может быть использовано для увеличения чувствительности микроядерного теста путем конвертирования эксцизионно-отрепарированных повреждений ДНК в разрыв цепи ДНК и соответственно МЯ посредством обработки цитозин-арабонозидом (во время G1 фазы клеточного цикла), который ингибирует заполнение разрыва (репарацию разрыва) на стадии эксцизионной репарации. Таким образом, тест становится более чувстви-

тельным к воздействию основных генотоксических агентов, индуцирующих образование ДНК-аддуктов.

Недавние исследования также показали, что формирование МЯ может быть связано с фрагментированным хромосомным материалом, образующимся во время формирования моста, растянутого и сломанного во время телофазы [23].

У здоровых людей микроядра в лимфоцитах обычно образуются как из ацентрических фрагментов, так и из целых хромосом в соотношении между 30 к 70% и 70 к 30% в зависимости от пола и возраста. Частота образования МЯ повышается с увеличением возраста; у женщин она в целом выше по сравнению с мужчинами. Половые хромосомы определяют повышение потерь хромосом в процессе митоза с возрастом. У женщин X-хромосома может составлять до 72% от всех МЯ, при этом 37%, по видимости, связано с дефектами кинетохора, что, вероятно, связано с инактивацией X-хромосомы [24].

Одним из механизмов образования микроядер являются нарушения расхождения хромосом в анафазе. Например, вследствие гипометилирования цитозина в центромерных и перичентромерных повторяющихся последовательностях (классические сателлитные повторы в перичентромерных регионах и повторы высшего порядка в центромерной ДНК). В норме классическая сателлитная ДНК подвергается метилированию остатками цитозина, но при синдроме ICF (иммунодефицит) метилирование не происходит, как и в результате обработки 5-азацидином (ингибитором ДНК-метилтрансферазы).

При гипометилированной цитозине перичентромерные регионы 1, 9 и 16 хромосом значительно удлиняются. Это служит причиной нарушения сегрегации хромосом, а также их потери и реализации в МЯ, вероятно, из-за неверной сборки кинетохора. Объединения кинетохорных белков (например, CENPA и CENPB) в центромерах, обычно, связано со статусом метилирования цитозина, а также метилирования гистонов. В последнем случае уменьшение целостности гетерохроматина может помешать прикреплению микротрубочек к кинетохору.

Ключевая роль кинетохорных белков при соединении хромосом с нитями веретена деления может быть причиной того, что дефекты в кинетохорных белках и микротрубочках приводят к формированию микроядер из потерянных в анафазе хромосом. Отставшие хромосомы могут быть материалом для формирования МЯ также в случае дефектов веретена деления, дефектов чек-пойнт генов, контролирующих митоз, а также ненормальной амплификации центросом. Установлено, что дицентрические хромосомы, сформированные по итогам объединения концов теломер, зачастую способны вовлекаться

в события сегрегации. Это происходит, если в анафазе центромеры дицентрических хромосом растягиваются к разным полюсам клетки с достаточными силами, чтобы оторвать хромосомы от веретена деления [25].

Для распознавания МЯ, образованных целыми хромосомами и ацентрическими фрагментами, использован метод панцентромерных ДНК-зондов. Специфичные хромосомные пробы позволяют разделять хромосомные потери, приводящие к формированию МЯ даже в случае отсутствия сформированных МЯ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модифицированный метод микроядерного теста, который позволяет дифференцировать анеугенные и кластогенные эффекты, является перспективным методом биодозиметрии. Представленные данные являются частью проекта по исследованию влияния низкодозового облучения радоном на организм человека, и в дальнейшем планируется существенное расширение группы обследованных. Обнаруженное увеличение частоты микроядер с увеличением ОА радона может быть вызвано дополнительным хроническим экспонированием радоном. В то же время тенденция к увеличению доли центромер-позитивных микроядер в группе с наибольшим уровнем радона не получила статистического подтверждения, что не исключает перспектив подобного показателя для оценки хронического экспонирования радоном.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burt J.J., Thompson P.A., Lafrenie R.M.* Non-targeted effects and radiation-induced carcinogenesis: a review // *J. Radiol. Prot.* 2016. Vol. 36. R23–R35.
2. *Valentin J.* The 2007 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. Ann ICRP. 2007. Vol. 37(2-4). P. 1–332.
3. *Henshaw D.L., Eatough J.P., Richardson R.B.* Radon: A causative factor in the induction of myeloid leukaemia and other cancers in adults and children? // *The Lancet.* 1990. Vol. 335. P. 1008 – 1012.
4. Radon and skin cancer in southwest England: an ecologic study / *B.W. Wheeler, J. Allen, M.H. Depledge, A. Curnow* // *Epidemiology.* 2012. Vol. 23 (1). P. 44–52.
5. *Kjelberg S., Wiseman J.S.* The relationship of radon to gastrointestinal malignancies // *Am. Surg.* 1995. Vol. 61 (9). P. 822–825.
6. *Müller W.-U., Streffer C.* Micronucleus assays // *Adv. Mutagen. Res.* 1994. No. 5. P. 1–134.
7. *Fenech M., Perepetskaya G., Mikhalevich L.* A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl catastrophe // *Environ. Mol. Mutagen.* 1997. Vol. 30. P. 112–118.
8. *Vral A., Thierens H., Ridder de L.* In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes // *Int. J. Radiat. Biol.* 1997. Vol. 71. P. 61–68.
9. *Norppa H., Renzi L., Lindholm C.* Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization // *Mutagenesis.* 1993. No. 8. P. 519–525.
10. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all chromosome centromeric probe / *C. Bolognesi, E. Landini, E. Perrone, P. Roggieri* // *Mutation Research.* 2004. Vol. 557. P. 109–117.
11. Validation of the micronucleus-centromere assay for biological dosimetry / *A. Wojcik, M. Kowalska, E. Bouzyk, I. Buraczewska, G. Kobialko, N. Jarocewicz, I. Szumiel* // *Genet. Mol. Biol.* 2000. Vol. 23. No. 4. P. 1083–1085.
12. *Fenech M.* Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death // *Mutat. Res.* 2006. Vol. 600 (1–2). P. 58–66.
13. *Fenech M.* The in vitro micronucleus technique // *Mutat Res.* 2000. Vol. 455. P. 81 – 95.
14. Cytogenetics for biological dosimetry / *M. Ricoul, T. Gnana-Sekaran, L. Piqueret-Stephan, L. Sabatier* // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1541. P. 189–208.
15. Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus / *L.S. Mikhalevich, F. A. De Zwart, G.A. Perepetskaya, N.V. Chebotareva, E.A. Mikhalevich, A.D. Tate* // *Int. J. Radiat. Biol.* 2000. Vol. 76. P. 1377–1385.
16. IAEA (International Atomic Energy Agency) Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual, 2001. No405. P. 71–87.
17. *Fenech M.* The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry // *Health Phys.* 2010. Vol. 208. P. 234–243.
18. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction / *M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P.van Hummelen* // *Mutation Research.* 1997. Vol.392(1-2). P. 19–30.
19. *Utani K., Kohno Y., Okamoto A.* Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. e10089.
20. Selective entrapment of extra-chromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase / *N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G.M. Wahl* // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 140. P. 1307–1320.
21. *King R.W.* When 2+2=5: The origins and fates of aneuploid and tetraploid cells // *Biochimica et biophysica acta.* 2008. Vol. 1786(1). P.4–14.
22. *O'Donovan P., Livingston D.M.* BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double strand break repair // *Carcinogenesis.* 2010. Vol. 31. P. 961–967.
23. *Hoffelder D.R., Luo L., Burke N.A.* Resolution of anaphase bridges in cancer cells // *Chromosoma.* 2004. Vol. 112. P. 389–397.
24. *Hando J.C., Nath J., Tucker, J. D.* Sex chromosomes,

micronuclei and aging in women // Chromosoma. 1994. Vol.103. P. 186–192.  
25. Whole chromosome loss is promoted by telomere

dysfunction in primary cells / J. Pampalona, D. Soler, A. Genesca, L. Tusell // Genes Chromosomes Cancer. 2010. Vol. 49(4). P. 368–378.

**APPLICATION OF THE IMPEDANCE METHOD FOR COMPARATIVE RESEARCH OF THE CHRONIC CHEMICAL STRESS IMPACT ON THE DEVELOPMENT OF THE GASTROINTESTINAL TRACT PATHOLOGY OF MALE AND FEMALE WHITE OUTBRED RATS**

© 2018 M.V. Kanevsky, I.K. Mironova, S.A. Konnova, A.A. Galitskaya, I.M. Agranovich, A.P. Khorovodov, E.G. Borisova, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya

Saratov State University

The results of comparative analyzes of the electrical properties (impedance and polarization coefficient) of healthy and pathological tissues of male and female white outbred rats are presented. It is shown that simulation of chronic chemical (diet with the inclusion of sodium nitrite and m-toluidine) and social (overcrowding) stress for 270 days leads to the development of pretumor pathologies and tumors of the gastrointestinal tract in 56% of animals, and there are 1.6 times more males with tumors than females, which is confirmed by histological studies. Measuring the impedance, it has been established that such a complex stress effect induces significant changes in the electrical parameters of the erythrocyte mass, as well as the tissues of the stomach and liver. In particular, a significant decrease was found in comparison with the control of the tissue polarization coefficient in males and females, respectively: in erythrocyte mass by 17 and 6%; in the gastric mucosa by 43 and 36%; in liver by 50 and 43% - this altogether may characterize the decrease in tissue viability and the presence of necrotic changes in them. It is shown that changes in the electrical parameters of tissues in males are more pronounced, which corresponds to the frequency of pathology development in males. It is noted that changes in the electrical parameters of erythrocyte mass is a convenient in vivo monitoring approach for studying the development of pathologies, including precancerous conditions of the gastrointestinal tract.

*Keywords:* rat tissue impedancemetry, gastric cancer, chronic stress.

---

*Alexey Larionov, Ph.D., Associate Professor of the Department of Genetics.*

*E-mail: alekseylarionov09@gmail.com*

*Valentin Volobaev, Assistant Lecturer at the Department of Biotechnology. E-mail: volobaev.vp@gmail.com*

*Ekaterina Serdyukova, Student, Department of Genetics.*

*E-mail: kattya.serdyukova.1997@mail.ru*