

УДК 575.22;575.224

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИВОТНЫХ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

© 2014 г. К. Г. Орджоникидзе, Т. Б. Демидова*, Е. Ю. Крысанов*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991, Москва, ул. Губкина, 3

**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН*

119071, Москва, Ленинский пр. 33

E-mail: krysanov@sevin.ru

Поступила в редакцию 11.12.13 г.

Окончательный вариант получен 14.01.14 г.

В статье рассмотрены современные методы оценки генетического гомеостаза животных. Подробно рассмотрены такие методы как ДНК-комет тест, микроядерный тест, хромосомные aberrации и сестринские хроматидные обмены. Рассмотрены вопросы чувствительности данных методов и особенности их применения для оценки генетического гомеостаза в естественных популяциях животных.

Ключевые слова: генетический гомеостаз, ДНК-комет тест, микроядра, aberrации хромосом, сестринские хроматидные обмены, окружающая среда, животные, онтогенез.

DOI: 10.7868/S0475145014030033

Организм на протяжении всего своего развития подвергается воздействию весьма разнообразных факторов как внешних, так и внутренних. Одной из главных особенностей живого организма является способность к поддержанию гомеостаза, как на уровне целого организма, так и отдельных его составляющих. В нормальных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством сложной физиологической системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий эти механизмы могут быть нарушены. Такие нарушения гомеостаза могут происходить до появления изменений, обычно используемых в качестве параметров жизнеспособности живых существ.

Изменения гомеостаза отражают базовые изменения функционирования живых существ и находят выражение в процессах, протекающих на разных уровнях, от молекулярного до организменного, и соответственно, могут быть оценены по различным параметрам с использованием различных методов. Способность поддерживать относительное постоянство и целостность генетических систем можно назвать генетическим гомеостазом.

Существуют разнообразные методы оценки генетического гомеостаза организма от молекулярных до цитогенетических. В настоящем обзор

е мы попытаемся рассмотреть ограниченный набор цитогенетических методов оценки генетического гомеостаза ориентируясь в основном на их применение к естественным популяциям животных на разных стадиях онтогенеза. Прямого или опосредованного химико-токсикологического анализа биологического образца недостаточно для понимания возможной опасности для живых организмов тех или иных воздействий. Необходима комплексная оценка реакции организма на разных уровнях его организации на те или иные токсические воздействия.

К основным цитогенетическим методам такого рода можно отнести анализ частот поврежденных ДНК, визуализируемых в виде ДНК-комет, микроядер, хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов.

В настоящее время наиболее часто употребляемыми являются ДНК-комет-тест и микроядерный тест, тогда как анализ хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов встречается сравнительно редко.

Также необходимо отметить, что в данном обзоре основное внимание будет уделено применению этих методов *in vivo*.

ДНК-КОМЕТ

Гель-электрофорез единичных клеток (*Comet Assay*) является одним из наиболее перспективных методов в мониторинге генотоксического действия широкого спектра как антропогенных, так и природных факторов на животных и растениях *in vivo*. Данный высокочувствительный метод позволяет оценить первичные повреждения ДНК, которые, впоследствии, как известно, могут приводить к возникновению хромосомных aberrаций и нарушению процессов клеточной пролиферации и дифференцировки, к апоптозу или развитию патологий различных тканей и органов. Следствием нарушений целостности генетического материала может оказаться снижение репродуктивного успеха животных, являющегося залогом успешного существования популяции. Таким образом, экотоксикологические параметры среды обитания и реакции на них биологических объектов представляют особую важность при изучении экологии видов в контексте их взаимодействия с факторами окружающей среды.

Предложенный в 1978 г. (Rydberg, Johanson, 1978) и усовершенствованный впоследствии (Olive, Banáth, 2006) метод основывался на принципе миграции ДНК клеток, иммобилизованных в агарозный гель и помещенных в электрическое поле. Преимуществом метода явилась его способность регистрировать повреждения ДНК на уровне единичной клетки. Позднее он был усовершенствован для регистрации целого ряда явлений (апоптоз, репарация, последствия некоторых физиологических состояний, оксидативный стресс) на различных тканях животных (Korpen, Verschaeve, 1996). В последнее десятилетие появилось большое количество работ, посвященных изучению генотоксического действия физических факторов (ионизирующая радиация, электромагнитное излучение), а также новых материалов, таких как наночастицы и нанотрубки (Oberdörster et al., 2005).

Основными этапами проведения теста ДНК-комет являются: получение гель-слайдов, получение микропрепаратов клеток, лизис, электрофорез, фиксация, окрашивание и микроскопический анализ слайдов.

Для получения гель-слайдов предметные стекла покрывают 1% агарозным гелем, в который вносят исследуемые клетки. Гель с клетками наносят на подготовленные гель-слайды. После затвердевания клетки подвергаются лизису, во время которого происходит диссоциация клеточных структур и выпетливания хроматина в поры агарозы. При электрофорезе под влиянием электрического поля ДНК мигрирует к аноду в виде отдельных фрагментов или петель и формирует электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от количества разрывов в ДНК. После электрофореза препараты фиксируют и окрашивают флуоресцирующими кра-

сителями, применяемыми для визуализации ДНК – этидиум бромид, пропидиум бромид, акридиновый оранжевый, SYBR Green I, YOYO-I, DAPI. Микропрепараты анализируют на флуоресцентном микроскопе с использованием высокочувствительной камеры и программного обеспечения, что позволяет проводить цифровую обработку геометрии комет (Оценка генотоксических свойств ... , 2010). При подобном способе анализа препаратов в качестве показателей поврежденности ДНК используют следующие основные показатели: длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте и “момент хвоста” (произведение первых двух перечисленных параметров). При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на несколько условных типов, а степень поврежденности вычисляется по формуле для индекса комет (отношение суммы числа комет каждого типа к общей сумме подсчитанных комет) (Collins, Dušinská, 2002; Collins, 2004; Olive, Banáth, 2006).

Существует два основных варианта метода ДНК-комет – нейтральный, при котором регистрируются двунитевые разрывы и щелочной, когда помимо двунитевых регистрируются также однонитевые. Последний вариант расширяет возможности оценки генотоксических факторов, однако требует дополнительных манипуляций: щелочной денатурации при $pH > 13$, в результате которой щелочно-лабильные сайты реализуются в однонитевые разрывы, щелочного электрофореза и нейтрализации слайдов.

К преимуществам данного метода можно отнести относительную простоту манипуляций, невысокую стоимость проведения исследования, высокую чувствительность, возможность исследовать любой биологический материал, в том числе малого объема или полученный в полевых условиях, что важно в экологических и генотоксикологических исследованиях.

Существует ряд работ, посвященных использованию метода ДНК-комет в качестве биоиндикаторного теста для экологической оценки влияния возможных генотоксикантов на окружающую среду, в частности, судя по реакции со стороны населяющих данную область организмов.

Наиболее популярными объектами в экологических исследованиях акваторий являются пресноводные и морские моллюски. Слободсковой с соавт. в 2010 г. была проведена оценка генотоксичности среды обитания на Дальнем Востоке на степень повреждения молекулы ДНК жаберных клеток эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*, Prime (Слободскова и др., 2010). Объектом другого исследования послужили пресноводные моллюски, обитающие на территории радиационно-экологического заповедника в зоне загрязнения Чернобыльской АЭС. В ходе данного исследования авторам удалось, помимо оценки загрязненности территорий, выявить различия в

уровнях пролиферативной активности гемоцитов моллюсков (Конева, 2013). Помимо моллюсков объектами для оценки состояния водной среды также являются различные виды проживающих на потенциально загрязненных территориях рыб семейства карповых, пециллиевых и т.д. (Russo et al., 2004; Стяжкина и др., 2011). Кроме изучения прямого воздействия гентоксических агентов рассматриваемый метод применяется для рассмотрения, к примеру, процессов репарации у глубоководных организмов, подверженных воздействию высокого давления (Pruski, Dixon, 2003).

В целом анализ литературы позволяет сделать заключение, что метод ДНК-комет прекрасно зарекомендовал себя в экотоксикологическом мониторинге водной среды.

Сухопутные организмы значительно реже выступают в качестве тест-объектов в экотоксикологических исследованиях. Из беспозвоночных можно отметить почвенных червей (Verschaeve, Gilles, 1995) и кузнечика (Augustyniak et al., 2013). Эти животные являются удобными индикаторами степени загрязнения почв солями тяжелых металлов или источниками ионизирующих излучений.

Одной из положительных сторон метода ДНК-комет является возможность проведения нескольких этапов теста в полевых условиях, когда хранение и транспортировка биологического материала могут оказаться трудоемкими или исказить итоговую картину исследования. Так, в исследованиях зависимости повышения степени повреждения ДНК на обитающих вблизи угольных карьеров представителях семейства тукотуковых, авторы проводили лизис в местах сбора материала, упаковывали образцы и отправляли их в лабораторию (Silva et al., 2000). При подобном подходе исчезает необходимость в изъятии животных из мест их обитания или их умерщвлении, что соответствует нормам биоэтики.

Модификация метода для работы с клетками генеративного ряда расширяет возможности при изучении экологии и физиологии уникальных животных, что демонстрирует недавнее исследование структурных особенностей спермиев у самцов австралийской ехидны, где авторы применили комбинацию молекулярно-генетических методов и щелочной модификации метода ДНК-комет (Johnston et al., 2009).

Оборотной стороной чувствительности метода является необходимость создания условий для недопущения появления посторонних повреждений клеток в процессе проведения исследования, что требует высококвалифицированного подхода. При этом параметры процедуры тестирования зависят не только от цели исследования или выбранной ткани, но и тестового вида (Jha, 2008; Collins, 2004; Сорочинская, Михайленко, 2008). Таким образом, при биомониторинге должен учитываться комплекс факторов как биологиче-

ской (пол, возраст, индивидуальная чувствительность в рамках одного вида), так и физико-химической (температура, pH) природы. Не следует также забывать о необходимости корректного подбора положительного и отрицательного контролей. Метод применим на различных тканях и может выявлять органоспецифическое действие агентов, однако, требует индивидуального подбора и стандартизации параметров таких процедур, как лизис, электрофорез, подготовка образца. Наиболее популярным органом-мишенью (для млекопитающих) является печень ввиду ее роли в метаболической активации и детоксикации ксенобиотиков, однако, при выборе органов и тканей для анализа необходимо исходить из химической природы и свойств токсического агента (Jha, 2008).

Рассмотренные вопросы свидетельствуют о том, что метод ДНК-комет обладает приемлемой чувствительностью для выявления первичных повреждений молекулы ДНК, вызванных неблагоприятной средой обитания, однако его применимость для экотоксикологических исследований должна оцениваться в контексте его уместности и актуальности для той или иной цели и сочетаться с использованием общепринятых методов.

МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ

В последние 20 лет тест на микроядра используется как надежный показатель генотоксического действия самых разных факторов (Schmid, 1975; Heddle et al., 1991). Простота и надежность этого теста позволяет использовать его как в лабораторных исследованиях токсичности различных веществ (Marrazzini et al., 1994), так и при мониторинге состояния природных популяций. Тест на микроядра является наиболее удобным и распространенным методом измерения повреждений хромосом у различных организмов, включая рыб, моллюсков, птиц и млекопитающих как в природе, так и в лаборатории (Bolognesi, Hayashi, 2011; Al-Sabti, Metcalfe, 1995). Наиболее широко он используется в водных экосистемах как биомаркер уровня загрязнений для самых разных групп организмов, от моллюсков (Mersch, Beauvais, 1997) до рыб (Hayashi et al., 1998) и амфибий (Fernandez et al., 1993).

Микроядро (МЯ) – это фрагмент ядра клетки не содержащий полного генома. Микроядра хорошо различимы в световой микроскоп и, как правило, расположены в цитоплазме недалеко от ядра клетки. Интенсивность и структура окрашивания микроядер сходна с окраской основного ядра. МЯ образуются из ацентрических хромосомных (или хроматидных) фрагментов или целых хромосом (хроматид), отстающих в процессе анафазы и не включающихся в основное ядро в телофазе. Ацентрические хромосомные фрагмен-

ты образуются в результате повреждений ДНК, а МЯ с целыми хромосомами образуются в результате нарушений сегрегации хромосом в анафазе, вызванными повреждениями веретена деления, кинетохора или дефектами в контроле клеточного цикла (Mateuca et al., 2006).

Одним из существенных достоинств метода является его простота и дешевизна. Частота МЯ подсчитывается на микропрепаратах, полученных из пролиферирующей ткани и окрашенных дифференциальными или флуоресцентными красителями. Для повышения чувствительности метода, при получении препаратов используется цитохалазин В, агент, индуцирующий цитокнетический блок. В результате на препаратах возрастает количество бинуклеарных клеток, что увеличивает чувствительность метода. Цитохалазин В блокирует деление цитоплазмы и приводит к образованию двуядерных, а в дальнейшем полиядерных клеток. Такая методика позволяет анализировать наличие микроядер в двуядерных клетках, прошедших один цикл деления (Fenech, 2007).

Тест на МЯ можно использовать для любых делящихся клеточных популяций независимо от структуры кариотипа. Как правило используются эритроциты, костный мозг у наземных позвоночных, а также жабры, почки или печень у водных животных (De Flora et al., 1993; Hayashi et al., 1998; Mersch, Beauvais 1997). При использовании эритроцитов одним из существенных преимуществ теста на МЯ является возможность применения этого метода без умерщвления животных, что позволяет проводить мониторинг состояния популяции не нарушая генетического разнообразия (Cabarcas-Montalvo et al., 2012).

Существуют различные механизмы действия генотоксичных веществ на структуру ДНК и целостность ядра. Генотоксиканты, приводящие к образованию МЯ условно делят на два класса: кластогены, приводящие к разрывам хромосом и образованию ацентрических фрагментов в микроядрах и анеугены, нарушающие веретено деления в процессе митоза и приводящие к образованию МЯ с отдельными хромосомами. Поэтому микроядра, образованные в результате кластогенного или анеугенного действия различаются по своему составу и могут содержать ацентрические фрагменты или целые хромосомы соответственно (Terradas et al., 2010). Возможность детектировать как кластогенные, так и анеугенные эффекты также является одним из достоинств микроядерного теста.

На образование МЯ могут влиять самые различные факторы. У здоровых особей МЯ образуются под действием внешних факторов, таких как загрязнение, радиация, лекарства, биологически опасные вещества или свободные радикалы. Кроме того, различные генетические заболевания, инфекции, воспалительные процессы или дефи-

цит питательных веществ также приводят к образованию МЯ.

Несмотря на очевидные преимущества, тест на МЯ имеет ряд недостатков. Они прежде всего связаны с низким спонтанным уровнем МЯ и его вариабельностью. Спонтанный уровень МЯ может варьировать у различных видов, в разные сезоны или под действием каких-либо внешних факторов. Кроме того, существенными являются физиологические (возраст, генеративное состояние или сезонные ритмы) и физико-химические факторы (температура, содержание кислорода в воде и др.) (Brunetti et al., 1988; 1992).

Имеются данные о разном уровне спонтанной частоты МЯ в различных органах и тканях. В некоторых тканях, например печени и эритроцитах рыб спонтанная частота МЯ, ниже, чем в предпочке (Bolognesi et al., 2006). Во многочисленных исследованиях было показано, что спонтанная частота МЯ существенно варьирует у различных видов и групп животных (Ильинских и др., 1992; Bolognesi, Hayashi, 2011; Grisolia et al., 2009; Melo et al., 2013; Zuniga-Ganzalez et al., 2000).

Известно, что на разных стадиях индивидуального развития чувствительность организма к воздействию генотоксикантов меняется. С возрастом возрастает частота хромосомных нарушений и, соответственно, увеличивается частота МЯ (Ильинских и др., 1992; Linde et al., 1998). Влияние сезона на чувствительность различных видов была отмечена у гидробионтов (Bolognesi et al., 2004; Bolognesi, Hayashi, 2011). Такие сезонные параметры как соленость, температура, pH и доступность пищи могут оказывать существенное влияние на появление МЯ. Кроме того, физиологическое состояние в различные сезоны года, так же как и генеративное состояние отражается на частоте МЯ. Так, было показано, что частота МЯ может различаться у самцов и самок (Ильинских и др., 1992).

Исследования в природе показали более высокую изменчивость в частоте МЯ в диких популяциях, по сравнению с лабораторными животными. Авторы рассматривают несколько факторов, объясняющих такую изменчивость, в том числе цитотоксичность и адаптацию к загрязненной окружающей среде, которая зависит от генетической составляющей популяции. Так например, высокая изменчивость и чувствительность были обнаружены в гетерогенных диких популяциях мидий (Bolognesi et al., 2004; Nigro et al., 2006).

Кроме того, особенность метаболизма экотоксиканта также может оказывать влияние на образование МЯ. Микроядра образуются в процессе деления клеток, поэтому они могут быть обнаружены в различное время после действия повреждающего события, в зависимости от кинетики клеточного цикла и механизма образования (Bolognesi, Hayashi, 2011). Для самых разных групп животных было показано, что виды обладают раз-

ной чувствительностью к экотоксикантам. Так например, чувствительность трех видов рыб европейских экосистем, кумжи (*Salmo trutta*, L.), обыкновенного голяна (*Phoxinus phoxinus*, L.) и речного угря (*Anguilla anguilla*, L.) к трем наиболее распространенным генотоксикантам, циклофосфамиду, колхицину и хлориду кадмия измеренная с помощью теста на МЯ оказалась различной (Rodrigues-Sea et al., 2003). У кумжи наблюдали достоверный рост МЯ под действием генотоксикантов, в то время как у голяна и угря его не было. Таким образом, кумжа оказалась чувствительна к трем генотоксикантам, а два других вида нет. Разница в чувствительности разных видов рыб была подтверждена в природе, так частота МЯ у кумжи была достоверно выше в более загрязненных водоемах, в то время как у голяна и речного угря этого не наблюдали.

Таким образом, микроядреный тест является простым и надежным методом для мониторинга состояния природных популяций, однако необходимо учитывать видовую, индивидуальную, физиологическую и сезонную изменчивость спонтанного уровня МЯ. Кроме того, постоянное присутствие в окружающей среде различных биотических и абиотических факторов затрудняет интерпретацию результатов: использование батареи тестов, повторные измерения и длительный мониторинг могут позволить снизить влияние изменчивости спонтанного уровня МЯ и выявить эффекты, связанные с загрязнением.

ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ, ГЕНОМНЫЕ МУТАЦИИ И СЕСТРИНСКИЕ ХРОМАТИДНЫЕ ОБМЕНЫ

Анализ хромосомных aberrаций применяется уже достаточно длительное время при изучении воздействия на живые организмы различных факторов окружающей среды (Бородкин, 1981; McVee et al., 1987; Гилева и др., 1992; Гилева и др., 1993; Крюков и др., 1995; Jena, Bhunya 1995; Глазко и др., 1996; Елисеева и др., 1996; Husby et al., 1999; Yadav, Trivedi, 2009).

Сущность метода состоит в учете нарушений структуры отдельных хромосом. Типы хромосомных aberrаций и методы их анализа хорошо известны и достаточно полно описаны в разнообразных учебных руководствах и обзорах (Захаров и др. 1982; Мамаева, 2002; Mateuca et al., 2006; Danford, 2012). Кроме того, часто при исследовании генотоксичности тех или иных факторов учитывают и геномные мутации к которым относят анеуплоидию и полиплоидию. Также, особенно на ранних стадиях онтогенеза или в отдельных тканях вместе с истинными aberrациями хромосом учитывают и разнообразные нарушения митотического аппарата клетки, так называемый анафазный метод (Печуренков, 1977; Kocan et al.,

1982; Евгеньева, Фадеева, 1997, Pak et al., 2012; Pak и др., 2013). Однако в настоящее время он применяется достаточно редко.

Для получения препаратов хромосом используются интенсивно пролиферирующие ткани (костный мозг у амфибий и млекопитающих, фабрициева сумка у птиц и предпочка у рыб), кроме того у беспозвоночных, рыб и амфибий часто используют эмбриональные стадии (Cheung et al., 2006; Dixon et al., 1999, 2002). Для визуализации хромосом используют, либо рутинное окрашивание, либо дифференциальное окрашивание с предварительной предобработкой препаратов. Следует однако отметить, что техники дифференциального окрашивания применяются почти исключительно для анализа хромосомных нарушений у человека или для некоторых лабораторных объектов. Для оценки частот aberrаций хромосом у животных из природных популяций применяют обычно только рутинное окрашивание хромосом, методы дифференциального окрашивания используют редко (McVee, 1991).

Пожалуй, из всех вышеописанных методов, подсчет хромосомных aberrаций является наиболее трудоемким и требующим высокой квалификации оператора, даже при исследовании контрольных лабораторных образцов высока межлабораторная вариабельность получаемых результатов (Севанькаев и др., 2013). Кроме того, ограничены возможности автоматизации данного метода, кариотипирование все же остается ручной процедурой, автоматизированы только некоторые этапы кариотипирования, например автоматический поиск метафаз. Но даже в этом случае, необходимо участие оператора, особенно при работе с разнообразным исходным материалом.

Достаточно неплохо он зарекомендовал себя и при использовании в природных популяциях животных (как например, при исследовании генетических последствий крупных ядерных аварий, или интенсивного использования пестицидов в агроценозах).

Следует также отметить, что разнообразные факторы биологической природы могут являться причиной возникновения aberrантных клеток. Это могут быть инфекционные агенты (Илиинских и др. 2005), возрастные изменения (Лильп, 1982; Nisitani et al., Krysanov, 1992), гормональные и иммунологические нарушения, стресс (Скорова и др., 1986; Dmitriev et al., 1997). Поэтому при анализе aberrаций хромосом в природных популяциях в постнатальном онтогенезе необходимо принимать во внимание, что не только какие-либо физико-химические факторы могут приводить к возникновению aberrантных клеток, но важную роль может играть и функциональное состояние исследуемого организма, а также эпидемиологическая ситуация. Поэтому в таких условиях

Основные преимущества и недостатки рассмотренных тестов

Тест	Преимущества	Недостатки
ДНК-комет тест	Возможность применять модификации метода для широкого спектра видов, органов, тканей. Относительно невысокая стоимость и трудоемкость. Высокая чувствительность. Возможность выявлять различные эффекты (репарация, апоптоз и др.) и нарушения (одно-/двунитевые разрывы). Возможность выполнять часть исследования в полевых условиях. Comet Assay занимает промежуточное положение между молекулярными и цитогенетическими методами	Необходимость подбирать специфические условия для работы на различных тканях или с целью выявления тех или иных эффектов (апоптоз, окислительный стресс и пр.). Субъективность в оценке результатов в случае отсутствия автоматизированных систем обчета параметров ДНК-комет. Регистрируются только потенциальные нарушения
Микроядерный тест	Простота, надежность и невысокая стоимость. Возможность использовать любые пролиферирующие ткани. Легко выполнять в полевых условиях. Нет необходимости умерщвлять животных. Можно выявлять как кластогенные, так и анеугенные эффекты	Невысокая спонтанная частота. Большая видовая, индивидуальная, физиологическая и сезонная изменчивость. Необходимы большие выборки
Аберрации хромосом, мутации генома, сестринские хроматидные обмены (СХО)	Высокая чувствительность, особенно при использовании методов дифференциального окрашивания хромосом. Достаточная простота при выявлении анеуплоидных и полиплоидных клеток. Возможность работы в полевых условиях и на разных стадиях онтогенеза	Невозможность автоматизации. Высокая трудоемкость. Высокая стоимость, особенно при использовании флуоресцентных методов анализа. Субъективность в оценке результатов, как следствие квалификации оператора. Трудности при работе с природными образцами (мелкие хромосомы у рыб и их большое число, невысокая митотическая активность и сезонная динамика). Необходимость предварительной предобработки в случае изучения СХО

необходимо увеличивать размер выборки для получения адекватных результатов.

Анализ частот сестринских хроматидных (СХО) обменов является еще более трудоемким по сравнению с анализом частот абберрантных клеток. В этом случае требуется предварительная инъекция 5-Бромдезоксимуридина (БДУ) для получения дифференциального окрашивания сестринских хроматид. Известно всего лишь несколько работ на животных (в основном, рыбах), где этот метод был применен для оценок мутагенности вод из естественных водоемов или отдельных мутагенов в лабораторных условиях (Kligerman, 1979, 1980; Hoofman, 1981; Hoofman, Vink, 1981; Gaag, Kerkhoff, 1985; Wisberg, Gaag, 1992; Das, John, 1999; Alsuhaibani, 2010). Суть метода состоит в дифференциальном окрашивании сестринских хроматид после предварительного включения БДУ и подсчета СХО в метафазах. Данный метод обладает высокой чувствительностью, однако для использования в природных популяциях практически не пригоден, поскольку требуется предварительная обработка животных с БДУ.

Анализ аберраций хромосом и сестринских хроматидных обменов высокочувствительные тесты для оценки влияния различного рода факторов на геном. СХО в большей степени подходит для оценки воздействия химических агентов. Однако, по сравнению с другими тестами они более трудоемкие, пригодны для ограниченного числа объектов и практически не поддаются автоматизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Являясь чувствительным тестом на наличие или отсутствие общего генотоксического эффекта, метод ДНК-комет, однако, ничего не говорит о специфичности выявляемых повреждений. Как правило, в системе комплексной оценки генотоксических эффектов он используется в сочетании с такими методами, как микроядерный тест или анализ частот хромосомных аберраций в костном мозге. В таблице рассмотрены основные преимущества и недостатки рассмотренных в обзоре те-

стов, используемых для оценки генетического гомеостаза.

Наиболее существенные повреждения ДНК на молекулярном уровне, эффективно детектируемые методом ДНК-комет — разрывы, приводящие к образованию хромосомных aberrаций в случае отсутствия или некорректного протекания процессов репарации в клетке. Хромосомные aberrации и потери могут привести к клеточной гибели, что в свою очередь порождает развитие патологических состояний. Если разрывы ДНК не репарировались, то в соматических клетках возможно развитие канцерогенеза, а в случае клеток генеративного ряда — влияние на фертильность индивида и вероятность передачи нарушений потомству. Вместе с тем, необходимо отметить, что на ранних стадиях мейоза у самцов в подобных клетках с достаточной вероятностью блокируется деление и они не дают начала гаметам (Богданов, Коломиец, 2007). Наличие хромосомных aberrаций в период эмбриогенеза тесно взаимосвязано со спонтанными абортми, гибелью эмбрионов на разных стадиях и возникновением морфологических аномалий.

Микроядерный тест также показывает нарушения, образовавшиеся в процессе клеточных делений из фрагментов, возникших при разрыве хромосом (кластогенный эффект) или отстающих хромосом (анеугенный эффект) в зависимости от исследуемого мутагена. Кроме того, более высокая доля положительных результатов для микроядерного теста может быть обусловлена генотоксическим и цитотоксическим эффектом мутагенов одновременно, тогда как цитотоксический эффект в тесте ДНК-комет демонстрируется наличием так называемых “облаков” или “ежиков” (клеток с отсутствующим или едва заметным маленьким ядром); как правило, такие клетки исключаются из группы клеток, используемых для получения результата, кроме случаев целенаправленного исследования апоптоза (Collins, 2004).

Тем не менее, исследователи отмечают довольно высокую взаимосвязь результатов исследований воздействия различных мутагенов на биологические объекты, полученных методами ДНК-комет, оценкой частоты хромосомных aberrаций и микроядерным тестом (Shelby, Witt 1995; Hartmann et al., 2001, 2003). Различными комбинациями описываемых методик оценивались генотоксические эффекты пестицидов, промышленных химикатов, а также применялись в биомониторинговых исследованиях и ряде медицинских приложений, например, при исследовании причин нарушения сперматогенеза у мужчин разного возраста. Показано, к примеру, что магнитное поле с частотой 50 Гц не приводит к каким-либо генотоксическим эффектам, причем этот вывод был получен сочетанием трех описываемых методик в сочетании с еще одним общепринятым

тестом — оценкой частоты сестринских хроматидных обменов (Stronati et al., 2004). Однако отмечается более высокое согласие между методом ДНК-комет и хромосомных aberrаций, чем между методом ДНК-комет и микроядерным тестом (Hartmann et al., 2001). В некоторых случаях сочетание двух методик (ДНК-кометы и микроядерный тест) дает положительный результат для одного теста и отрицательный для второго, что является следствием того, что для проведения теста ДНК-комет стадия клеточного цикла, на которой формируется нарушение, не является таким определяющим фактором, как для микроядерного теста. Как правило, в целом исследователями отмечается более высокая (или, по крайней мере, не меньшая) чувствительность метода ДНК-комет по сравнению с общепринятыми цитогенетическими методами.

Однако из-за некоторых ограничений и неоднозначных трактовок результатов, полученных методом ДНК-комет, для получения выводов признается необходимость сочетания генотоксических и экотоксикологических подходов.

Рассмотренные выше достоинства и недостатки методов применяемых для оценки генетического гомеостаза показывают, что применение только одного из них не позволяет получить адекватной оценки состояния организма. Поэтому, на наш взгляд необходимым является применение как минимум двух из вышеприведенных методов, а в идеале всех возможных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс как индикатор динамики мейоза и хромосомной изменчивости. М.: КМК, 2007. 358 с.
- Бородкин П.А. Цитогенетическое исследование микропопуляций сибирской красной полевки в различных радиоэкологических условиях // Экология. 1981. № 5. С. 40–44.
- Гилева Э.А., Большаков В.Н., Косарева Н.Л. и др. Частота хромосомных нарушений у синантропных домашних мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнения среды // Докл. Акад. Наук. 1992. Т. 325. № 5. С. 1058–1061.
- Гилева Э.А., Косарева Н.Л., Любашевский Н.М. и др. Изменчивость частоты хромосомных нарушений, индуцированных антропогенными поллютантами, у домашней мыши из Гиссарской долины // Экология. 1993. № 1. С. 62–70.
- Глазко Т.Т., Сафонова Н.А., Бунтова Е.Г. и др. Гетерогенность цитогенетической изменчивости в клетках костного мозга лабораторных и диких грызунов в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика. 1996. Т. 30. № 4. С. 25–34.
- Евгеньева Т.П., Фадеева Е.О. Цитогенетическое обследование клеток роговицы некоторых видов грызунов южного Вьетнама // Докл. Акад. Наук. 1997. Т. 353 № 6. С. 837–840.

- Елисеева К.Г., Картель Н.А., Войтович А.М., и др. Хромосомные aberrации в различных тканях мышечных грызунов и амфибий из загрязненных радионуклидами районов Беларуси // Цитология и генетика. 1996. Т. 30. № 4. С. 21–24.
- Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. М.: Медицина, 1982. 263 с.
- Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Из-во Томск. ун-та, 1992. 272 с.
- Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ткаченко С.Б. Инфекционная карипатология. Томск: Из-во Томск. ун-та, 2005. 168 с.
- Конева О.Ю. Межпопуляционные различия параметров ДНК-комет гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis* из регионов с разной экологической нагрузкой // Цитология. 2013. Т. 55. № 7. С. 475–481.
- Крюков В.И., Толстой В.А., Долгополова Г.В. и др. Влияние химического загрязнения экосистем долины рек Сурхандарьи на частоту хромосомных нарушений у грызунов // Экология. 1995. № 2. С. 169–171.
- Лилья Н.Г. Нестабильность хромосом у мышей линий 101/Н и C57BL/6 при старении // Генетика. 1982. Т. 18. № 12. С. 1976–1982.
- Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир, 2002. 235 с.
- Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro* (Методические рекомендации МР 4.2. 0014–10). 2010. С. 28.
- Пак И., Моисеенко Т., Сергиенко Л. и др. Изменчивость цитогенетических показателей сиговых рыб Обь-Иртышского бассейна // Экология. 2013. № 4. С. 310–312.
- Печуренков В.Л. Выход хромосомных перестроек у эмбрионов вьюна под влиянием хронического гамма-облучения и этилендиаминтетра-ацетатной кислоты (ЭДТА) // Радиобиология инф. бюлл. 1977. Т. 20. С. 71–72.
- Севаньяев А.В., Хвостунов И.К., Снегирева Г.П. и др. Сравнительный анализ результатов цитогенетических обследований контрольных групп лиц в различных отечественных лабораториях // Радиационная биология, радиоэкология, 2013. Т. 53. № 5. С. 5–24.
- Скорова С.В., Назарова Г.Г., Герлинская Л.А. Влияние стресса на частоту нарушений хромосом у водяной полевки // Изв. СО РАН. 1986. Т. 18. № 3. С. 91–94.
- Слободскова В.В., Солодова Е.Е., Слинко Е.Н. и др. Оценка генотоксичности кадмия в клетках жабр двусторчатого моллюска *Corbicula japonica* с помощью метода ДНК-комет // Биология моря. 2010. Т. 36. № 4. С. 303–308.
- Стяжкина Е.В., Обвинцева Н.А., Шапошникова И.А. и др. Оценка уровня повреждения и репарации ядерной ДНК у плотвы (*Rutilus rutilus* L.) водоема в-10 течения каскада // Вопросы радиационной безопасности. 2011. № 5. С. 67–74.
- Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждения ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008. Т. 10. № 3. С. 303–309.
- Al-Sabti K., Metcalfe C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water // Mutat. Res. 1995. V. 343. № 2–3. P. 121–135.
- Alsuhairani S. *In vivo* cytogenetic studies on aspartame // Comp Funct Genomics. 2010. P. 1–4.
- Augustyniak M., Orzechowska H., Kedziorski A. et al. DNA damage in grasshoppers' larvae—Comet assay in environmental approach // Chemosphere. 2013. V. 96. P. 180–187.
- Bolognesi C., Frenzzilli G., Lasagna C. et al. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels // Mutat. Res. 2004. V. 552. P. 187–196.
- Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals // Mutagenesis. 2011. V. 26. № 1. P. 205–213.
- Bolognesi C., Perrone E., Roggeri P. et al. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions // Aquat Toxicol. 2006 V. 78. S. 1. P. 93–98.
- Brunetti R., Gabriele M., Valerio P. et al. The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1992. V. 83. P. 75–78.
- Brunetti R., Majone F., Gola I. et al. The micronucleus test: examples of application to marine ecology // Mar. Ecol. Prog. 1988. Ser. 44. P. 65–68.
- Cabarcas-Montalvo M., Olivero-Verbel J., Corrales-Aldana H. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia // Sci. Total Environ. 2012. V. 416. P. 208–214.
- Cheung V.V., Jha A., Owen R. et al. Development of the *in vivo* chromosome aberration assay in oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larvae for genotoxicity assessment // Mar. Environ. Res. 2006. V. 62. P. 278–282.
- Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair // Molecular biotechnology. 2004. V. 26. № 3. P. 249–261.
- Collins A.R., Dušinská M. Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay // Methods in Molecular Biology vol. 186: Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. (Ed. D. Armstrong), Humana Press Inc., Totowa, 2002. NJ, chapter 17. P. 147–159.
- Danford N. The interpretation and analysis of cytogenetic data // Methods Mol. Biol. 2012. V. 817. P. 93–120.
- Das P., John G. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations *in vivo* in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides // Toxicol. Lett. 1999. V. 104. № 1–2. P. 111–116.
- De Flora S., Viganò L., D'Agostini F. et al. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water // Mut. Res. 1993. V. 319. № 3. P. 167–177.
- Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R. et al. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview // Mutagenesis. 2002. V. 17. № 6. P. 495–507.
- Dixon D.R., Wilson J.T., Pascoe P.L. et al. Anaphase aberrations in the embryos of the marine tubeworm *Pomatoceros lamarckii* (Polychaeta: Serpulidae): a new *in vivo* test assay for detecting aneuploids and clastogens in the marine environment // Mutagenesis. 1999. V. 14. P. 375–383.

- Dmitriev S.G., Zakharov V.V., Sheftel B.I.* Cytogenetic homeostasis and population density in red-backed voles *Clethrionomys glareolus* and *C. rutilus* in central Siberia // *Acta Theriologica*. 1997. S. 4. P. 49–55.
- Fenech M.* Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 5 P. 1084–1104.
- Fernandez M., L'Haridon J., Gauthier L. et al.* Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment // *Mut. Res.* 1993. V. 292. № 1. P. 83–99.
- Gaag M.A., Kerkhoff J.F.J.* Mutagenicity testing of water with fish: a step forward to a reliable assay // *Sci. Total Env.* 1985. V. 47. P. 293–298.
- Grisolia C.K., Rivero C.L., Starling F.L. et al.* Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake // *Genet. Mol. Biol.* 2009. V. 32. № 1. P. 138–143.
- Hartmann A., Piappert U., Poetter F. et al.* Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test // *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003. V. 536. № 1. P. 27–38.
- Hartmann A., Elhajouji A., Kiskinis E. et al.* Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test // *Food and chemical toxicology*. 2001. V. 39. № 8. P. 843–858.
- Hayashi M., Ueda T., Uyeno K. et al.* Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms // *Mut. Res.* 1998. V. 399. № 2. P. 125–133.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M. et al.* Micronucleus test as an index of cytogenetic damage: present, past and future // *Environ. Mol. Mutagen.* 1991. V. 18. P. 277–291.
- Hooftman R.N., Vink G.J.* Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo[a]pyrene, and river water // *Ecotoxicol. Environ.* 1981. S. 5. V. 261–269.
- Hooftman R.N.* The induction of chromosome aberrations in *Notobranchius rachowi* (Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulfonate or benzo[a]pyrene // *Mutat. Res.* 1981. V. 91. P. 347–352.
- Husby M.P., Hausbeck J.S., McBee K.* Chromosomal aberrancy in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) collected on abandoned coal strip mines, Oklahoma, USA // *Env. Tox. Chem.* 1999. V. 18. № 5. P. 919–925.
- Jena G.B., Bhunya S.P.* Use of chick, *Gallus domesticus*, as an *in vivo* model for the study of chromosome aberration: a study with mitomycin C and probable location of a 'hot spot' // *Mutat. Res.* 1995. V. 334. P. 167–174.
- Jha A.N.* Ecotoxicological applications and significance of the comet assay // *Mutagenesis*. 2008. V. 23. № 3. P. 207–221.
- Johnston S.D. et al.* Directional mapping of DNA nicking in ejaculated and cauda epididymidal spermatozoa of the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*: Monotremata) // *Reproduction, Fertility and Development*. 2009. V. 21. № 8. P. 1008–1014.
- Kligerman A.D.* Induction of sister chromatid exchanges in the central mudminnow following in vivo exposure to mutagenic agents // *Mutat. Res.* 1979. V. 64. P. 205–217.
- Kligerman A.D.* The use of aquatic organisms to detect mutagens that cause cytogenetic damage // *Radiation Effects on Aquatic Organisms* / Ed. Egami N. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo Univ. Park Press. Baltimore: 1980. P. 241–252.
- Kocan R.M., Landolt M.L., Sabo R.M.* Anaphase aberrations: a measure of genotoxicity in mutagen-treated fish cells // *Environ. Mutag.* 1982. V. 4. P. 181–189.
- Koppen, G., Verschaeve L.* The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cell // *Mutation Res.* 1996. V. 360. P. 193–200.
- Krysanov E.Yu.* Aneuploidy in postnatal ontogenesis of fishes // *Acta Zool. Fennica*. 1992. V. 191. P. 177–182.
- Linde A.R., Sanchez-Galan S., Izquierdo J.I. et al.* Brown trout as biomonitor of heavy metal pollution: effect of age on the reliability of the assessment. *Ecotoxicol* // *Environ. Saf.* 1998. V. 40. P. 120–125.
- McBee K.* Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus*) at a petrochemical waste disposal site: II. Cryptic and inherited aberrations detected by G-band analysis // *Chemistry Environmental Toxicology and Chemistry*. 1991. V. 10. № 10. P. 1321–1329.
- McBee K., Bickham J.W., Brown K.W. et al.*, Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus* and *Sigmodon hispidus*) at a petrochemical waste disposal site: I. Standard karyology // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1987. V. 16. № 6. P. 681–688.
- Marrazzini A., Betti C., Bernacchi F. et al.* Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons // *Mutagenesis*. 1994. V. 6–9. P. 505–515.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V. et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring // *Biochimie*. 2006. V. 88. P. 1515–1531.
- Melo K.M., Alves I.R., Pieczarka J.C. et al.* Profile of micronucleus frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon // *Genet. Mol. Biol.* 2013. V. 36. № 3. P. 425–429.
- Mersh J., Beauvais M.N.* The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments // *Mut. Res.* 1997. V. 393. № 1–2. P. 141–149.
- Nigro M., Fallen A., Del Barga I. et al.* Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels // *Aquat. Toxicol.* 2006. V. 77. P. 339–347.
- Nisitani S., Hosokawa M., Sasaki M.S. et al.* Acceleration of chromosome aberrations in senescence-accelerated strains of mice // *Mutat. Res.* V. 237. № 5–6. P. 221–228.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.* Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // *Environmental health perspectives*. 2005. V. 113. № 7. P. 823–839.
- Olive P.L., Banáth J.P.* The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // *Nature protocols*. 2006. V. 1. № 1. P. 23–29.

- Pak I.V., Moiseenko T.I., Sergienko L.L. et al.* Cytogenetic biomarkers for the assessment of the influence of pollution on natural fish populations // *Ecotoxicol. Env. Saf.* 2012. V. 85. P. 82–87.
- Pruski A.M., Dixon D. R.* Toxic vents and DNA damage: first evidence from a naturally contaminated deep-sea environment // *Aquatic toxicology.* 2003. V. 64. № 1. P. 1–13.
- Rodriguez-Cea A., Ayllon F., Garcia-Vazquez E.* Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003. V. 56. № 3. P. 442–448.
- Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A. et al.* Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments // *Ecotoxicol. Envi. Saf.* 2004. V. 57. № 2. P. 168–174.
- Rydberg B., Johanson K.J.* Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells // *DNA repair mechanisms.* 1978. P. 465–468.
- Schmid W.* The micronucleus test // *Mut. Res.* 1975. V. 31. P. 9–15.
- Shelby M.D., Witt K.L.* Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests // *Environ. Mol. Mutagen.* 1995. V. 25. P. 302–313.
- Silva J., de Freitas R.O., Marinho J.R. et al.* An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents // *Genetics Mol. Biol.* 2000. V. 23. № 1. P. 241–245.
- Stronati L., Testa A., Villani P. et al.* Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses // *Bioelectromagnetics.* 2004. V. 25. № 1. P. 41–48.
- Terradas M., Martin M., Tusell L. et al.* Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? // *Mutat. Res.* 2010. V. 705. P. 60–67.
- Verschaeve L., Gilles J.* Single-cell gelelectrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils // *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 1995. V. 54. P. 112–119.
- Wrisberg M.N., Gaag M.A.* *In vivo* detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory // *Sci. Total Env.* 1992. V. 121. P. 95–108.
- Yadav K.K., Trivedi S.P.* Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals // *Mut. Res. / Genet. Tox. Env. Mut.* 2009. V. 678. P. 7–12.
- Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Luna-Aguirre J. et al.* Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): part two // *Mutat. Res.* 2000. V. 467. № 1. P. 99–103.

Evaluation of Genetic Homeostasis in Animals at Different Stages of Ontogenesis in the Environment

C. G. Ordzhonikidze^a, T. B. Demidova^b, and E. Yu. Krysanov^b

^a Vavilov Institute of General Genetics, RAS, ul. Gubkina 7, Moscow, 119991 Russia

^b Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninsky prospect 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: krysanov@sevin.ru

Received December 11, 2013; in final form, January 14, 2014

Abstract—Modern methods of genetic homeostasis assessment in animals are described in the present article. The single gel-electrophoresis test (Comet Assay), micronuclei test, chromosome aberration frequency, and sister chromatid exchanges are reviewed in detail. The questions of test-sensitivity of given methods and principles or their application for genetic homeostasis assessment in wild populations of animals are considered.

Keywords: genetic homeostasis, Comet Assay, micronuclei test, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, environment, animals, ontogenesis