

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П.Г.Демидова

**И.М. Прохорова,
М.И. Ковалева,
А.Н. Фомичева**

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Лабораторный практикум

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов специальностей Биология и Экология*

Ярославль 2005

УДК 575+615.4

ББК Е 04я73

П 84

Рекомендовано

*Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2005 года*

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор А.В. Яльцев;
кафедра зоологии Ярославского государственного
педагогического университета им. К.Д. Ушинского

П 84

Прохорова, И.М., Ковалева, М.И., Фомичева, А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум / И.М. Прохорова, М.И. Ковалева, А.Н. Фомичева; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – 132 с.

ISBN 5-8397-0446-6

Лабораторный практикум подготовлен на основе программы дисциплины специализации «Генетическая токсикология» для студентов факультета биологии и экологии специальностей 011600 Биология и 013100 Экология (дисциплина «Генетическая токсикология», блок ДС), очной формы обучения.

Ил. 39. Табл. 7. Библиогр.: 51 назв.

УДК 575+615.4

ББК Е 04я73

ISBN 5-8397-0446-6

© Ярославский
государственный
университет, 2005

© И.М. Прохорова,
М.И. Ковалева,
А.Н. Фомичева, 2005

Введение

Задача лабораторного практикума по Генетической токсикологии – ознакомить студентов с методами выявления и оценки мутагенов. Работа проводится по типу УИРС (учебная исследовательская работа студентов) как индивидуальное и групповое исследование.

В начале практикума студенты сами предлагают химический препарат, генотоксичность которого они хотели бы оценить. Так студентами изучались различные лекарства, чай и соки разных фирм, косметические препараты и пр. Некоторые студенты оценивали генотоксичность препаратов, с которыми они работают при выполнении курсовых и дипломных работ на других кафедрах. Программа практикума предполагает, что изучаемый фактор последовательно исследуется на разных ступенях тестирования. Каждый студент оценивает его генетический потенциал, а затем данные, полученный всей группой, суммируются. Это позволяет получить объем данных, достаточный для проведения статистической обработки.

В конце практикума студенты составляют заключение о генотоксичности препарата и дают рекомендации в отношении его применения: запретить или ограничить его применение, заменить на безопасный аналог, разрешить к применению.

Методика проведения лабораторного практикума как научного исследования позволяет одновременно решать несколько задач:

- в процессе работы студент получает систему знаний, умений и навыков по данной профессии, предусмотренных учебной программой;
- приобретает профессионально важные качества, которые позволяют ему правильно использовать эти знания, умения и навыки;
- обеспечивает положительную мотивацию на приобретение высокой профессиональной квалификации, стремление к компетентности в будущей деятельности;
- студенты понимают, что научное исследование не схоластично, что они могут его выполнять, и что оно решает вопросы, которые касаются людей, в том числе тебя и твоих близких;
- осознание практической важности и востребованности его профессии;

– позволяет не просто понять, но прочувствовать, что генетическая опасность факторов среды реальна, и необходимо защищать от них себя и окружающих;

– способствует выработке гражданской позиции, которая необходима для будущего специалиста, работающего в области охраны окружающей среды;

– прививает вкус к научным исследованиям. Это подтверждается тем, что к нам приходят потом студенты и аспиранты, которые выполняют работы на других кафедрах с просьбой дать им рабочее место, чтобы исследовать химические соединения, которые они изучают, чтобы описать ещё один параметр – генетическую безопасность.

В настоящем пособии описана система тестов для оценки генотоксического действия индивидуальных факторов среды и суммарной генотоксической активности природных сред, используемая в лаборатории генетики Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова (Прохорова, 1991). В связи с тем, что специализация факультета биологии и экологии – охрана водной среды, большее внимание уделялось именно оценке и выявлению генотоксикантов в природных водоемах. Система включает несколько тестов, позволяющих проводить оценку генетически активных факторов среды на трех ступенях тестирования.

На первой ступени тестирования в большинстве токсикогенетических лабораторий используется тест обратных мутаций у *Salmonella typhimurium*. На учебных занятиях использование сальмонеллы не рекомендовано и требует специального разрешения санитарно-эпидемиологических служб. Поэтому нами в практикуме использован другой тест-объект – одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris*.

На второй ступени тестирования изучается метафазный анализ хромосомных aberrаций в культуре лейкоцитов периферической крови человека и ана-телофазный анализ хромосомных aberrаций в меристематической ткани *Allium cepa* (L).

Для изучения действия фактора в целостном организме используются два теста с применением *Drosophila melanogaster* в качестве тест-объекта: тест рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) и тест доминантных летальных мутаций (ДЛМ).

Проверив изучаемый фактор на генетическую безопасность на трех ступенях тестирования, студенты составляют заключение о генотоксичности препарата и дают рекомендации в отношении его применения: запретить или ограничить применение, заменить на безопасный аналог, разрешить к применению. Результаты оформляются в виде научной статьи.

ГЛАВА 1.

Генетическая токсикология, предмет и задачи

Генетическая токсикология возникла в 60 – 70-х годах прошлого века для изучения генетических последствий воздействия факторов окружающей среды на генетический аппарат человека. Генетическая токсикология – раздел экологической генетики, где теории мутагенеза находят свое практическое применение.

Генетическая токсикология изучает воздействие как на гено-ративные, так и на соматические клетки. Нарушения в соматических клетках могут иметь различные последствия:

- гибель клетки;
- клетка дает клон раковых клеток;
- аутоиммунные заболевания, если генетическое нарушение возникло в клетках иммунной системы;
- дегенеративные изменения в клетке, которые приводят к преждевременному старению.

Однако эти изменения не передадутся последующему поколению.

Нарушения генетического аппарата в половых клетках не сказываются на здоровье организма, подвергнувшегося воздействию, но, оказавшись при слиянии гамет в зиготе, обнаружатся в каждой клетке нового организма. Последствия этого могут проявиться в разные этапы онтогенеза и выражаться как:

- стерильность;
- несостоявшаяся беременность, связанная с гибелью на самых ранних этапах развития, так что беременность может быть и не диагностирована;
- самопроизвольные выкидыши (абортусы);
- перинатальная смертность (смертность во время родов);
- врожденные пороки развития;
- наследственные болезни.

Вероятно, все перечисленные нарушения – это надводная часть айсберга, так как нам ещё не известны все последствия при различных вариантах генетических нарушений.

Генетическая токсикология, таким образом, имеет два важнейших аспекта: выявление факторов, которые, вызывая мутации в половых клетках, представляют угрозу последующим поколениям, и факторов, которые, вызывая мутации в соматических клетках, снижают жизнеспособность нынешнего поколения.

Гентоксикология помогает правительствам стран выбрать стратегию и тактику в отношении различных факторов, важных для экономики. Основной задачей гентоксикологии является создание методологии для классификации факторов окружающей человека среды по степени их генетической опасности с целью осуществления различных регулирующих действий, направленных на предотвращение и уменьшение возможных генетических последствий этих факторов (Абилев, 2003). Для контроля за содержанием генотоксикантов в среде, окружающей человека, необходима разработка этих действий по следующим направлениям:

1. Оценка индивидуальных факторов и их гигиеническое нормирование (установление ПДК).
2. Мониторинг среды на содержание таких факторов в окружающей среде.
3. Генетический мониторинг популяций человека.

Для того чтобы наладить работу по этим направлениям, необходимо последовательное решение следующих задач:

- разработка тест-систем для выявления и оценки индивидуальных генотоксикантов;
- проверка в чистом виде всех факторов, с которыми сталкивается человек, на генотоксичность, проведение их гигиенического нормирования;
- оценка суммарной генотоксической активности этих факторов в сложных смесях и природных средах (воздух, вода, почва), так как генотоксичность здесь может быть модифицирована (в связи с этим уточнение ПДК);
- постоянное слежение (мониторинг) за содержанием генотоксикантов в окружающей среде с тем, чтобы не был превышен рассчитанный безопасный уровень;

- разработка прогноза долговременных последствий для популяций при данном уровне генотоксического загрязнения окружающей среды;

- разработка мер защиты от воздействия генотоксикантов окружающей среды, в том числе и методов антимуtagenеза.

По итогам исследований правительства принимают решения о дальнейшей судьбе тех или иных факторов, применяемых человеком. Так, если выясняется высокая опасность для человека и окружающей среды, на использование данного фактора накладывают «вето» или строгое ограничение с обязательным применением мер защиты. Если же использование данного фактора не представляет угрозы, его разрешают для широкого использования.

В настоящее время генотоксикология – одно из лидерных направлений экологии, так как генотоксиканты являются наиболее опасными загрязнителями. В отличие от токсикантов, они оказывают двоякое действие: изменяют наследственность как в поколении, подвергшемся воздействию, так и в последующих поколениях. Поэтому накопление мутаций не только приводит к гибели отдельных индивидов, но и к вырождению и вымиранию популяций и видов.

По мнению некоторых ученых, число мутаций у вида *Homo sapiens* уже превысило уровень, с которого вид считается вымирающим (Данилов-Данилян). Такая оценка, по-видимому, несколько преувеличена, так как выявляемость мутаций у человека значительно выше, чем у других видов.

Но человечество стремится не только выжить, но и сохранить природу, биологическое разнообразие. Поэтому необходима защита от генотоксикантов всех видов, населяющих Землю. В связи с этим генетическая токсикология переросла первоначальную задачу: изучение действия факторов среды на наследственность человека. В генетической токсикологии возникло и быстро развивается направление, которое можно назвать *экоотоксикогенетикой*. Ее задача – изучение воздействия факторов среды на генетический аппарат различных организмов в составе биоценоза.

ГЛАВА 2. Изменчивость

На молекулярном уровне изменчивость заключается в изменении генов, их комбинаций и проявлении действия генов в процессе онтогенеза. На фенотипическом уровне изменчивость проявляется как изменение признаков. Изменение окружающей среды при антропогенном воздействии имеет следствием увеличение изменчивости у всех организмов, от вирусов до человека (Жимулев, 2004).

2.1. Типы изменчивости

Изменчивость – широкое понятие, выделяют несколько типов изменчивости (рис. 2.1.1). Генетическая токсикология изучает только мутационную изменчивость.

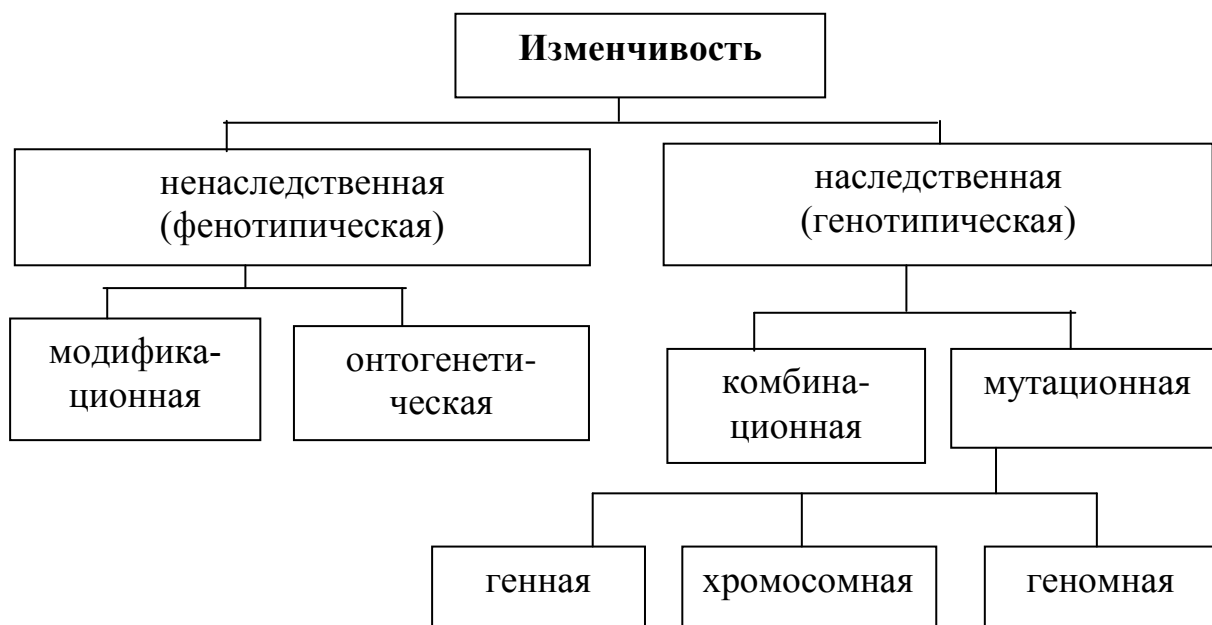


Рис. 2.1.1. Типы изменчивости

Ненаследственная, или фенотипическая, изменчивость связана с изменением фенотипа без изменения генотипа.

Модификационная изменчивость – это изменение признаков под прямым воздействием факторов среды. Она не затрагивает наследственный субстрат и, следовательно, не передается потомству. Гены остаются прежними, но фенотипы могут резко меняться. Например, листья лютика, выросшего в воде, в отличие от лютика, выросшего на берегу, сильно рассечены.

Благодаря модификационной изменчивости признаки в зависимости от условий среды могут быть сильно модифицированы на базе одного и того же генотипа. Так, например, кролики гималайской породы белые но кончики ушей, нос, лапки и хвост – черные. Такой фенотип связан с тем, что ген, контролирующий образование черного пигмента, работает только при низких температурах. Поэтому черная окраска – только на тех участках тела, где температура ниже. При высокой температуре кролики полностью белые, при низкой – полностью черные. Если выбрить участок кожи и прикладывать к нему лед, охлаждая до -2°C , то участок кожи будет черным. Иначе говоря, на базе одного и того же генотипа при воздействии факторов среды формируется разный фенотип (рис. 2.1.2).

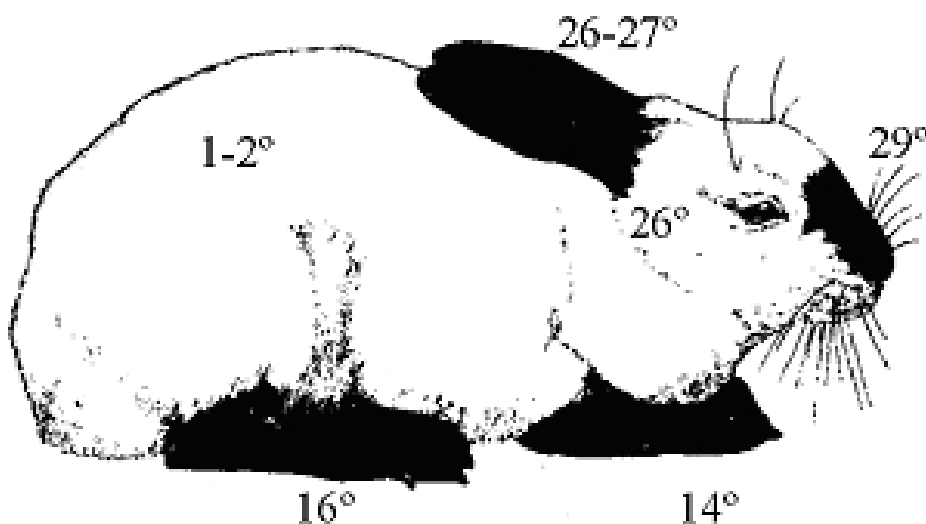


Рис. 2.1.2. Карта распределения температурных порогов пигментации у гималайского кролика (цифры показывают температуру, выше которой волосы на данном участке тела будут белыми, ниже которой – черными)

Онтогенетическая изменчивость связана не с изменением генов, а с изменением проявления генов в процессе индивидуального развития. Например, у чешуекрылых насекомых (бабочек) развитие идет с полным превращением: яйцо – личинка (гусеница) – имаго. И у личинки и у имаго одни и те же гены, но фенотипические различия более выражены, чем у организмов разных таксонов. Это связано с тем, что на разных стадиях развития экспрессируются разные гены.

Наследственная, или генотипическая, изменчивость связана с изменением генотипа.

Комбинационная изменчивость связана не с изменением генов, а с появлением новых комбинаций уже существующих генов. Она обеспечивается тремя процессами: независимым расхождением хромосом в мейозе, кроссинговером, случайным сочетанием отцовской и материнской наследственности в зиготе. Благодаря комбинационной изменчивости обеспечивается колоссальное разнообразие организмов, размножающихся половым путем. Так, за всю историю человечества на Земле за счет существования этой изменчивости не было, нет и не будет двух абсолютно одинаковых людей (кроме однояйцовых близнецов, которые возникли в результате митоза). Каждый человек уникален и неповторим. Популяции организмов, размножающихся половым путем, гетерогенны, у них большой резерв «наследственной изменчивости». Он составляет поле для естественного отбора. В случае изменения условий в популяции окажутся особи с мутациями, позволяющими приспособиться к новым факторам. Отрицательным моментом комбинационной изменчивости может быть то, что удачные комбинации не сохраняются, рассыпаются в следующем поколении. Чтобы сохранить такие комбинации, в настоящее время так много уделяется внимания клонированию организмов.

Мутационная изменчивость связана с изменением самих генов, т. е. с изменением последовательности нуклеотидов в ДНК. Эти изменения наследуются и играют большую роль в эволюции, являясь материалом для естественного отбора.

На фенотипическом уровне мутации – явление прерывистого скачкообразного изменения наследственного признака. Мутации могут затрагивать любой признак: морфологический, физиологи-

ческий, биохимический, поведенческий. Эти изменения могут быть резкими или едва заметными отклонениями от дикого типа (стандарта).

Учение о мутациях было впервые сформулировано в начале XX века голландским ученым Г. Де Фризом, одним из трех первооткрывателей законов Менделя. Он работал с растением *энетрой* (ослиник Ламарка). На основе изучения её изменчивости он развил теорию мутаций.

2.2. Основные положения теории мутаций

1. Мутации возникают внезапно, без переходов, скачкообразно.
2. Новые изменения константны, устойчивы, наследуются.
3. Мутации не образуют вариационных рядов, т.е. они являются качественными, а не количественными.
4. Мутации возникают в разных направлениях, могут быть как полезными, так и вредными, т.е. они не носят адаптивного характера.
5. Выявление мутаций зависит от количества проанализированных особей.
6. Одни и те же мутации могут возникать повторно.
7. Мутации дают начало новым видам.
8. В эволюции большее значение имеют множественные мелкие мутации, а не резкие крупные изменения.
9. Мутации автогенны, т. е. самопроизвольны.

За время, прошедшее с создания мутационной теории, знания о мутациях значительно пополнились. Некоторые положения мутационной теории оказались неверными, другие оказались изменены.

Так, сохранили свое значение 1, 2, 4, 5, 6, 8-е положения.

Третье положение верно для качественных признаков, для количественных признаков могут существовать вариационные ряды.

По седьмому положению единого мнения нет. Действительно, возникновение генной или хромосомной мутации вряд ли

может дать начало сразу новому виду, видообразование – длительный процесс. Однако при геномных мутациях, и особенно при соединении в зиготе геномов разных видов (аллоплоидия), возникновение нового вида возможно.

В отношении девятого положения показано, что мутации не самопроизвольны, а изменения генов и хромосом следует связывать с воздействием факторов среды – мутагенов. Мутагены могут быть факторами *экзогенными* – внешними по отношению к клетке, а также *эндогенными* факторами (например, продуктами нормального метаболизма в клетке).

2.3. Новые положения теории мутаций

В настоящее время мутационная теория дополнена новыми положениями:

1. Выявлены закономерности в, казалось бы, ненаправленных случайных изменениях наследственного материала. Эта закономерность выражена в законе Вавилова. Согласно мутационной теории Де Фриза мутации могут идти в разных направлениях – это непредсказуемые события. Н.В. Вавилов сформулировал закон гомологических рядов наследственной изменчивости: *генетически близкие роды и виды имеют сходные ряды наследственной изменчивости*. Закон Вавилова позволяет прогнозировать, в каком направлении могут идти мутации у данного вида, т.е. делает мутационный процесс более предсказуемым. Таким образом, мутации получили первую характеристику – мы можем охарактеризовать все возможные мутаций.

Мутации получили вторую характеристику – частотную: частота мутирования для разных генов различна. Есть «горячие точки» – гены, для которых характерна особенно высокая частота мутаций.

Известны и так называемые множественные мутанты – это несколько генов, мутирующих одновременно. Причем частота их совместного мутирования на порядок и более превышает теоретически ожидаемую. Уровень мутабельности вида находится под генетическим контролем и может быть видовой характеристикой.

В связи с загрязнением окружающей среды Н.П. Дубининым введено еще одно положение в теорию мутаций: «Факторы, введенные прогрессом науки в среду, окружающую человека, способствуют накоплению отрицательных мутаций – генетического груза».

Мутагены из орудия эксперимента стали элементами биосферы. В силу этого теория мутаций из круга экспериментальных, селекционно-практических и общеэволюционных приложений становится важнейшим элементом проблемы человека, приобретает большой социальный аспект. Современная теория мутаций вошла важным компонентом в общую проблему «человек и биосфера».

2.4. Классификация мутаций

В зависимости от того, что положено в основу классификации, существует несколько классификаций мутаций.

1. По характеру изменения генотипа:

- генные (точечные) мутации – изменения последовательности нуклеотидов в ДНК в пределах одного гена;
- хромосомные мутации – изменения структуры хромосом;
- геномные мутации – изменения количества хромосом.

2. По характеру изменения генотипа:

- летальные мутации, приводящие к летали в различные периоды онтогенеза;
- морфологические мутации, обуславливающие изменения строения организмов;
- физиологические мутации, изменяющие функции организмов;
- биохимические мутации, изменяющие биохимические реакции;
- поведенческие мутации, изменяющие поведение организмов.

Понятно, что эта классификация отражает недостаток наших знаний, так как в принципе причинами всех этих изменений являются изменения на биохимическом уровне.

3. По проявлению в гетерозиготе:

- доминантные мутации, проявляющиеся в гомо- и гетерозиготном состоянии;
- рецессивные мутации, проявляющиеся только в гомозиготном состоянии.

4. По причине возникновения:

- индуцированные (наведенные) мутации, возникшие при воздействии какого-либо фактора;
- спонтанные мутации, возникшие без видимых причин (как правило, причина просто не выяснена).

5. По направлению мутирования:

- прямые мутации – изменение признака от дикого типа (стандарта) к мутантному;
- обратные мутации (реверсии) – изменение от мутантного признака к дикому (стандарту).

6. По локализации в организме:

- генеративные мутации, возникшие в половых клетках;
- соматические, возникшие в соматических клетках.

7. По локализации в клетке:

- ядерные мутации, возникшие в ядерной ДНК;
- цитоплазматические, возникшие в ДНК цитоплазматических органоидов (митохондрий, пластид).

8. По степени отклонения от нормального фенотипа.

Г. Мёллер, предложивший эту классификацию, выделяет следующие типы мутаций:

- гипоморфная мутация, приводящая к ослаблению признака (например, пониженная свертываемость крови);
- аморфная мутация, приводящая к отсутствию признака (например, несвертываемость крови);
- гиперморфная мутация приводит к усилению признака (например, повышенная свертываемость крови);
- неоморфная мутация приводит к полному изменению признака (например, формирование у дрозофилы на месте антенны конечности).

2.5. Генные мутации

Генные (точковые) мутации обусловлены изменением последовательности нуклеотидов в ДНК в пределах одного гена. Наименьший участок ДНК, изменение которого может привести к изменению признака, называется **мутоном**. Мутоном равен одной паре нуклеотидов. Но даже незначительные изменения гена могут привести к значительным изменениям на уровне фенотипа. Так, например, причина заболевания человека серповидно-клеточной анемией, от которого ежегодно в Африке гибнет 80 000 человек, вызвано изменением всего одной пары нуклеотидов в гене, контролирующим синтез гемоглобина. В результате такое изменение одного нуклеотида в кодоне приводит к постановке другой аминокислоты в первичной полипептидной цепи: вместо глутамина встанет валин. В результате образуется аномальный глобин. Следствием такого **плейотропного** (множественного) действия одного гена будет нарушение у организма целого комплекса признаков. Нарушения затронут практически все системы органов (рис. 2.5.1). Несмотря на заменные переливания крови, организм погибнет.

2.5.1. Типы генных мутаций

По изменению на уровне ДНК выделяют следующие типы мутаций:

- замены пар оснований;
- делеции (выпадение нуклеотидов);
- вставка одной или нескольких пар оснований;
- инверсия – перестановка нуклеотидов внутри гена в результате поворота участка ДНК на 180°. Поскольку результатом инверсии является замена пар оснований, многие исследователи этот тип нарушений не выделяют.

Рассмотрим эти типы мутаций.

Замена пар оснований в ДНК.

Замены могут быть двух типов:

- транзиции;
- трансверзии.

Транзиции, или простые замены, – это замены пуриновых оснований на пуриновые, пиримидиновых – на пиримидиновые. Они могут быть четырех вариантов:

$G \rightarrow A$

$A \rightarrow G$

$T \rightarrow C$

$C \rightarrow T$

Все эти типы замен могут возникать под воздействием различных факторов среды. Например, при воздействии азотистой кислоты возникает транзиция $G \rightarrow A$. Эта мутация может происходить при поступлении в организм азотсодержащих пищевых добавок, так как уже в желудке они дают азотистую кислоту.

Трансверзии, или сложные замены, – замена пуринового основания на пиримидиновое, и пиримидинового – на пуриновое. Их может быть восемь вариантов.

$G \rightarrow C$ $A \rightarrow C$

$C \rightarrow G$ $C \rightarrow A$

$T \rightarrow A$ $G \rightarrow T$

$A \rightarrow T$ $T \rightarrow G$

Делеции – утрата одной или нескольких пар оснований в пределах одного гена. В этом случае изменится разделение нуклеотидов по кодонам.

Например:

↓-мутаген

Исходная ДНК:3 | 123 | 123 | 123 | 123 | 123 | 123 | 123 |

Под действием мутагена делетировал третий нуклеотид в четвертом кодоне. В результате получилась последовательность:

Измененная ДНК... 3 | 123 | 123 | 123 | 121 | **231** | **231** | **231** |

Например:

Под действием мутагена произошла вставка нуклеотида 2 на первую позицию в пятом кодоне. В результате получилась последовательность:

ДНК.....3 | 123 | 123 | 123 | 123 | **212** | **312** | **312** | **312** | ...

Мутации сдвига рамки считывания могут быть подавлены (супрессированы) другими мутациями. Подавляющие мутации называются *супрессорными*. Так, делеция может быть супрессирована вставкой, а вставка – делецией.

Делетированная ДНК:

↓ -ВСТАВКА 2

.....3 | 123 | 123 | 123 | 121 | **231** | **231** | **231** | **231** | **231** |

ДНК после супрессорной мутации:

.....3 | 123 | 123 | 123 | 121 | **231** | **223** | 123 | 123 | 123 |

В результате супрессии измененным окажется только участок от делеции до вставки.

По изменению на уровне белка выделяют три типа мутаций:

- миссенс мутации;
- сеймсенс мутации;
- нонсенс мутации.

Миссенс мутации. В результате миссенс мутации образуется новый белок с новой функцией, что приводит к изменению признака.

Это основной класс генных мутаций, показано, что они возникают под влиянием радиации, химических веществ.

Миссенс мутации бывают 4-х типов:

1) *лики-тип* приводит к образованию менее активного фермента или меньшего количества фермента, а следовательно, к ослаблению признака;

2) *условные* приводят к тому, что контролируемый геном белок может оказывается активным в одних и неактивным в других условиях (например, мутанты, чувствительные к температуре, pH среды и др.) Сюда относятся и так называемые «условные летали», которые дают летальный эффект только при определенных условиях;

3) *комплементационного типа*. В этом случае активность сложного белка, состоящего из двух или более полипептидных цепей, может оказаться нормальной за счет того, что мутанты комбинации двух мутантных цепей дополняют друг друга;

4) *мутации, дающие измененный белок*, но иммунологически подобный нормальному.

Нонсенс мутации. Замена оснований может перевести триплет в нонсенс-кодон: УАГ, УАА и УГА. Эти триплеты терминальны, на них прекращается синтез белка. При воздействии мутагенов нонсенс мутации регистрируются чаще, чем миссенс. Это может быть вызвано не тем, что они дают более выраженным эффектом и поэтому лучше выявляются.

По фенотипу нонсенс мутации отличаются от миссенс мутаций тем, что не бывают лики-типа, не бывают условными, почти не дают комплементации и не дают белка измененного, но иммунологически подобного нормальному.

Сеймсенс мутации – это мутации в ДНК, которые не приводят к изменению белка (например, за счет вырожденности генетического кода.)

2.6. Хромосомные мутации

Мутации, обусловленные изменением участка хромосомы, превышающие размеры одного гена, называются *хромосомными мутациями*. Эта категория разнообразна: от крупных перестроек до микроаббераций, не улавливаемых микроскопически. Структурные изменения хромосом связаны с разрывом и воссоединением частей хромосом. Вначале происходит разрыв и образование фрагментов со свободными связями. Второй этап – рекомбинация и закрытие свободных связей. Анализ хромосомных перестроек используется в токсикогенетических исследованиях для выявления генотоксичности факторов среды.

В настоящее время для выявления хромосомных аббераций используется несколько методов.

Во время митоза абберации изучаются на стадии метафазы или ана-телофазы:

– *метафазный анализ*. В метафазу все хромосомы видны «в лицо», и это позволяет зарегистрировать делеции, крупные дупликации, перичентрические инверсии, транслокации;

– *ана-телофазный анализ* выявляет фрагменты и мосты, которые являются следствием делеций и транслокаций.

Во время мейоза по картинам конъюгации можно обнаружить делеции, дупликации, инверсии и транслокации.

В интерфазу выявляются микроядра, которые образованы целыми хромосомами или фрагментами, которые являются результатом делеций и транслокаций.

Политенные хромосомы позволяют выявлять все типы хромосомных нарушений: делеции, дупликации, инверсии, транслокации.

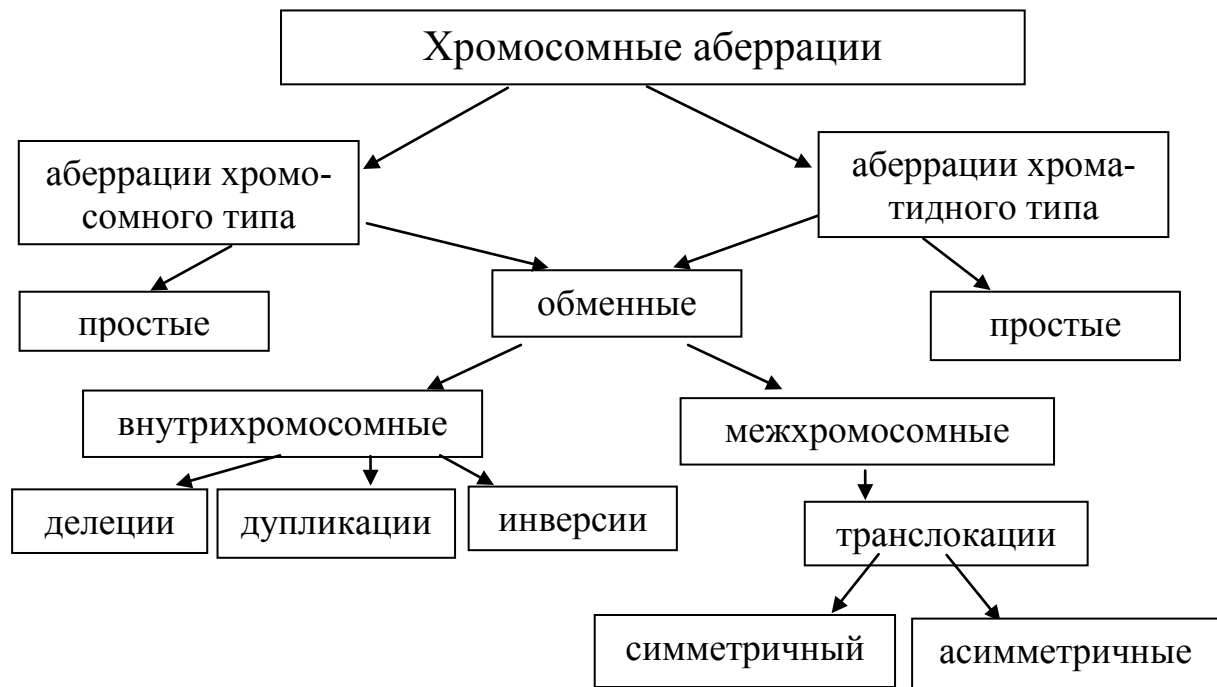


Рис. 2.6.1. Классификация хромосомных aberrаций

Все хромосомные aberrации, регистрируемые на стадии метафазы разделяют на две основные группы: *aberrации хромосомного типа* и *aberrации хроматидного типа* (рис. 2.6.1). Aberrации хромосомного типа – результат повреждения хромосомы в предсинтетический период интерфазы (G_1). Aberrации хроматидного типа возникают при повреждении хромосомы в синтетический (S) и постсинтетический (G_2) периоды, когда хромосома уже состоит из двух хроматид. Среди обоих типов aberrаций выделяют простые и обменные aberrации. В основе простых aberrаций – повреждение хромосомы с образованием фрагментов. Обменные – с рекомбинацией участков внутри одной и той же хромосомы или между несколькими хромосомами. К внутрихромосомным перестройкам относятся делеции, дупликации и инверсии. К межхромосомным перестройкам относятся транслокации.

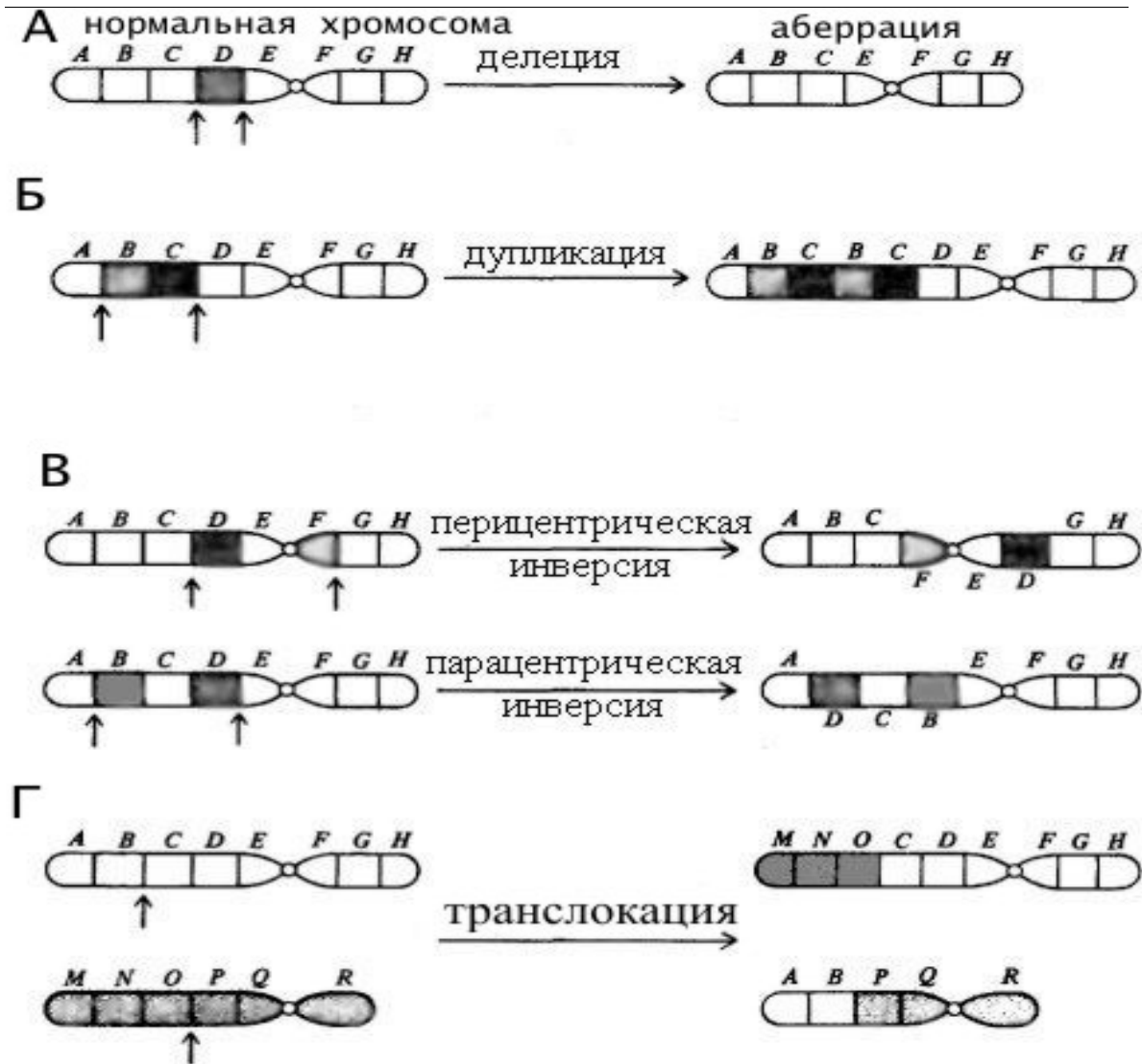
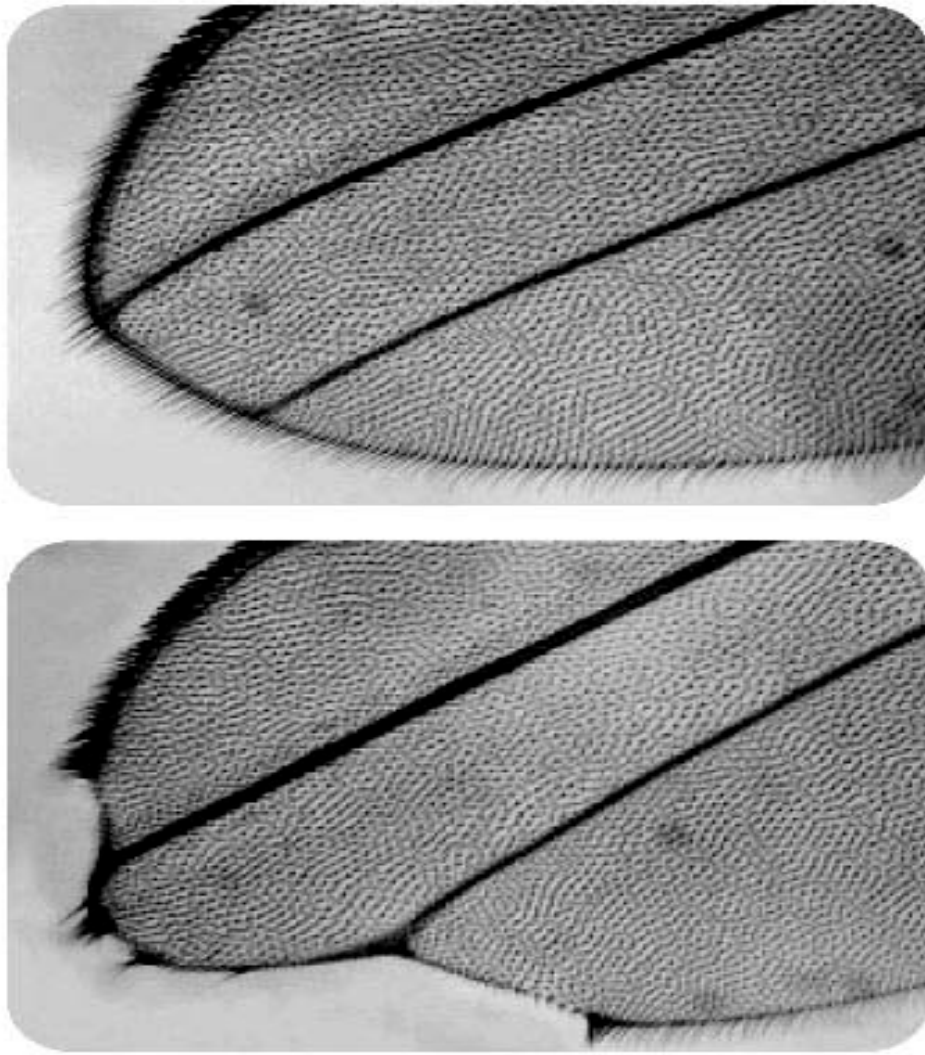


Рис. 2.6.2. Типы хромосомных aberrаций
(справа – нормальные хромосомы, слева – aberrантные)

Делеции – потеря участка хромосомы размером более одного гена (рис. 2.6.2А). Впервые открыта у дрозофилы в 1917 году. Фенотипически она проявляется в виде небольшой вырезки на крыльях. Эта мутация – *Notch* положила начало учению о нарушениях в структуре хромосом (рис. 2.6.3).



*Рис. 2.6.3. Мутация Notch (вырезка на крыле) у *Dr. melanogaster* (вверху – нормальное крыло, внизу – мутантное крыло)*

Делеции, даже мелкие, в гомозиготном состоянии обуславливают леталь. В гетерозиготном состоянии могут уходить от отбора и сохраняться в популяции. У полиплоидных форм делеция может не проявляться в фенотипе, поэтому полиплоидные формы пережили своих диплоидных родственников (секвойя, кета).

Делеции бывают *концевыми (дефишенси)* или *интерстициальными*. Концевая хромосомная делеция является результатом одного разрыва в стадию G_1 . В результате наблюдается укороченная исходная хромосома и два ацентрических фрагмента, расположенные рядом с хромосомой или вдали от неё. Хроматидная делеция является результатом разрыва в период G_2 . В результате

возникает хромосома, у которой хроматиды разной длины, а делетированный участок лежит обычно рядом с комплементарным сегментом целой хроматиды (рис. 2.6.4).

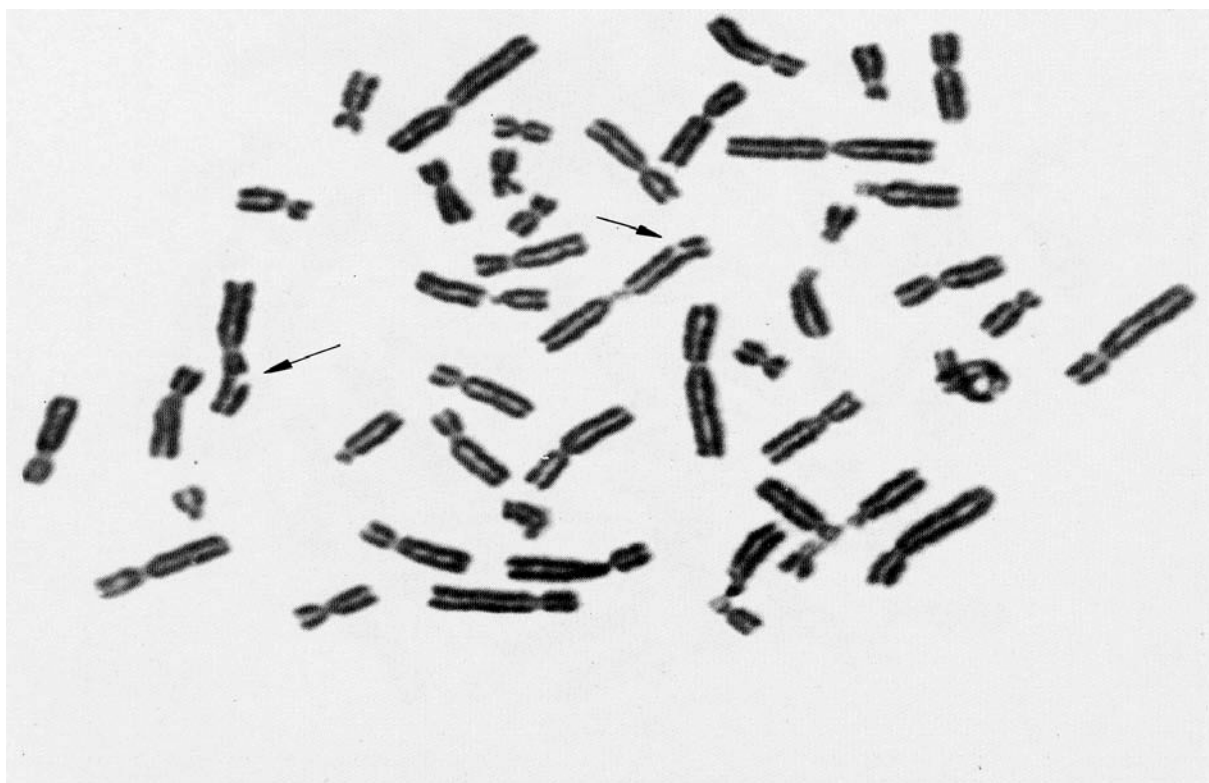
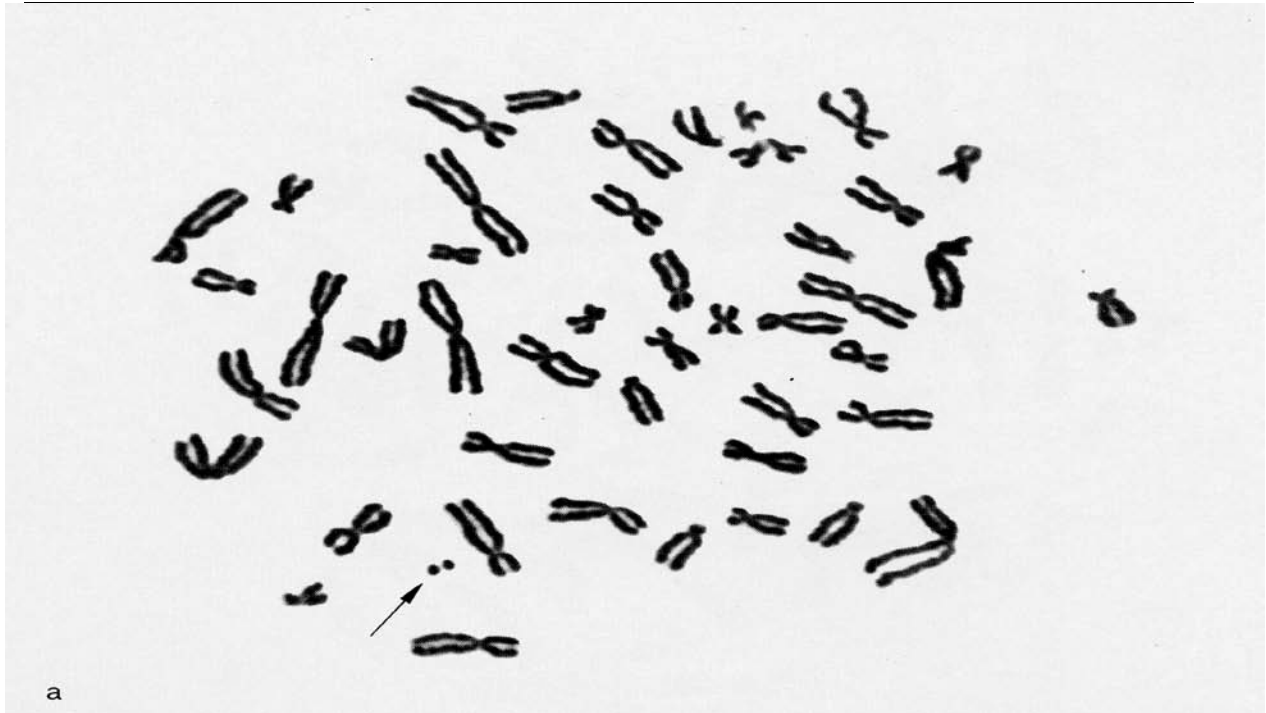


Рис. 2.6.4. Метафазная пластика.

Делеция: два одиночных фрагмента (обозначены стрелками)

Интерстициальная хромосомная делеция возникает при выпадении срединного участка хромосомы в результате двух разрывов на стадии G_1 . Образуется укороченная хромосома, и за счет «липких концов» и парные ацентрические кольца. Эти кольца могут объединяться в одно большое кольцо. Если делеция захватывает район центромеры, то образуются парные центрические кольца и два ацентрических фрагмента. При хроматидной интерстициальной делеции опять же возникает хромосома с разными по длине хроматидами. Делетированный участок даст ацентрическое кольцо.

Делеция – наиболее частая аберрация, регистрируемая при воздействии мутагенных факторов (рис. 2.6.5).



*Рис. 2.6.5. Метафазная пластика.
Интерстициальная делеция: парные кольцевые фрагменты
(обозначены стрелками)*

Делеции могут быть зарегистрированы:

- методом метафазного анализа делеции обнаруживаются по укорочению хромосомы и образованию фрагментов;
- методом ана-телофазного анализа делеции регистрируются по образованию фрагментов;
- во время профазы I мейоза: при конъюгации комплементарный делетированному участку сегмент образует петлю (рис. 2.6.2);
- в интерфазу делеция обнаруживается по наличию микроядер;
- на гигантских хромосомах делеция выявляется по наличию петли в участке хромосомы, соответствующем делетированному участку.

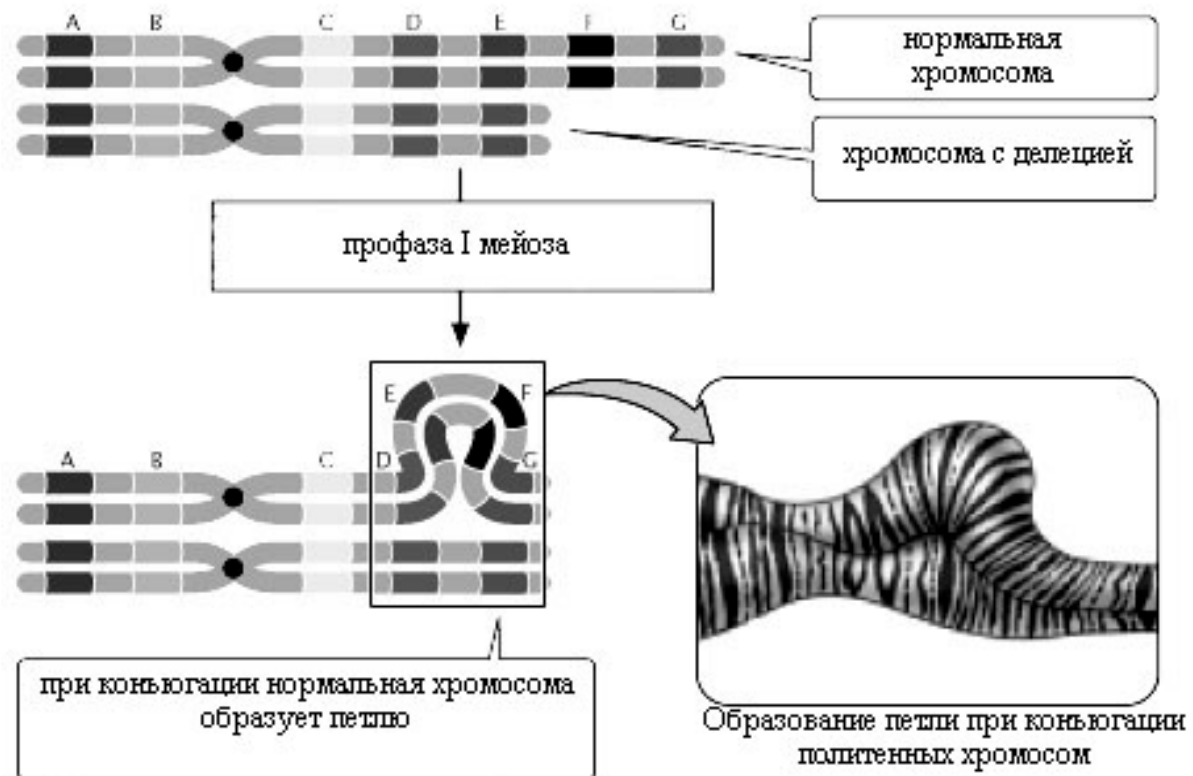


Рис. 2.6.6. Выявление делеций во время мейоза и на политеменных хромосомах

Дупликации – это удвоение участка хромосомы (рис. 2.6.2Б). Обнаружены у дрозофилы в 1919 году, а затем дублицированные участки обнаружены и в составе других хромосом дрозофилы и других организмов. Особенно много для анализа дупликаций дали политеменные хромосомы. В политеменных хромосомах дублицированные участки видны под микроскопом. Дупликация – один из важнейших моментов, обеспечивающих эволюцию путем увеличения количества ДНК на гаплоидный набор. В случае дупликации мутации могут возникать по разным генам, даже важным для жизни, не вызывая леталь. Главная причина дупликаций – неравный кроссинговер.

У дрозофилы есть ген, определяющий число фасеток в глазу. Мутация в этом участке (*Bar*) снижает количество фасеток с 800 у дикого типа до 350 у мутантного. В гомозиготном состоянии этот ген снижает число фасеток до 70. Интересно, что та же доза

генов, но иначе расположенных в хромосомах обуславливает образование другого числа фасеток. Следовательно, фенотипический эффект гена зависит не только от дозы гена, но и от положения гена в хромосомах. Это явление, когда действие гена зависит от его генетического окружения называется – *эффект положения гена* (рис. 2.6.7). В настоящее время эффект положения описан для многих генов.

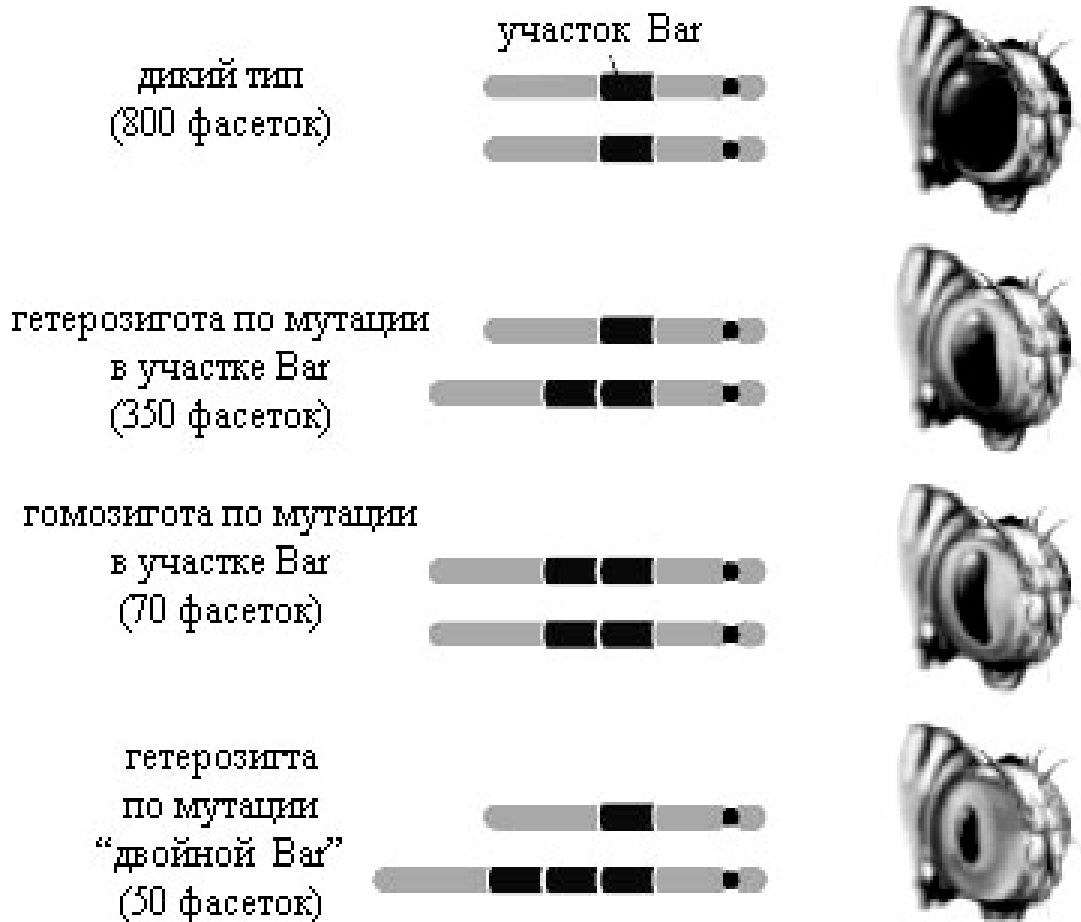


Рис. 2.6.7. Эффект положения гена: изменение числа фасеток в зависимости от положения генов в хромосоме

Дупликации регистрируются:

- метафазным анализом выявляются только крупные дупликации по изменению морфологии хромосом;
- ана-телофазным анализом не выявляются;
- в мейозе во время конъюгации дублицированный участок образует петлю;
- в интерфазу дупликации не обнаруживаются.

На политенных хромосомах обнаруживается в виде петли в дуплицированном участке.

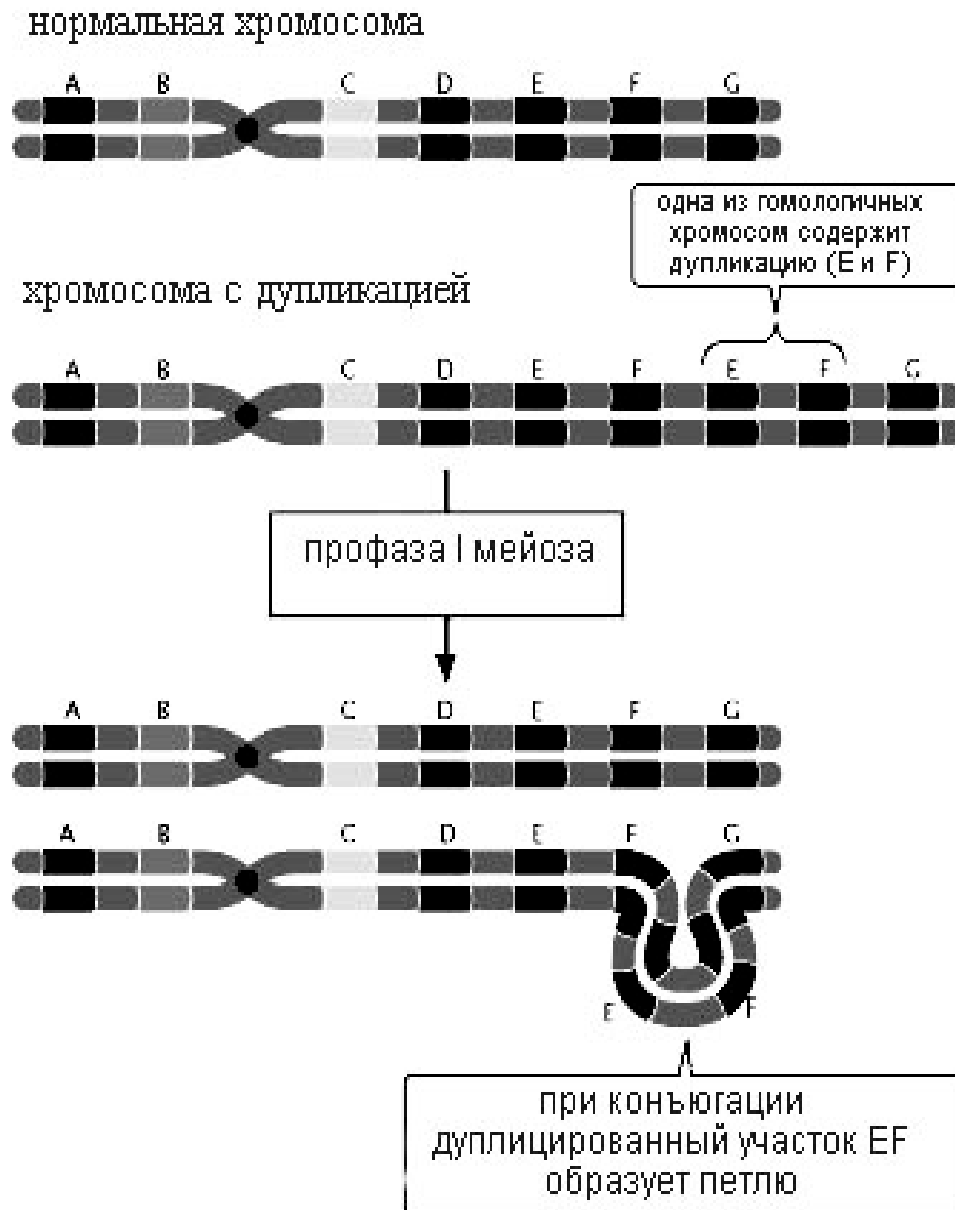


Рис. 2.6.8. Выявление дупликаций во время мейоза

Инверсии. Хромосомная инверсия возникает в результате двух разрывов в одной хромосоме и поворота участка хромосомы на 180° (рис. 2.6.2В). Выделяют *парацентрические инверсии*, когда два разрыва расположены по одну сторону от центромера. При этом относительное расположение генов меняется, однако баланс генов и морфология хромосомы не меняется. При *перичентрической инверсии* инвертированный участок включает цен-

тромер. В результате может измениться положение центромера и мутация может быть зарегистрирована в метафазном анализе. Инверсия играет роль в эволюции, так как изменяет сцепление генов. Поскольку баланс генов сохраняется, фенотипически инверсия может и не проявиться, и при гомозиготности по инверсии клетка пройдет через митоз и мейоз. Однако при гетерозиготности возникает так называемая инверсионная петля. Если в инвертированном участке пройдет кроссинговер, образуются дицентрические хромосомы и ацентрические фрагменты. В этом случае у растений пыльца будет нежизнеспособной. У животных гаметы жизнеспособны, однако зигота гибнет.

Инверсии выявляются:

- метафазный анализ выявляет перичентрические инверсии по изменению морфологии хромосом;
- при ана-телофазном анализе инверсия выявляется в случае кроссинговера в инвертированном участке (в мейозе появляется дицентрическая хромосома и ацентрический фрагмент) (рис. 2.6.10);
- в мейозе инверсия обнаруживается по наличию инверсионной петли (рис. 2.6.9).

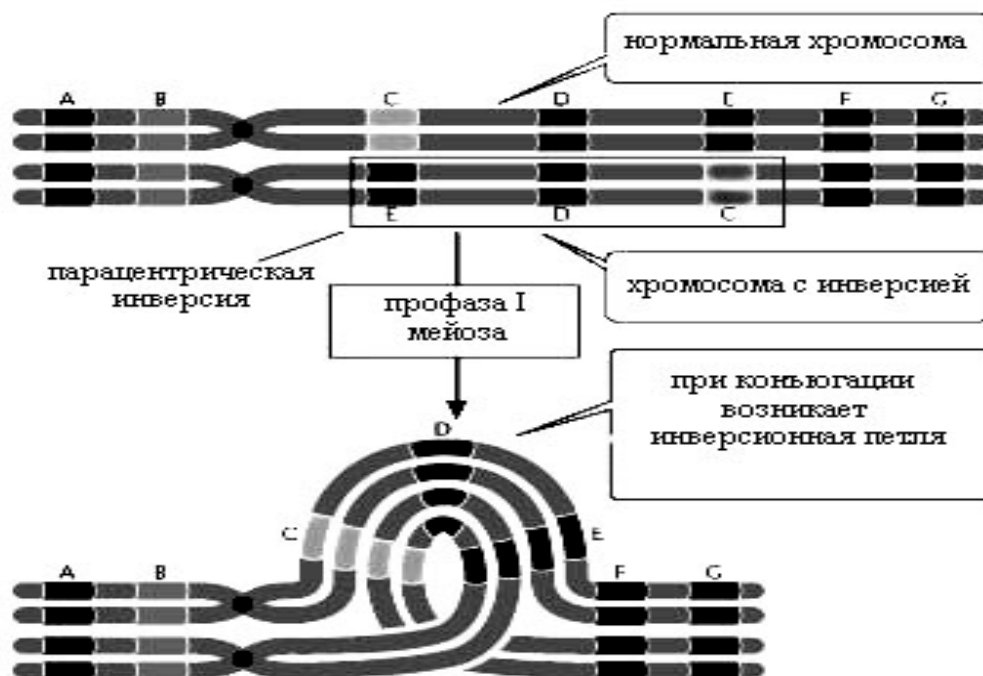


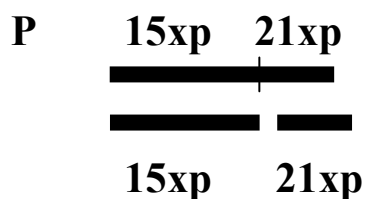
Рис. 2.6.9. Образование инверсионной петли в мейозе

В интерфазе инверсии могут быть микроядра за счет ацентрического фрагмента;

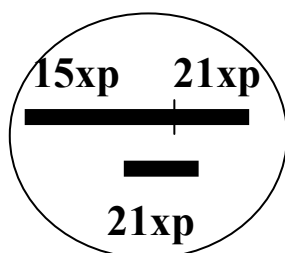
- на политенных хромосомах инверсия выявляется по изменению рисунка дисков и по наличию инверсионной петли.

Транслокации. Транслокация – это перенос генетического материала одной хромосомы на другую негомологичную хромосому. Транслокации относятся к межхромосомными перестройками и являются результатом двух разрывов – по одному в паре негомологичных хромосом (рис. 2.6.2Г). Результатом могут быть два типа обменов:

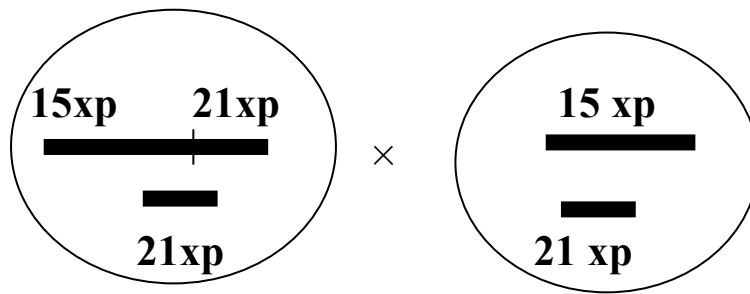
1. *Симметричный обмен*, когда центрик одной хромосомы соединяется с ацентрическим фрагментом другой хромосомы. В результате возникают две центрические хромосомы. Такая транслокация называется *сбалансированной* и может не проявиться фенотипически, так как баланс генов не меняется. Есть вариант болезни Дауна, обусловленный наличием такой сбалансированной транслокации у одного из родителей. В этом случае хромосома 21-й пары транслоцирована на 15-ю пару. Таким образом, у этого человека будет 45 хромосом, так как 15-я и 21-я хромосомы составляют одну хромосому. Но баланс генов не изменится, и фенотипически это нарушение не проявится.



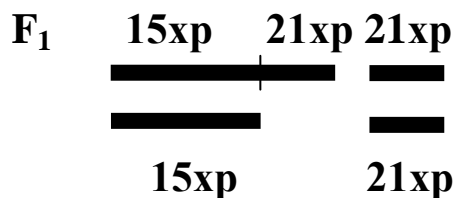
Однако при образовании гамет может возникнуть гамета:



При оплодотворении происходит слияние гамет:

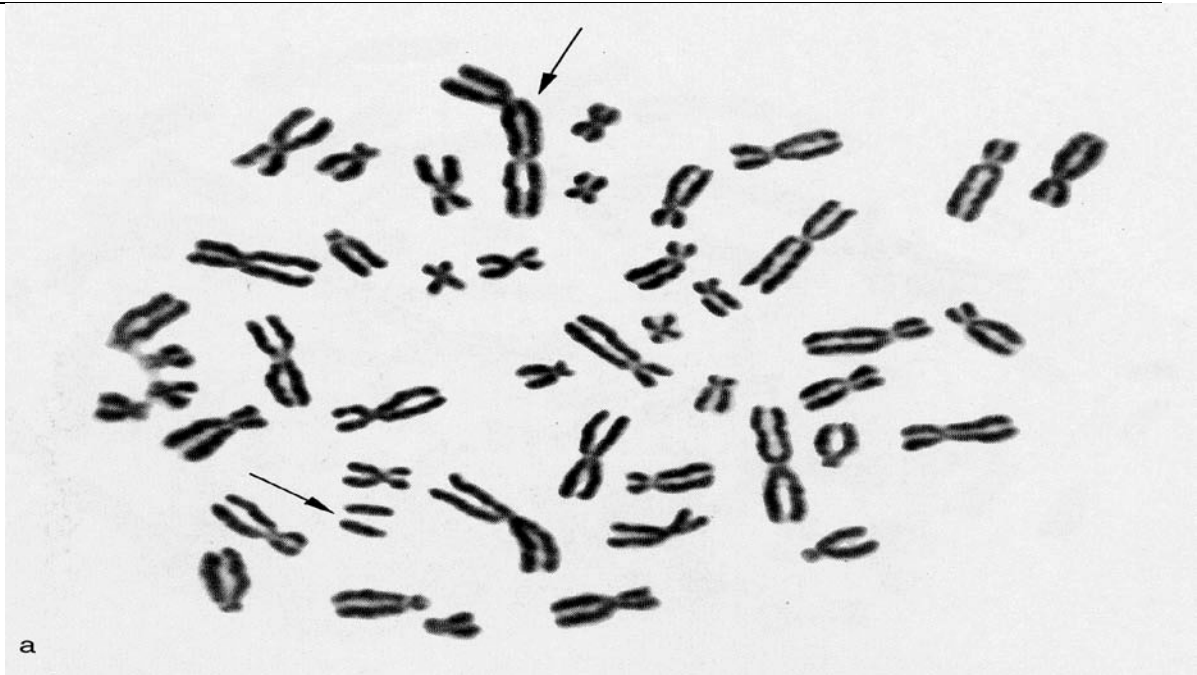


Образовавшаяся зигота содержит три дозы генетического материала 21-й хромосомы:



Таким образом, у потомства при 46 хромосомах в клетках может быть избыток материала 21 хромосомы, следствием чего и будет болезнь Дауна.

2. *Асимметричный обмен*, когда центрический участок одной хромосомы соединяется с центрическим участком другой негомологичной хромосомы, а ацентрические участки этих хромосом также соединяются (рис. 2.6.11). В результате возникает дицентрическая хромосома и ацентрические фрагменты.



*Рис. 2.6.11. Метафазная пластинка.
Транслокация: дицентрик и парные ацентрические фрагменты
(обозначены стрелками)*

Клетки с такими нарушениями не могут пройти митоз и мейоз и обычно гибнут.

Обмен может быть полным или неполным. Во втором случае часть разрывов не воссоединяется.

Транслокации выявляются:

- метафазным анализом по изменению морфологии хромосом;
- ана-телофазным анализом по наличию фрагментов и мостов;
- во время мейоза транслокации выявляются по наличию транслокационного креста, который образуется при конъюгации исходных хромосом и хромосом с транслокацией (рис. 2.6.12, 2.6.13);
- в интерфазу транслокация выявляется по наличию микроядер;
- на политенных хромосомах транслокация выявляется по изменению расположения дисков.

*Рис. 2.6.12. Транслокация: образование
транслокационного креста при реципрокной транслокации*



Рис. 2.6.13. Участок метафазной пластики.
Транслокация: транслокационный крест
(слева – фотография, справа – реконструкция)

2.7. Геномные мутации

Геном – совокупность генов, заключенных в наборе хромосом гаплоидной клетки. Мутации, обусловленные изменением числа хромосом, называются геномными (рис 2.7.1). Подавляющее большинство эукариотических организмов являются диплоидными организмами, то есть каждая хромосома имеет себе гомолога.

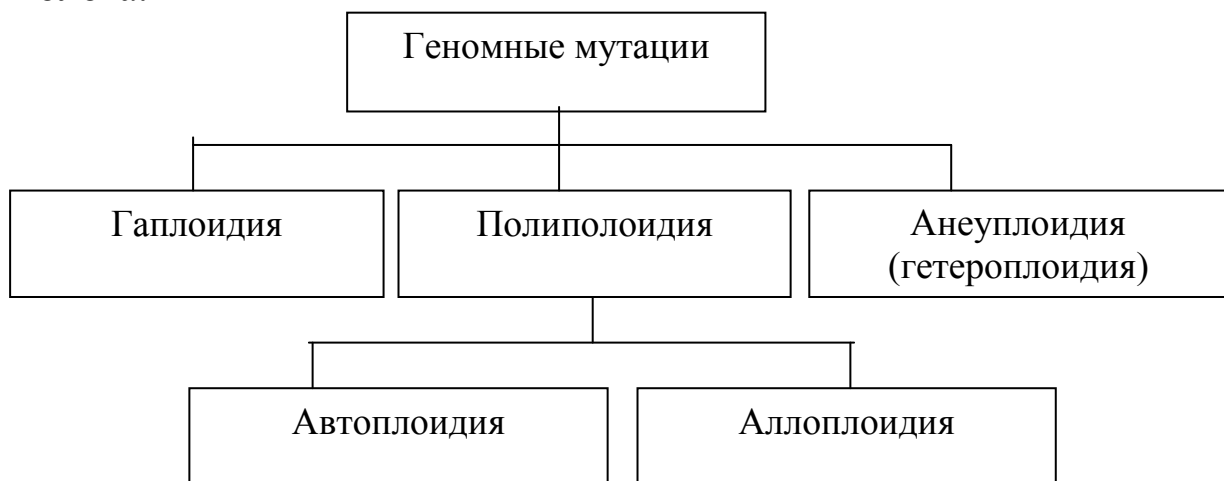


Рис. 2.7.1. Классификация геномных мутаций

Гаплоидия является естественным состоянием некоторых организмов (мхи, некоторые водоросли, грибы). Вместе с тем гаплоидия отмечается и у диплоидных организмов как геномная мутация. У гаплоидных животных и растений снижена жизнеспособность. При мейозе происходит случайное расхождение гамет к полюсам клетки, так как не образуются биваленты. Поэтому часто отмечается стерильность или снижение фертильности за счет несбалансированности гамет. Гаплоидия может возникать при воздействии генетически активных факторов среды.

Полиплоидия (эуплоиплоидия) – это изменение числа хромосом кратно гаплоидному набору (n). Полиплоидия возникает под влиянием факторов внешней среды как на структуру хромосомы, так и на поведение хромосом в митозе и мейозе. Причины полиплоидии – неравное расхождение хромосом к полюсам в анафазе, деление ядра без деления клетки (цитокинеза), удвоение хромосом без деления ядра.

Автополиплоидия – это умножение генома одного вида. Фенотипически сказывается, обычно, в изменении признаков организма, то есть эта изменчивость играет роль в эволюции.

Триплоиды ($3n$) описаны среди растений и животных. У растений триплоиды жизнеспособны, этот уровень гетерозисный. У животных, наоборот, наблюдается снижение жизнеспособности и отклонения в развитии. У человека известна мутация $3n$ (69 хромосом). Фенотипически она проявляется в наличии сочетанных пороков развития, снижении умственных способностей, ранней гибели.

Поскольку у растений этот уровень гетерозисный, селекционеры пытаются искусственно получить полиплоидные мутанты, воздействуя различными факторами среды. Н.И. Вавилов писал, что человечество питается полиплоидами. Действительно, большая часть культивируемых растений – картофель, пшеница, рожь, плодовые растения – являются полиплоидами.

Группа родственных видов, у которых кариотип составляет ряд возрастающего увеличения основного числа (n), называется полиплоидным рядом. Особенно высоки полиплоидные ряды у декоративных растений. Например, у хризантемы ($n = 9$) разные виды и сорта содержат от 18 до 198 хромосом.

Аллополиплоидия (амфиполиплоидия) – умножение геномов разных видов. У аллоплоидов резко выражен гетерозис, который стойко сохраняется в потомстве. Пример аллоплоида – мягкая пшеница – *Triticum aestivum* ($2n = 42$). Её геном составлен из трех видов растений:

1. *Triticum monococcum* ($n = 7$)
2. *Aegilops speltoides* ($n = 7$)
3. *Aegilops squarrosa* ($n = 7$)

$$\Sigma n = 21 \quad (2n = 42)$$

Аллополиплоиды фертильны, у них нормально проходит мейоз, так как каждая хромосома имеет себе гомологичную.

Анеуплоидия (гетероплоидия) – изменение числа хромосом не кратно n . Например, кариотип организмов, у которых одна лишняя хромосома в какой либо паре – $2n+1$. Это нарушение называется *трисомия*. При *моносомии*, наоборот, недостает одной хромосомы в какой-либо паре. Если нет обеих гомологичных хромосом какой-то пары, говорят о *нулисомии*.

Впервые гетероплоидию обнаружил Бриджес у дрозофилы. У мух было вместо двух три половые хромосомы (трисомия по X-хромосоме). Он посчитал это парадоксом. Но позже выяснилось, что гетероплоидия широко распространена и, видимо, встречается у всех живых организмов, в том числе и у человека.

Гетероплоидия фенотипически сопровождается более резко выраженными негативными изменениями, чем эуплоидия. У человека гетероплоидия, как правило, проявляется в виде хромосомных болезней с целым комплексом нарушений в различных системах органов, обычно сопровождается бесплодием. Анеуплоидия, как и полиплоидия, возникает при воздействии факторов окружающей среды, как физических (ионизирующее излучение), так и химических (различные химические соединения) и биологических (в том числе и эндогенных: стресс, гормональный дисбаланс и др.).

2.8. Уровни защиты организмов от мутагенов

Мутагены всегда были на нашей планете. И организмы в процессе эволюции выработали механизмы защиты от мутагенов.

Эта защита осуществляется на всех уровнях организации и обеспечивается следующим:

1. Двухцепочечностью ДНК.

Благодаря двухцепочечности, даже после потенциально летального повреждения ДНК клетка способна выжить благодаря процессам исправления ДНК. Процесс исправления повреждений ДНК называется *генетической репарацией*.

Генетическая репарация бывает нескольких типов. *Экцизионная* репарация заключается в вырезании (экцизия) поврежденных участков молекулы и синтезе нового участка при использовании второй неповрежденной цепи ДНК в качестве матрицы.

Исправление повреждений, которые не восстанавливаются после этого типа репарации, может быть обеспечено *пострепликационной* репарацией.

Третий тип репарации – *внеплановый синтез ДНК*. Он составляет основу одного из методов генетической токсикологии.

2. Вырожденность генетического кода.

Благодаря тому, что одна аминокислота кодируется несколькими триплетами, мутантный кодон может кодировать ту же аминокислоту. Белок, а следовательно, и признак останутся неизменными.

3. Если аминокислоты сходны по активности, то мутация заметно не скажется на функции белка.

Например, изменение глутамина на валин обусловит выраженную форму серповидно-клеточной анемии. А при замене глутамина на лизин симптомы болезни будут выражены незначительно.

4. Замененная аминокислота окажется не в активном центре белка, а в функционально незначимой части белка. Изменения в фенотипе будут выражены слабо или вообще не выражены.

5. Диплоидность организма. Мутантный ген в гетерозиготном состоянии не проявится в фенотипе.

6. Пенетрантность (то есть доля организмов, у которых ген проявляется в фенотипе) зависит от условий среды. Например, пенетрантность шизофрении 65%. Таким образом, у 35% особей гомозиготных по мутантному гену болезнь не проявится.

7. Антимутагенез. Природой создано много факторов, защищающих геном от возникновения мутаций. Это некоторые витамины, соединения тиолового ряда, хлорофилл, фермент пероксидаза и многие другие.

ГЛАВА 3.

Методы оценки мутагенов

3.1. Проблемы оценки мутагенов

На первом этапе главной задачей генетической токсикологии была разработка методов оценки мутагенного эффекта различных факторов и выявление среди них наиболее чувствительных и экономичных тестов.

Можно назвать основные требования, применяемые к современным токсикогенетическим методам:

- высокая чувствительность (чтобы не пропустить потенциальный мутаген, не дать ложноотрицательного ответа);
- специфичность (чтобы регистрировать только истинные мутагены, не давать ложноположительного ответа);
- способность выявлять все типы мутаций;
- возможность выявлять как прямые мутагены, так и косвенные мутагены (промутагены), приобретающие мутагенную активность в процессе метаболизма в организме;
- возможность выявлять как универсальные мутагены, индуцирующие мутации у всех организмов, так и мутагены, активные в ограниченном наборе биологических систем;
- экономичность, краткосрочность, простота в выполнении;
- воспроизводимость результатов (возможность получения аналогичных результатов на той же тест-системе);
- возможность экстраполяции данных, полученных при исследованиях *in vitro* на условиях *in vivo* (Дмитриева, Парфёнов, 1991);
- возможность экстраполяции полученных данных на человека.
- регистрация как нарушений структуры ДНК, так и генетических процессов (генетическая репарация, кроссинговер, протекание митоза, нарушение центромеры, митотического аппарата, и др.

К настоящему времени разработано более 200 методов оценки генотоксикантов, в которых используются различные тест-объекты, от вирусов до высших животных и клеток человека, и регистрируются самые различные генетические повреждения. Однако существующее многообразие методов свидетельствует о том, что ни один из них не является универсальным, удовлетворяющим всех исследователей. Причины этого следующие:

1. Тесты на мутагенность являются видоспецифичными, так как есть мутагены, повреждающие геном только у определенных видов. Таким образом, мутаген, опасный, например, для человека, может быть не выявлен на используемом исследователем тест-объекте. Поэтому необходимо использовать несколько тест-объектов.

2. Методы являются тест-специфичными, то есть выявляют немного видов наследственных нарушений, чаще один тип мутаций. Поэтому, если тест, регистрирующий хромосомные мутации, дал отрицательный ответ, это не означает, что фактор не вызывает генных мутаций. Следовательно, чтобы не получить ложноотрицательных ответов, необходимо использовать несколько тестов.

3. Исследование одним методом и на одном тест-объекте может дать различный ответ из-за тканеспецифичного действия фактора. В тесте рецессивных летальных мутаций у *Dr. melanogaster*. Так, у дрозофилы ответ зависит от того, в какие органы вводилось химическое соединение. Тканеспецифичность отмечается и при использовании микроядерного теста (Л.Н. Сычева, 2004).

4. Косвенные мутагены (промутагены) сами не обладают мутагенной активностью, но их метаболиты генотоксичны. Таким образом, даже проверка фактора несколькими методами на нескольких тест-объектах ещё не гарантирует, что его генетическая безопасность окончательно установлена.

По этим причинам для уменьшения количества возможных ложноотрицательных и ложноположительных ответов необходимо использовать широкий набор методов с применением широкого круга объектов. Это сильно усложняет и удорожает исследование.

Для уменьшения возникших затрат Б. Бриджесом и Фламмом (Bridges, 1976; Flamm, 1974) была предложена этапность тестирования, когда на первом этапе факторы отбираются по степени индуцируемого генотоксического эффекта. Дальнейшее тестиро-

вание требует больших затрат и проводится с учетом результатов первого этапа.

Традиционно процедура тестирования делится на три этапа:

Первый этап. Первичный скрининг. Задача его – выявить, может ли в принципе данный фактор взаимодействовать с ДНК. Требования к методам этого этапа: высокая чувствительность, краткосрочность и экономичность. На данном этапе в качестве тест-объектов используются микроорганизмы, особенно часто – бактерия *Salmonella typhimurium*.

Второй этап. Определяется, может ли данный фактор повреждать ДНК в эукариотических клетках. В качестве тест-объектов используются культуры клеток млекопитающих и человека.

Третий этап. Выясняется, может ли фактор вызывать генетические нарушения в целостном организме. Используются тесты, учитывающие эффект в соматических и половых клетках *in vivo* (Тарасов, 1994).

На рисунке 3.1.1 представлена схема поэтапного тестирования факторов на мутагенность. С увеличением стоимости тестирования происходит значительное снижение количества факторов, генотоксичность которых предстоит оценить.

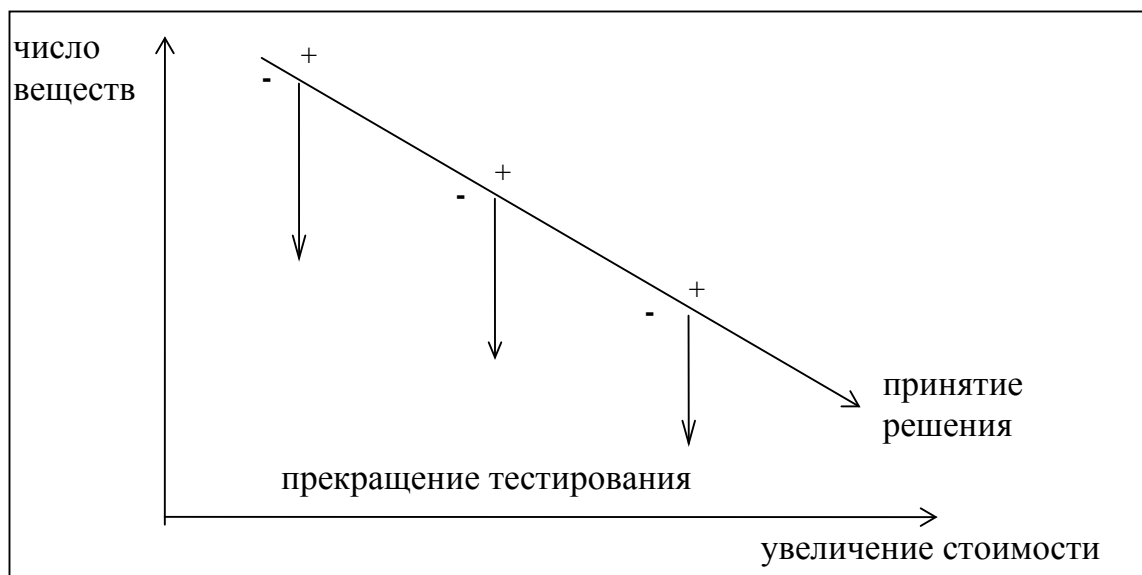


Рис. 3.1.1. Принципиальная схема поэтапного тестирования (В.А. Bridges, 1974):
 “+” – положительный ответ тестирования,
 “–” – отрицательный ответ тестирования

3.2. Бактериальные тест-системы для выявления мутагенов

Бактерии широко используются в генетической токсикологии по следующим причинам:

- бактерии одноклеточные организмы с высокой скоростью размножения, поэтому даже редкие мутации, встречающиеся с частотой 1×10^{-6} , могут быть зарегистрированы;
- генетика бактерий хорошо изучена, методы культивирования дешевые, не требуют больших затрат и площадей;
- получены штаммы, обладающие высокой чувствительностью ко многим мутагенам;
- методы с использованием бактерий краткосрочны.

Бактериальные тест-системы делятся на три основных класса:

- 1) позволяющие обнаруживать обратные мутации;
- 2) позволяющие выявлять прямые мутации;
- 3) обладающие недостаточностью по репарации ДНК.

Наиболее широко в генетической токсикологии используется **метод учета обратных мутаций у *Salmonella typhimurium***. Штаммы дикого типа (прототрофы) способны к синтезу всех необходимых аминокислот из неорганического азота, если в среде есть источник углерода, например глюкоза. Б. Эймсом с соавторами получены штаммы *Salmonella typhimurium*, имеющие генную мутацию в гистидиновом опероне, препятствующую синтезу аминокислоты гистидина. Такие штаммы (их обозначают *his*⁻) являются ауксотрофами по гистидину.

Для увеличения чувствительности этих штаммов к мутагенам в генотип бактерий введены добавочные маркеры:

- мутация *rfa* – увеличивает проницаемость бактериальной стенки, таким образом, изучаемое химическое соединение легко проникает в бактерию. Благодаря этому вероятность ложноотрицательных ответов, обусловленных непроходимостью фактора через клеточную стенку, снижается;
- мутация в гене *uvrB* обуславливает дефект генетической репарации. В результате мутация не будет исправлена, а будет

зарегистрирована, что также снижает вероятность ложнонегативного результата;

– введение плазмиды pKM101 увеличивает чувствительность бактерии к мутагенам.

Таким образом, штаммы являются высокочувствительными, что очень важно на первом этапе скрининга мутагенов. При воздействии мутагенов у ауксотрофных бактерий может возникнуть обратная мутация к прототрофности ($his^- \rightarrow his^+$). По частоте таких мутаций и определяется мутагенная активность фактора.

Схема основного метода

В пробирку, содержащую 2 мл расплавленного мягкого агара («верхнего» агара), добавляют 2 мл культуры *Salmonella typhimurium* штамма Эймса и различные дозы тестируемого вещества.

Параллельно ставят отрицательный (интактный) и позитивный контроль. В отрицательный контроль добавляется только растворитель, а не тестируемое вещество. Этот контроль позволяет определить спонтанный (фоновый) уровень мутаций. В позитивный контроль вносят стандартные мутагены для проверки корректности проводимого опыта.

После перемешивания содержимое каждой пробирки выливают на поверхность твердого агара («нижний» агар, минимальная среда), не содержащего гистидина, так, чтобы распределить верхний агар тонким слоем по поверхности нижнего. Затем чашки ставят в термостат для инкубирования. Через 48 часов просматривают выросшие колонии. На чашке вырастут только те колонии, которые могут синтезировать гистидин, то есть у них произошла обратная мутация от ауксотрофности по гистидину к прототрофности ($his^- \rightarrow his^+$). Таким образом, регистрируются обратные мутации, учет мутаций очень простой, не требует специальных навыков.

Если число выросших колоний в опытном варианте превышает таковое в отрицательном контроле, делается вывод о том, что фактор может вызывать обратные мутации, то есть является мутагеном в данной тест-системе.

Недостатком метода является то, что он выявляет только прямые мутагены и не выявляет промутагены.

Эймсом с соавторами разработана модификация этого метода, которая позволяет выявлять не только мутагенность самого соединения, но и генетическую активность продуктов его распада при метаболизме в животном организме. Этот метод называется **тестом *Salmonella*/микросомы**. У *Salmonella typhimurium* отсутствуют большинство ферментов, характерных для млекопитающих. Эти ферменты добавляют в виде экстракта, приготовленного из печени крыс. Печень гомогенизируют и центрифугируют при высокой скорости. В результате получают содержащий ферменты супернатант, который называется фракцией S9. Этими ферментами действуют на исследуемое вещество, как бы моделируя его метаболизм в организме животного.

Схема метода *Salmonella*/микросомы

В пробирку, содержащую, как и при основном методе, 2 мл «верхнего» агара, 2 мл культуры *Salmonella typhimurium* и тестируемое вещество, добавляют 0,5 мл фракции S9, к которой добавлены поставщики необходимой для метаболизма энергии (никтинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) и глюкозо-6-фосфат), фосфатный буфер, соли кальция и магния. Ферменты, содержащиеся в смеси S9, могут воздействовать на тестируемое вещество и образовавшиеся при этом метаболиты в случае мутагенности могут индуцировать мутации, в том числе и обратную мутацию ($his^- \rightarrow his^+$).

В опыте ставится два варианта:

Первый вариант: как и в основном опыте, ставят отрицательный контроль и опыт без фракции S9.

Второй вариант: в опытные пробирки добавляют фракцию S9.

После посева на чашки Петри и 48 часов инкубации сравнивают количество выросших колоний в первом и втором вариантах. Если в первом варианте частота мутаций в опыте выше, чем в контроле, то вещество является мутагеном прямого действия. Если во втором варианте после метаболической активации частота мутаций возрастает по сравнению с первым вариантом, то вещество является и мутагеном косвенного действия.

Метод Эймса позволяет проводить **мутагенотипирование**, то есть, какой тип мутаций фактор может индуцировать: замены

пар оснований в ДНК или фрейм-шифт мутации. Для этого Эймсом созданы штаммы, у которых нарушения в гистидиновом опероне обусловлены разными мутациями:

– у штаммов **TA1535** и **TA100** – миссенс-мутации, связанные с заменами пар оснований в ДНК. Поэтому штамм может ревертирует под действием мутагенов, индуцирующих именно замены пар оснований;

– штаммы **TA1538**, **TA98**, **TA97** – мутации типа сдвига рамки считывания (фрейм-шифт мутации). Поэтому штамм может ревертировать только при воздействии мутагенов, вызывающих делеции или вставки пар нуклеотидов в ДНК.

Таким образом, воздействуя фактором на эти штаммы, можно сделать заключение: если обратные мутации возникли у штаммов **TA1535** и **TA100**, значит, фактор вызывает замены пар оснований, если обратные мутации возникают у штаммов **TA1538**, **TA98**, **TA97**, значит, фактор способен вызывать выпадения и вставки нуклеотидов ДНК.

3.3. Эукариотические микроорганизмы как тест-объекты для выявления мутагенов

Среди используемых в гентоксикологии эукариотических микроорганизмов применяются наиболее изученные виды *Saccharomyces cerevisia*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, водоросли *Chlorella vulgaris*. Тесты с использованием одноклеточных эукариот обладают всеми преимуществами, свойственными бактериальным тестам. Вместе с тем эукариотические организмы ближе на эволюционной лестнице к высшим млекопитающим, и, следовательно, экстраполяция данных более обоснованна. В лабораторном практикуме Ярославского госуниверситета в качестве тест-объекта широко используется одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris*. Использование *Chlorella vulgaris* как тест-объекта при оценке мутагенов рассмотрено в лабораторном практикуме.

3.4. Цитогенетические методы

Главным недостатком низших организмов как объектов генетической токсикологии является сложность экстраполяции полученных данных на человека из-за различия в процессах метаболической активации. Таким образом, выявление косвенных мутагенов в этих тестах может быть некорректным. Поэтому в генетической токсикологии разработаны методы с использованием млекопитающих *in vivo* или *in vitro*. Наиболее широко используются цитогенетические методы, характеризующие действие фактора по частоте хромосомных мутаций. Из них наиболее часто применяются метафазный анализ, ана-телофазный анализ, микро-ядерный тест и метод сестринских хроматидных обменов (СХО).

3.4.1. Метафазный анализ

Анализ хромосом соматических клеток в метафазу митоза методически хорошо разработан. Метод информативен, так как:

- кариотип многих организмов хорошо изучен,
- в метафазу виден весь геном целиком непосредственно с помощью микроскопического анализа,
- метод достаточно краткосрочен и экономичен,
- в метафазу хромосомы хорошо видны.

Метафазный анализ проводится в митотически делящихся клетках человека и высших животных. В генетической токсикологии особенно широко используется культура лейкоцитов периферической крови человека.

Метафазный анализ является обязательным компонентом систем, предназначенных для проверки факторов внешней среды на мутагенную активность.

Принцип метода

Для целей тестирования используют микро- или полумикро-метод.

Периферическую кровь человека помещают в питательную среду, содержащую все необходимое для жизни и размножения клеток вне организма. В культуру добавляют стимулятор митозов фитогемагглютинин (ФГА). В результате лейкоциты вступают в

митозы. Далее культуру подвергают воздействию изучаемого фактора. Клетки инкубируют при 37° в течение 72 часов. За 6 часов до конца инкубации в культуру добавляется колхицин или кальцимид, которые препятствуют образованию ахроматинового веретена деления и способствуют спирализации хромосом. В результате деление клетки останавливается на стадии метафазы. Это приводит к накоплению метафазных клеток в культуре. Через 72 часа инкубации культуру центрифугируют. Осевшие на дно пробирки клетки обрабатывают гипотоническим раствором хлористого калия или цитрата натрия. Это приводит к набуханию клеток и облегчает разброс хромосом на цитологическом препарате. Затем гипотонический раствор убирают центрифугированием, клетки фиксируют (фиксатор: 3 части метилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Взвесь клеток наносят на предметное стекло, выжигают фиксатор. Препарат окрашивают. Для генотоксических исследований используется так называемое равномерное окрашивание по Романовскому – Гимза.

После окраски препараты исследуют под микроскопом при увеличении $12,5 \times 1,5 \times 100$. Выбирают метафазные пластинки, отвечающие следующим требованиям:

- метафазные пластинки не должны иметь большого количества наложений хромосом;
- уровень спирализации должен быть таким, чтобы акроцентрические хромосомы были видны в виде четко выраженных структур;
- не анализируются метафазные пластинки с хромосомами, входящими в анафазу;
- учитываются клетки с числом хромосом от 44 до 47, так как из-за технических манипуляций возможны потери хромосом в пластинке.

Для генотоксического анализа не требуется проведение карiotипирования, о мутагенной активности судят по частоте хромосомных aberrаций. Определяют: общее число проанализированных клеток, количество клеток с aberrациями хромосом, общее число поврежденных хромосом и типы aberrаций. О мутагенности фактора судят, сравнивая эти показатели в контрольном и опытном вариантах.

3.4.2. Ана-телофазный анализ

Ана-телофазный анализ подробно изложен при описании лабораторной работы «Определение генотоксического действия факторов окружающей среды с использованием *Allium cepa* в качестве тест-объекта».

3.4.3. Микроядерный тест

Метафазный анализ хромосом требует высокой квалификации исследователя, что значительно удорожает исследование. Поэтому в генетической токсикологии интенсивно велась разработка новых методов с целью упрощения учета хромосомных мутаций. В результате в 1973 году был разработан микроядерный тест, основанный на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга. Позже тест стал применяться и для учета микроядер в различных тканях и органах: в лимфоцитах человека, в клетках печени, толстой кишки, ранних сперматиде и т. д. Микроядерный тест в силу простоты и возможности быстрого анализа стал одним из распространенных скрининговых тестов в генетической токсикологии.

Микроядра возникают из ацентрических фрагментов и хромосом, отставших в анафазе. Они одеваются мембраной, и в клетке наряду с основным ядром образуется микроядро.

Наиболее распространенным методом является учет микроядер в полихромных эритроцитах. С помощью этого метода исследовано большое количество соединений. Окрашивание препаратов производят по Романовскому – Гимза. Также широко используются окрашенные мазки костного мозга мышей и крыс. Метод можно применять для оценки не только индивидуальных факторов, но и для оценки генотоксической ситуации территорий, изучая микроядра в костном мозге или крови животных, обитающих на данных участках. Микроядерный тест на рыбах используется для оценки загрязнения водной среды.

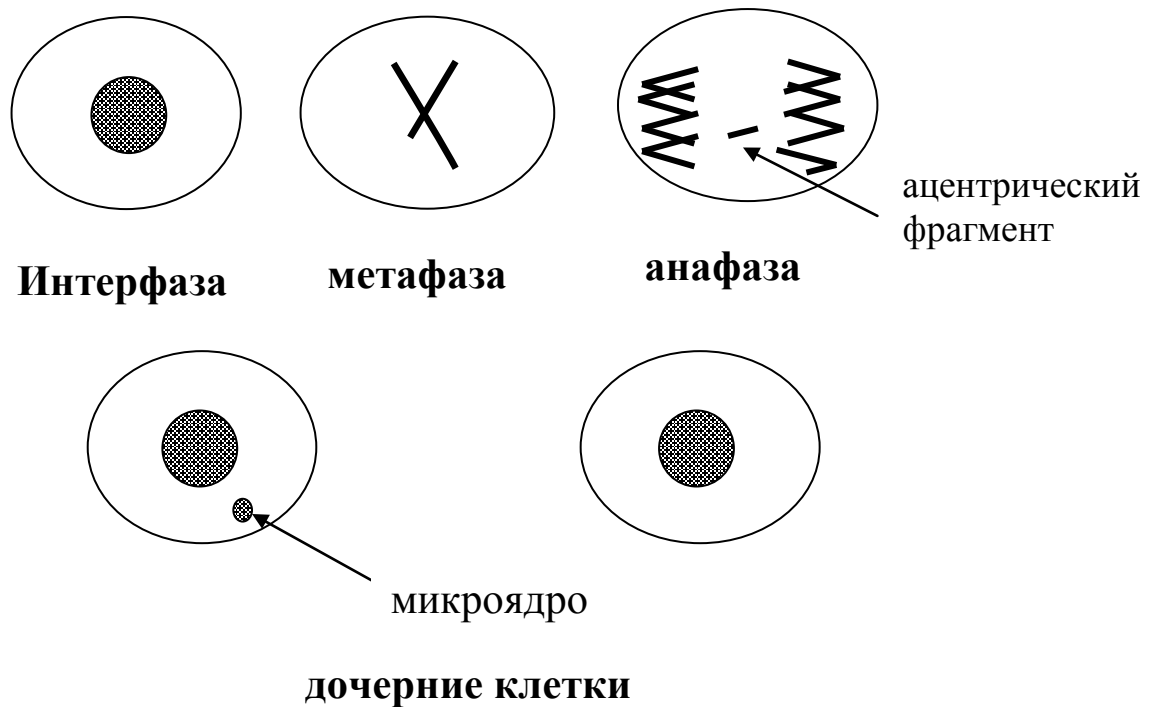


Рис. 3.4.1. Образование микроядра из ацентрического фрагмента

3.4.4. Сестринские хроматидные обмены

Каждая хромосома после S-периода состоит из двух хроматид. Такие хроматиды называются *сестринскими*. Между ними часто происходит обмен гомологичными участками – *сестринский хроматидный обмен (СХО)*. Поскольку сестринские хроматиды абсолютно идентичны друг другу, выявить такой обмен цитогенетическими методами невозможно. Вместе с тем известно, что мутагены и канцерогены вызывают разрывы в хромосомах. Первым этапом возникновения как кроссинговера, так и генных и хромосомных мутаций является именно разрыв. Следовательно, если фактор повышает частоту кроссинговера, значит, он способен вызывать и мутации.

СХО происходят в десятки раз чаще, чем хромосомные абберации, следовательно, метод регистрации СХО, был бы значительно чувствительнее, чем метод учета хромосомных аббераций. Но чтобы зарегистрировать СХО, нужно, чтобы две сестринские хроматиды отличались друг от друга. Это было достигнуто вве-

дением к культуру клеток аналога тимина – бромдезоксиуридина (БДУ). Клетки в присутствии БДУ проходят два деления, и в синтезированной ДНК вместо тимина будет включаться БДУ. Хроматиды, включившие БДУ, выглядят на окрашенных препаратах более светлыми, поэтому СХО будут видны как переместившиеся светлые и темные участки (рис. 3.4.2).

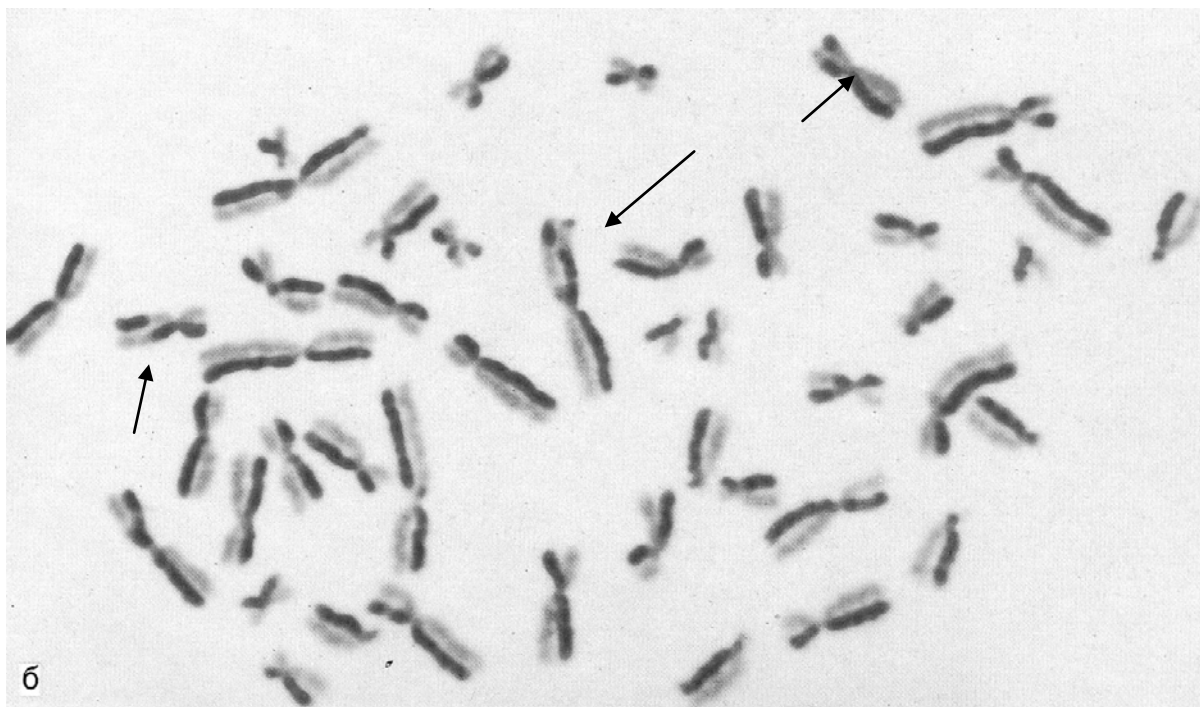


Рис.3.4.2. Метафазная пластинка (сестринские хроматидные обмены обозначены стрелками)

Природа СХО недостаточно выяснена, однако благодаря своей высокой чувствительности метод широко используется как для оценки мутагенности индивидуальных факторов среды, так и для оценки мутагенности сложных смесей и природных сред. О генетической активности фактора судят по превышению частоты СХО над спонтанным уровнем.

3.4.5. Политенные хромосомы

Политенные (гигантские хромосомы) обнаружены в Бальбиани в 1881 году в слюнных железах личинок хирономуса. Позже они обнаружены и в других клетках и тканях животных и растений.

Увеличение размеров политенных хромосом обусловили следующие явления:

1) соматическая конъюгация, выражающаяся в попарном объединении гомологичных хромосом;

2) накопление отдельных хромонемных нитей в процессе последовательных редупликаций, которые не сопровождаются расхождением нитей ДНК. В результате все нити ДНК остаются в одной хромосоме, и хромосома представляет многонитчатую структуру, в которой у дрозофилы, например, накапливаются тысячи нитей. Хромосома становится хорошо видимой в световой микроскоп.

Для цитогенетики важно, что каждая гигантская хромосома разбита на множество темных и светлых полос – дисков и междисковых районов, причем для каждого участка хромосомы этот рисунок постоянен. Это позволяет отличать отдельные районы хромосом и локализовать гены в определенных локусах.

Благодаря этим свойствам политенные хромосомы являются прекрасным материалом для обнаружения и локализации всех типов хромосомных перестроек: инверсий, делеций, дупликаций, транслокаций.

Широкое разнообразие тестов позволяет генотоксикологам составлять комплексы методов в зависимости от задач исследования и возможностей лаборатории. В таких комплексах стараются использовать разные тест объекты и методы, регистрирующие максимально большое количество типов генетических нарушений. Это позволяет сводить к минимуму количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

ГЛАВА 4.

Генотоксическое загрязнение окружающей среды и его негативные последствия

Загрязнение окружающей среды оказывает негативное воздействие на живые организмы, в том числе и на человека. По мнению экспертов, 20 – 85% заболеваемости населения обусловлено провоцирующим действием загрязнения окружающей среды (Дубинин, 1994).

Среди загрязнителей окружающей среды особую опасность представляют генотоксиканты. Генотоксикантами называются факторы, способные вызывать как повреждения структуры ДНК (генные, хромосомные и геномные мутации), так и нарушения генетических процессов, косвенно влияющих на выход мутаций (репарации, рекомбинации, гибель клеток, клеточной трансформации, нарушениям процессов деления клеток, и т.д.) (В.А. Тарасов, 1994).

Наиболее опасные генотоксиканты – диоксины, фураны, полихлорированные бифенилы, пестициды и инсектициды, тяжелые металлы. Это так называемые *суперэкоотоксиканты* – стойкие органические соединения, повсеместно распространенные в окружающей среде, высокоустойчивые к разложению и способные мигрировать по пищевым цепям. (Н.П. Бочков, 1989; Н.П. Дубинин, 1986; В.В. Худолей, 2000).

Генотоксиканты являются одной из причин отмечаемого в настоящее время ухудшения здоровья населения. Их воздействие может привести к увеличению частоты наследственных, онкологических и аутоагрессивных заболеваний, врожденным порокам развития (ВПР), осложнениям течения беременности и перинатального периода, спонтанным абортam (СА), преждевременному старению. Генотоксическое загрязнение окружающей среды также способствует развитию болезней с наследственным предрас-

положением. Это такие **экологозависимые заболевания**, как гипертония, атеросклероз, туберкулез, шизофрения, сахарный диабет, псориаз, аллергии и др. (Н.П. Бочков, 1984; Н.П. Дубинин, Ю.В. Пашин, 1978; В.В. Худолей, 1999).

Особая опасность генотоксикантов заключается в том, что их эффект не прекращается с гибелью организма, подвергнувшегося воздействию, поскольку наследственные структуры передаются потомству, то отдаленные негативные последствия проявятся и в следующих поколениях. Образующиеся в результате действия генотоксикантов вредные мутации составляют **генетический груз** популяции. В популяции, существующей в стабильной среде, генетический груз поддерживается на оптимальном уровне. При увеличении содержания генотоксических факторов в окружающей среде происходит рост генетического груза, что может привести к вырождению и вымиранию вида (Алтухов, 2003; Бочков, 1984; Дубинин, 1994; Тарасов, 1998; Худолей, 1999). Поэтому проблема ухудшения генофонда населения признана одной из приоритетных в программе по экологической безопасности России.

В современных популяциях человека увеличивается как доля наследственной патологии среди общего числа заболеваний, так и абсолютное количество наследственных заболеваний. В России с 1988 по 1998 год доля детей,отягощенных наследственными болезнями, возросла с 4 до 10,5%. В Ярославской области заболеваемость взрослого и детского населения превышает средние по России показатели.

Увеличение частоты ВПР и СА у населения также связано с генетическим загрязнением окружающей среды. Каждый второй СА связан с мутацией в половых клетках или в оплодотворенной яйцеклетке на ранних стадиях её развития. Среди населения Ярославской области с 2001 по 2003 год отмечается увеличение частоты спонтанных абортс на 2,38%. Частота врожденных аномалий среди детей Ярославской области в период с 1988 по 1992 год возросла в 5 раз, в период с 2001 по 2003 год – в 1,3 раза.

90% мутагенов являются и канцерогенами (Н.П. Дубинин, 1986). По оценке ВОЗ, от 75 до 90% всех форм раковых заболеваний людей обусловлены факторами среды, а не наследственной предрасположенностью к болезням. По числу онкобольных Яро-

славская область входит в пятерку самых неблагополучных регионов России. По раку легкого – 10-е место, по раку желудка – 11-е, по раку кожи – 12-е место, из тысячи больных семь человек – дети до 14 лет. В период с 1993 по 2003 год частота онкологической заболеваемости в Ярославской области возросла на 13,0%, в период с 2001 по 2003 год – на 4,8%. Частота онкологических заболеваний среди детей области в период с 1988 по 1992 год возросла на 13,0%, с 2000 по 2003 год – с 7,1 до 12,0 случаев на 100 000 человек. В частности, число детей, больных раком почек, в этот период увеличилось в два раза. Заболеваемость мочеполовой системы среди детского населения (до 14 лет) Ярославской области с 2001 по 2003 год увеличилась на 16,1%.

Таким образом, для России, и в частности для Ярославской области, особенно актуален мониторинг за содержанием генотоксикантов в природных средах.

ГЛАВА 5.

Методы выявления и оценки генотоксикантов

5.1. Отбор и подготовка проб для проведения токсикогенетического анализа

При изучении химических факторов важным моментом является приготовление растворов исследуемого вещества в различных концентрациях. В качестве растворителей используется вода или органические растворители, чаще всего диметилсульфоксид (ДМСО).

Подготовка проб для оценки СМА природных сред

Определение СМА объектов окружающей среды осуществляется по следующей принципиальной схеме (Метод. указания..., сост. В.В. Соколовский, В.С. Журков, Ю.А. Рахмани, 1990): отбор проб воздуха, воды, почвы, пищевых и других продуктов, концентрирование и экстракция (или фракционирование), при необходимости стерилизация с последующим испытанием в тест-системах.

Отбор и подготовка проб воздушно-пылевых частиц (ВПЧ)

Отбор ВПЧ производится на стекловолоконные фильтры с помощью аспираторов (например, фирмы «Staplex»). Привес фильтра должен быть не менее 300 мг, то есть объем пропущенного воздуха – не менее 1 тыс. м³. Допустимо объединение фильтров из разных пробоотборников, работавших синхронно. Желательно фракционирование ВПЧ по размерам (от 2 до 20 мкм).

Экстракция проводится органическими растворителями (ацетоном, циклогексаном, дихлорметаном), реже водой. Фильтры полностью погружают в растворитель (около 100 мл). Экстракцию проводят в шутль-аппарате, в темноте в течение двух часов. Далее растворитель переливают в колбочку и упаривают (при необходимости – с использованием водоструйного насоса) до сухого остатка. Сухой остаток полностью растворяют в ДМСО. Объем ДМСО должен быть точным, 1 мл полученного экстракта должен соответствовать 100 м³ воздуха, пропущенного через фильтр.

Далее готовятся разведения экстрактов в ДМСО (1:0, 1:5, 1:25), которые используются для исследований в различных тестах. Чаще всего используется тест Эймса (*Salmonella*/микросома) и цитогенетические тесты.

Хранение проб: оптимальным считается хранение проб до проведения тестирования – на стадии сухого остатка в морозильной камере (не более одной недели).

Подготовка проб воды

Правильная оценка генотоксической активности в значительной мере зависит от метода подготовки проб, который сводит до минимума потери генотоксикантов. В настоящее время для подготовки проб воды в токсикогенетике используются различные методы: вымораживание, выпаривание, вакуумная перегонка с целью получения различных фракций, использование ионообменных смол, обратный осмос, экстракция органическими растворителями (Метод. указания..., 1990; И.М. Прохорова, 1985). Показано, что при определении генотоксичности одной и той же пробы с использованием одних и тех же тестов, но при подготовке проб разными методами можно получить сильно различающиеся результаты: от сильного мутагенного эффекта до полного его отсутствия. При этом ни один из используемых методов не позволяет полностью сохранить содержащиеся в пробе химические соединения.

В зависимости от задач и условий эксперимента анализируется или нативная, или концентрированная вода (Р.К. Лекавичус, 1983; Метод. указания..., 1990). В случае низкой концентрации мутагенных соединений в нативной воде проводится концентри-

рование проб. Основными способами концентрирования образцов воды являются: испарение в вакууме, вымораживание, ультрафильтрация, адсорбция/десорбция на активном угле и других сорбентах (Р.К. Лекавичус, 1983; Метод. указания..., 1989).

Испарение в вакууме осуществляется на специальной установке при температуре 25 – 30⁰С и давлении 10 – 15 мм рт. ст. Пределом концентрирования является момент интенсивного выпадения осадка (25 – 50-кратное концентрирование). Воды поверхностных водоемов допускают концентрирование до 100 раз и выше.

Вымораживание проб воды проводится следующим образом (Метод. рекомендации по экспериментальной оценке суммарной мутагенной активности загрязнений воздуха и воды, 1990): в морозильную камеру помещают несколько стаканчиков с исходной водой. По мере образования льда раствор сливают в другие стаканчики. Процесс продолжается до тех пор, пока незамерзшая часть не достигнет нужной степени концентрирования.

Экстракция органическими растворителями. Минимальные потери генотоксикантов при подготовке проб воды к анализу обеспечивает следующий метод концентрирования проб: органические вещества экстрагируются эфиром, эфир затем выпаривается досуха при 45⁰ С, осадок растворяется в ДМСО (И.М. Прохорова и др., 1985). Минеральные компоненты концентрируются выпариванием, осадок растворяется в дистиллированной воде. Для анализа могут использоваться обе фракции, как отдельно, так и совместно.

Стерилизация проб необходима перед использованием в некоторых тест-системах (бактерии, дрожжи, одноклеточные водоросли, культуры клеток). Наиболее пригодный метод – холодная стерилизация с помощью мембранных фильтров Ø пор 0.17 или 0.3 мкм).

Все операции проводят в стерильных условиях, со стерильной посудой и оборудованием.

Хранение проб. Показано, что при длительном хранении проб воды их генотоксический эффект значительно снижается. Во избежание этой ошибки пробы следует тестировать сразу после отбора проб, или хранить в замороженном состоянии непродолжительное время.

Периодичность отбора проб воды природных водоемов

Важной проблемой для проточных водоемов является выбор периодичности отбора проб.

Частота отбора проб зависит от условий конкретного водоема и должна быть прямо пропорциональна уровню антропогенной нагрузки на водоем и обратно пропорциональна водности реки.

Подготовка проб почвы и донных отложений

Для анализа используются нативные образцы или вытяжки образцов донных отложений.

Приготовление вытяжек: 5 г исследуемого образца заливается 50 мл дистиллированной воды. Колбы ставятся на качалку, и при комнатной температуре образцы экстрагируются 2 – 3 часа. Полученный экстракт отфильтровывается, выпаривается досуха в вытяжном шкафу. Осадок растворяется в 5 мл стерильной дистиллированной воды (Л.Г. Дубинина, 1996).

Стерилизация: так же, как для воды.

Все операции проводят в стерильных условиях, со стерильной посудой и оборудованием.

Хранение проб. Непродолжительное время на стадии сухого осадка в морозильной камере.

5.2. *Chlorella vulgaris* как тест-объект для оценки генотоксичности факторов окружающей среды

Одноклеточная зеленая водоросль хлорелла является одним из удобных тест-объектов для исследования генетического действия факторов среды. Методы культивирования ее экономичны, жизненный цикл сравнительно короток (18 – 22 часа) и очень прост. Для неё характерно полное отсутствие полового размножения. Бесполое размножение осуществляется автоспорами – дочерними клетками. Автоспоры формируются в материнской клетке путём обособления цитоплазмы вокруг дочерних ядер. Ядра образуются путём митотического деления ядра материнской клетки. Материнская клетка образует 2^n автоспор, где n – число последовательных репликаций ДНК в ядре. Автоспоры выходят

при разрыве материнской оболочки. Они интенсивно фотосинтезируют, растут, а затем сами образуют автоспоры (от 2 до 64 штук, в зависимости от штамма и условий культивирования). Таким образом, в колонии все клетки генетически идентичны, все имеют одинаковую наследственность (рис. 5.2.1).

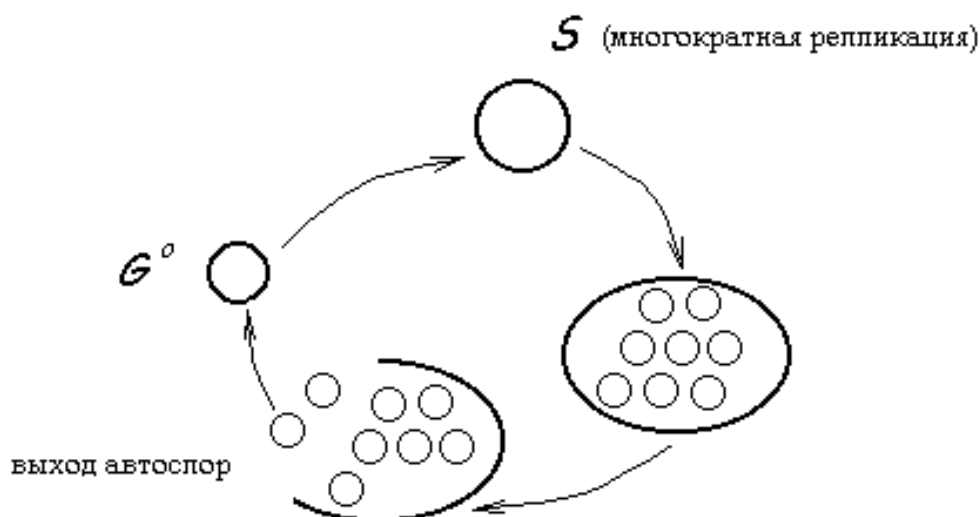


Рис. 5.2.1. Жизненный цикл хлореллы

У хлореллы выделены разнообразные мутанты: морфологические – изменены размеры (карлики), форма; пигментные – изменена окраска колоний; мутанты с измененной чувствительностью к антибиотикам, потребностью к элементам питания, жизнеспособностью. Многие из таких мутантов являются стабильными и сохраняют свой фенотип при длительных пересевах.

Для оценки мутагенности некоторых факторов среды удобен тест видимых мутаций. В этом случае проводят культивирование с добавлением в среду веществ, моделирующих условия загрязнения среды. При действии мутагенов возникают мутантные колонии – полные и мозаичные. Мозаичные колонии у хлореллы могут быть двух типов: секторные и крапчатые. В секторных колониях клетки с измененным составом пигментов, формой или размерами расположены в виде более или менее четких секторов. Размер сектора определяется долей мутантных клеток в колонии. В крапчатых же колониях нормальные и мутантные клетки расположены произвольно. Это может быть обусловлено периодиче-

ским выщеплением мутантов или неравномерным распределением клеток в ходе формирования колонии.

Суть метода оценки мутагенного действия различных факторов с использованием хлореллы заключается в следующем. Приготавливается суспензия хлореллы, содержащая определенное количество клеток в 1 мл. Изучаемым фактором действуют на суспензию водоросли. Химические вещества можно помещать и в центр чашки, на поверхность среды. В этом случае вещество диффундирует в агар и воздействует таким образом на клетки. После инкубации подсчитывается общее число колоний, выросших на чашке, число мутантных колоний.

В качестве питательной среды для хлореллы могут использоваться разные среды ФДАГА, Прата, Тамийя в зависимости от исследуемых факторов. Состав среды Прата (на 1 литр дистиллированной воды): KNO_3 – 0,1 г; KH_2PO_4 – 0,01 г; MgSO_4 – 0,01 г; FeCl_3 – 0,001 г; Агар – 20 г.

Для характеристики эффекта исследуемого фактора определяется выживаемость клеток и частота появления мутаций. Учет ведется на уровне колоний, так как в настоящее время нет достаточно чувствительных методов учета на уровне клеток. Но все клетки колонии возникли путем митоза, и они, как правило, идентичны исходной материнской клетке.

Выживаемость клеток хлореллы позволяет характеризовать цитотоксическое и цитостатическое действие изучаемого фактора. Отдифференцировать, что вызывает агент – гибель клеток или только остановку размножения, – в данной системе нельзя.

Частота появления мутантных колоний характеризует генетическое действие изучаемого фактора.

Цель работы: освоить методы оценки генотоксического действия химических веществ в тесте с использованием хлореллы.

Оборудование занятия: культура хлореллы (штамм ЛАРГ-1) на скошенном агаре, микроскопы МБС-1 и МБИ-1, камера Горяева, предметные и покровные стекла, спиртовка, штатив, микробиологическая петля, стерильная водопроводная вода, стерильная посуда: пробирки для разведения суспензии (10 шт.), пипетки на

10 мл³ и 2 мл³, микропипетки (0,1 – 0,2 мл³), чашки Петри со средой Прата, шпатели.

Раздаточный материал: генетическая коллекция штаммов хлореллы.

Задание

1. Ознакомиться с генетической коллекцией хлореллы. Рассмотреть под микроскопом МБС-1 (ув. $8 \times 0,6$) колонии дикого и мутантных штаммов хлореллы. Изучить под микроскопом особенности строения клеток хлореллы (ув. 10×40) на временных препаратах, приготовленных из колоний дикого штамма хлореллы. Записать название и основную характеристику мутантов.

2. Дать оценку мутагенного действия химического вещества, используя хлореллу в качестве тест-объекта.

I. Постановка эксперимента.

(Вся работа проводится в стерильных условиях, со стерильной средой и посудой).

1) В пробирку с 5 мл стерильной воды внести микробиологической петлей семисуточную культуру *Chlorella vulgaris* (шт. ЛАРГ-1). Суспензию тщательно размешать.

2) Подсчитать концентрацию клеток в исходной суспензии с помощью камеры Горяева: подсчитываются клетки в пяти больших квадратах по диагонали. Расчет концентрации производится по формуле:

$$C = \frac{W}{20} \times 10^6,$$

где C – концентрация клеток хлореллы (клеток/мл),

W – число клеток в пяти больших квадратах.

3) Произвести разведение исходной суспензии для достижения необходимой концентрации **10 000** кл./мл (рабочая суспензия). Это необходимо сделать для посева точного количества клеток на чашку. Если внести клеток слишком много, подсчитать выросшие колонии будет трудно. Если клеток будет внесено слишком мало, то при токсическом эффекте фактора полученные результаты не будут статистически достоверными. Оптимальное количество высеваемых на одну чашку клеток – 500. Минимальный объем суспензии, который можно внести достаточно точно с

помощью микропипетки, – 0,1 мл. Таким образом, концентрация клеток в рабочей суспензии, из которой ведется посев, должна составлять 5 000 кл./мл. Если мы вносим изучаемый реагент в растворе, то необходимо иметь концентрацию клеток в рабочей суспензии в два раза больше, то есть 10 000 кл./мл (если вносится сухое вещество, то концентрацию клеток в рабочей суспензии должна составлять 5 000 кл./мл.). Суспензию любой концентрации можно получить серией последовательных разведений. Для этого подготовить несколько пробирок (3-4 пробирки), содержащих по 4,5 мл стерильной воды. В первую пробирку внести 0,5 мл исходной суспензии, во вторую пробирку – 0,5 мл из первой пробирки, в третью пробирку – 0,5 мл из второй пробирки (каждый раз суспензию тщательно перемешивают пипетированием). При каждом разведении концентрация клеток будет уменьшаться в 10 раз. При необходимости в последней пробирке можно сделать любое нужное разведение (в два, три, четыре ... раза) (рис. 5.2.2).

4) Обработать суспензию изучаемым агентом. Для этого в сухую пробирку внести 1,0 мл рабочей суспензии хлореллы (конц. – 10 000 кл./мл) и 1 мл 0,5%-ного раствора изучаемого препарата – это опытный вариант. Таким образом, в опыте концентрация химического соединения будет составлять 0,25%, концентрация клеток хлореллы – 5 000 кл./мл. Пробирку оставить на 30 минут для контакта с агентом, периодически встряхивая ее.

5) Поставить контрольный вариант: в пробирку внести 1,0 мл рабочей суспензии хлореллы и 1 мл стерильной воды и оставить на 30 минут.

6) Провести посев контрольного и опытного вариантов. В чашку Петри со средой Прата внести из пробирки с опытной суспензией (пункт 4) микропипеткой 0,1 мл (500 клеток). Суспензию тщательно растереть шпателем по поверхности среды (эту работу следует сделать очень тщательно, иначе клетки будут расти неравномерно и подсчет окажется невозможным). То же повторить и для контрольного варианта.

Чашки опытного и контрольного вариантов подписать (дата, вариант, фамилия студента) и поставить в термостат для инкубации в течение 7 дней при температуре 30°C.

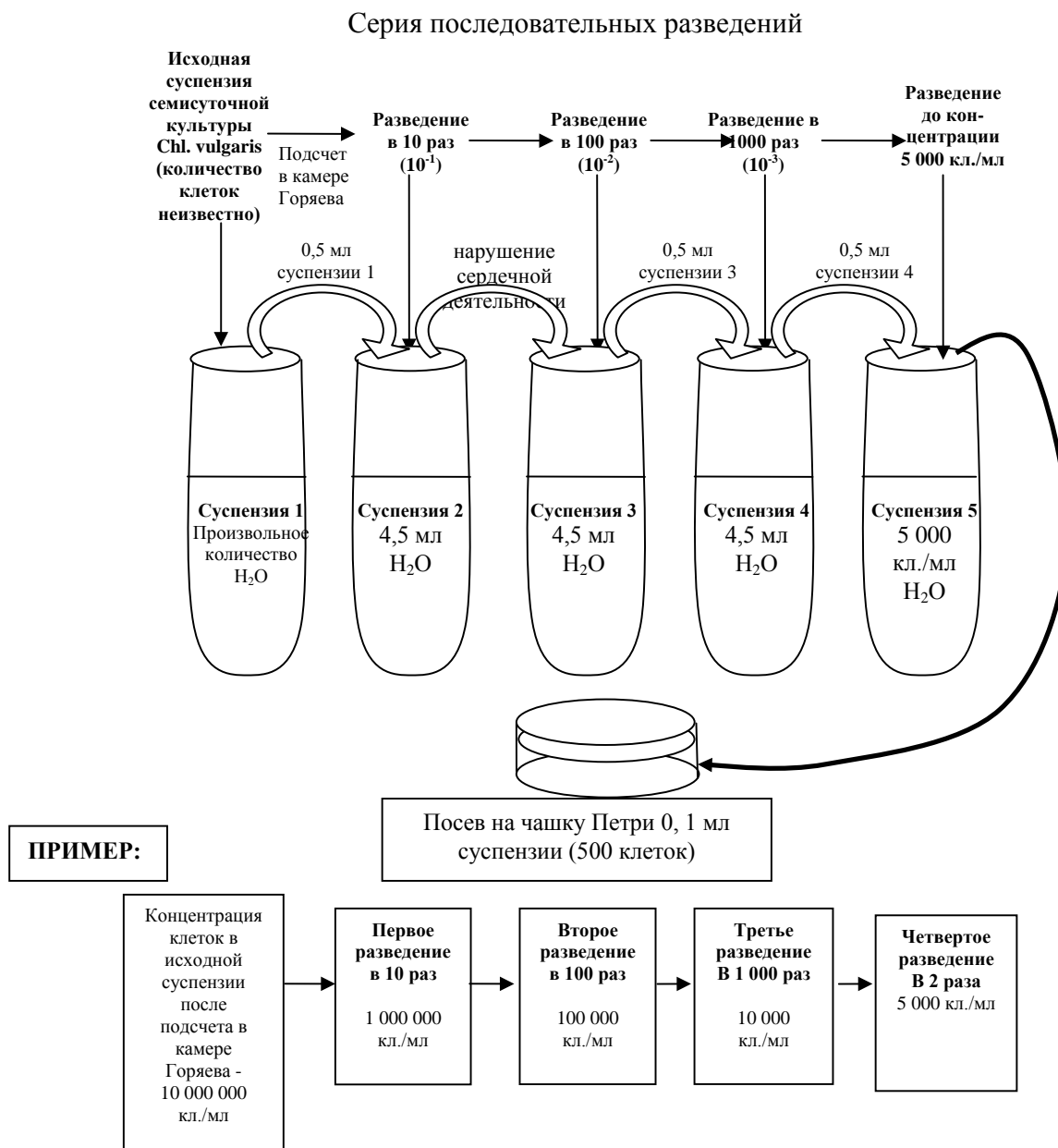


Рис. 5.2.2. Метод последовательного разведения культуры клеток хлореллы

II. Учет полученных результатов.

Чашки контрольного и опытного вариантов с хлореллой после 7 дней инкубации вынуть из термостата. Вначале учесть контрольный вариант. Для этого под МБС-1 (ув. $8 \times 0,6$) просмотреть всю поверхность посева в чашках Петри. Подсчитать общее количество выросших колоний отдельно в каждой чашке контрольного и опытного вариантов. Чтобы было удобнее вести подсчет, надо крышку чашки разделить на 8 секторов. Просчитанные колонии отмечать точкой, нанесенной на крышку чашки. Далее подсчитать все мутантные колонии на каждой чашке.

Для каждой чашки опытного и контрольного вариантов подсчитать процент выживаемости клеток ($W, \%$) по формуле:

$$W, \% = \frac{N}{N_{\text{контр.}}} 100,$$

где N – число выросших на чашке колоний,

$N_{\text{контр.}}$ – среднее число выросших колоний в контрольном варианте.

Вычислить для каждой чашки отдельно процент мутаций ($M, \%$):

$$M, \% = \frac{l}{N} 100,$$

где l – число мутантных колоний на чашке,

N – число выросших колоний.

Все результаты внести в таблицу 5.2.1.

Таблица полученных в ходе работы результатов

№ чашки	Кол-во выросших колоний, N	Выживаемость, W, %	Отклонение, $(X_i - \bar{X})$	Квадраты отклонений $(X_i - \bar{X})^2$	Частота мутаций, M, %	Отклонение, $(X_i - \bar{X})$	Квадраты отклонений $(X_i - \bar{X})^2$
1							
2							
3							
4							
Сумма, Σ							
Среднее, \bar{X}							

III. Статистическая обработка полученных результатов.

а) *Нахождение общего размаха колебания признаков:* общий размах признака ограничивается лимитами, т.е. минимальным (X_{\min}) и максимальным (X_{\max}) значением вариантов. Вариантой в нашем случае является каждая чашка с посеянными клетками хлореллы. Какой вывод можно сделать, проведя сравнение контрольного и опытного вариантов? Подчеркните в таблице значения лимитов.

б) *Вычисление средней арифметической:* поскольку в данной работе число вариантов меньше 30, следует пользоваться прямым способом: все варианты суммируются и полученная сумма делится на число вариантов:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots}{n} = \frac{\sum X}{n},$$

где $\sum X$ – сумма вариантов, n – число вариантов.

в) *Вычисление среднего квадратического отклонения (σ):* среднее квадратическое отклонение характеризует разнообразие признаков. Показателем этого являются и лимиты. Но судить по лимитам о разнообразии признака нельзя. Ведь это крайние значения, а они могут быть нехарактерными для большинства вари-

ант. А среднее квадратическое отклонение учитывает отклонение от среднеарифметической каждой варианты. Поэтому σ является наилучшим показателем разнообразия признака. Для малых выборок σ рассчитывается по формуле:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}},$$

где n – количество проанализированных вариантов.

Рассчитайте значение σ для выживаемости и мутабельности отдельно по контрольному и опытному варианту. Полученные конечные значения и промежуточные расчетные $(X_i - \bar{X})$, $(X_i - \bar{X})^2$ внесите в таблицу 5.2.1.

г) *Оценка достоверности средней арифметической*: средние арифметические, характеризующие действие изучаемого вещества на выживаемость и частоту мутаций у хлореллы, рассчитаны для нашего небольшого числа повторностей, для нашей выборки. Будут ли они достоверны и для всей генеральной совокупности, для любого числа повторностей? Это устанавливается при помощи средней ошибки (m). Для малых выборок:

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

где m – ошибка среднего,

σ – среднее квадратичное отклонение;

n – количество проанализированных вариантов.

Из формулы видно, что величина средней ошибки находится в обратной зависимости от n . Таким образом, чем больше повторностей опыта исследуется, тем меньше ошибка \bar{X} . Величину \bar{X} записывают с величиной его ошибки: $\bar{X} \pm m$.

Рассчитайте m для контрольного и опытного вариантов.

д) *Нахождение показателя достоверности разницы*: заполните таблицу 5.2.2, внося в нее уже вычисленные показатели \bar{X} , m , v для выживаемости и мутабельности. Число степеней свободы (v) вычисляется по формуле:

$$v = n - 1.$$

**Сравнение данных по выживаемости
и частоте мутаций у хлореллы**

Вариан- ты	Количе- ство ча- шек, n	Число степеней свободы, ν	Выживаемость, $W, \%$		Частота мутаций, $M, \%$	
			\bar{X}	m	\bar{X}	m
Контроль						
Опыт						

Теперь следует сравнить рассчитанные средние арифметические выживаемости и мутабельности контрольного и опытного вариантов. \bar{X} двух сравниваемых групп, даже взятых из одной генеральной совокупности, всегда могут в какой-то мере отличаться друг от друга. Поэтому необходимо выяснить, являются ли различия между средними арифметическими контрольного и опытного вариантов достоверными, или же это различие случайно. Для нашего эксперимента можно использовать t -критерий Стьюдента:

$$t = \frac{\bar{x}_o - \bar{x}_k}{S_d},$$

где \bar{x}_o - среднее арифметическое опытного варианта,

\bar{x}_k - среднее арифметическое контрольного варианта,

S_d - ошибка отклонения, которая определяется при $n_1 \neq n_2$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x}_o)^2 + \sum (x_i - \bar{x}_k)^2}{n_o + n_k - 2} \left(\frac{1}{n_o} + \frac{1}{n_k} \right)},$$

при $n_1 = n_2$

$$S_d = \sqrt{m_o^2 + m_k^2}.$$

Найдя t , по таблице Стьюдента (Приложение, табл. 2) определяем значение вероятности достоверности разницы. Для этого устанавливаем число степеней свободы:

$$\nu = (n_o - 1) + (n_k - 1).$$

Находим в таблице строку, соответствующую полученному ν . Далее, в этой строке выбираем значение t меньшее, чем рассчитано в нашем опыте. Верхняя строка в таблице показывает вероят-

ность (p). Отклонение считается достоверным при достижении 0,05% уровня значимости (вероятность 0,95).

Таким образом, если получаемая вероятность $p \geq 0,95$, различия между контрольным и опытным вариантом будут достоверными.

Представьте в виде диаграммы полученные результаты (рис. 5.2.3, 5.2.4, 5.2.5).

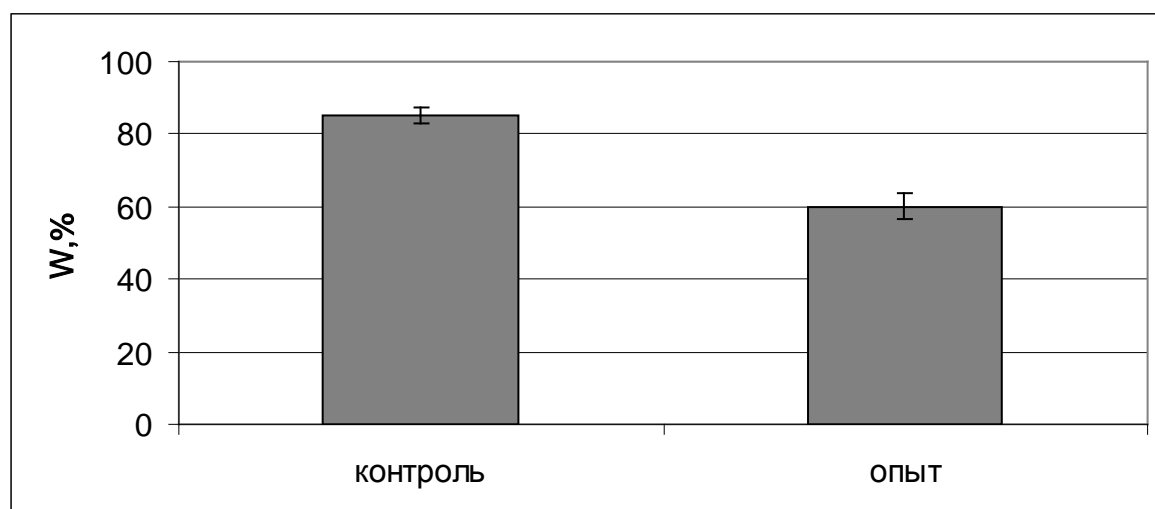


Рис. 5.2.3. Выживаемость клеток *Chlorella vulgaris* при воздействии химического соединения

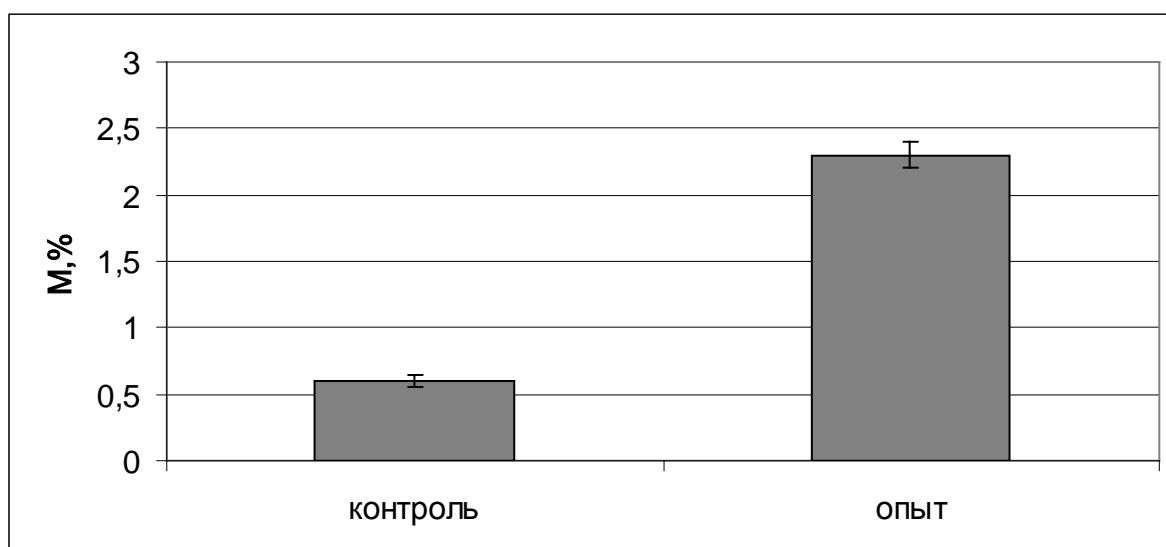


Рис. 5.2.4. Частота мутаций у *Chlorella vulgaris* при воздействии химического соединения

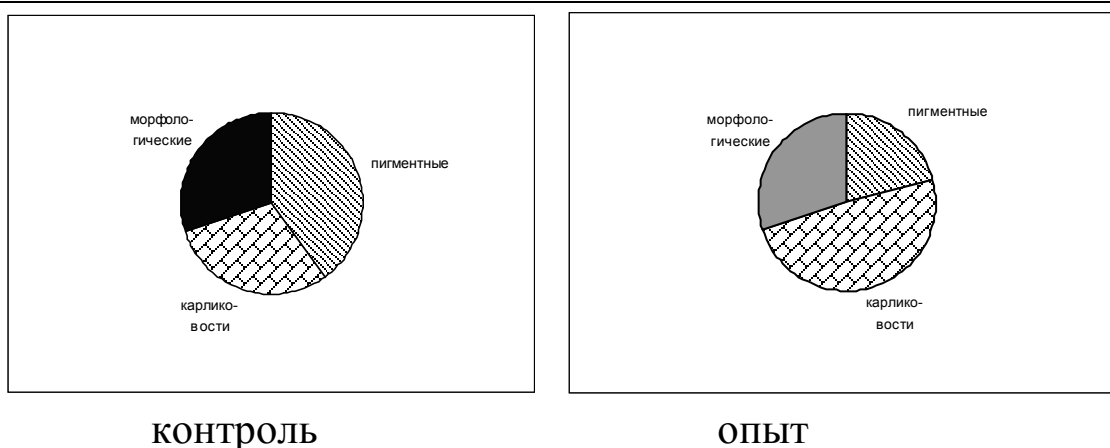


Рис. 5.2.5. Соотношение типов мутаций у *Chlorella vulgaris*

IV. Выводы.

На основе статистически обработанных результатов опыта сделайте вывод о генетическом, цитотоксическом и цитостатическом действии изучаемого химического вещества.

Таблица 5.2.3

Таблица полученных в ходе работы результатов

Вариант, № чашки	Кол-во выросших колоний, N	Выживаемость, W, %	Отклонение, $(X_i - \bar{X})$	Квадраты отклонений $(X_i - \bar{X})^2$	Частота мутаций, M, %	Отклонение, $(X_i - \bar{X})$	Квадраты отклонений $(X_i - \bar{X})^2$
Контроль							
1							
2							
3							
и т.д.							
Опыт							
1							
2							
3							
и т.д.							
Сумма, Σ							
Среднее, \bar{X}							

**Сравнение данных по выживаемости
и частоте мутаций у хлореллы**

Варианты	Количество чашек, n	Число сте- пеней сво- боды, ν	Выживаемость, $W, \%$		Частота мутаций, $M, \%$	
			\bar{X}	t	\bar{X}	t
Контроль						
Опыт						

5.3. Определение генотоксического действия факторов окружающей среды с использованием *Allium* *sepa* в качестве тест-объекта

Одним из широко используемых токсикогенетических методов является анализ хромосомных aberrаций в меристематической ткани проростков корешков *Allium sepa* [4]. *Allium sepa* хорошо изучен генетически, имеет 16 ($2n = 16$) удобных для анализа хромосом. Материал – луковицы можно получать в достаточно большом количестве в любое время года. Метод является хорошо разработанным и информативным. На одном и том же материале можно характеризовать изучаемый фактор среды по трем параметрам:

- мутагенному действию;
- митотоксическому действию;
- судить о причинах нарушения митотического цикла.

5.3.1. Клеточный (митотический) цикл

Клеточный (митотический) цикл – это совокупность взаимосвязанных и хронологически детерминированных событий, происходящих в клетке в период подготовки к делению, а также на протяжении самого митоза (рис. 5.3.1).

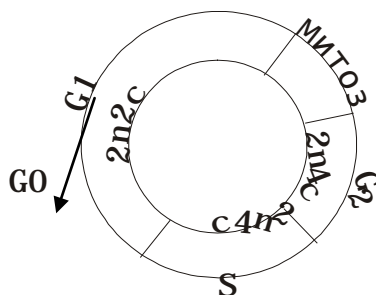


Рис. 5.3.1 Клеточный (митотический цикл)

Таким образом, митотический цикл совпадает со всем периодом существования клетки, то есть с её жизненным циклом. В митотическом цикле выделяют четыре периода: собственно митоз, пресинтетический период, синтетический и постсинтетический. Три последних периода приходятся на интерфазу. Митотический цикл может быть изображен в виде круга, на котором, пропорционально продолжительности, отмечены его периоды от одного митоза до другого (рис. 5.3.2).

Интерфазой называют стадию покоящегося ядра, однако это наиболее активная фаза с точки зрения биохимических процессов. В интерфазной клетке хорошо видно ядро. Оно имеет гомогенную мелкозернистую структуру с нанесенным рисунком хроматина, хорошо видны ядрышки (рис. 5.3.2). В *пресинтетический период* (G_1) в клетке происходит активный синтез белков, обеспечивающих рост клетки, накопление продуктов, необходимых для редупликации ДНК. Этот период наиболее длительный (от 10 часов до нескольких суток). Генетическая характеристика клеток в этот период $2n2c$.

В *синтетический период* (S) проходит редупликация ДНК, наработка гистонов. Продолжительность его 6 – 10 часов. Генетическая характеристика $2n4c$. Хромосомы удваиваются, то есть в каждой хромосоме теперь две молекулы ДНК, упакованные в две хроматиды (рис. 5.3.3).

В *постсинтетический период* (G_2) заканчивается подготовка клетки к делению. Идут подготовительные процессы для формирования ахроматинового веретена, идет накопление энергии, поскольку митоз требует значительных затрат энергии. Генетическая характеристика клеток в этот период $2n4c$.

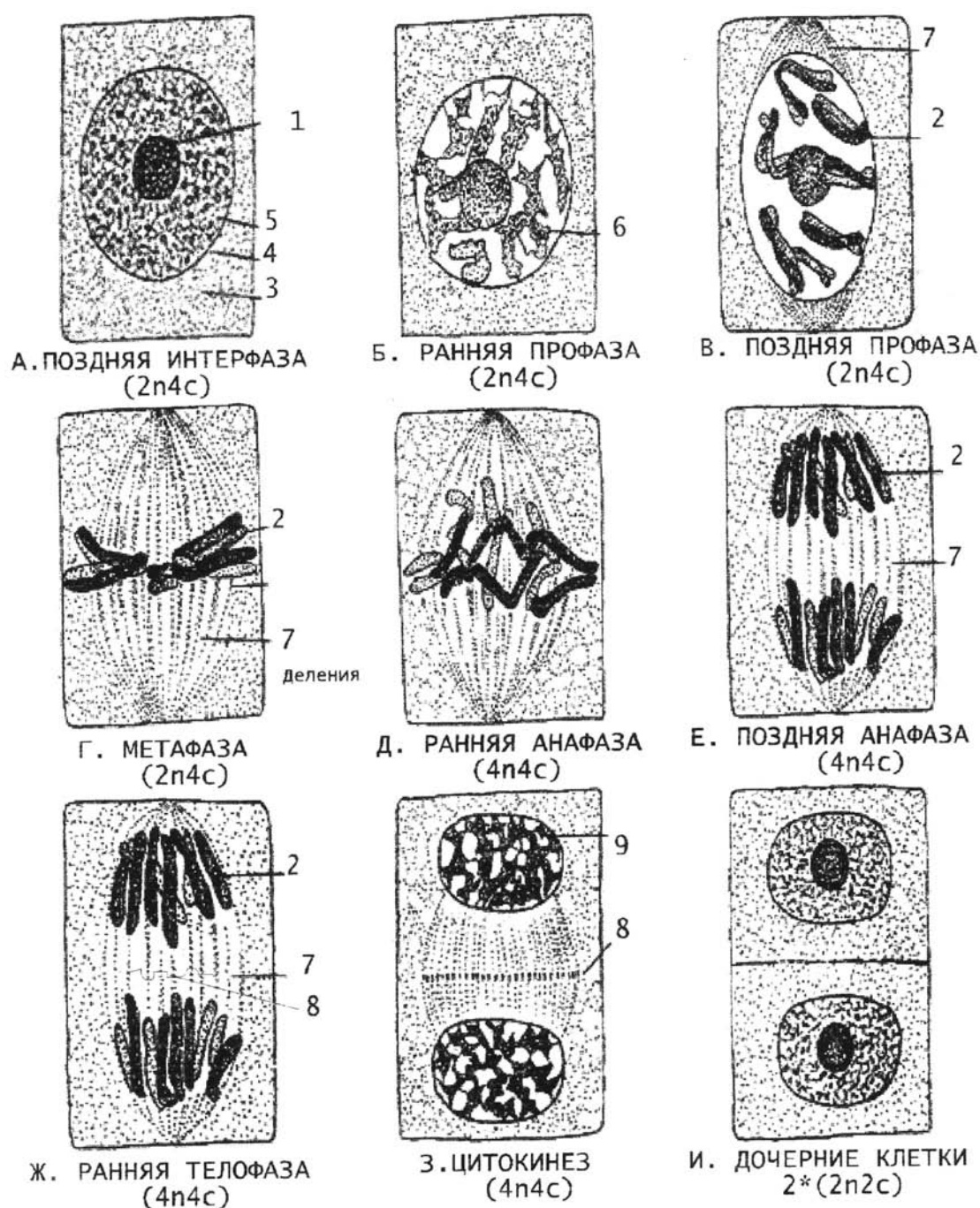


Рис. 5.3.2. Митотическое деление растительной клетки:
 1 – ядро, 2 – хромосомы, 3 – цитоплазма, 4 – кариолемма,
 5 – кариоплазма, 6 – глыбки хромтина, 7 – веретено деления,
 8 – фрагмопласт, 9 – ядра дочерних клеток

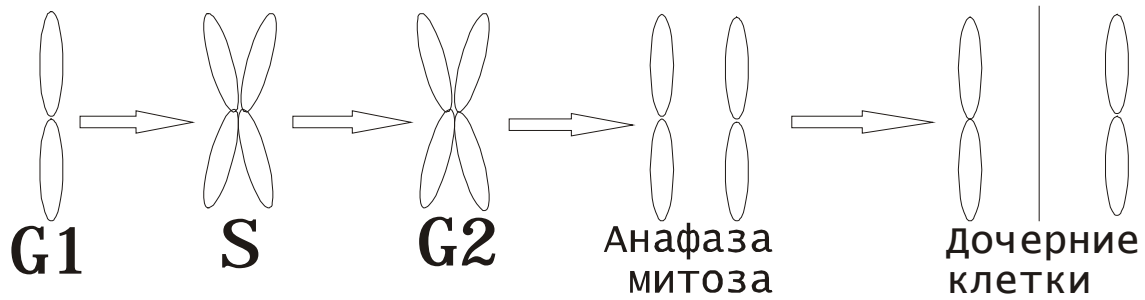


Рис. 5.3.3. Морфология хромосом в течение клеточного цикла

Интерфаза от G_1 и до конца S периода называется *ранней интерфазой*. Её генетическая характеристика $2n2c$. Хромосома в этот период содержит одну молекулу ДНК. От конца S периода и до митоза – *поздняя интерфаза*. Каждая хромосома содержит по две молекулы ДНК, упакованные в две хроматиды. Генетическая характеристика этого периода клеточного цикла $2n4c$.

Далее клетка вступает в митоз. Количество митозов, которое может пройти клетка, генетически детерминировано. Используя определенное количество митозов, клетка может перейти в особую фазу митотического цикла – G_0 или дифференцированное состояние. В клетке могут идти активные метаболические процессы, но в митоз она не вступает. Разные клетки в разное время вступают в G_0 . Например, нервные клетки рано перестают делиться, клетки кожного эпителия длительное время сохраняют способность к делению.

Митоз. Картины различных фаз митоза в настоящее время хорошо изучены.

Профаза. Начало митоза связано с заметным увеличением размеров ядра и появлением в нем хромосомных нитей. Это обусловлено спирализацией и дегидратацией хромосом. За счет многопорядковой спирализации хромосомы и становятся видимыми в световой микроскоп (рис. 5.3.2). Для профазы характерно специфическое поведение клеточного центра. Центриоли удваиваются еще в интерфазу. В профазу удвоенные центриоли начинают отходить друг от друга к противоположным полюсам клетки. Между ними натягиваются полимеризованные белковые нити – образуется ахроматиновое веретено деления (рис. 5.3.2). В конце

профазы видно, что хромосомы представляют собой двойные нити. В конце профазы происходит разрушение ядерной оболочки и исчезновение ядрышек. Генетическая характеристика клетки на стадии профазы $2n4c$.

Метафаза. В период метафазы полностью сформировано веретено деления, хромосомы располагаются в экваториальной плоскости, прикрепляясь центромерами к нитям веретена деления. Плечи же хромосом располагаются перпендикулярно к веретену деления (рис. 5.3.2). Спирализация хромосом достигает в это время максимума, размер их может быть в 25 раз меньше, чем в ранней профазе. Благодаря отчетливой морфологии хромосом именно в метафазу проводят кариотипирование. Генетическая характеристика клетки на стадии метафазы $2n4c$.

Анафаза. Стадия метафазы заканчивается делением центромера, который объединял до этого хроматиды. Этот процесс означает начало анафазы (рис. 5.3.2Д). Центромеры расходятся и хроматиды отделяются друг от друга. Деление происходит одновременно во всех хромосомах. С этого момента сестринские хроматиды называются сестринскими хромосомами. Сестринские хромосомы начинают расходиться к полюсам клетки. Таким образом, количество хромосом в клетке увеличилось в два раза. Генетическая характеристика клетки $4n4n$. К каждому полюсу направляется $2n2c$ генетического материала (рис. 5.3.2).

Телофаза Хромосомы располагаются у полюсов клетки (рис. 5.3.2Ж). Начинается процесс реконструкции ядра. Хромосомы деспирализуются, в области ядрышковых организаторов образуются новые ядрышки. Идет образование клеточной перегородки и образование двух дочерних клеток (рис. 5.3.2). Получившиеся дочерние клетки генетически идентичны друг другу и материнской клетке. Генетическая характеристика каждой клетки $2n2c$ (рис. 5.3.2).

5.3.2. Ход выполнения лабораторной работы

Аппаратура и материалы: чашки Петри, цилиндры мерные (25 мл., 100 мл.), пенициллиновые флаконы, стекла предметные и покровные, бюксы (15, 25, 100 мл.), пипетки мерные (1,0; 2,0; 10,0), пипетки глазные, лупы стереоскопические МБС-9, микро-

скопы, 45%-ная уксусная кислота, этиловый спирт, 2%-ный ацеторсеин.

Порядок проведения работы

1. Подготовка материала.

Для оценки митотоксического и мутагенного действия изучаемого фактора используются луковицы *Allium* сера. Для проведения опытов отбирается выровненный материал: луковицы должны быть типичными для используемого сорта, одинаковыми по размеру. Луковицы помещают в химические стаканчики с очищенной водопроводной водой так, чтобы донце луковиц соприкасалось с водой. Через 2 – 3 дня корешки прорастают. Когда они достигнут длины 1,5 – 2 см, луковицы используют для экспериментов.

2. Обработка корешков изучаемым фактором.

Предварительно пророщенные луковицы переносят в химические стаканчики с раствором изучаемого препарата в различных концентрациях так, чтобы корешки были полностью погружены в раствор. Опыт сопровождается интактным и позитивным контролем. Интактный контроль позволяет определить спонтанный уровень для обоих генотоксических событий в данных условиях опыта. Позитивный контроль позволяет проверить чувствительность тест-системы, насколько она пригодна для регистрации генотоксического эффекта. При интактном контроле луковицы помещаются в стаканчики с очищенной водопроводной водой (той же, которая используется для приготовления растворов препарата в опытном варианте). При позитивном контроле луковицы помещаются в стаканчики, содержащие раствор препарата с известным мутагенным действием. Каждый стаканчик должен сопровождаться этикеткой, на которой указаны: вариант опыта (т.е. контроль или опыт), концентрация препарата, дата и время обработки корешков препаратом.

Время обработки подбирается так, чтобы воздействие продолжалось в течение полного клеточного цикла для данного объекта, то есть в течение трех периодов интерфазы (G_1, S, G_2) и митоза. Для *Allium* сера продолжительность клеточного цикла 14 часов.

Если изучается воздействие на отдельные периоды митотического цикла, исходят из следующих данных: обработка в течение 1 часа позволяет анализировать воздействие на клетки, вошедшие на стадию G₂; через 6 часов – клетки на поздней S стадии; через 9 часов – на ранней S стадии; через 14 часов – клетки на стадии G₁, то есть вышедшие из митоза.

От каждой луковицы отбирается по два корешка длиной 5 – 7 мм каждый, из которых готовятся два микропрепарата.

3. Отмывание препарата:

- слить раствор препарата из стаканчика;
- налить в стаканчик очищенную водопроводную воду, так чтобы корешки были полностью покрыты водой;
- через 1 – 2 минуты воду слить;
- повторить промывку 2-3 раза. Оставить луковицы в стаканчиках с последней порцией воды;
- перенести луковицы в стаканчики с очищенной водопроводной водой.

4. Фиксация материала.

Фиксацию корешков проводят фиксатором Кларка, состоящим из этилового спирта (96%) и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Для фиксации удобно использовать пенициллиновые флаконы. Фиксатор должен превосходить материал по объёму в два раза.

Фиксация корешков:

- приготовить фиксатор (в вытяжном шкафу!);
- разлить фиксатор в пенициллиновые флаконы (по ½ флак она);
- от корешков отрезать лезвием точку роста – участок в 1 см. Пинцетом в каждый флакон перенести корешки и этикетку из стаканчика, в котором проводилась обработка препаратом;
- флаконы поставить в холодильник (3 – 4° С). В этих условиях материал можно сохранять 1 – 2 недели;
- если необходимо сохранять материал дольше, его помещают в 70%-ный этиловый спирт. Сначала материал промывают 70%-ным спиртом 2-3 раза. Для этого выливают фиксатор и вместо него наливают такое же количество 70%-ного спирта. Через 20 – 30 минут спирт заменяют новой порцией. В последней пор-

ции спирта корешки оставляют для хранения в холодильнике (до 1 года).

5. Приготовление цитологических препаратов.

Каждый студент готовит по два препарата корешков: один – контрольного, другой – опытного варианта. Исследование проводят на давленных препаратах кончиков корешков, окрашенных 2%-ным ацетоорсеином.

Окраска корешков и приготовление давленных препаратов:

- корешки отмывают от фиксатора в очищенной водопроводной воде, а затем в дистиллированной;

- окраска корешков. Корешки пинцетом переносят в фарфоровый тигель с красителем (2%-ный раствор орсеина в 45%-ной уксусной кислоте) и тигель нагревают, проводя 3 – 4 раза над пламенем горелки до появления паров (*не доводя до кипения!*). Тигель оставляют на столе на 5 – 10 минут. Затем раствор сливают и наливают чистый раствор ацетоорсеина. Корешки ещё остаются в растворе от 30 минут до суток. Время подбирается в зависимости от материала и качества красителя;

- корешки отмывают от красителя в 45%-ной уксусной кислоте 10 – 15 минут;

- готовят давленные препараты корневых меристем. Корешок извлекают из уксусной кислоты и помещают на предметное стекло. Лезвием отрезают кончик корешка длиной 2 – 3 мм. На стекло капают каплю 45%-ной уксусной кислоты и накрывают корешок покровным стеклом. Далее, придерживая покровное стекло, аккуратно раздавливают корешок спичкой до получения монослоя клеток.

6. Анализ препаратов.

Препараты анализируют под микроскопом. Для этого при малом увеличении находят участок, где расположены мелкие почти квадратной формы клетки. Это молодые, активно делящиеся клетки. Сначала следует найти и внимательно рассмотреть клетки в интерфазе, профазе, метафазе и телофазе. После того как просмотрели и вспомнили морфологические картины различных фаз митоза, приступают к определению митотического и фазных индексов.

Для этого рассматривают весь участок, где есть делящиеся клетки последовательно на соседних полях зрения. Чтобы не

учесть дважды один и тот же участок, рассматривают препарат, передвигая справа налево, затем следующий ряд слева направо. Анализируют 600 клеток с хорошо прокрашенными ядрами, неповрежденными клеточными стенками. Подсчитывают общее количество проанализированных клеток, а так же число делящихся клеток отдельно по стадиям митоза: в профазе, метафазе, анафазе, телофазе.

Каждый студент составляет таблицу 5.3.1, в которую заносит все полученные им данные.

Таблица 5.3.1

**Определение митотического индекса
в меристеме корешка *Allium cepa****

Поле зрения	Количество клеток в стадии				
	интерфа- зы	профазы	метафазы	анафазы	телофазы
1					
2					
3					
4 и т. д.					
Σ клеток в каждой фазе					
Сумма делящихся клеток (П+М+А+Т)					

* Заполняется каждым студентом.

5.3.3. Определение митотоксической активности тканей

Показателем уровня митотической активности тканей является митотический индекс (MI, %). Митотический индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате изучаемой ткани. Индекс может говорить о нормальном протекании митоза, об угнетении процесса деления клеток или, напротив, усилении митотической активности тканей. На основании этого делается заключение о митотоксическом или митозстимулирующем действии изучаемого фактора. Определяется MI, % по формуле:

$$MI, \% = \frac{(П + М + А + Т)}{N} \times 100,$$

где (П+М+А+Т) – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно.

Рассчитайте значения митотического индекса в контрольном и опытном вариантах и занесите данные в таблицу 5.3.2.

Таблица 5.3.2

Сводная таблица учета митотического и фазных индексов в меристеме проростков корешков *Allium cepa**

№ повторности (к-решка)	Всего клеток	Сумма делящихся клеток	MI, % $X_i - \bar{X} \quad (X_i - \bar{X})^2$	Число клеток в профазе	ПИ, %	Число клеток в метафазе	МИ, %	Число клеток в ана-телофазе	А-ТИ, %
Контроль									
1									
2									
3									
4									
5 и т.д.									
Сумма, Σ									
Среднее, \bar{X}									
m									
v									
Опыт									
1									
2									
3									
4									
5 и т.д.									
Сумма, Σ									
Среднее \bar{X}									
m									
v									

* Вносятся данные всей группы.

5.3.4. Статистическая обработка результатов

Поскольку работа проводится как индивидуальное и групповое исследование, обработке и анализу подвергаются данные, полученные всеми студентами группы. На основании всех таблиц, составленных группой, составляется общая таблица, куда заносятся данные всех студентов.

Статистическая обработка результатов проводится аналогично таковой при использовании хлореллы в качестве тест-объекта.

Рассчитайте значение $\bar{X} \pm m$ для митотического индекса в контрольном опытном вариантах. Определите достоверность разницы между контрольным и опытным вариантом с использованием t-критерия Стьюдента.

Сделайте вывод о митотоксическом действии изучаемого фактора на основе статистически обработанных результатов опыта.

Представьте в виде диаграммы полученные результаты (рис. 5.3.4).

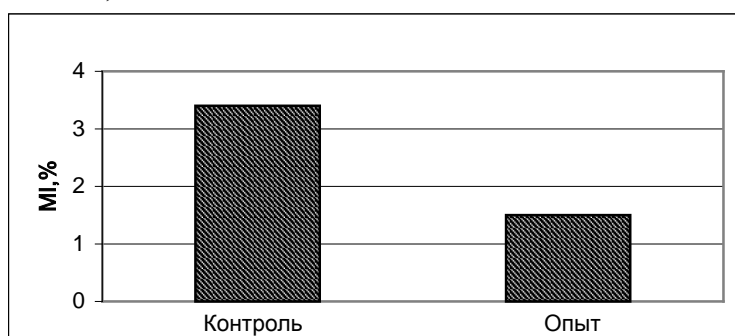


Рис. 5.3.4. Митотический индекс в меристеме проростков корешков Allium cepa

Определение относительной длительности фаз митоза

Если значение митотического индекса в опытном варианте ниже, чем в контрольном, делается заключение о митотоксическом действии фактора. Если значение митотического индекса в опытном варианте превышает контрольное, то однозначного вывода сделать нельзя.

Увеличение MI может быть обусловлено как усилением пролиферации клеток, так и изменением продолжительности различных фаз, то есть задержкой клеток на определенных фазах мито-

за. Вскрыть причины изменения МІ можно, анализируя продолжительность фазных индексов.

Фазные индексы позволяют судить об относительной длительности каждой фазы митоза. Определяют относительные длительности фаз митоза по следующей формуле:

$$\text{ПИ, \%} = \frac{\text{П}}{\text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}} \times 100 ,$$

$$\text{МИ, \%} = \frac{\text{М}}{\text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}} \times 100 ,$$

где П, М – количество клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы и т.д.

Рассчитайте фазные индексы для опытного и контрольного корешков. Данные занесите в таблицу 5.3.2. *Рассчитайте* средние значения для величин фазных индексов (ПИ, МИ, АИ, ТИ) контрольного и опытного вариантов. Представьте полученные данные графически (рис. 5.3.5). Проведите сравнение относительной длительности разных фаз митоза в контроле и опыте.

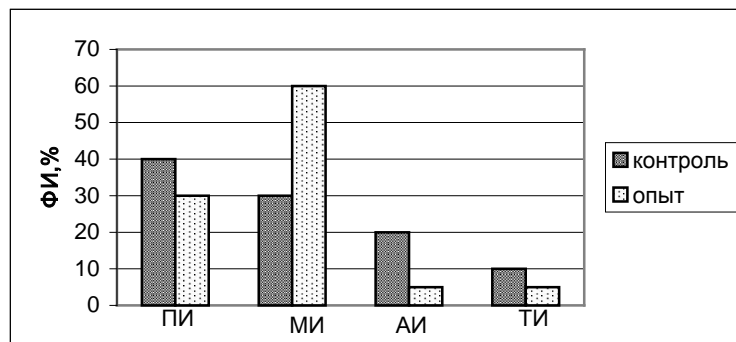


Рис. 5.3.5. Соотношение фазных индексов

На основании этого сравнения можно сделать предположение о характере действия изучаемого фактора на митоз.

Например, если в опытном варианте отмечено увеличение МІ, при этом значение АИ и ТИ снижено, а значение МИ увеличено. Такая ситуация в ткани может быть вызвана действием анализируемого фактора на веретено деления в меристематических

клетках. В этом случае расхождение хромосом к полюсам, обеспечиваемое ахроматиновым веретеном, происходить не будет. Клетка не может пройти из метафазы в анафазу, следствием этого могут быть геномные мутации. Если снижен ПИ, можно предположить, что данный фактор влияет на процессы, происходящие в интерфазу при подготовке клеток к делению. Увеличение ПИ по сравнению с контролем свидетельствует о том, что затруднено прохождение клетками стадии профазы, что может быть вызвано нарушением надмолекулярной структуры хромосом. Таким образом, определение МІ позволяет регистрировать митотоксическое действие вещества, а расчеты ФИ помогают выявить механизм этого действия.

5.4 Определение мутагенного действия факторов окружающей среды с использованием *Allium* сера в качестве тест-объекта

Изучение митотически делящихся тканей позволяет оценивать мутагенное действие факторов окружающей среды окружающей среды по способности вызывать хромосомные перестройки (абerrации).

Абerrации хромосом (ХА), то есть изменения структуры хромосом, изучаются на стадии метафазы (метафазный метод) и на стадии ана-телофазы (анателофазный метод). Эти методы позволяют выявлять мутагенную активность того или иного фактора, оценить степень мутагенной активности фактора, силу воздействия разных его доз, определять минимальную действующую дозу, определять зависимость доза-эффект.

Наиболее точным является метафазный метод, так как он регистрирует большее количество типов абerrаций, определяет тип перестройки и в какой именно хромосоме она произошла. Но этот метод пригоден только для объектов, для которых уже идентифицированы все хромосомы, определен кариотип. Метафазный анализ более сложный и требует высокой квалификации исследователя. Этот метод используется, например, для диагностики хромосомных болезней человека.

Ана-телофазный анализ более простой, экономичный, не требует знания кариотипа и идентификации типов повреждения хромосом. Он позволяет выявить меньше типов аберраций, но его чувствительность вполне достаточна для заключения «мутагенен» или «немутагенен» фактор. Ана-телофазный анализ является достаточно чувствительным, корректным и удобным на первом экотоксикогенетического исследования.

5.4.1. Типы хромосомных аберраций, выявляемые ана-телофазным методом

Структурные изменения хромосом связаны с разрывом и воссоединением частей хромосом.

Структурные изменения отличаются друг от друга в зависимости от того, на какой стадии митотического цикла произошло нарушение. Если нарушение прошло на стадии G_1 , то есть до редупликации хромосом, наблюдаются *хромосомные разрывы*. Если хромосома уже редуплицирована и имеет две хроматиды (стадия S или G_2), происходят *хроматидные разрывы*.

Ана-телофазный метод позволяет выявлять следующие типы структурных перестроек хромосом (рис. 5.4.1).

Делеция – потеря участка хромосомы, возникновение центрических (с центромерой) и ацентрических (без центромеры) фрагментов.

Концевая делеция – потеря концевого участка хромосомы. В случае хромосомной делеции наблюдаются два фрагмента, лежащие параллельно друг другу, в случае хроматидной делеции имеется одиночный фрагмент. Если имеется изохроматидная делеция, т.е. повреждены концы обеих хроматид, то пару хроматидных фрагментов трудно отличить от двойных хромосомных фрагментов.

Интерстициальная делеция – потеря внутреннего участка хромосомы. При потере внутреннего участка одного плеча (парацентрическая делеция) образуются кольцевые ацентрические фрагменты и микрофрагменты. При перицентрической делеции, включающей центромерный район, образуется центрическое кольцо. В случае хромосомной делеции такое кольцо будет двойным с расположенными рядом двумя фрагментами, в случае хро-

матидной делеции – одиночное кольцо с одиночными фрагментами.

Внутрихромосомные обмены	Норма	Терминальная делеция	Интерстициальная делеция	Центрическое кольцо и фрагмент	Ацентрическое кольцо	Перицентрическая инверсия
Межхромосомные обмены	Норма	Дицентрик и фрагмент			Симметричный межхромосомный обмен	

Рис. 5.4.1. Типы хромосомных aberrаций (схема)

Транслокация – обмен участками между двумя хромосомами. *Симметричная транслокация* – обмен ацентрическими участками одинаковой или разной длины. При анафазном анализе такие перестройки не обнаруживаются. *При асимметричном обмене*, когда происходит соединение центрических фрагментов, образуется дицентрик, то есть хромосома с двумя центромерами, и в анафазе наблюдаются мосты и фрагменты. В случае хромосомных асимметричных обменов возникают двойные мосты, перекрещенные или параллельные, лежащие близко друг к другу. При образовании хроматидных дицентриков наблюдаются одиночные мосты.

Кроме фрагментов и мостов могут встречаться следующие нарушения.

Слипания хромосом, связанные с изменением консистенции хромосом.

Многополюсные митозы возникают в результате нарушения веретена деления.

Отставания хромосом возникают при нарушении поведения хромосом на веретене деления и могут быть обусловлены нарушениями как в самой хромосоме, так и в ахроматиновом веретене.

5.4.2. Определение мутагенного эффекта химического соединения

Мутагенное действие вещества оценивается по частоте индуцированных веществом хромосомных aberrаций (ХА).

Хромосомные aberrации в митозе можно регистрировать на стадии метафазы, анафазы и телофазы.

В данной работе применяется ана-телофазный метод анализа хромосомных аномалий. Он не требует специальных навыков, длительного времени, более тонкого и детального определения изменений в строении хромосом. Вместе с тем метод является достаточно чувствительным при выявлении генотоксикантов. Он не позволяет выявить все типы хромосомных перестроек, однако позволяет определить, способен ли анализирующий фактор повреждать хромосомы, т.е. является ли мутагеном или нет.

Наиболее типичные картины хромосомных перестроек, выявляемые в ана-телофазе, представлены на рисунке 5.4.2.

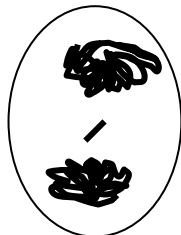

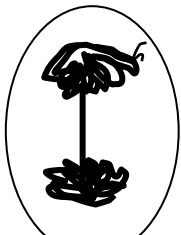
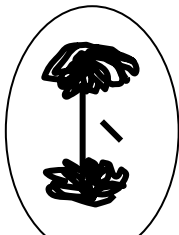

Ход выполнения лабораторной работы

Анализ хромосомных aberrаций проводится на тех же препаратах, что и при определении митотоксического действия фактора. Каждый студент анализирует так же по два препарата. Первый – давленный препарат кончика корешка лука (контрольный вариант), второй – давленный препарат кончика корешка лука, обработанного изучаемым фактором.

1. Анализ препаратов.

При большом увеличении микроскопа ($12,5 \times 1,5 \times 40$) просматривается весь препарат последовательно на соседних полях

зрения. Чтобы не учесть дважды один участок, просматривают препарат, передвигая его справа налево, затем следующий ряд слева направо, и т.д. Учитывают ана-телофазы на всем препарате. При этом учитываются только те клетки, в которых расстояние между анафазными (телофазными) группами больше ширины одной анафазной (телофазной) группы. Телофазные клетки, в которых наблюдается начало образования фрагмопласта, не учитываются. Анализ перестроек не проводится при наложении клеток и при нарушении целостности оболочки клетки.

Одиночный фрагмент	Парные фрагменты	Мост	Мост + фрагмент	Мост + двойной фрагмент
				


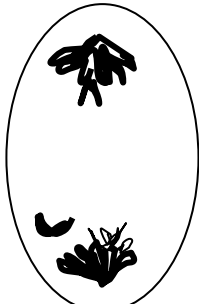
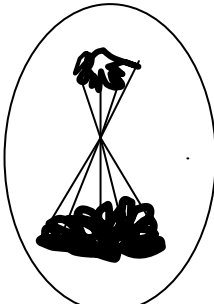
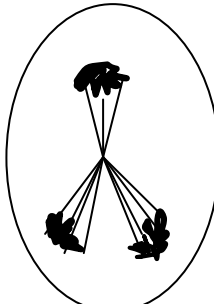
Трехгрупповая метафаза	Отставание хромосом	Асимметричный митоз	Трехполюсный митоз
			

Рис. 5.4.2. Картины хромосомных aberrаций на стадии ана-телофазы

Клетки, в которых не удастся определить тип aberrации, относят к классу «с неразобранными aberrациями».

Каждый студент составляет таблицу 5.4.1, в которую заносит все полученные им данные.

**Учет хромосомных aberrаций
в меристеме проростков корешков *Allium cepa****

Поле зрения	Кол-во ана-телофаз в поле зрения	Ана-телофазы с хромосомными aberrациями						
		мосты	фрагменты	отставания	трех-полюсные митозы	трех-групповые метафазы	асимметричные митозы	Неразобранные нарушения
1								
2								
3								
4								
и т. д.								
Σ клеток								

* Заполняется каждым студентом.

2. Определение частоты хромосомных aberrаций.

Показателем мутагенной активности изучаемого фактора является частота хромосомных aberrаций (ХА, %). Частота хромосомных aberrаций показывает отношение числа клеток с хромосомными aberrациями к общему числу клеток, находящихся на стадиях ана- и телофазы, и рассчитывается по формуле:

$$\text{ХА, \%} = \frac{n}{(A + T)} \times 100,$$

где n – количество aberrантных ана- и телофаз,

(A+T) – общее количество ана-телофаз на препарате

Рассчитайте частоту ХА в контрольном и опытном вариантах.

Поскольку работа проводится как индивидуальное и групповое исследование, обработке и анализу подвергаются данные, полученные всеми студентами группы. На основании таблиц 5.4.1, составленных каждым студентом, группой составляется интегральная таблица 5.4.2, куда заносятся данные всех студентов. Эти интегральные данные подвергаются статистической обработке. Обработку проводят по формулам для малых выборок.

Определите для частоты мутаций среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку средней (m) и достоверность разницы между частотой мутаций в контрольном и опытном варианте (td). Вся обработка данных проводится аналогично таковой при оценке митотоксического действия фактора (см. Работа 1. Статистическая обработка результатов).

Сделайте вывод на основе статистически обработанных результатов опыта о наличии мутагенного действия изучаемого фактора. Полученные результаты представьте в виде диаграммы (рис. 5.4.3).

Для характеристики мутагенного действия изучаемого фактора проводится анализ спектра aberrаций (рис. 5.4.4). Подсчитывается доля aberrаций определенного типа от общего числа всех aberrаций. Проводится сравнение спектра спонтанных aberrаций (контрольный вариант) и спектра aberrаций, индуцированных изучаемым фактором.

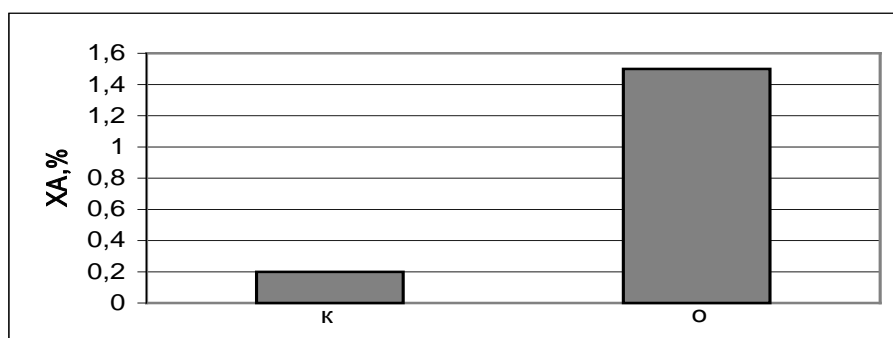


Рис. 5.4.3. Частота хромосомных aberrаций в меристеме проростков корешков *Allium cepa*

Представить на диаграмме соотношение типов хромосомных aberrаций в контрольном и опытном варианте. Проанализировать диаграмму, проведя сравнение спектра и частоты разных типов хромосомных aberrаций.

Анализ типов хромосомных перестроек позволяет делать заключение о характере действия препарата. Так, появление фрагментов и мостов свидетельствует о том, что препарат способен вызывать разрывы в ДНК, приводящие к нерцепинокным транслокациям и делециям. В случае, когда требуется более детальный анализ типов возникающих ХА, следующим этапом работы дол-

жен быть более трудоемкий метафазный анализ. Однако для общей оценки мутагенности факторов среды и для генетического мониторинга за состоянием окружающей среды вполне достаточно ана-телофазный анализ.

Если при анализе митоза не будет выявлено мутагенного эффекта, изучаемый фактор нельзя считать полностью генетически безопасным. Необходимо дальнейшее исследование его на способность индуцировать другие генетические изменения: точковые мутации, кроссинговер и т.д. Наличие значительных нарушений в митозе достаточно для того, чтобы ставить вопрос о замене данного вещества на безопасный аналог или поиск безопасных путей применения данного фактора.

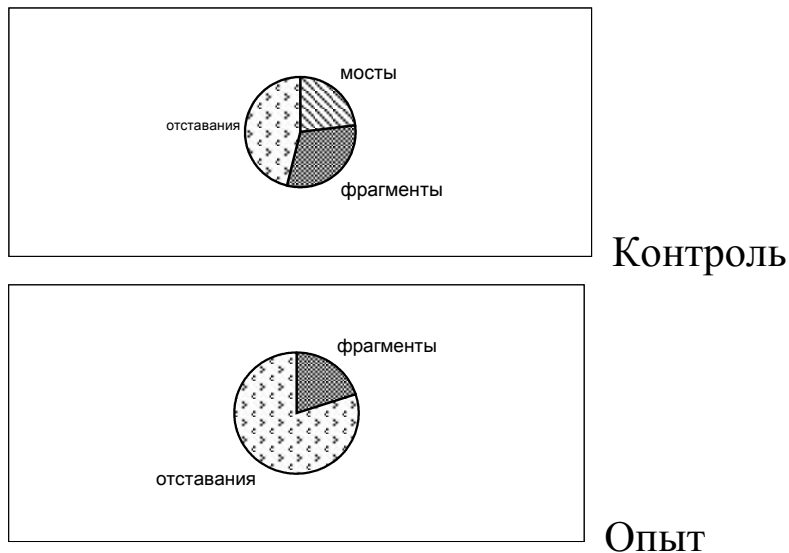


Рис. 5.4.4. Соотношение типов хромосомных aberrаций

5.5. *Drosophila melanogaster* как тест-объект для оценки генотоксичности факторов окружающей среды

Плодовая мушка дрозофила является одним из самых распространенных объектов, используемых для выявления генотоксического действия различных факторов. Ее удобство для таких исследований обусловлено следующими особенностями:

– непродолжительный цикл развития (10 суток от момента откладки яиц до вылета имаго);

- высокая плодовитость (200 – 250 яиц от одной самки);
- у дрозофилы изучено большое число генов, определяющих легкоразличимые признаки;
- фенотип дрозофилы хорошо изучен (описано более 200 признаков), что позволяет регистрировать даже незначительные изменения признаков, например, изменение направления жилок на крыльях или числа щетинок;
- дрозофила легко разводится в лабораторных условиях на простых, недорогих питательных средах;
- малое количество хромосом в кариотипе ($2n = 8$);
- у дрозофилы описаны практически все виды мутаций: различные типы генных, хромосомных и геномных;
- у дрозофилы можно вести учет как генеративных, так и соматических мутаций и таким образом сравнивать закономерности мутирования как половых, так и соматических клеток;
- дрозофила обладает микросомальной ферментной системой сходной с таковой в печени млекопитающих и человека. Поэтому дрозофила может использоваться для выявления и мутагенов и промутагенов.

Но дрозофила как тест-объект токсикогенетики имеет и ряд недостатков:

- относительно низкая чувствительность (по сравнению, например, с бактериями);
- далеко отстоит от человека на родословном древе, а следовательно, полученные результаты можно переносить на человека с большой осторожностью.

5.5.1. Жизненный цикл дрозофилы

Dr. melanogaster относится к насекомым с полным превращением. Оплодотворенные самки откладывают на поверхность корма яйца. Яйцо – около 0,5 мм в длину. На спинной стороне яйца (соответствующем спинной стороне будущего зародыша) имеются два отростка (филаменты) которые не позволяют яйцу погружаться в жидкую среду. На переднем конце яйца расположено отверстие (микропиле). Через него проникает сперматозоид. В нормальных условиях (при температуре +25° С) эмбриональное развитие протекает 20 – 24 часа (рис. 5.5.1).

Вышедшая из яйца червеобразная личинка (1-го возраста) усиленно питается, проедавая в корме ходы и погружаясь в него. Вся личиночная стадия продолжается 4 – 5 суток. В процессе развития личинки претерпевают две линьки. Перед окукливанием они выползают на стенки стаканчика с кормом, перестают питаться, затем и двигаться. Происходит окукливание. Куколка имеет характерную боченкообразную форму и покоится на месте прикрепления до выхода мух.

На стадии куколки происходит перестройка органов дрозофилы. Все личиночные органы (кроме нервной системы и половых желез) резорбируются и заменяются имагинальными развивающимися из имагинальных дисков. Стадия куколки продолжается примерно 4 дня.

Таким образом, в оптимальных условиях весь цикл развития проходит 10 дней. Следует отметить, что с изменением условий среды развитие может сильно затянуться или сократиться. При снижении температуры на 1°C цикл удлиняется примерно на 1 день. При температуре 16°C оно составляет 26 суток, при температуре 28 – 31°C – 8 суток. Медленнее развиваются дрозофилы при высокой плотности культуры (саморегуляция плотности популяции).

В течение 8 – 10 часов после выхода из куколки самки остаются девственными, виргинными. Для проведения экспериментов по скрещиванию следует брать именно виргинных самок. Для этого их отсаживают от самцов не позже чем через 8 часов после вылета имаго.

5.5.2. Методы культивирования дрозофилы

Для разведения дрозофилы можно использовать лабораторные линии или взять несколько пар мух из природной популяции летом. Последние не очень подходят для генетических анализов, но вполне подходят для изучения жизненного цикла, строения насекомых.

Для культивирования дрозофилы используют стаканчики высотой 8 – 10 см и диаметром 2 – 3 см. Посуда стерилизуется кипячением или протирается спиртом. Стаканчики с культурой закрываются стерильным ватным тампоном.

Состав среды: на 700 мл воды – 25 г манки, 8 г агара, 75 г пекарских дрожжей. В среду можно добавить перетертый банан

или изюм. Среду варят 20 минут. Остужают и разливают по стаканчикам осторожно, так чтобы не испачкать стенки, так как на подтеки мухи отложат яйца, которые потом погибнут. Высота каши 1,5 – 2 см. На поверхность застывшей каши наносят капельку дрожжевого молочка (раствор дрожжей на кипяченой воде) – оно необходимо для питания мух и их личинок. Требуется следить за влажностью в стаканчике. Если становится очень влажно (разжижается среда, появляется конденсат), нужно стенки протереть или поместить в стаканчик трубочку из фильтровальной бумаги. Рассматривать и подсчитывать можно только наркотизированных мух. Для усыпления мух используется эфир для наркоза. Для наркотизации пробирку или стаканчик с находящимися в них дрозофилами осторожно постукивают дном о ладонь или о положенный на стол кусок пенопласта (чтобы не разбить пробирку). Когда мухи упадут на дно, ватную пробку быстро вынимают, на края сосуда с мухами надвигают край эфиризатора (морилки). Затем пробирку с мухами и эфиризатор переворачивают, так чтобы сосуд с мухами находился наверху. Постукивая по дну эфиризатора, перекидывают в него всех дрозофил. Морилку быстро закрывают пробкой и ждут, пока уснут все мухи (не передерживать, иначе мухи погибнут). Далее мух высыпают на керамическую плитку и анализируют. Мухи могут находиться в стадии наркоза до 5 минут. Если дрозофилы проснутся раньше, чем закончен анализ – мух можно закрыть половинкой чашки Петри, положив под нее кусочек смоченной эфиром ваты.

При переносе спящих мух на питательную среду стаканчик положить горизонтально. Иначе мухи крылышками прилипнут к среде и, когда проснутся, не смогут подняться и погибнут.

5.5.3. Методы оценки мутагенов с использованием *Drosophila melanogaster*

Цель работы: освоить методы оценки генотоксического эффектов факторов среды с использованием дрозофилы.

Оборудование занятия: микроскопы МБС-1 и МБИ-1, чашки Петри, препаровальные иглы, эфир для наркоза, вата. Пробирки с питательной средой для дрозофилы, термостат.

Раздаточный материал: генетическая коллекция линий дрозофилы (мутантные и дикие линии дрозофилы, линия М-5).

Работа 1.

Половой диморфизм у *Drosophila melanogaster*

Цель: ознакомиться с явлением полового диморфизма у дрозофилы, научиться отличать самцов и самок для постановки скрещиваний.

Отличия самцов и самок у *Drosophila melanogaster* (рис. 5.5.2):

- 1) самки имеют более крупные размеры тела, в частности брюшка, по сравнению с самцами;
- 2) конец брюшка у самок заострен. На брюшке хорошо видно чередование темных (пигментированных) и светлых (непигментированных) участков. У самцов последние членики брюшка срастаются, поэтому конец брюшка полностью черный, имеет вид оплавленной шелковой нити»;
- 3) половые органы самца пигментированы, половые органы самок светлые;
- 4) у самцов на первом членике лапки передней пары конечностей находится половой гребешок. Под микроскопом он имеет вид гребешка, под биноклем выглядит как черное пятно.

Рассмотрите под микроскопом МБС наркотизированных мух различных линий дрозофилы. Отметьте, какие признаки затронуты мутацией. Запишите названия линий и характерные признаки мух каждой мутантной линии.

Работа 2.

Мутации у *Drosophila melanogaster*

Цель: Ознакомиться с различными линиями дрозофилы.

Рассмотрите под микроскопом МБС наркотизированных мух различных линий дрозофилы. Отметьте, какие признаки затронуты мутацией. Запишите названия линий и характерные признаки мух каждой мутантной линии (рис. 5.5.3).

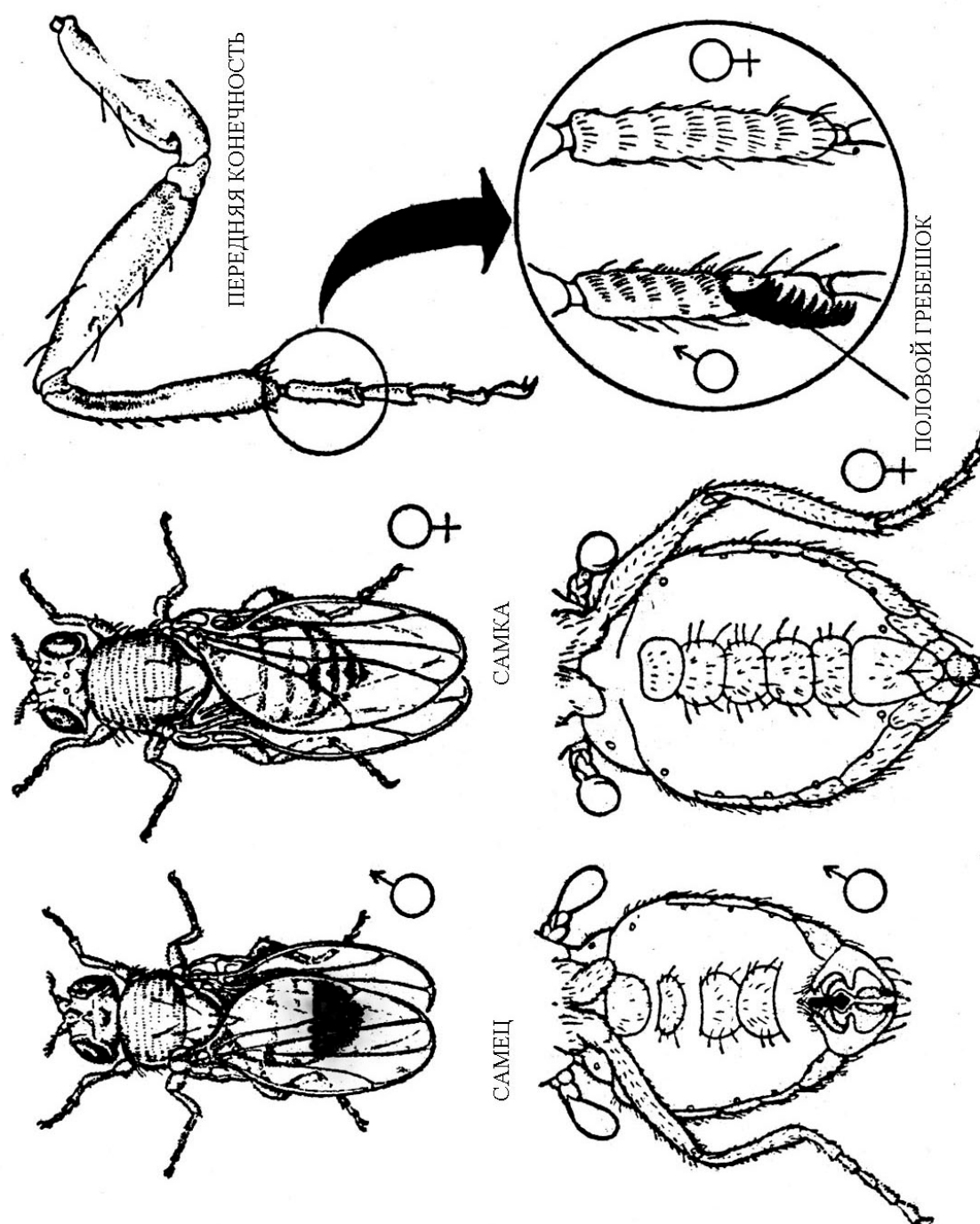


Рис. 5.5.2. Половой диморфизм у *Drosophila melanogaster*

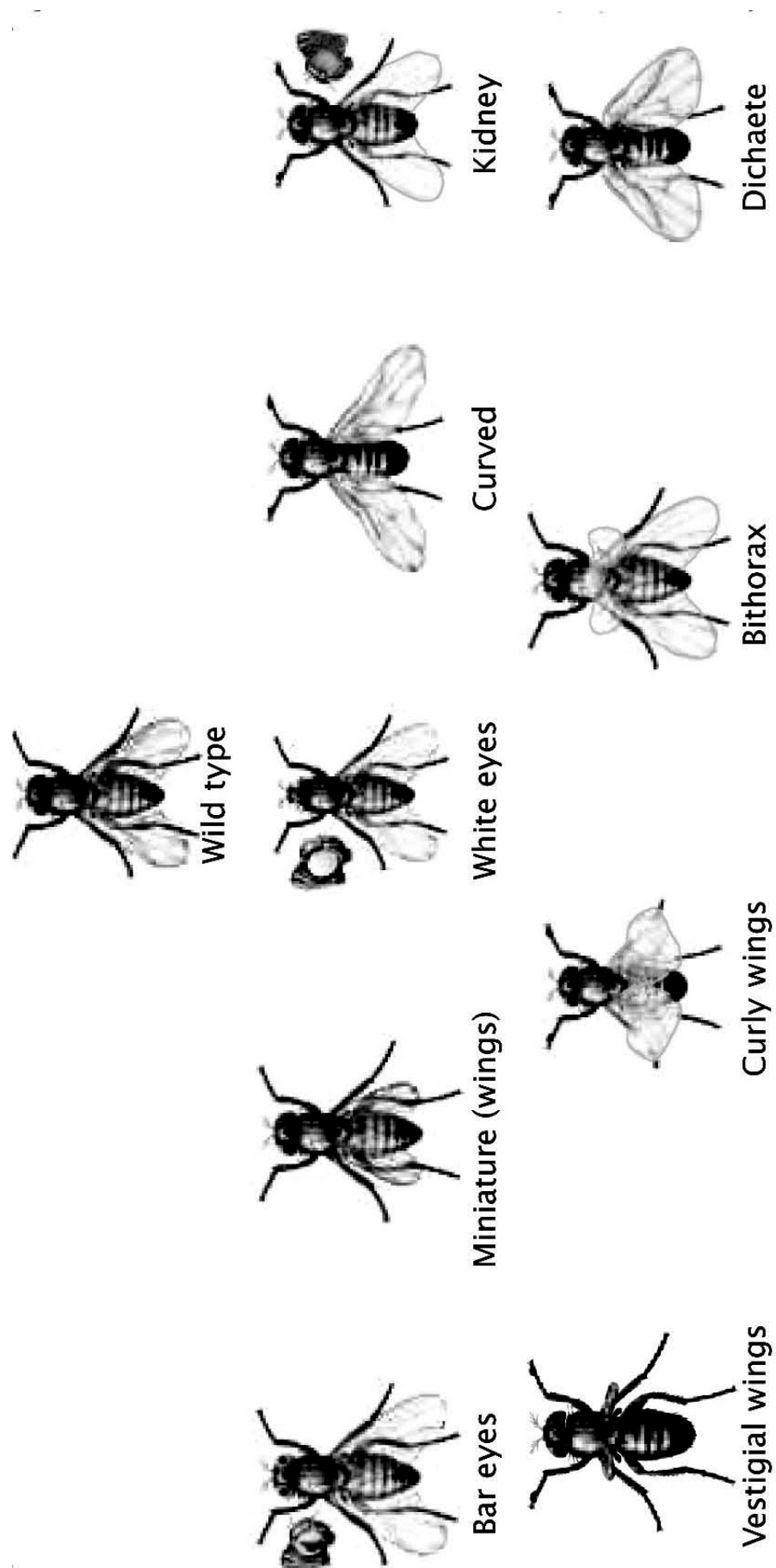


Рис. 5.5.3. *Mymayuu* y *Drosophila melanogaster*

Работа 3.

Учет доминантных летальных мутаций (ДЛМ)

ДЛМ обусловлены изменением наследственности в половых клетках родителей, приводящих к гибели потомков в F_1 , в основном во время эмбрионального периода. Но они могут проявляться на любых стадиях онтогенеза – от яйца до имаго. Предлагаемый метод позволяет учитывать ДЛМ, проявляющиеся рано в онтогенезе – на стадии яйца: учитываются яйца, из которых не вышли личинки.

Метод учета частоты ДЛМ один из самых простых и экономичных методов выявления генотоксического эффекта, как индивидуальных загрязнителей, так и суммарной мутагенной активности (СМА) природных сред.

Для учета частоты ДЛМ можно использовать любую линию дрозофилы дикого типа (например, Д-32 или Canton S).

Ход выполнения работы

1. Воздействию изучаемого фактора подвергают 3-дневных самцов (это возраст максимальной половой активности). Изучаемые факторы могут быть физической, химической или биологической природы и представлены в твердом виде, растворах или газовой фазе. Метод удобен для оценки СМА природных сред – воды, воздуха, почвы.

2. Подопытных самцов затем скрещивают с виргинными самками. Для этого самцов и самок помещают на 12 часов в колбу с кормом.

3. Параллельно с опытом ставят контрольный вариант, используя 3-дневных самцов той же линии.

4. Через 12 часов в колбу помещают пластинку, покрытую слоем питательного агар. Оплодотворенные самки откладывают яйца на поверхность корма в течение суток.

5. Через сутки пластики просматривают под биноклем и подсчитывают число отложенных яиц. Затем пластинки помещают в чашки Петри. В чашку рядом с пластинкой помещают кусо-

чек ваты, смоченный дистиллированной водой (чтобы корм не подсыхал).

6. Через 48 часов под МБС подсчитывают число яиц с невылупившимися личинками. Их легко отличить от яиц, из которых личинки вылупились, – пустые оболочки повисают на препаровальной игле, если их подцепить и приподнять.

7. Подсчитывают частоту ДЛМ ($D, \%$) по формуле:

$$D, \% = \frac{n}{N} 100,$$

где N – число отложенных яиц,

n – число яиц, из которых не вылупились личинки.

8. Статистическую обработку полученных данных проводят, объединив данные, полученные всеми студентами группы. Рассчитывают $\bar{X} \pm m$, а также определяют достоверность разности между значениями ДЛМ в опытном и контрольном варианте. Данные по частоте ДЛМ в контрольном и опытном варианте представьте графически.

Работа 4.

Метод учета рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у *Drosophila melanogaster*

Метод разработан основоположником радиационной генетики Г. Меллером (1927). Меллер синтезировал линию-анализатор СЕВ, позволявшую регистрировать у дрозофилы данный тип мутаций. Для этих целей позднее стали использовать другую, также созданную Меллером линию-анализатор, называемую в мировой литературе Meller-5 (синоним М-5, Vasc). Самцы и самки этой линии несут X-хромосому, маркированную генами *scute* (*sc*), *white-apricot* (w^a) и *Bar* (*B*). Кроме того, эта хромосома содержит две инверсии: одну большую, затрагивающую большую часть X-хромосомы, а в ней, между генами *B* и w^a , еще одну маленькую инверсию (*InS*). Поскольку инверсии являются «запирателями кроссинговера», мутация, возникшая в X-хромосоме, не мо-

жет оказаться в гомологичной хромосоме в результате рекомбинации; т.е. все гены в хромосоме будут сохраняться. Таким образом, генотипы мух будут следующими:

$$\begin{array}{cc}
 \text{♀} & \begin{array}{c} \text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8 \\ \hline \hline \text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8 \end{array} & \text{♂} & \begin{array}{c} \text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8 \\ \hline \hline \text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8 \end{array}
 \end{array}$$

По фенотипу мухи имеют полосковидные глаза абрикосового цвета (фенотип Meller-5). Мутации, возникающие в эксперименте, при изучении мутагенности кого-либо фактора, могут быть зарегистрированы у самцов линии дикого типа. Мутации при этом могут возникать различные, но метод позволяет обнаружить только один тип: рецессивные, сцепленные с полом летальные мутации (РСПЛМ). Поэтому метод называют методом Meller-5 или методом РСПЛМ.

При оценке мутагенного действия какого-либо фактора этим фактором воздействуют на самцов дикого типа. Если фактор является мутагенным, то в половых клетках самцов возникают мутации, в том числе и типа РСПЛМ. Так как мутации рецессивны, то обнаружить их можно только у потомства, когда они окажутся в гомозиготном (у самок) или гемизиготном (у самцов) состоянии.

Рассмотрим два варианта:

1. Вещество не мутаген, следовательно, в X-хромосоме не возникло мутаций.

$$\begin{array}{lcl}
 \text{P:} & \begin{array}{c} \text{♀} \quad \frac{\text{B w}^{\text{a}}}{\text{B w}^{\text{a}}} \end{array} & \times \quad \begin{array}{c} \text{♂} \quad \frac{++}{\text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8} \end{array} \\
 \\
 \text{Гаметы:} & \begin{array}{l} 1) \text{ B w}^{\text{a}} \\ 2) \text{ B w}^{\text{a}} \end{array} & \begin{array}{l} 1) ++ \\ 2) \text{ sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8 \end{array} \\
 \\
 \text{F}_1: & \begin{array}{c} \frac{\text{B w}^{\text{a}}}{++} \end{array} & \begin{array}{c} \frac{\text{B w}^{\text{a}}}{\text{sc}^{\text{sl}} \text{ B InS w}^{\text{a}} \text{ sc}^8} \end{array}
 \end{array}$$

Самок F_1 скрещивают с самцами М-5.

$$P(F_1): \quad \text{♀} \quad \frac{B w^a}{++} \quad \times \quad \text{♂} \quad \frac{B w^a}{\text{—}} \quad \searrow$$

$$\begin{array}{ll} \text{Гаметы:} & 1) \frac{B w^a}{\text{—}} & 1) \frac{B w^a}{\text{—}} \\ & 2) \frac{++}{\text{—}} & 2) \text{—} \searrow \end{array}$$

$$F_2: \quad \begin{array}{ll} \frac{B w^a}{\text{—}} & \frac{B w^a}{\text{—}} \searrow \\ \frac{B w^a}{\text{—}} & \\ \frac{B w^a}{++} & \frac{++}{\text{—}} \searrow \end{array}$$

Таким образом, в F_2 будут самцы и самки двух фенотипов: дикого и М-5.

2. Вещество – мутаген, в X-хромосоме возникла рецессивная летальная мутация (l)

$$P: \quad \text{♀} \quad \frac{B w^a}{B w^a} \quad \times \quad \text{♂} \quad \frac{++}{\text{—}} \quad \searrow$$

$$\begin{array}{ll} \text{Гаметы:} & 1) \frac{B w^a}{\text{—}} & 1) \frac{+l+}{\text{—}} \\ & 2) \frac{B w^a}{\text{—}} & 2) \text{—} \searrow \end{array}$$

$$F_1: \quad \frac{B w^a}{+l+} \quad \frac{B w^a}{\text{—}} \quad \searrow$$

Возникшая рецессивная мутация в X-хромосоме оказывается теперь у самок в F_1 в гетерозиготном состоянии, т.е. фенотипически не проявится. Чтобы перевести ее гемизиготное состояние, скрещивают всех самок F_1 с самцами линии М-5.

$$\begin{array}{l}
 P(F_1): \quad \text{♀} \quad \frac{B w^a}{+l +} \quad \times \quad \text{♂} \quad \frac{B w^a}{\text{—}} \\
 \\
 \text{Гаметы:} \quad \begin{array}{ll} 1) \quad \frac{B w^a}{\text{—}} & 1) \quad \frac{B w^a}{\text{—}} \\ 2) \quad \frac{+l +}{\text{—}} & 2) \quad \text{—} \end{array} \\
 \\
 F_2: \quad \begin{array}{ll} \frac{B w^a}{\frac{B w^a}{B w^a}} & \frac{B w^a}{\text{—}} \\ \frac{B w^a}{+l +} & \frac{+l +}{\text{—}} \end{array}
 \end{array}$$

Таким образом, в F_2 не будет самцов дикого типа, так как мутация у них оказывается в гемизиготном состоянии и вызывает их гибель. Отсутствие самцов дикого типа свидетельствует о наличии мутации.

Поэтому просматривают пробирки F_2 : если в пробирке кроме двух типов самок имеются два типа самцов – культура считается нормальной. Если же в пробирке отсутствуют самцы дикого типа – культура считается летальной.

Подсчитывают частоту ($L, \%$) летальных культур по формуле:

$$L, \% = \frac{l}{N} 100,$$

где N – общее число пробирок в F_2 ,

l – число летальных культур.

Рассчитывают также ошибку ($m, \%$):

$$m = \pm \sqrt{\frac{L \cdot (100 - L)}{N}}.$$

Задание.

1. Записать особенности тесторной линии для метода Meller-5.
2. Записать схему метода Meller-5 для случая возникновения и в случае отсутствия мутации.

3. Поставить скрещивание для учета РСПЛМ в половых клетках подвергнутого воздействию мутагена самца дрозофилы.

Для этого в опытном варианте в пробирку с кормом поместить обработанного мутагеном самца и виргинную самку.

В контрольном варианте в пробирку с кормом поместить самца линии дикого типа (Д-32) и самку линии Meller-5. Пробирку подписать (фамилия, группа, дата) и поставить в термостат при температуре 25 °С.

4. В течение недели просматривайте пробирку. Отметьте, когда появились личинки, куколки. После появления личинок дрозофил- имаго (родители) удалить из пробирки.

5. После начала вылета мух отбирать виргинных самок для постановки второго скрещивания.

6. Поставить скрещивание для получения F_2 . Для этого в пробирку поместить одну самку и двух самцов F_1 . После появления личинок также удалить родителей из пробирки. Каждый студент ставить 10 культур (10 пробирок).

7. После вылета имаго провести учет частоты РСПЛМ в контрольном и опытном варианте. Для этого с помощью лупы просмотреть пробирки, отметить летальные культуры. Полученные данные каждый студент вносит в общую таблицу (табл. 5.5.1).

Таблица 5.5.1

Частота летальных культур у *Drosophila melanogaster*

Вариант	Всего культур в F_2	Число летальных культур	Частота летальных культур
Контроль	1		
	2		
	3		
	...		
Всего			
Опыт	1		
	2		
	3		
	...		
Всего			

8. Рассчитать частоту РСПЛМ и ошибку процента. Представить графически частоту РСПЛМ в контрольном и опытном варианте. Сделать вывод о мутагенной активности изучаемого фактора.

Работа 5.

Учет мутаций в соматических клетках дрозофилы

В настоящее время нет методов для генетического изучения частоты прямых мутаций в соматических клетках дрозофилы. Исследователям приходится пользоваться косвенными критериями. Одним из таких критериев является частота митотической рекомбинации, митотического кроссинговера. Показано, что конъюгация и обмен участками хромосом могут происходить не только в половых клетках при мейозе, но и при митотическом делении соматических клеток.

Исходным моментом при возникновении рекомбинации является разрыв спирали ДНК в хромосоме. Таким образом, чем чаще разрывы – тем чаще кроссинговер. При образовании хромосомных мутаций исходным моментом также является разрыв в хромосоме. Чем чаще разрывы, тем, соответственно, чаще хромосомные перестройки. И действительно, ряд мутагенов вызывает разрывы в ДНК.

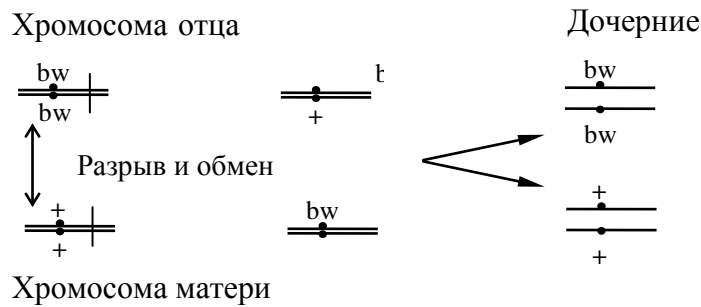
Таким образом, общим событием при возникновении хромосомных мутаций и при кроссинговере являются разрывы хромосом. Поэтому частота рекомбинаций в соматических клетках при воздействии какого-либо фактора свидетельствует о способности этого фактора индуцировать повреждения хромосом, то есть о его мутагенной активности.

Соматический мозаицизм у дрозофилы является удобной тест-системой для быстрой оценки мутагенного действия факторов внешней среды. Ответ будет получен уже в F_1 .

В настоящее время разработан ряд методов учета соматической рекомбинации у дрозофилы с использованием разных линий, разных фенотипических маркеров рекомбинации, и т.д.

Одним из наиболее удобных (простым и быстрым) является следующий метод, предложенный В.С. Михеевым: учет частоты рекомбинаций в глазных фасетках дрозофилы. Материалом для исследования служат дрозофилы генотипа $bw/+$ (ген bw обуславливает развитие коричневых глаз).

После кроссинговера результат будет следующим:



Клетки $+/+$ дадут фасетки красного цвета. Клетки bw/bw дадут фасетки с коричневым пигментом. Рассматривая глаза дрозофилы, можно увидеть черные пятна на красном фоне. Размер черного пятна будет определяться тем, сколько митозов пройдет клетка после рекомбинации. Количество пятен – частота рекомбинации (Kr , %) определяется по формуле:

$$Kr, \% = \frac{r}{N} 100,$$

где Kr – частота соматической рекомбинации,

r – число рекомбинантных пятен,

N – число просмотренных глаз.

Статистическая обработка результатов проводится по формулам для малых выборок. Рассчитываются среднее арифметическое (\bar{x}), ошибка среднего (m), достоверность разницы между контролем и опытом (t-критерий Стьюдента).

Представить графически соотношение частоту соматического мозаицизма в контрольном и опытном вариантах.

Приложение

Таблица 1

Генетический код

<i>Первое ос- нование</i>	<i>Второе основание</i>				<i>Третье ос- нование</i>
	У (А)	Ц (Г)	А (Т)	Г (Ц)	
У (А)	Фен	Сер	Тир	Цис	У (А)
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц (Г)
	Лей	Сер	-	-	А (Т)
	Лей	Сер	-	Три	Г (Ц)
Ц (Г)	Лей	Про	Гис	Арг	У (А)
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц (Г)
	Лей	Про	Гис	Арг	А (Т)
	Лей	Про	Гис	Арг	Г (Ц)
А (Т)	Иле	Тре	Асн	Сер	У (А)
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц (Г)
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А (Т)
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г (Ц)
Г (Ц)	Вал	Ала	Асп	Глн	У (А)
	Вал	Ала	Асп	Глн	Ц (Г)
	Вал	Ала	Глу	Гли	А (Т)
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г (Ц)

**Критические значения *t*-критерия Стьюдента
для трех уровней значимости (α)
и чисел степеней свободы (ν)**

Числа степе- ней свобо- ды (ν)	Уровни значимости			Числа степе- ней сво- боды (ν)	Уровни значимости		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	-	18	2,10	2,88	3,92
2	4,30	9,92	31,60	19	2,09	2,86	3,88
3	3,18	5,84	12,96	20	2,09	2,85	3,85
4	2,78	4,60	8,61	21	2,08	2,83	3,82
5	2,57	4,03	6,87	22	2,07	2,82	3,79
6	2,45	3,71	5,96	23	2,07	2,81	3,77
7	2,37	3,50	5,41	24	2,06	2,80	3,75
8	2,31	3,36	5,04	25	2,06	2,79	3,73
9	2,26	3,25	4,78	26	2,06	2,78	3,71
10	2,23	3,17	4,59	27	2,05	2,77	3,69
11	2,20	3,11	4,44	28	2,05	2,76	3,67
12	2,18	3,05	4,32	29	2,05	2,76	3,66
13	2,16	3,01	4,22	30	2,04	2,75	3,65
14	2,14	2,98	4,14	40	2,02	2,70	3,55
15	2,13	2,95	4,07	60	2,00	2,66	3,46
16	2,12	2,92	4,02	120	1,98	2,62	3,37
17	2,11	2,90	3,97	∞	1,96	2,58	3,29

Словарь терминов

А

Аберрации хромосом (*хромосомные перестройки, хромосомные мутации*) – изменения структуры хромосом.

Ана-телофазный анализ – метод учета хромосомных аберраций в ана- и телофазу митоза.

Анафаза – стадия митоза, на которой происходит деление центромеры и хроматиды расходятся к полюсам клетки.

Анафазный индекс (АИ) – доля клеток в анафазе от общего числа делящихся клеток.

Асимметричный митоз – митоз, при котором к разным полюсам клетки расходятся разное число хромосом.

Ахроматиновое веретено – см. *веретено деления*.

Ацентрик – хромосомный фрагмент, у которого отсутствует центромера.

Ацентрическое кольцо – хромосомная перестройка в виде кольца без центромера, результат парацентрической делеции.

Б

Биологические мутагены – см. *мутагены*.

В

Веретено деления (*ахроматиновое веретено*) – нити полимеризованного тубулина, берущие начало от центриолей и формирующиеся в раннем митозе; хромосомы прикрепляются своими центромерами к нитям веретена, затем в анафазе хроматиды расходятся вдоль нитей веретена к полюсам клетки.

Внутрихромосомный обмен – обмен материалом между сестринскими хроматидами или внутри одной хроматиды.

Г

Гемизигота – организм или клетка в гемизиготном состоянии. Например, мужской организм генам по генам, расположенным только в X- или Y-хромосоме.

Гемизиготность (гемизиготное состояние) – гаплоидное состояние генов в нормальной диплоидной клетке или организме (например, гены X-хромосомы у самцов дрозофилы).

Ген – 1) основная единица наследственной информации. Гены представляют собой последовательности нуклеотидов ДНК, расположенные в определенных участках хромосом. Гены содержат информацию для синтеза функциональных молекул РНК и белков, которые формируют структуры клетки и обеспечивают выполнение ее функций; 2) структурная и функциональная единица наследственной информации, способная к самовоспроизведению и расположенная в определенном месте (локусе) данной хромосомы.

Ген летальный – см. *летальный ген*.

Генетическая репарация – исправление повреждений в ДНК.

Генетическая токсикология – раздел генетики, изучающий воздействие факторов среды на наследственность человека.

Генетическая характеристика клетки – количество хромосом (n) и количество ДНК (c) в клетке в тот или иной период клеточного цикла.

Генетический груз – совокупность генов, снижающих общую приспособленность организма или популяции.

Генетический мониторинг – постоянное слежение за содержанием генетически активных факторов.

Генетический потенциал (активность) – способность фактора повреждать генетические структуры и процессы.

Генные мутации (точковые мутации) – изменения последовательности нуклеотидов ДНК в пределах одного гена.

Геном – совокупность всех генов, содержащихся в гаплоидном наборе хромосом данной клетки или организма.

Геномные мутации – изменения количества хромосом в геноме.

Генотип – совокупность генов клетки.

Генотоксикант – фактор, способный изменять генетические структуры и процессы.

Генотоксичность – способность фактора повреждать генетические структуры и процессы.

Генофонд – совокупность всех генов популяции.

Гены аморфные – возникают в результате генных мутаций аллели, которые не оказывают в гетерозиготном состоянии никакого влияния на свойства, контролируемые нормальным аллелем. Степень проявления признака зависит только от количества от мутировавших аллелей.

Гены антиморфные – мутировавшие аллели, действие которых имеет направление, противоположное действию стандартного аллеля. В зависимости от соотносительного эффекта мутантного и исходного аллелей можно путем перерекombинации их получить промежуточное проявление.

Гены гиперморфные – гены, действующие в направлении, аналогичном действию нормального аллеля, но приводящие к усилению фенотипического эффекта.

Гены гипоморфные – гены, действующие в том же направлении, что и нормальные, но их фенотипический эффект слабее.

Гены неоморфные – мутировавшие гены, оказывающие воздействие, несвойственное нормальным аллелям.

Гетерозигота (*гетерозиготное состояние*) – 1) зигота, образовавшаяся в результате слияния гамет, различающихся в отношении качества, количества и расположения генов; 2) диплоидная клетка, в аналогичных локусах гомологичных хромосом которой расположены различные варианты одного гена. Клетка является гетерозиготной по данному локусу.

Гистоны – небольшие высококонсервативные ДНК-связывающие белки, богатые основными аминокислотами, классифицируются по процентному содержанию лизина и аргинина (богатые лизином и богатые аргинином гистоны): входят в состав нуклеосом, каждая из которых включает 8 молекул в такой последовательности – H2A-H2B-H4-H3-H3-H4-H2B-H2A, в то время как H1 связывается с ДНК в межнуклеосомных участках (H1 может отсутствовать, как, например, у дрожжей).

Гомозигота (*гомозиготное состояние*) – 1) зигота, образовавшаяся в результате слияния гамет, идентичных в отношении качества, количества и расположения генов; 2) диплоидная клетка, несущая два идентичных аллеля одного гена.

Гомологичная хромосома – пара хромосом, имеющих одинаковую морфологию, и полученные одна от одного, другая от другого родителя. Образуют пару при мейозе.

Горячие точки – участки ДНК с особенно высокой частотой мутаций.

Д

Делеция – абберрация, при которой часть хромосомы теряется в результате разрыва.

Делеция изохроматидная – разрыв и потеря фрагмента затрагивает обе хроматиды.

Делеция интерстициальная – делеция, которая затрагивает внутренний участок хромосомы.

Делеция концевая (дефишенси, терминальная делеция) – делеция, которая затрагивает участок вблизи конца хромосомы и приводит к его потере.

Делеция парацентрическая – делеция, которая затрагивает участок одного плеча хромосомы.

Делеция перицентрическая – делеция, которая включает центромерный район хромосомы и приводит к образованию центрического кольца.

Дицентрик – см. *хромосома дицентрическая*.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

Доминантная мутация – термин, обозначающий любую мутацию, эффект которой проявляется в гетерозиготном состоянии.

Доминантные летальные мутации (ДЛМ) – мутации, приводящие к летали в гетерозиготном состоянии.

Ж

Жизненный цикл – см. *клеточный цикл*.

И

Идиограмма (кариограмма) – расположение всех хромосом кариотипа (фотография, рисунок) по парам и группам пар, обычно в порядке уменьшения размеров.

Изменчивость – свойство живых организмов образовывать различающиеся варианты в процессе индивидуального развития, или в группе организмов в ряду поколений, или под действием факторов внешней среды; выделяют **И.** наследственную, модификационную и онтогенетическую, а также качественную и количественную. Один из ведущих факторов эволюции, обеспечи-

вающий приспособляемость организмов и лежащий в основе естественного отбора, а также в основе антропогенной селекции.

Изохроматидная аберрация – аберрация, затрагивающая обе хроматиды.

Инверсия – внутрихромосомная перестройка, при которой область между двумя разрывами переворачивается на 180°.

Инверсия парацентрическая – инверсия затрагивает участок одного плеча хромосомы.

Инверсия перичцентрическая – инвертированный участок включает центромерный район хромосомы.

Инсерционный мутагенез – мутационное изменение генома вследствие вставок последовательностей нуклеотидов мобильных генетических элементов, вирусов, а также в результате трансфекции или микроинъекции ДНК; в результате **И.м.** может происходить частичная или полная инактивация генов.

Интерфаза – этап клеточного цикла между двумя последовательными митозами, фаза покоя клетки или же стадия от последнего митоза до смерти клетки; в интерфазе хроматин большей частью деспирализован (в отличие от интеркинеза); в норме интерфаза включает три фазы клеточного роста – G₁, G₂, и S периоды.

К

Кариокинез – деление ядра клетки.

Кариолемма – липопротеидная оболочка, отделяющая содержимое ядра от цитоплазмы в эукариотической клетке; состоит из двух липопротеидных мембран, разделенных перинуклеоларной полостью; **К.** характеризуется наличием структур, образующих поры.

Кариоплазма (кариолимфа, нуклеоплазма, ядерный сок) – непрокрашиваемое (в отличие от хроматина) содержимое клеточного ядра, в которое погружен хроматин; после удаления хроматина в **К.** сохраняется белковый матрикс.

Кариотип – хромосомный набор соматической клетки или биологического вида.

Кариотипирование – определение кариотипа

Клетка половая – любая гамета на любой стадии ее развития (от первичной **П.к.**).

Клетка соматическая – т.е. любая неполовая клетка многоклеточного организма.

Клеточный центр – органоид, участвующий в образовании веретена деления при делении клетки.

Клеточный цикл – период жизни клетки от окончания одного деления до окончания следующего деления, включающий интерфазу (периоды G_1 , S, G_2) и митоз (период M), иногда выделяют в интерфазе период G_0 (дифференцированное состояние); **К.ц.** по продолжительности у разных организмов значительно варьирует.

Кольцо – хромосомная перестройка, при которой концы хромосомы соединяются с образованием кольцевидной структуры.

Кольцо ацентрическое – см. *ацентрическое кольцо*.

Кольцо центрическое – см. *центрическое кольцо*.

Кроссинговер – см. *рекомбинация*.

Л

Леталь гаплофазная – летальная мутация, проявляющаяся на этапе образования гаплоидных гамет (до образования зиготы – в отличие от зиготической летали); при наличии **Л.г.** формирование зиготы с участием данной мутантной гаметы невозможно.

Летальный ген – ген, который в случае замещения нормального аллеля вызывает гибель гаметы или зиготы; может быть доминантным или рецессивным.

М

Межхромосомный обмен – обмен материалом между двумя хроматидами различных хромосом.

Мейоз (мейотическое деление) – два последовательных деления эукариотической клетки (ядра), в результате которого образуются 4 клетки с гаплоидным набором хромосом.

Меристематическая ткань – недифференцированная ткань, клетки которой находятся в постоянной готовности к делению.

Меристематические клетки – клетки меристематической ткани.

Метафаза – стадия митоза, на которой хромосомы конденсируются и располагаются в экваториальной плоскости веретена деления.

Метафазный анализ (*метод*) – анализ кариотипа на стадии метафазы.

Метафазный индекс (*МИ*) – доля клеток в метафазе от общего числа делящихся клеток.

Микроядерный тест – метод, позволяющий оценивать генотоксический потенциал фактора по наличию микроядер (см. *микроядро*) в клетке.

Микроядро – мелкий фрагмент хромосомного материала, наблюдаемый в интерфазе вне основного ядра, может возникать из хромосомного фрагмента или целой хромосомы, отделившейся от веретена в процессе митоза.

Миссенс-мутация – мутация, в результате которой образуется генный продукт с замещенной аминокислотой и, следовательно, измененным признаком.

Митоз (*митотическое деление*) – стадия клеточного цикла, не прямое деление эукариотических клеток, при котором образуется митотический аппарат и конденсированные хромосомы равномерно распределяются по двум дочерним клеткам. Количество и качество генетического материала в дочерних клетках идентично материнскому.

Митозстимулирующее действие – действие фактора, усиливающее размножение клеток в ткани.

Митотическая активность – способность клеток к размножению.

Митотическая активность тканей – доля делящихся клеток в какой-либо ткани.

Митотическая рекомбинация (*митотический кроссинговер, соматическая рекомбинация*) – обмен аналогичными участками между гомологичными хромосомами во время митоза.

Митотический аппарат клетки – комплекс, включающий центриоли клеточного центра, ахроматиновое веретено и кинетохорные участки хромосом.

Митотоксический потенциал (*активность, действие*) – способность фактора вызывать нарушения митоза.

Многополюсный митоз – полицентрический митоз для него характерно образование более двух полуверетен, ведет к неправильному распределению хромосом.

Мозаицизм – состояние, при котором в организме присутствуют клетки двух или более различных кариотипов.

Мост анафазный – образующийся в результате слипания хромосомного матрикса расходящихся к противоположным полюсам хромосом.

Мутаген – фактор, воздействие которого увеличивает частоту мутирования выше спонтанной.

– **биологический** – фактор биологической природы (вирусы, вакцины, токсины паразитов и бактерий и др.);

– **косвенный, не прямой** – фактор, который сам не вызывает мутаций, однако внутри клеток происходит его метаболическая активация с образованием веществ, обладающих мутагенной активностью;

– **физический** – гамма- и рентгеновские лучи, элементарные частицы, температура и др.;

– **химический** – многочисленные органические и неорганические соединения, включая некоторые чужеродные для данного объекта – биополимеры и др.

Мутагенез (направленный мутагенез) – индукция *in vitro* мутации в конкретном сайте клонированной последовательности ДНК; метод **Н.м.** позволяет идентифицировать функционально значимые участки в молекулах белков и нуклеиновых кислот, а также получать белки и ферменты с измененными свойствами (например, повышенной термостабильностью), – например, замена лизина на лейцин в положении 112 с помощью метода **Н.м.** позволяет анализировать закономерности третичной структуры гормона роста млекопитающих.

Мутагенное загрязнение – загрязнение, связанное с поступлением химических, физических или биологических мутагенных факторов.

Мутагенность – способность нарушать наследственные структуры клетки.

Мутант – организм, измененный в результате мутации; как правило, **М.** отличается от исходной формы (дикого типа) и часто имеет сниженную жизнеспособность при тех или иных нарушениях нормального фенотипа.

Мутации индуцированные (наведенные мутации) – мутации, для которых известен вызвавший их фактор.

Мутация – спонтанное (естественно возникающее) или индуцированное изменение структуры гена (последовательности нуклеотидов, хромосомы, генома), приводящее или не приводящее к изменению тех или иных признаков организма; термин «М.» введен Х. Де Фризом в 1901 году.

Мутация генеративная – мутации, происходящие в гаметах или клетках предшественницах гамет, как правило передающихся по наследству.

Мутация генная – см. *генные мутации*.

Мутация геномная – см. *геномные мутации*.

Мутация доминантная – мутация, проявляющаяся в гетерозиготном состоянии.

Мутация летальная – мутация, вызывающая преждевременную гибель несущего ее организма; при этом, очевидно, доминантная Л.м. губительна для всех организмов (гомо- и гетерозигот), а рецессивная – только для гомозигот.

Мутация рецессивная – мутация, проявляющаяся в гомозиготном состоянии и не проявляющаяся в гетерозиготном состоянии.

Мутация соматическая – происходят в соматических клетках. Передаваться потомству могут только при бесполом размножении.

Мутирование – процесс возникновения мутаций.

Н

Наследственность – свойство организмов обеспечивать структурную и функциональную преемственность поколений путем передачи биологических признаков в ряду поколений у всех организмов. Н. – явление строго непрерывное, обеспечивается наличием материальной субстанции, детерминирующей развитие биологических признаков, а именно генов.

Нерасхождение хромосом – нарушение процесса деления хромосом в ходе митоза или мейоза, что приводит к образованию дочерних клеток с добавочными хромосомами или их нехваткой.

Нонсенс-мутация – мутация, в результате которой возникает нонсенс-кодон.

О

Однонитевой разрыв – разрыв одной из двух молекул (нитей) в двойной спирали ДНК.

Онтогенез – процесс индивидуального развития организмов от зиготы до смерти.

П

Период G1- (постсинтетический) – стадия клеточного цикла, в которой заканчивается подготовка клетки к делению.

Период G1- (предсинтетический) – стадия клеточного цикла до редупликации ДНК.

Период S- – стадия клеточного цикла, в которой протекает нормальный (репродуктивный) синтез ДНК.

Позитивный контроль ставится параллельно с опытом. При позитивном контроле объект подвергается воздействию заведомого мутагена с целью выяснения регистрирует ли тест-система мутации.

Полиплоидия – увеличение в клетке хромосом в количестве кратном n (гаплоидному набору).

Политения – явление образования многонитчатых гигантских (политенных) хромосом (П.Х.) в результате многочисленных эндомитозов. Удвоенные хромосомы не претерпевают спирализацию, не расходятся и в таком виде вступают в следующий цикл редупликации, снова удваиваются и не расходятся. П.Х. характерны для слюнных желез личинок двукрылых.

Половой диморфизм – наличие двух половых форм – самцов и самок, обличающихся по ряду фенотипических признаков.

Популяция – совокупность особей одного вида, обладающих общим генофондом (что определяется наличием свободного скрещивания) и занимающих определенную территорию, репродуктивно изолированных от других аналогичных совокупностей. Термин «П.» предложен В. Иоганzenом в 1903 году.

Пролиферативная активность клеток – скорость размножения клеток.

Пролиферация – размножение клеток – увеличение числа клеток (в ткани, культуре), происходящее путем митотических делений; по мере дифференцировки, а также старения клеток в организме интенсивность П. снижается (т.е. увеличивается ин-

тервал между митозами), а некоторые дифференцированные клетки (например, нейроны) полностью теряют способность к П.

Промутаген – соединение, приобретающее мутагенные свойства только после метаболических преобразований в организме (т.е. после метаболической активации).

Профаза митоза – первая фаза митотического деления, начинающаяся с появления видимых хромосом.

Профазный индекс (ПИ) – доля клеток в профазе от общего числа делящихся клеток

Р

Радиационная генетика – раздел генетики, изучающий вопросы воздействия ионизирующего излучения на живые организмы, приводящего к возникновению индуцированных облучением мутаций; начало **Р.г.** положено работами Г. Меллера (1927), описавшего возникновение мутаций под действием ионизирующего облучения, а также Г.А. Надсона и Г.С. Филиппова (1925), описавших «радиорасы» у дрожжей при действии изотопов радия.

Радиационный мутагенез – получение мутаций под действием ионизирующего излучения; различают спонтанный (естественный) **Р.м.** – под действием солнечной (космической) радиации или радиации, не контролируемой человеком (подземные ископаемые и т.п.), и искусственный (индуцированный, направленный) **Р.м.** – в контролируемых человеком (как правило, экспериментальных) условиях; второй тип **Р.м.** достаточно широко применяется в селекции (особенно в селекции растений) для получения широкого спектра различных мутаций, среди которых могут быть отобраны полезные.

Разрыв – повреждение хроматиды (одной или обеих), приводящее к появлению просвета, по длине превышающего ширину хроматиды.

Реверсная мутация – восстановление у мутантного организма дикого или псевдодикого типа, соответственно, в результате истинной обратной мутации, приводящей к восстановлению исходной структуры ДНК, либо в результате супрессорной мутации; термин «**Р.**» применяют также для обозначения изменения (искусственного или спонтанного) пола на противоположный.

Редупликация ДНК – самоудвоение молекулы ДНК.

Рекомбинантная гамета – зрелая половая клетка (гамета), набор генов в которой в результате произошедшей в мейозе рекомбинации отличается от родительского набора; как правило, понятие «Р.г.» применяют в отношении конкретного признака, так как при рассмотрении целого генома большинство гамет являются рекомбинантными.

Рекомбинация (кроссинговер) – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости; в общем смысле под Р. понимают создание новой комбинации генов при соединении гамет родителей, более узко Р. – обмен участками хроматид и хромосом в процессе клеточного деления; у прокариот Р. осуществляется в процессе конъюгации, трансформации либо трансдукции, у вирусов – при смешанной инфекции; у эукариот, как правило, Р. характерна для мейоза (мейотическая Р.), но иногда имеет место и в митозе (соматическая Р.); различают реципрокную (взаимный обмен участками молекулы ДНК), нереципрокную (односторонний перенос участка ДНК); общую (кроссинговер), сайт-специфическую и незаконную Р. (обмен участками негомологичных хромосом в результате хромосомных перестроек).

Рецессивная, сцепленная с полом летальная мутация (РСПЛМ) – рецессивная летальная мутация, возникающая в половой хромосоме (например, в X-хромосоме дрозофилы).

С

Самка виргинная – неоплодотворенная самка (например, у дрозофилы).

Сестринские хроматиды – хроматиды одной хромосомы, генетически идентичны.

Сестринский хроматидный обмен (СХО) – приблизительно симметричный обмен материалом между двумя сестринскими хроматидами.

Соматический мозаицизм – см. *мозаицизм*.

Спирализация хромосом – процесс уплотнения хромосом, начинающийся в интерфазе и достигающий максимума в метафазе; в основе С.Х. лежат сложные процессы скручивания (упаковки) хроматина, а также процесс фосфорилирования гистона H1, контролируемый специфическим ферментом – гистонкиназой.

Суммарная мутагенная активность (СМА) – показатель, характеризующий мутагенную активность совокупности факторов (на пример, СМА речной воды, почвы, воздуха).

Т

Телофаза – конечная стадия митоза, в которой происходит образование дочерних ядер, деконденсация хромосом и разделение цитоплазмы (цитокинез).

Телофазный индекс (ТИ) – доля клеток в телофазе от общего числа делящихся клеток.

Тест-объект – объект на котором изучается действие фактора.

Тест-система – система показателей, по которым оценивается действие фактора.

Транслокация – межхромосомная изохроматидная перестройка, возникающая в результате обмена материалом между негомологичными хромосомами.

Транслокация асимметричная – если оторвавшийся сегмент содержит центромеру и после и после соответствующего воссоединения разрыва возникает одна дицентрическая хромосома и один ацентрический фрагмент.

Транслокация симметричная – после транслокации образуются две моноцентрические хромосомы.

Трехгрупповая метафаза – образование в метафазе ни одной группы хромосом на экваторе, а ещё дополнительно к ней двух групп у полюсов клетки.

Трехполюсный митоз – см. *многополюсный митоз*.

У

Универсальный мутаген – мутаген, вызывающий мутации у всех организмов, от вирусов до человека.

Ф

Фенотип – совокупность всех внешних и внутренних структур и функций организма, он не является постоянным свойством организма.

Физические мутагены – см. *мутагены*.

Фрагмент – участок хромосомы, образовавшийся в результате её разрыва.

Фрагмент ацентрический – появляется в результате разрыва, не содержит центромеры.

Фрагмент центрический – появляется в результате разрыва, содержит центромер.

Х

Химические мутагены – см. *мутагены*.

Хроматида – половина хромосомы после репликации. Хроматиды одной хромосомы (сестринские хроматиды) идентичны друг другу.

Хроматидные разрывы – нарушения, затрагивающие лишь одну из хроматид, нарушение возникает после редупликации ДНК.

Хроматиды сестринские – см. *сестринские хроматиды*.

Хроматин – нуклеопротеидный комплекс, составляющий хромосомы эукариотических клеток, включает ДНК, гистоны и различные негистоновые белки; термин «Х.» введен У. Флеммингом в 1880 году для описания окрашиваемых специальными красителями внутриядерных структур.

Хромосома – органелла клеточного ядра у эукариот (у прокариот она расположена непосредственно в цитоплазме), являющаяся носителем генетической информации (генов), способная к воспроизведению с сохранением структурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений; основу Х. составляет непрерывная двухцепочечная спирально уложенная (конденсированная) молекула ДНК, связанная с гистонами и негистоновыми белками, образующими хроматин; набор Х. (кариотип) является видоспецифичным признаком, для которого характерен относительно низкий уровень индивидуальной изменчивости; термин «Х.» предложен В. Вальдейером в 1888 году.

Хромосома дицентрическая (дицентрик) – хромосома с двумя центромерами.

Хромосомная aberrация – см. *aberrации хромосом*.

Хромосомные болезни – болезни, обусловленные изменением числа или структуры хромосом.

Хромосомные мутации – см. *aberrации хромосом*.

Хромосомные перестройки – см. *aberrации хромосом*.

Хромосомные разрывы – нарушения, затрагивающие обе хроматиды одной хромосомы, возникают до редупликации ДНК.

Ц

Центриоль – немембранная структура, элемент клеточного центра, состоит из микротрубочек; при делении клетки участвует в образовании веретена деления.

Центрическое кольцо – хромосомная перестройка в виде кольца с центромером, результат перичентрической делеции.

Центромера – первичная перетяжка хромосомы, область соединения двух сестринских хроматид, обеспечивает прикрепление к нитям веретена деления.

Цитогенетическое действие (активность) – способность какого-либо фактора нарушать количество или структуру хромосом.

Цитокинез – процесс разделения материнской клетки на две дочерние, происходящий в телофазе мейоза или митоза и осуществляемый за счет образования либо фрагмопласта (растительные клетки), либо клеточной перетяжки (животные); иногда термин «Ц.» используется для обозначения всего процесса клеточного деления, что неверно.

Ч

Частота мутаций – количественный показатель интенсивности мутационного процесса, равен доле гамет со вновь возникшими мутациями по отношению к общему числу гамет (в одном поколении).

Я

Ядрышко – плотное образование, выявляемое в интерфазных эукариотических клетках: ассоциировано с ядрышковым организатором и включает молекулы рибонуклеопротеинов (предшественников рибосом); часто в клетке содержится 1 – 2 Я., иногда – более 2-х; Я. может формироваться в цитоплазме на внехромосомных копиях генов р-РНК (например, у некоторых инфузорий); Я. включает фибриллярный центр, фибриллярный и гранулярный компоненты.

Ядрышковые организаторы – кластер генов рРНК, место локализации которого на хромосоме обозначается как район ядрышкового организатора и обнаруживается с помощью метода импрегнации серебром.

Список использованной литературы

1. Абилов С.К. // Генетика. 1979. Т. 15, № 5. С. 807–811.
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с.
3. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978. 365 с.
4. Бочков Н.П., Катосова Л.Д. Группы повышенного генетического риска среди населения в условиях загрязнения окружающей среды // Мутагены и канцерогены окружающей среды. Мат. междунар. науч. конф. М., 1994. Часть 2. С. 234–267.
5. Ваулина Э.Н. Определение времени клеточного цикла у хлореллы // Генетика. 1966. № 10. С. 108–110.
6. Ваулина Э.Н., Аникеева И.Д., Коган И.Г. Одноклеточная зеленая водоросль хлорелла – удобный объект для исследования мутагенности факторов окружающей среды. М.: Наука, 1975. С. 54–57.
7. Гинтер Е.К. Проблемы оценки генетического груза в популяциях человека в связи с загрязнением окружающей среды // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека. Мат. междунар. науч. конф. М., 1994. С. 215–233.
8. Гостимский С.А., Дьякова М.И. Практикум по генетике. М.: Изд-во МГУ, 1974. 171 с.
9. Данилов–Данилян В.И., Линд А. К читателям // Экос. 1997. № 1–2. С. 5.
10. Дубинин Н.П. Некоторые проблемы современной генетики. М.: Наука, 1994. 224 с.
11. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1986. 559 с.
12. Дубинин Н.П., Пашин Ю.В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978. 127 с.
13. Дубинина Л.Г. Тест система оценки мутагенной активности загрязнителей окружающей среды в культуре лейкоцитов крови человека. М.: ВИНТИ, 1978. 64 с.
14. Журков В.С. Методология интегральной оценки мутагенных загрязнений водных объектов // Мутагены и канцерогены в окружающей среде. СПб., 1998. С. 126–130.
15. Журков В.С., Катосова А.Д., Платонова В.И., Ревазова Ю.А., Ревич Б.А. Анализ хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови

женщин, контактирующих с диоксинами // Токсикологический вестник. 2000. № 2. С. 2–6.

16. Захаров А.Ф., Бенюш В.А. Атлас: Хромосомы человека М.: Медицина, 1982. 263 с.

17. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. М.: Наука, 1971. 223 с.

18. Иванов В.Б., Быстрова Е.И., Дубровский И.Г. Проростки огурца как тест-объект для обнаружения эффективных цитостатиков // Физиология растений. 1986. № 1. С. 195–199.

19. Каталог мутагенов. Методические рекомендации. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1986. 130 с.

20. Квитко К.В., Хропова В.И. Индуцированные ультрафиолетом и спонтанные мутации *Chlorella vulgaris* // Вестник ЛГУ. Биология. 1963. № 9. С. 150.

21. Куринный А.И. О тактике генетического контроля за применением пестицидов // Цитология и генетика. 1986. Т. 20. С. 463–467.

22. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 290 с.

23. Лекавичус Р.К. Специфичность химического мутагенеза при региональном мониторинге загрязнения окружающей среды: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1984. 26 с.

24. Лекавичус Р.К. Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды. Вильнюс: Мокалас, 1983. 223 с.

25. Методические рекомендации по комплексной оценке генетического риска применения фиторегуляторов в растениеводстве. М.: Изд-во МСХА, 1992. 28 с.

26. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств новых ветеринарных препаратов. М.: МЗ СССР, 1981. 56 с.

27. Методические указания по экспериментальной оценке суммарной мутагенной активности загрязнений воздуха и воды / Сост. В.В. Соколовский, В.С. Журков, Ю.А. Рахманин. М., 1990. 25 с.

28. Методическое руководство по биотестированию воды. РФ-118-02-09. М.: Госкомприроды СССР, 1991. 46 с.

29. Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека. М., 1994. 146 с.

30. Определение цитогенетического эффекта пестицидов путем учета индуцированных хромосомных перестроек в меристеме корешков ячменя / Сост. Г.А. Кириллова, И.А. Тихонович, Т.М. Петрова. Л.: Изд-во ЛГУ, 1981. 30 с.

31. Пашин Ю.В. Практическая применимость современных тест-систем для оценки мутагенности факторов окружающей среды // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. М.: Мысль, 1977. Вып. 2. С. 85–88.

32. Прохорова И.М. Оценка генотоксичности регуляторов роста растений // Экологические аспекты регуляции роста и продуктивности растений. Ярославль, 1991. С. 325–337.

33. Прохорова И.М., Белавина М.И. Загрязнение окружающей среды и наследственная заболеваемость // Экологозависимые заболевания: материалы научно-практической конференции. Ярославль: Изд-во ВВО РЭА, 1996. С. 15–19.

34. Прохорова И.М., Тючкалов А.И., Потапова Н.И., Хватов В.В. К вопросу о токсикогенетическом анализе воды // Физиологические аспекты токсикологии гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ, 1989. С. 4–11.

35. Ревазова Ю.А. Взаимодействие различных факторов среды и оценка их суммарной генотоксической активности в среде обитания человека // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека: доклады международного симпозиума. М., 1994. С. 97–105.

36. Ревазова Ю.А. Современные подходы к оценке загрязнения окружающей среды генотоксикантами и генетического здоровья населения // Материалы второго съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. СПб.: НИИ химии СПбГУ, 2000. С. 204.

37. Руководство по контролю качества питьевой воды. М.: Медицина, 1994. Т. 1. С. 36–150.

38. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенной и канцерогенной активности химических веществ. Всемирная организация здравоохранения. Женева, 1982. 211 с.

39. Соколовский В.В. Журков В.С. Оценка суммарной мутагенной активности в гигиене окружающей среды // Оценка суммарной генетической активности природных и сточных вод: материалы научной конференции. Ярославль, 1985. Деп в ВИНТИ № 3297-866. С. 160–190.

40. Тарасов В.А. Принципы качественной и количественной оценки генетической опасности химических веществ // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека: доклады международного симпозиума. М., 1994. С. 3–66.

41. Тарасов В.А. Принципы количественной оценки генетической опасности химических загрязнителей биосферы // Мутагены и канце-

рогены в окружающей среде: новые подходы к оценке риска для здоровья. СПб., 1998. С. 92–117.

42. Худолей В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия // Исследования по генетике. СПб., 1999. Вып. 12. С. 67–85.

43. Худолей В.В. Профили генетической активности и реализации эффекта «грязной дюжины» СОЗ // Материалы второго съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. СПб.: НИИ химии СПбГУ, 2000. С. 213–214.

44. Шевченко В.А. Радиационная генетика одноклеточных водорослей. М.: Наука, 1979. С. 3–25.

45. Экологическая безопасность России. Материалы межведомственной комиссии по экологической безопасности. М.: Юридическая литература, 1996. Вып. 2. С. 178–191.

46. Эколого-гигиенический контроль за применением пестицидов – мутагенов: метод. рекомендации. Киев: ВНИИГИНТОКС, 1989. 25с.

47. Abe A., Urano K. Influence of chemicals commonly found in a water environment on the Salmonella mutagenicity test // Science of the total environment. 1994. V. 153. № 1–2. P. 169–175.

48. Mikucki J., Kozera W., Bakuniak E. Rapid methods in studies on genetic changes induced by chemicals // Journal of environmental science and health. Part B. Pesticides, food contaminant and agricultural waters. 1983. V. 18, № 4–5. P. 529–551.

49. Morgan W. F., Corcoran J., Hartmann A., Kaplan M.I., Limoli C.L. DNA double-strand breaks, chromosome rearrangements, and genomic instability // Mutation research. 1998. V. 404, № 1–2. P. 125–128.

50. Sarkar D., Sharma A., Talukder G. Plant Extracts as Modulators of Genotoxic Effects // Botanical review. 1996. V. 62, № 4. P. 275–300.

51. Sharma C.B. Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals // Current science. 1983. V. 52, № 21. P. 1000–1002.

Оглавление

Введение.....	3
ГЛАВА 1. Генетическая токсикология, предмет и задачи	5
ГЛАВА 2. Изменчивость	8
2.1. Типы изменчивости.....	8
2.2. Основные положения теории мутаций	11
2.3. Новые положения теории мутаций	12
2.4. Классификация мутаций.....	13
2.5. Генные мутации.....	15
2.6. Хромосомные мутации	20
2.7. Геномные мутации	35
2.8. Уровни защиты организмов от мутагенов.....	38
ГЛАВА 3. Методы оценки мутагенов.....	40
3.1. Проблемы оценки мутагенов	40
3.2. Бактериальные тест-системы для выявления мутагенов	43
3.3. Эукариотические микроорганизмы как тест-объекты для выявления мутагенов	46
3.4. Цитогенетические методы.....	47
ГЛАВА 4. Генотоксическое загрязнение окружающей среды и его негативные последствия	53
ГЛАВА 5. Методы выявления и оценки генотоксикантов ...	56
5.1. Отбор и подготовка проб для проведения токсикогенетического анализа	56
5.2. <i>Chlorella vulgaris</i> как тест-объект для оценки генотоксичности факторов окружающей среды.....	59
5.3. Определение генотоксического действия факторов окружающей среды с использованием <i>Allium</i> сера в качестве тест-объекта	71
5.4. Определение мутагенного действия факторов окружающей среды с использованием <i>Allium</i> сера в качестве тест-объекта	83

5.5. <i>Drosophila melanogaster</i> как тест-объект для оценки генотоксичности факторов окружающей среды.....	92
Работа 1. Половой диморфизм у <i>Drosophila melanogaster</i> ...	97
Работа 2. Мутации у <i>Drosophila melanogaster</i>	97
Работа 3. Учет доминантных летальных мутаций (ДЛМ) .	100
Работа 4. Метод учета рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у <i>Drosophila melanogaster</i>	101
Работа 5. Учет мутаций в соматических клетках дрозофилы.....	106
Приложение	109
Словарь терминов	111
Список использованной литературы	126

Учебное издание

Прохорова Инна Мечиславовна
Ковалева Маргарита Игоревна
Фомичева Анна Николаевна

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Лабораторный практикум

Редактор, корректор А.А. Антонова
Компьютерная верстка И.Н. Ивановой

Подписано в печать 30.12.2005. Формат 60х84/16. Бумага тип.
Усл. печ. л. 7,9. Уч.-изд. л. 5,0. Тираж 100 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.
Ярославский государственный университет
150000 Ярославль, ул. Советская, 14

Отпечатано
ООО «Ремдер» ЛР ИД № 06151 от 26.10.2001
г. Ярославль, пр. Октября, 94, оф. 37
тел. (4852) 73-35-03, 58-03-48, факс 58-03-49

**И.М. Прохорова, М.И. Ковалева,
А.Н. Фомичева**

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Лабораторный практикум



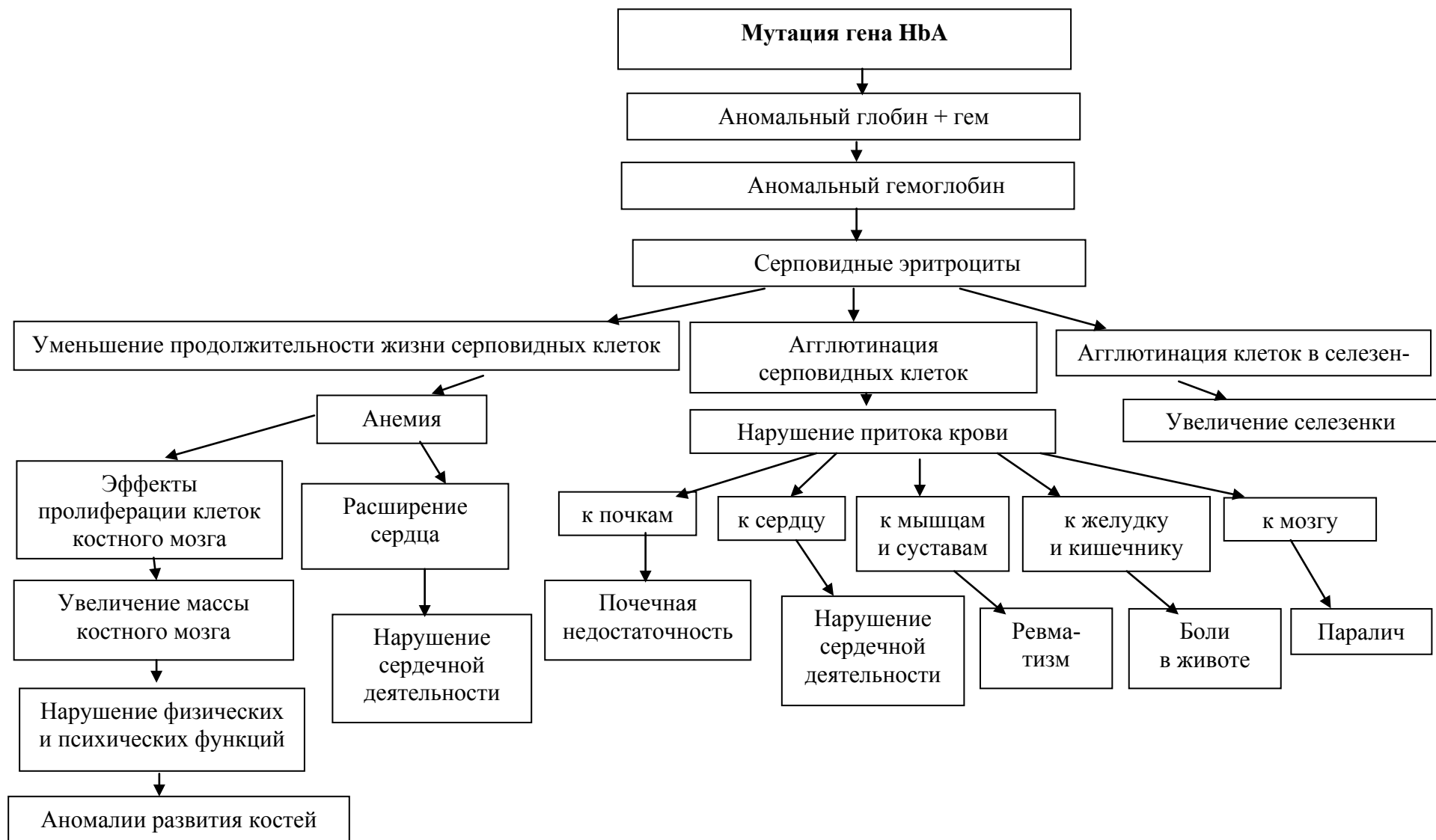


Рис. 2.5.1. Плейотропное действие гена при серповидноклеточной анемии

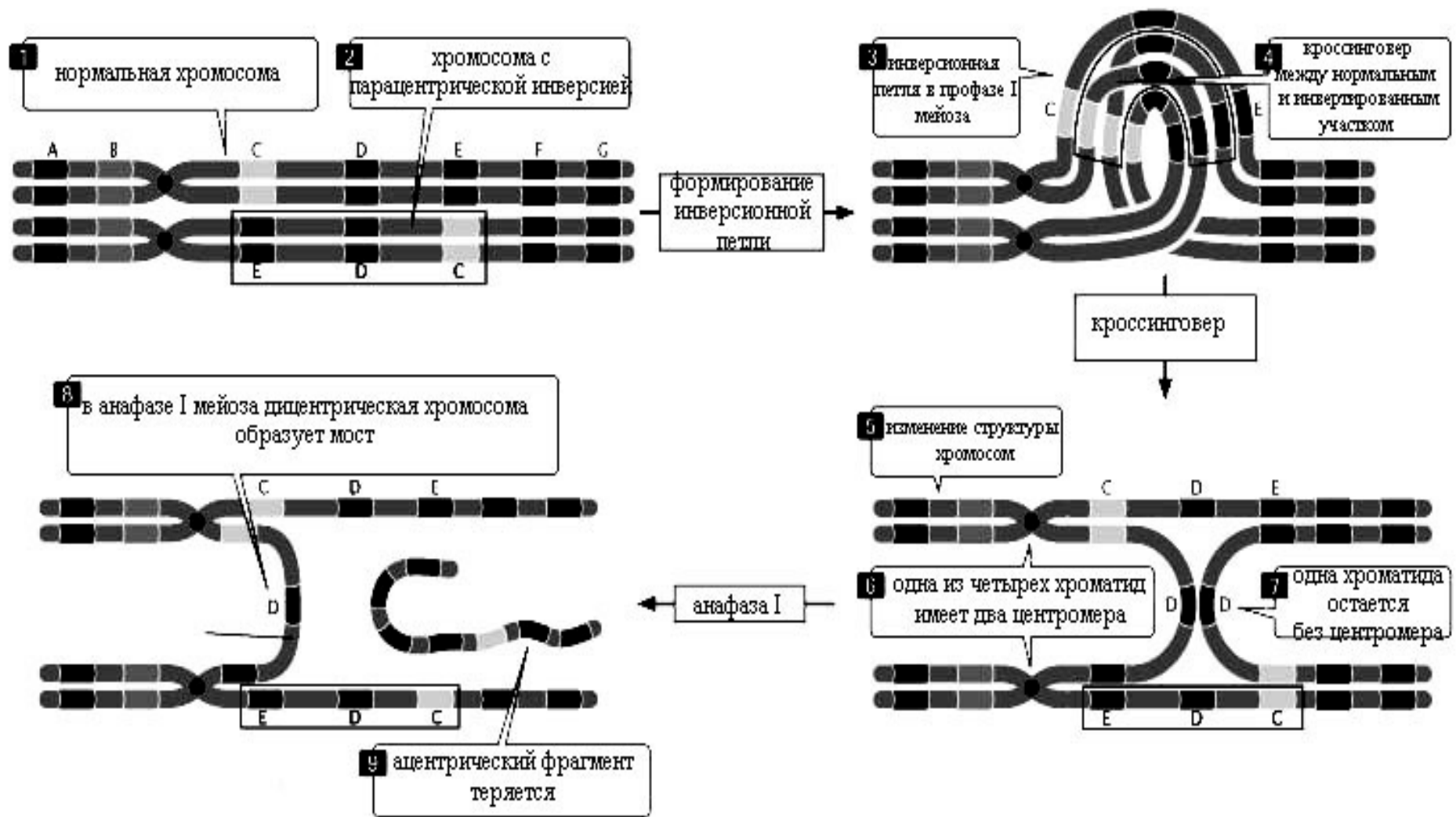


Рис. 2.6.10. Последствия инверсии:
образование дицентрической хромосомы и ацентрического фрагмента в анафазу

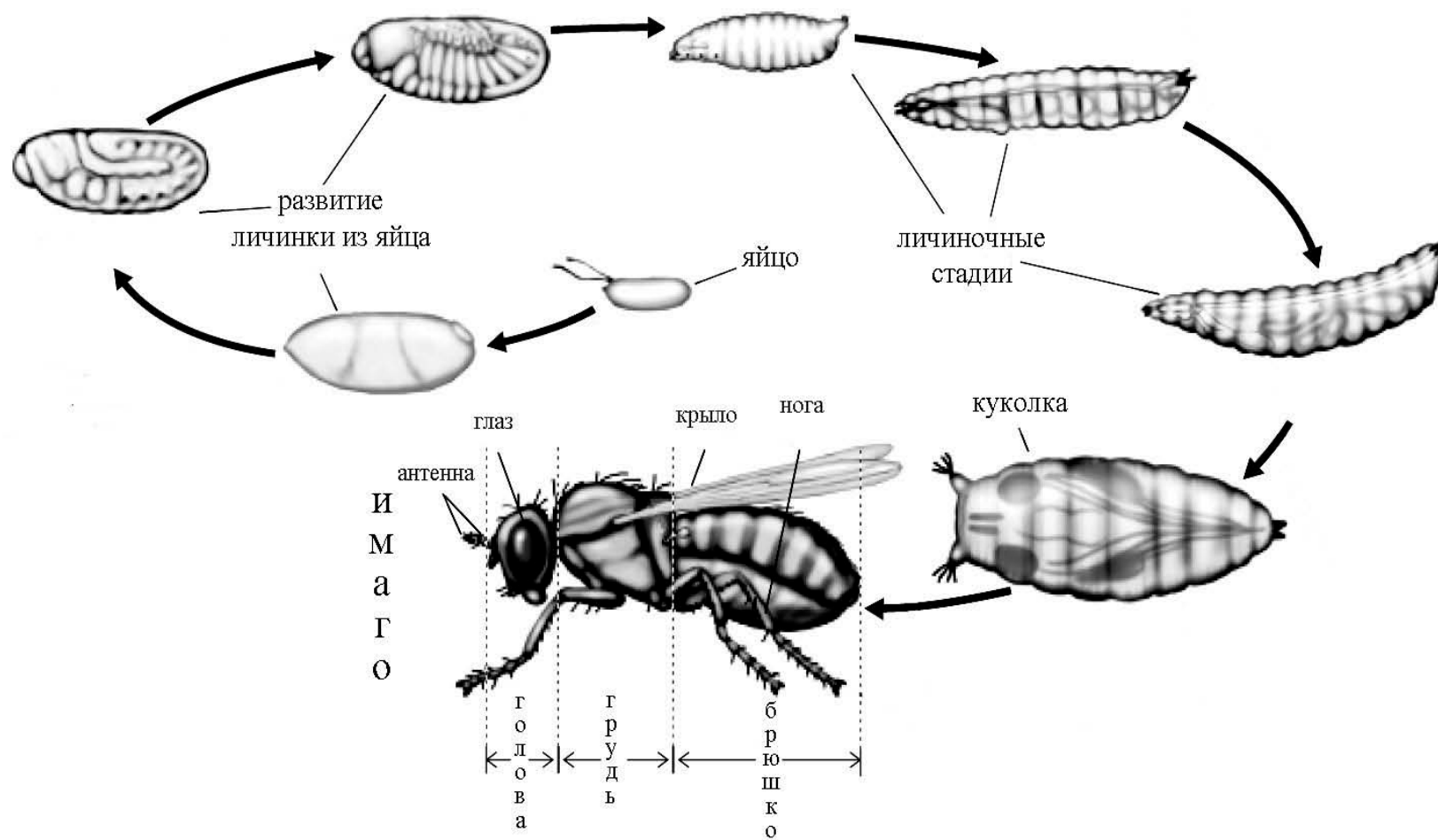


Рис. 5.5.1. Жизненный цикл *Drosophila melanogaster*

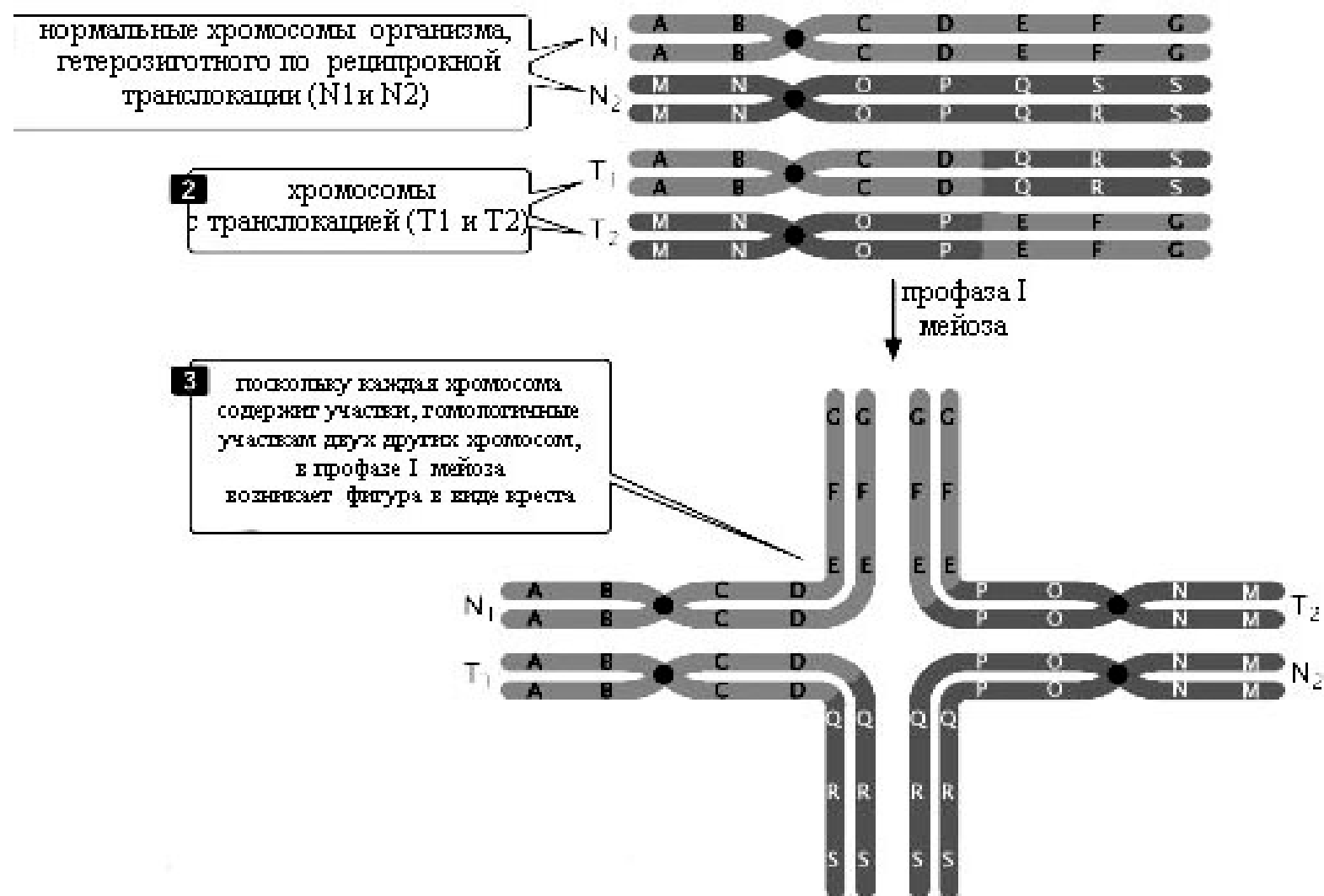


Рис. 2.6.12. Транслокация: образование транслокационного креста при реципрокной транслокации

*Сводная таблица учета хромосомных aberrаций в меристеме проростков корешков Allium cepa**

[illegible]

Среднее, \bar{X}															
m															
v															
Опыт															
1															
2															
3															
4															
5 и т.д.															
Сумма, Σ															
Среднее, \bar{X}															
m															
v															

* Вносятся данные всей группы.