Высшее профессиональное образование

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ

Учебное пособие

Естественные науки

ACADEMIA

ВЫСШЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ

Под редакцией С. А. Гераськина и Е. И. Сарапульцевой

Допущено
Учебно-методическим объединением
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлению «Биология» и биологическим специальностям

ACADEMA
Москва
Издательский центр «Академия»
2010

генных растений. Детально представлено положение дел в этой области исследований, впервые описаны методы генетического мониторинга агропопуляций высших растений.

Пособие включает теоретические основы и методологию генетического подхода к биотестированию качества окружающей среды, в том числе мониторинг человека и генетически модифицированных организмов (гл. 1—5). Теоретические главы завершаются списком литературы, куда вошли монографии, учебники, учебные пособия известных ученых в области генетики, биоинженерии, биоэкологии и охраны окружающей среды.

Практическая часть пособия содержит подробное описание 12 методов генетического контроля окружающей среды, включая методы мониторинга человека (гл. 6). Работы приведены в форме, доступной для воспроизведения их студентами на практических занятиях продолжительностью 2—4 академических часа. Большинство практических работ сопровождается рисунками, справочным материалом и рабочими таблицами, к каждой работе дается список литературы.

Глава 1 учебного пособия написана Л. В. Цаценко и Е. И. Сарапульцевой; глава 2 — С. А. Гераськиным, Л. В. Цаценко и Т. И. Евсеевой; глава 3 — С. К. Абилевым, В. М. Глазером, И. Ким, С. А. Гераськиным, С. Г. Инге-Вечтомовым, Е. И. Степченковой, Е. И. Сарапульцевой и Л. В. Цаценко. Авторами главы 4 являются С. Г. Смирнова и И. А. Замулаева; главы 5 — Л. В. Цаценко, Е. И. Сарапульцева, Л. Н. Комарова и Д. В. Крутенко. В подготовке и подробном описании практических заданий по освоению методов генетического контроля приняли участие все авторы книги, в том числе Г. Ф. Михайлова (подразделы 6.9; 6.10) и Н. В. Амосова (подраздел 6.6).

Глава 1
ЦЕЛИ, ЗАДАЧИ И МЕСТО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В СИСТЕМЕ НАУК

1.1. Цели и задачи генетического мониторинга

Генетический мониторинг — это научное направление, в рамках которого разрабатываются методология и практические методы оценки появления и накопления в окружающей среде генотоксических веществ, изучения спектра их мутационного воздействия и способности индуцировать тот или иной вид генетических нарушений. К генотоксикантам относят вещества и агенты, способные индуцировать мутации в половых и соматических клетках, что является причиной наследуемых изменений в первом случае и бластомогенеза — во втором. Как отдельное научное направление генетический мониторинг возник на рубеже 70—80-х гг. XX в. в связи с необходимостью разработки методов анализа изменений наследственных структур организма под влиянием техногенных факторов.

Основной целью генетического мониторинга является выявление объема и содержания генетического груза[1] в популяциях живых организмов, а также количественных критериев оценки последствий мутагенеза.

Термин «мониторинг» (от лат. *monitor* — тот, кто напоминает, предупреждает, надзирает) вошел в обиход специалистов по охране окружающей среды в 1972 г., когда на Стокгольмской конференции ООН по окружающей среде было предложено создать глобальную систему мониторинга (*Global Environment Monitoring Systems — GEMS*). Термин «генетический мониторинг» в отношении популяции человека применили Н. П. Дубинин и Ю. П. Алтухов (1975 г.), определив его как наблюдение за уровнем мутационного груза в популяциях человека.

Наличие и степень проявления генетических изменений характеризуют мутагенную активность среды, а возможность сохранения генетических изменений в популяциях отражает эффективность

[1] Генетическим грузом называют накопление летальных и сублетальных отрицательных мутаций, вызывающих при переходе в гомозиготное состояние выраженное снижение жизнеспособности особей или их гибель.

функционирования защитных систем организмов. В норме большинство генетических нарушений распознается и элиминируется клеткой, например: с помощью внутриклеточных систем репарации, путем апоптоза или посредством иммунной системы. Достоверное превышение спонтанного уровня таких нарушений является индикатором стрессового воздействия. Генетические изменения могут выявляться на генном, хромосомном и геномном уровнях.

Нестабильная экологическая обстановка и ухудшение общего состояния биосферы делают необходимым широкое использование генетического мониторинга. Генетический мониторинг включает методы, позволяющие количественно оценить и прогнозировать направленность и интенсивность мутационного процесса в популяциях, а в случае необходимости подобрать систему мероприятий, направленных на предотвращение отрицательных последствий для живых организмов. Отсюда вытекает основная цель генетического мониторинга — получение информации о наследственных изменениях, которая необходима и достаточна для принятия решений о мерах по защите генофонда от мутагенных факторов окружающей среды, ослаблению их действия и предупреждению вредных отдаленных последствий.

Проблема генетического мониторинга состоит в том, чтобы подобрать информационные показатели, способные с возможно большей полнотой отражать состояние генетических систем, дать оценку количественных параметров этих систем, а также их корректную интерпретацию.

Основные задачи генетического мониторинга включают: генетико-токсикологическую оценку; выявление зон повышенного риска; оценку динамики и временных трендов генетических процессов; апробацию разных тест-систем; построение универсальных математических моделей для разных типов популяций.

Различают следующие виды генетического мониторинга:

1) мониторинг природных генетических систем;

2) территориальный генетический мониторинг в связи с загрязнением природной среды;

3) мониторинг искусственных и экспериментальных генетических систем.

Новым направлением в адаптивной селекции растений является создание сортов-популяций, копирующих природные популяции. По мнению ряда исследователей, успех в создании новых типов агрофитоценозов будет зависеть от полноты моделирования в их структуре и функции принципов организации естественных растительных сообществ, характеризующихся высокой степенью гетерогенности. Ввиду этого необходимо разрабатывать принципы двух типов генетического мониторинга: мониторинг природных и искусственных генетических систем.

1.2. Подходы к генетическому мониторингу

Последствия воздействия факторов внешней среды на природные и аграрные экологические системы в значительной степени определяются иерархичностью организации биоты. На каждом уровне биологической организации существуют свои специфические способы защиты от экзогенных стрессоров (репарация, репопуляция, регенерация, изменение видового состава и структуры биоценоза и др.). Поэтому до высших уровней биологической организации стрессовые воздействия чаще всего доходят с запаздыванием и в значительно смягченной, косвенной форме, хотя есть и обратные примеры, когда малое воздействие за счет системных и биологических механизмов усиления способно приводить к значительным эффектам. Таким образом, наиболее ранние изменения можно зафиксировать на молекулярно-клеточном уровне организации живой материи. При этом генетические тесты имеют уникальное значение для оценки изменений, наступающих, как правило, до появления морфологических, физиологических, популяционных и других отклонений от нормы. Генетические тесты фиксируют наиболее серьезные последствия загрязнения окружающей среды — усиливающееся мутагенное давление на биосферу, проявляющееся в увеличении частоты канцерогенеза и наследственных заболеваний, возрастании генетического груза в популяциях человека, животных и растений, изменении их генетической структуры. Накопление генетических нарушений в долгосрочной перспективе ведет к ухудшению здоровья и репродуктивной способности слагающих популяцию организмов. Следовательно, именно генетические тест-системы должны использоваться для ранней диагностики изменений, возникающих в результате хозяйственной деятельности человека.

Для оперативного выявления большинства мутагенов и канцерогенов в окружающей среде применяют краткосрочные генетические тесты. Давно известно, что некоторые химические вещества способны вызывать рак у человека и животных. Химические вещества также вызывают мутации в половых клетках, которые повышают частоту наследственных заболеваний. Многие тысячи таких химических веществ, включая фармакологические препараты, бытовые химические вещества и пищевые добавки, пестициды и нефтепродукты, уже присутствуют в окружающей среде и каждый год синтезируют все новые и новые химические соединения. Помимо этого, существуют и природные химические вещества, относительно которых известно, что они обладают мутагенной и/или канцерогенной активностью (например, микотоксины, содержащиеся в пищевых продуктах). Поэтому важно, чтобы химические вещества, воздействию которых люди подвергаются

Следует различать отклонения в развитии, вызванные действием генетических и экологических факторов.

• На *популяционном уровне* проводят учет элементов, характеризующих продуктивность популяции растений, а именно количество развитых и неразвитых цветков в колосе или метелке, массу 1 000 зерен. Оценку гетерогенности семенного потомства исследуемых форм проводят по критериям: энергия прорастания семян; всхожесть; выживаемость проростков; количество проростков; индекс устойчивости (толерантности), определяемый как отношение длины корней у проростков на растворе с исследуемым загрязнителем к приросту корней на растворе того же состава без загрязнителя; выявление генотипов, характерных для той или иной среды в зависимости от уровня техногенной нагрузки.

Успех генетического мониторинга зависит от системы тестов, к которым предъявляются специфические требования. Так, для зерновых колосовых культур набор тестов для генетического мониторинга будет охватывать все уровни биологической организации (рис. 1.1) — пример приведен для озимой мягкой пшеницы и ячменя. Набор тестов может меняться для каждой культуры, так как зависит от индивидуальных особенностей фаз органогенеза.

1.3. История зарождения генетического мониторинга как научного направления

Генетический мониторинг основан на фундаментальных знаниях, накопленных генетикой. В процессе становления генетики как науки можно выделить несколько этапов. До конца XIX в. в биологии существовали разные гипотезы о природе наследственности и изменчивости. Основными предпосылками для формирования научных представлений об этих явлениях служили наблюдения за половым размножением у животных и растений, результаты опытов по гибридизации растений и развитие учения о клетке. Основы современных представлений о наследственности и изменчивости организмов были впервые сформулированы чешским исследователем Г. Менделем (G. J. Mendel) в 1865 г. Он установил закономерности наследования родительских признаков в гибридном потомстве и сделал вывод, что формирование каждого наследственного признака определяется парой материальных наследственных задатков, один из которых организм получает от матери, другой — от отца. Конкретная реализация признака определяется взаимоотношениями доминантности — рецессивности между материнским и отцовским задатками. При созревании половых клеток в каждую отдельную клетку попадает только

по одному гену от каждой пары. Проведенные независимо друг от друга в начале XX в. опыты Г. де Фриза в Голландии, К. Корренса в Германии и Э. Чермака в Австрии показали универсальное значение сформулированных Г. Менделем принципов для живой природы и человека.

Важнейшим шагом в развитии генетики стало построение Т. Морганом (Th. H. Morgan) и его сотрудниками в 1910—1915 гг. хромосомной теории наследственности, согласно которой гены располагаются на хромосомах в линейной последовательности и воспроизводятся при клеточных делениях, а хромосомы могут обмениваться своими участками (кроссинговер), что приводит к рекомбинации генетического материала. Следующим шагом было установление химической природы генов. Советский генетик Н. К. Кольцов одним из первых развил представление о форме существования наследственного материала (1927 г.), а Н. В. Тимофеев-Ресовский с соавторами в середине 30-х гг. XX в. вычислили примерный объем гена. В 1944 г. О. Эйвери (O. T. Avery) с соавторами показали, что носителем наследственного материала является молекула ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсон (J. D. Watson) и Ф. Крик (F. H. C. Crick) предложили модель строения ДНК, механизмы ее репродукции и изменчивости, а несколько позже создали теорию универсального генетического кода, с помощью которого генетическая информация, зашифрованная в ДНК, реализуется в структуре белка. Эти открытия означали переход генетики на молекулярный уровень исследования фундаментальных биологических процессов.

В начале XX в. Г. де Фризом (H. de Vries) была сформулирована мутационная теория, хотя экспериментально индуцировать мутации долгое время не удавалось. В 1925 г. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов открыли на низших грибах мутагенное действие рентгеновских лучей, показав, что после облучения возникают разнообразные новые расы, свойства которых воспроизводятся в потомстве. В 1927 г. Г. Меллер (H. J. Muller) в опытах на дрозофиле убедительно доказал, что ионизирующее излучение способно индуцировать мутации. Позже И. А. Раполорт и Ш. Ауэрбах (Ch. Auerbach) открыли явление мутагенеза под влиянием химических веществ. Теперь известно, что в окружающей нас природной среде содержится много разнообразных химических, физических и биологических факторов (мутагенов), способных вызывать мутации у всех живых организмов, включая человека. К концу 80-х гг. XX в. у человека было выявлено свыше 4 тысяч мутантных фенотипов. Особое значение для слежения за частотой мутагенеза приобрел анализ мутаций белков крови. Мутационный анализ позволил изучить структуру гена гемоглобина и другие важные особенности строения, функции и организации генетического материала у человека.

В начале XX в. датский генетик В. Иоганнсен (W. Johannsen) сформулировал понятия «генотип» (совокупность наследственных задатков) и «фенотип» (совокупность их проявлений). Российский биолог И. И. Шмальгаузен ввел понятие «норма реакции генотипа» (рамки, в пределах которых может варьировать проявление фенотипа в ответ на изменения условий среды). Советскими генетиками Б. Л. Астауровым и Н. В. Тимофеевым-Ресовским в 20—30-е гг. XX в. были разработаны представления о комплексной обусловленности признаков организма взаимодействием генотипических, внутриорганизменных и внешнесредовых факторов. В 1944 г. американские генетики Г. Бидл (G. W. Beadle) и Е. Тейтем (E. L. Ta-tum), обобщив опыт изучения биохимических мутантов у микроскопических грибов, предложили гипотезу о регуляции генами синтеза ферментов, выражаемую принципом «один ген — один фермент», что перевело феногенетику на биохимический, а затем и на молекулярный уровень.

В 20-е гг. XX в. параллельно и независимо друг от друга генетиком из СССР С. С. Четвериковым, англичанами Р. Фишером (R. Fisher) и Дж. Холдейном (J. B. S. Haldane), американским ученым С. Райтом (S. Wright) были заложены основы популяционной генетики. Ими сформулировано представление о генетической гетерогенности популяций, а также о роли системы скрещивания, колебаний численности, миграций организмов, мутаций, репродуктивной изоляции и естественного отбора в изменениях генотипического состава популяций и их эволюции. Позже популяционная генетика составила основу синтетической теории эволюции.

Первостепенной задачей генетики стали оценка и последующее длительное динамическое слежение (мониторинг) за возможными отрицательными генетическими последствиями применения химикатов, а также воздействия факторов, присутствующих в окружающей среде, как для самого человека, так и для животных, растений и микроорганизмов. Значение генетического мониторинга факторов окружающей среды тем более велико, что мутагенез наряду с тератогенезом и канцерогенезом составляет основной комплекс отдаленных опасных последствий повышения концентрации биологически активных факторов в биосфере.

Глава 2

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ОРГАНИЗМОВ

2.1. Характеристика факторов, вызывающих наследственные изменения

По современным оценкам количество загрязняющих среду обитания отходов ежегодно увеличивается в среднем на 4 %. Опасность техногенных стрессоров состоит прежде всего в том, что биологические системы — организмы, популяции и биоценозы — недостаточно адаптированы к ним. Многие техногенные факторы отличаются по величине, интенсивности, продолжительности и моменту воздействия от существующей в природе нормы, что обусловливает их повышенную эффективность. До 90 % всех случаев рака у человека в настоящее время обусловлено воздействием факторов окружающей среды, из них 70—80 % — воздействием химических канцерогенов и около 10 % — радиационных. Количество произведенных и находящихся в окружающей среде токсичных хлорорганических веществ достаточно для уничтожения всех аэробных организмов. Кроме 22 радионуклидов имеется 12 металлов (Be, Al, Cr, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb), токсичных во всех своих водо-, щелоче- и кислотно-растворимых соединениях.

Возрастающее распространение техногенных химических соединений в окружающей среде сделало первостепенной задачу выявления генетически активных химических соединений. Для ее решения было необходимо разработать простые высокочувствительные методы, позволяющие оценить мутагенность широкого набора химических соединений и их сложных смесей. Были предложены многочисленные тесты с использованием микроорганизмов (часть таких тестов подробно описана в гл. 6). Однако микроорганизмы в качестве тест-объектов имеют существенный недостаток: система метаболизма у млекопитающих и бактерий значительно отличается. В организме млекопитающих и человека подавляющее большинство химических соединений претерпевают биотрансформацию, поэтому мутагенные и канцерогенные эффекты определяются непрямым действием исходного соединения, а продуктов их метаболизма. В результате большинство известных химических соединений является не прямыми мутагенами и кан-

церогенами, а промутагенами и проканцерогенами. Это не позволяет регистрировать с помощью микроорганизмов мутагенную активность метаболитов химических соединений, образующихся в процессе биотрансформации. Выход из этой ситуации был найден.

Увеличение во всех компонентах биосферы количества доступных для живых организмов форм тяжелых металлов делает актуальным анализ последствий этих, обусловленных развитием человеческой цивилизации, процессов на биоценозы. Особенно важны такие исследования в отношении растений, поскольку сохранение оптимальных условий жизнедеятельности на нашей планете во многом зависит от состояния фитоценозов, их способности выполнять свои функции в биосфере.

В последнее время тревогу вызывает воздействие остатков пестицидов, ионов тяжелых металлов и других ксенобиотиков на структуру, функции и генетическую основу агропопуляций, что может привести к ухудшению генетических свойств ценных видов культурных растений. В первую очередь отрицательное воздействие перечисленных факторов сказывается на генетической чистоте сорта, т.е. способности из поколения в поколение передавать сгруппированные в селекционном процессе блоки генов с хозяйственно важными характеристиками сортов.

Для сохранения генофонда культурных растений необходимы раннее тестирование и предсказание возможных изменений на уровне организма и популяции, связанных с использованием в сельском хозяйстве пестицидов и удобрений в реально применяемых концентрациях. Решить эту задачу можно с помощью генетического мониторинга, уделив внимание изучению причин, механизмов и последствий мутационной изменчивости, т.е. наследуемых изменений генетического материала.

2.2. Действие физических и химических факторов на наследственный аппарат клетки

Существуют серьезные отличия в механизмах действия физических и химических факторов, связанные в первую очередь с различиями в формах передачи энергии и путей поступления в клетки-мишени. В частности, начиная с определенной дозы ионизирующего излучения, дальнейшее ее снижение влияет только на долю пораженных ядер, оставляя неизменной величину средней энергии, абсорбированной ядром, в отличие от химических мутагенов, концентрацию которых можно уменьшать вплоть до молекулы на клетку. Специфика химических факторов обнаруживается также при анализе путей их поступления в клетки. Хотя излучения частично поглощаются покрывающей клетки-мишени тканью, но качество их при этом не меняется. Химические же агенты, проходя через метаболическую систему организма, могут существенно изменяться. При этом они могут как потерять свои токсические или мутагенные свойства, так и усилить их. Яркий пример такого превращения — циклофосфамид, широко используемый в качестве цитостатика. Это немутагенное само по себе соединение в организме млекопитающих превращается в сильный мутаген. Таким образом, различия в генетическом действии этих двух групп мутагенов носят кардинальный характер. Именно поэтому калибровочная кривая, построенная на основе облучения культуры клеток *in vitro*, может быть использована в целях биологической дозиметрии для оценки дозы облучения *in vivo*. Трудно представить что-либо подобное в отношении химических субстанций.

2.2.1. Действие физических факторов

Относительный вклад в техногенную нагрузку факторов физической природы стремительно возрастает. За последние 50—60 лет суммарная напряженность электромагнитных полей и интенсивность неионизирующих излучений увеличилась по сравнению с естественным фоном в 1 000—1 000 000 раз. С точки зрения экологии и эволюции такое увеличение можно рассматривать как мгновенный скачок со сложно предсказуемыми медицинскими, биологическими и экологическими последствиями.

Ионизирующее излучение (ИИ) в отношении индукции биологических эффектов является наиболее изученным из факторов физической природы. Первые экспериментальные доказательства способности ионизирующего излучения индуцировать мутации были практически одновременно получены в середине 20-х гг. XX в. Г.А. Надсоном и Г.С. Филипповым на плесневых грибах *Mucor genevensis*, Г. Меллером на дрозофиле и Р. Стадлером на овсе. В результате этих исследований биологи впервые получили возможность экспериментально воздействовать на наследственную изменчивость. Ионизирующее излучение индуцирует все типы повреждений, возникающих в ДНК и спонтанно — от модификации отдельных оснований до крупных перестроек, захватывающих обширные области хромосом, включающие большое количество генов. Однако спектры спонтанных и индуцированных ионизирующим излучением повреждений ДНК существенно различаются. Если при спонтанном мутагенезе бóльшая часть (65 %) повреждений ДНК относится к генным мутациям, а именно к заменам пар

оснований, то при радиационном мутагенезе в основном возникают делеции. Двунитевой разрыв ДНК (ДР ДНК) — самый опасный и сложно репарируемый тип повреждений генетического материала, индуцируемый ионизирующим излучением и некоторыми химическими мутагенами. В то же время ДР ДНК постоянно возникают в клетках, хотя и с гораздо меньшей частотой, в ходе нормального функционирования генетического аппарата.

При анализе биологических эффектов действия ИИ важно ясно представлять, какие элементарные события происходят в облученной клетке и как соотносится уровень индуцированных генетических повреждений со спонтанным. Согласно исследованиям Б. Эймса, только за счет окисления активными формами кислорода в ДНК одной нормальной клетки человека в течение суток возникает 1 млн повреждений оснований. Такое же количество повреждений формируется при γ-облучении клеток в дозе 0,5 Гр. В свете этих данных гораздо более понятными становятся оценки генетической эффективности естественного радиационного фона, на 6 порядков уступающие скорости образования спонтанных повреждений ДНК. Эта оценка остается справедливой даже с учетом того, что спектр индуцируемых ИИ повреждений смещен в сторону более тяжелых нарушений относительно спонтанных. Тем не менее естественный радиационный фон индуцирует в клетке ДР ДНК в 1 000 раз реже, чем они возникают спонтанно.

В начальный период развития радиобиологии принято было считать, что выход мутаций на единицу дозы одинаков как для малых, так и для больших доз (линейность), и предполагалось, что квант энергии излучения, воздействуя непосредственно на хромосому, вызывает в молекулах ДНК необратимые изменения (беспороговость). Эти постулаты легли в основу получившей в настоящее время наибольшее распространение линейной беспороговой концепции, подразумевающей безусловную опасность любых уровней облучения, в том числе и не превышающих естественный радиационный фон. На молекулярном уровне действие ионизирующего излучения действительно является беспороговым, поскольку энергия любого кванта излучения превышает энергию связи в биологических макромолекулах.

Накопление экспериментальных фактов показало возможность модификации результатов мутационного процесса разными факторами, а также то, что первичные повреждения ДНК восстанавливаются в ходе репарационных процессов. Это в корне изменило концептуальную основу понимания мутационного процесса. Уже к середине прошлого века стало ясно, что при изучении биологического действия низких доз ИИ необходимо отойти от механически перенесенных из области больших доз представлений.

В чем же заключается причина существенных различий в ответной реакции клетки на облучение в больших и малых дозах? Исчерпывающего ответа на этот вопрос пока не существует, поэтому до настоящего времени нет и общепризнанной концепции биологического действия малых доз ИИ. Однако многое уже известно, и это позволяет сделать вывод, что закономерности формирования биологических эффектов больших и малых доз принципиально различаются. В этом различии существенную роль играют так называемые «немишенные» феномены, выраженность которых не увеличивается с дозой облучения. Поэтому при облучении в больших дозах они играют незначительную роль. Понятно, что такой характер проявления немишенных реакций самым существенным образом сказывается на форме дозовой зависимости и определяет ее нелинейность в диапазоне малых доз.

Перечислим наиболее существенные из них:

- различие систем репарации, активируемых в клетке в ответ на облучение в больших и малых дозах;
- адаптивный ответ, заключающийся в увеличении устойчивости к большим дозам после воздействия в малых;
- эффект свидетеля, состоящий в том, что часть не подвергшихся воздействию клеток реагируют так же, как облученные;
- генетическая нестабильность, проявляющаяся в повышенной частоте возникновения самых разных генетических нарушений (генных мутаций, аберраций хромосом, гибели) в поколениях подвергшихся воздействию (не обязательно радиационному) клеток. Это явление может проявляться на протяжении многих поколений, характерно как для соматических, так и для половых клеток и поэтому может проявляться у потомков облученных организмов.

Учет немишенных эффектов, играющих определяющую роль в формировании ответной реакции клетки на низкодозовое радиационное воздействие, позволяет объяснить имеющиеся в нашем распоряжении факты закономерностей индукции генетических эффектов малыми дозами ионизирующих излучений, а именно:

- принципиальное различие биологических эффектов, индуцируемых облучением в больших и малых дозах;
- малую величину дозы, вызывающей вскоре после облучения увеличение метаболической активности в клетках разного типа;
- нелинейность формы дозовой зависимости;
- существование нижнего порога эффектов по дозе;
- зависимость эффекта от мощности дозы;
- неспецифичность в отношении природы инициирующих агентов.

Биологическое действие УФ-излучения обусловлено в основном процессами фотоэффекта и фотовозбуждения макромолекул. Поскольку каждому виду биологических макромолекул присущи собственная структура энергетических уровней и соответствующие им разрешенные переходы электронов, это однозначно характеризует энергии поглощаемых ею фотонов. Избирательное, зависящее от энергии фотонов поглощение не позволяет говорить о биологическом действии УФ-излучения вообще. Его следует относить к тем или иным длинам волн, в результате облучения которыми часто регистрируются существенно различающиеся биологические реакции. Мутагенное действие УФ-излучения связано с формированием пиримидиновых димеров.

Большинство физических и биологических явлений нашей повседневной жизни обусловлено электромагнитными силами. Внешние электромагнитные поля могут выступать как источники электромагнитных помех, снижающих надежность жизненных процессов человека, растений, животных и экосистем. Поглощение энергии электромагнитного поля (ЭМП) обусловлено торможением или ускорением свободных ионов и заряженных молекул, а также переориентировкой диполей воды и молекулярных структур, имеющих дипольные группировки. Эти процессы приводят к выделению в биообъектах тепловой энергии. На этих принципах основана работа микроволновых печей.

В зависимости от интенсивности дополнительного теплообразования и от сложности биологической организации тепло может рассеиваться по законам термодинамики. У теплокровных в этом участвует физиологическая система термокомпенсации, включающая сердечно-сосудистую систему, потовые железы и др. Интенсивности электромагнитного излучения (ЭМИ), вызывающие напряжение систем термокомпенсации с последующим срывом их функционирования, приводят к перегреву организма.

Помимо тепловых эффектов имеются феномены, которые нельзя объяснить выделением тепла. Они регистрируются при низких интенсивностях и, как правило, при импульсной модуляции излучения. Возможные механизмы нетепловых (специфических) эффектов:

- синхронизация колебательных процессов молекул-осцилляторов и резонансный эффект, наиболее выраженный в сверхвысокочастотном (СВЧ) и ультравысокочастотном (УВЧ) диапазонах;
- избирательное действие на биологические мембраны нервных клеток, влияние на процессы комплексообразования и активности ферментов, а также на изолированные фосфолипидные мембраны;
- конформационные сдвиги в важнейших биомолекулях, включая ДНК и РНК.

Спецификой генетического действия неионизирующих ЭМИ является зависимость от частоты, а также относительно высокая биологическая эффективность низкоинтенсивного микроволнового излучения, не приводящего к значительному нагреванию объекта. Объяснить эти результаты можно воздействием ЭМИ на конформационное состояние генома.

При взаимосвязанном возбуждении в организме колебаний различных диапазонов неионизирующих излучений (СВЧ, КВЧ, инфракрасного — ИК, оптического, УФ) биологические результаты воздействия должны иметь много общего. Основной чертой является резонансный характер биологического отклика организма на действие всех диапазонов неионизирующих когерентных излучений. Например, известно наличие множества резонансов мембран, смещенных друг относительно друга по частоте, причем каждой резонансной частоте соответствует свой характер биологического действия. Резонансный характер биологического действия зафиксирован в КВЧ (коротковысокочастотном — миллиметровом), оптическом и УФ-диапазоне излучений, причем в последних двух случаях с помощью узкополосных фильтров показана многократная острая зависимость биологического эффекта от частоты излучения.

В шкале ЭМИ бóльшая часть диапазонов по несущей частоте относится к неионизирующим, когда энергии кванта недостаточно для ионизации. УФ-диапазон является промежуточным, коротковолновая часть которого уже ионизирует. Далее идут рентгеновское излучение и гамма-кванты. Принципиальное различие физических механизмов передачи энергии биологическим объектам ЭМИ разных частотных диапазонов свидетельствует о возможности их специфического действия на компоненты экосистем. Сравнительный анализ данных о чувствительности живых организмов, находящихся на разных ступенях эволюционной лестницы, к действию ионизирующего и УФ-излучений свидетельствует о существенном различии рядов чувствительности организмов к действию этих факторов. Причем если в случае ионизирующего излучения чувствительность возрастает с увеличением сложности и эволюционной продвинутости организмов, то для УФ-излучения характерна обратная тенденция.

Имеющиеся данные относительно действия ЭМИ СВЧ-диапазона на компоненты агроэкосистем (растения, животные, насекомые, микроорганизмы) также свидетельствуют о различии рядов чувствительности живых организмов к действию ЭМИ разных частотных диапазонов. Отличие классического ряда радиорезистентности живых организмов от рядов резистентности для неионизирующих ЭМИ не ограничивается примерами УФ- и СВЧ-воздействий. Таким образом, для каждого из диапазонов

ЭМИ, различающихся физическими способами передачи энергии биологическим объектам, существуют свои специфические ряды резистентности.

2.2.2. Действие химических факторов

Обращаясь к рассмотрению факторов химической природы, в первую очередь необходимо подчеркнуть огромное разнообразие химических веществ и механизмов их действия. Способность вызывать мутации продемонстрирована для многих химических соединений при тестировании на самых разных организмах. Повсеместное распространение и широкий спектр делают химические агенты особо опасными факторами для здоровья человека и природной среды.

Основная трудность при оценке мутагенной активности химических соединений связана с тем, что мутационный процесс в этом случае имеет видо- и тканеспецифический характер. Не менее 85 % химических соединений являются мутагенами в одних тест-системах и не обладают этим свойством в других. В основном это связано с различиями процессов биотрансформации и фармокинетики химических соединений у разных видов, а также в клетках разных тканей в пределах одного организма. В результате мутагены в системе *in vitro* необязательно являются мутагенами в системе *in vivo*, мутагены в соматических клетках необязательно являются мутагенами для половых клеток, мутагены для крыс не всегда оказываются мутагенами для мышей и т.д.

В случае химических агентов связать экспозицию с биологическим эффектом достаточно сложно, поскольку их концентрация в клетке сложным образом зависит от концентрации в среде и должна измеряться непосредственно в мишенной биологической структуре. Обычно это невозможно, и приходится делать специальные предположения относительно механизмов поступления, удержания, метаболизма и экскреции исследуемого агента.

К химическим мутагенам относят любые вещества, прямо или косвенно нарушающие структуру и воспроизведение молекул ДНК: афлатоксины, гетероциклические и полициклические аромамины, нитрозамины, полиароматические гидрокарбонаты (ПАГ), азотистую кислоту, соли тяжелых металлов, акридиновые красители, а также гербициды, инсектициды, некоторые лекарственные препараты, комплексно нарушающие метаболизм у млекопитающих и человека.

Нитроароматические компоненты содержатся в дизельном топливе и широко распространены в окружающей среде. Специфические продукты деградации взрывоопасны и загрязняют подземные воды. Положительные результаты получены с использованием биотеста на *Tradescantia* на примере загрязнения грунтовых вод нитрокомпонентами, извлеченными из высокоопасных материалов.

Полиароматические гидрокарбонаты широко распространены в экосистемах. В литературе описаны случаи раков у рыб, обитающих в воде, содержащей эти вещества. Бенз(а)пирен — один из наиболее потенциально опасных канцерогенных ПАГ. При тестировании с помощью растений он вызывает незначительные эффекты или дает отрицательный результат. Из этого можно заключить, что растительные биотесты являются нечувствительными мишенями к канцерогенам этого класса, и эти эффекты не могут быть обнаружены в окружающей среде при имеющихся концентрациях.

Полициклические ароматические амины оказывают генотоксическое воздействие на большинство изученных видов растений. Многие из ароматических аминов, обнаруженных в окружающей среде, переводятся растениями в ходе пероксидазных реакций в высокомолекулярные продукты, которые эффективно индуцируют мутации в тестах на бактериях и клетках млекопитающих.

Нитрозамины могут быть обнаружены специфическими индикаторными растениями, такими как арабидопсис (*Arabidopsis*) и табак (*Nucotiana tabacum*).

Некоторые *промышленные химикаты* были протестированы растительными биотестами. Этилбензин, трихлорэтилен, толуол, тетрахлорэтилен и этилтолуол дали положительный отклик в Trad-МЯ-тесте (микроядерный тест на традесканции). Этиленамин вызывал аберрации хромосом у ячменя. ДЕНР (ди(2-этилэксил)-фталат) давал положительный результат на клетках корней лука.

Особый класс химических мутагенов представляют вещества, непосредственно не взаимодействующие с ДНК, однако реализующие свое мутагенное действие путем поражения ферментных систем клетки, контролирующих метаболизм ДНК. В случае мутагенов, относящихся к этому классу, следует ожидать существования реального порога в дозовой (концентрационной) зависимости, как это имеет место для токсического действия. В этой связи дозовая (концентрационная) зависимость для химических мутагенов может меняться от линейно-беспороговой к пороговой. В таких условиях единственная разумная стратегия тестирования связана с минимализацией генетической опасности, когда из всех потенциально опасных выбирают ситуацию с минимальным уровнем генетического риска.

К наиболее распространенным химическим мутагенам в агросекторе относят пестицидные соединения и соли тяжелых металлов. Понятие «тяжелые металлы» объединяет широкий круг эле-

ментов, существенно различающихся по своим химическим свойствам, биологической доступности, скорости миграции и распространенности в биосфере. К тяжелым металлам относят химические элементы с атомной массой более 40.

Токсичности тяжелых металлов, их миграции, накоплению и реакции на них отдельных организмов и целых экосистем посвящено большое количество исследований. Вместе с тем, несмотря на обилие публикаций, целостной теории токсичности тяжелых металлов пока не существует. Отсутствует ясное представление о возможных негативных последствиях загрязнения среды тяжелыми металлами. Слабо разработаны вопросы прогноза отдаленных генетических последствий хронического воздействия металлов в низких концентрациях, а также воздействия на организм тяжелых металлов в сочетании с другими химическими и физическими факторами.

Специалистами по охране окружающей среды выделена группа наиболее токсичных тяжелых металлов. Это ртуть, свинец и кадмий. По абсолютной величине в техногенных выбросах преобладает свинец, однако если оценивать поступление тяжелых металлов в биосферу по отношению к их кларковому содержанию, то наиболее опасным элементом является кадмий, который не относится к числу элементов, необходимых для нормальной жизнедеятельности животных и растений. Ионы кадмия обладают высокой общей токсичностью и канцерогенной активностью. Данные о мутагенном эффекте кадмия противоречивы.

Многочисленными исследованиями на биологических объектах разного уровня организации — от микроорганизмов до млекопитающих — показано, что соли тяжелых металлов обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Большинство из них представляют собой метаболические яды, действующие на энергетику клетки, фотосинтез и регуляторные процессы. Поэтому мутагенное действие тяжелых металлов является, как правило, побочным эффектом, результатом нарушения метаболизма, проницаемости мембран и т. п. Следует учесть, что многие тяжелые металлы относятся к биологически активным соединениям, микроэлементам и жизненно необходимы для организмов. В связи с этим для некоторых из них не существует биологических барьеров при поступлении в организм, и они способны в значительных количествах концентрироваться в отдельных органах, тканях и даже субклеточных структурах.

В отличие от других химических веществ пестициды целенаправленно рассеиваются человеком в биосфере. Система химической защиты урожая к настоящему времени превратилась в новый, неведомый ранее экологический фактор. По сравнению с тяжелыми металлами механизмы токсического действия пестицидов

менее разнообразны и сводятся к нарушению нескольких метаболических процессов: преобразование энергии в хлоропластах и митохондриях, передача нервного импульса в нейронах и биосинтез некоторых жизненно важных для клетки соединений. Эти процессы, несмотря на очевидные различия, имеют общую черту: их ключевые этапы осуществляются на клеточных мембранах и катализируются специализированными мембранными белками.

В следующей главе подробнее рассмотрены закономерности формирования токсического и мутагенного эффектов у растений при действии ионов металлов.

2.3. Действие металлов на наследственный аппарат клетки

Важным свойством, определяющим биологическую эффективность ионов металлов, является их способность к комплексообразованию. Константы образования хелатных комплексов зависят от заряда, радиуса, степени гидратации иона металла и формы его электронных орбиталей, участвующих в образовании ковалентной связи с хелатной группой, а также нуклеофильностью лиганда. Токсичность растворов солей металлов положительно связана с электроотрицательностью, которая определяет способность металла вступать в химические реакции с образованием ионных или ковалентных связей. Важной характеристикой биологического действия ионов металлов является произведение растворимости их сульфидов.

Более токсичными являются металлы, образующие наименее растворимые сульфиды. Эта закономерность представляет собой отражение двух взаимосвязанных явлений: особого сродства многих металлов к тиоловым (сульфгидрильным) группам, с одной стороны, и биологической роли SH-групп — с другой. Значение сульфгидрильных групп для нормального состояния белков, осуществления физиологических и биохимических процессов общеизвестно. При реакции ионов металлов с сульфгидрильными группами образуются нерастворимые, слабо диссоциирующие меркаптиды, что является причиной осаждения белков. Высокое сродство к SH-группам проявляют Hg, Cd, Ag, Au, Sb, Cu, Pb и As^{3+}. Не образуют прочных соединений с тиолами Al, Cr, Mn, W, Ba, Ca, Zr, Mg, Th. Интересно отметить, что обусловливающее высокую токсичность свойство металлов образовывать малорастворимые соединения с сульфгидрильными группами лежит в то же время в основе механизма детоксикации этих элементов. Например, среди металлов, вызывающих повышенный синтез фитохелатинов, металлотионеинов, называют Hg, Cd, Ag и Au, тогда

как влияния Ca, Al и Mg на содержание в клетках этих металлсвязывающих белков не обнаружено.

В порядке снижения способности индуцировать генные мутации тяжелые металлы можно расположить в ряд: $As^{3+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$; по кластогенной активности (действие на хромосому): $ZnSO_4 > Pb(CH_3COO)_2 > Al(NO_3)_3 = NiSO_4 > CdCl_2 > CuSO_4$ и Al, Pb, Cd, Ni > Zn, Cu. Во всех случаях Cu, оцениваемый как высокотоксичный металл, проявляет низкую мутагенную активность. Способность кадмия вызывать повреждения ДНК ниже по сравнению с менее токсичным для клеток Pb.

В большинстве случаев при определенных концентрациях и времени воздействия регистрируют сначала достоверное увеличение уровня мутагенного эффекта, а затем при повышении дозовой нагрузки проявляется токсический эффект на уровне клеток, тканей и органов. В определенном диапазоне и мутагенный, и токсический эффекты постепенно нарастают. При высоких концентрациях токсический эффект усиливается, что может приводить к снижению экспериментально наблюдаемой частоты аберрантных клеток. Мутагенный эффект наиболее токсичных соединений выявляется при дозах, не превышающих EC_{50}. Бóльшие концентрации существенно уменьшают пролиферативную активность клеток, занижая частоту регистрируемых цитогенетических нарушений. Следует заметить, что эти закономерности прослеживаются в случае действия на растения Cd, Ni, Pb, Zn, Al, Ag, As. Мутагенные эффекты Sb, Cr (III, VI), Cu выявляются нерегулярно и, как правило, при низких концентрациях и времени воздействия.

Описанные закономерности реакции растений находятся в хорошем соответствии с известными механизмами действия ионов металлов. В основе молекулярных механизмов токсического и мутагенного действия металлов лежит их способность связываться с аминокислотами, белками, замещать близкие по физико-химическим свойствам ионы металлов в ферментах, генерировать реакционно-активные свободные формы кислорода.

Низкие концентрации металлов, еще не оказывающие токсического действия на клетки, могут снижать эффективность репарации повреждений ДНК. Это хорошо объясняет тот факт, что регистрируемые с помощью цитогенетических тест-систем нарушения ДНК (генные мутации, хромосомные аберрации) начинают проявляться при более низких концентрациях металлов по сравнению с теми, которые индуцируют токсические эффекты. Причем в зависимости от концентрации и физико-химических свойств ионы металлов влияют на разные ферменты и белки, вовлеченные в репарацию ДНК, и индуцируют разные повреждения ДНК.

Ионы металлов генерируют образование свободных форм кислорода, вызывающих повреждения оснований, одиночные разрывы ДНК и являющихся сигналом к изменению генной экспрессии и апоптозу. Причем концентрации металлов, индуцирующие развитие свободнорадикальных процессов, приводящих к образованию дополнительных повреждений ДНК, превышают те, которые снижают эффективность репарации оксидативных повреждений, вызываемых свободными формами кислорода, образующимися в течение аэробного метаболизма клеток. Параллельно усиливается инактивация ферментов репарации ионами металлов. Эти процессы, по-видимому, и обусловливают одновременное увеличение в определенном диапазоне концентраций, не превышающих, как правило, EC_{50}, уровня регистрируемых в цитологических экспериментах мутагенных и токсических эффектов.

Некоторые металлы образуют с ДНК аддукты, а также сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, являющиеся физическим барьером для осуществления репарационных процессов. Эти серьезные нарушения функционирования генома, приводящие к сильным токсическим эффектам и канцерогенезу, наблюдаются при высоких концентрациях металлов. Например, уровень гомологичной рекомбинации, необходимой для осуществления репарации межнитевых сшивок и двунитевых разрывов ДНК, не повышается при обработке *in vivo* клеток корней *Nicotiana tabacum* кадмием в нетоксичных концентрациях. Наряду с этим регистрируемая комета-тестом поврежденность ДНК ядер корней *Nicotiana tabacum* со сниженной каталазной активностью увеличивается при возрастании концентрации металла быстрее, чем у растений дикого типа. Причем уровень повреждений ДНК изолированных ядер корней растений, как мутантных, так и дикого типа, не повышался. Отсюда можно заключить, что кадмий в указанном диапазоне низких концентраций вызывает повреждения ДНК опосредованно, через развитие свободнорадикальных процессов, и эти повреждения не включают двунитевых разрывов и межнитевых сшивок.

Механизмы влияния металлов на ростовые процессы растений изучены в большей степени, чем механизмы, приводящие к мутагенным эффектам. Важным механизмом, обеспечивающим возможность функционирования образовательных тканей в неблагоприятных условиях, в том числе при избытке ионов металлов, является контроль клеточного цикла. У всех эукариот движение по клеточному циклу контролируется циклинзависимыми киназами (ЦЗК), которые связаны с определенными регуляторами — циклинами. На активность ЦЗК оказывают влияние внутриклеточные сигналы, в том числе индуцируемые внешней средой. В роли таких сигналов могут выступать повреждения ДНК и веретена

деления, изменение уровней содержания ауксина и цитокинина, окислительно-восстановительного гомеостаза и мембранного потенциала, величина которого непосредственно связана с ионными градиентами, в частности K^+, H^+, Ca^{2+}. В результате этих процессов изменяется длительность клеточного цикла за счет задержки в контрольных точках, в основном G_1/S, G_2/M, и/или продолжительности определенных фаз.

Важное значение задержки предсинтетической фазы в выживаемости клеток показано в исследованиях с дрожжами, насекомыми, млекопитающими и растениями. При прорастании семян задержка предсинтетической стадии играет особую роль, поскольку клетки эмбриона синхронизированы в G_1 либо на стадии G_1 и лишь частично G_2 в зависимости от вида. При неблагоприятных условиях увеличение продолжительности предсинтетической стадии, менее чувствительной к повреждающим ДНК воздействиям, обеспечивает возможность выживания меристематических клеток. Например, восстановление функций меристем растений при воздействии высоких концентраций кадмия осуществляется за счет клеток, находившихся во время обработки токсикантом в G_1.

В зависимости от концентрации ионы металлов могут индуцировать повреждения ДНК и/или нитей веретена деления. В обоих случаях осуществляется задержка клеточного цикла. При этом в ответ на повреждение митотического веретена происходит подавление анафазы, если же повреждена ДНК, может подавляться и распад циклинов, и активность сепаразы, необходимой для начала разъединения сестринских хроматид. Анеуплоидия, возникающая при действии солей Cd, Ni и Cr, вызвана нарушениями расхождения хромосом. При этом металлы не повреждают кинетохоры, а воздействуют непосредственно на нити веретена деления. Влияние высоких концентраций Cd на процесс расхождения хромосом к полюсам и цитокинез является следствием нарушения внутриклеточного баланса серы в результате связывания металла с SH-группами сократительных белков веретена и ферментов, ответственных за нормальный ход клеточного деления.

Некоторые металлы могут приводить к аномалиям митоза и удлинению по этой причине клеточного цикла не за счет непосредственного повреждения нитей веретена деления, а в результате нарушения других процессов, обеспечивающих нормальное движение хромосом к полюсам. Так, литий вызывает задержку или полную остановку анафазного движения хромосом в клетках волосков тычинок традесканции, ингибируя полифосфоинозитидный цикл.

Таким образом, снижение пролиферативной активности клеток образовательных тканей растений может являться следствием

разных процессов: с одной стороны, находящейся под генетическим контролем регуляции клеточного цикла, позволяющей сохранять нормальное функционирование меристем при воздействии металла за счет увеличения либо времени на репарацию ДНК, либо длительности стадии, во время которой ДНК менее чувствительна к внешним воздействиям; с другой стороны, нарушения расхождения хромосом к полюсам и цитокинеза, приводящего к изменению плоидности клеток меристем.

На фитоценозы оказывают одновременное влияние разные по природе факторы. В связи с этим особенно важно знать закономерности и механизмы совместного действия ионов металлов на растения. Изучение изменений физиолого-биохимических процессов, роста и развития растений при одновременном воздействии на них металлов началось в конце XIX в. в рамках агрохимических исследований. В проведенных исследованиях основное внимание обращалось на увеличение или снижение поступления в растения одного макро- или микроэлемента в присутствии другого; тогда же были введены понятия соответственно синергического и антагонистического характеров поступления ионов в клетки. Наибольший антагонизм проявляют элементы-аналоги или катионы одинаковой валентности, способные образовывать сходные комплексы.

На примере взаимоотношения пар Cd — Rb и Ca — Na показано, что увеличение поглощения двухвалентных катионов происходит при наличии в растворе одновалентного катиона в высокой концентрации. Механизм конкурентного поступления ионов металлов в растения имеет большое значение в снижении негативного влияния высокотоксичных элементов на метаболизм клеток в присутствии эссенциальных. Например, Ca уменьшает токсические эффекты многих металлов — K, Na, Mg, Al, Fe, Li, Cd, Co, Zn; Ba и Na снимают ингибирующее влияние Li на рост корней проростков пшеницы, хотя их защитный эффект выражен слабее, чем Ca; Zn и Se снижают токсическое действие Cd на растения.

При взаимодействии ионов металлов с внутриклеточными структурами инициируется множество последовательно и параллельно протекающих метаболических процессов, включающих, в частности, как активацию защитных механизмов, так и подавление их работы. Снижение микроэлементами неблагоприятного воздействия на растения токсичных металлов представляет собой явление закономерное, а потому наблюдается не только для водных культур, но и в вегетационных экспериментах при поглощении металлов из почвы.

При совместном действии в низких концентрациях ионы металлов, ингибируя ферменты репарации, могут приводить к си-

нергическому увеличению уровня мутагенного эффекта за счет реализации репарируемых в норме спонтанных и индуцированных оксидативных повреждений ДНК. Известно, что именно возникновение в комплементарных нитях ДНК расположенных недалеко друг от друга повреждений, вызванных каждым фактором в отдельности, является одной из наиболее вероятных причин появления трудноре парируемых двунитевых разрывов. Имеются сведения, что As (III), Ni (II), Co (II), Cd, Hg, Pb уже в наномолярных концентрациях ингибируют ферменты эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, усиливая таким образом мутагенный эффект УФ-радиации и бенз(а)пирена. Усиление развития свободнорадикальных процессов также является причиной возникновения синергических реакций клеток растений при совместном действии ионов металлов.

Достоверные синергические мутагенный и токсический эффекты, индуцируемые у растений (*Tradescantia* (клон 02), *Allium cepa*, *A. schoenoprasum*, *Hordeum vulgare*) при совместном действии различающихся физическими и химическими свойствами металлов, присутствующих как в двухкомпонентных модельных либо сложных по составу природных растворах, так и в почве, являются закономерными событиями и с наибольшей вероятностью возникают в диапазоне концентраций, характерных для условий слабо- и среднезагрязненных металлами территорий. Увеличение интенсивности воздействия ведет к проявлению достоверных токсических эффектов, регистрируемых (в зависимости от силы совместного влияния факторов) на уровне тканей, органов или организма в целом.

В диапазоне низких доз действующих факторов обнаруживаются и антагонистические эффекты, проявляющиеся в снижении частоты мутаций без замедления митотической активности клеток или в ускорении ростовых процессов растений.

В целом тяжелые металлы являются сильным токсичным и мутагенным фактором, причем их совместное действие может привести к достоверно высоким мутагенным и токсическим эффектам, которые не возникают при раздельном действии факторов в таких же дозах.

Глава 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМ, ПРИМЕНЯЮЩИХСЯ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

3.1. Базовые принципы генотоксических тестов на растениях

Мутации на генном уровне включают замещения оснований или сдвиг рамки считывания, который происходит вследствие встраивания или удаления оснований. Генные мутации ведут либо к инактивации гена, либо к изменению его функции. В частности, мужские гаметофиты могут быть эффективно использованы в программах скрининга мутагенов, базирующихся на большом количестве просмотренных клеток. Одно из преимуществ этой тест-системы связано с гаплоидным состоянием пыльцевых зерен. Поэтому все мутации, оказывающие влияние на развитие пыльцы, легко фиксируются. Оценка частоты абортивных пыльцевых зерен отражает нарушения практически во всех частях генома. Основные критерии распознавания абортивных пыльцевых зерен: размер значительно больше нормального; измененная форма; плохое прокрашивание, поскольку абортивные пыльцевые зерна не окрашиваются. Кроме того, *waxy* и алкогольдегидрогеназа — гены, мутации в которых ведут к разным фенотипическим изменениям и часто используются для оценки мутагенного воздействия. Эти тест-системы могут не только быть использованы для диагностики мутагенных эффектов индуцированных низкими уровнями поллютантов, но и предоставлять информацию о природе индуцированных мутаций.

Цитогенетический анализ тканей растений (главным образом кончиков корней, верхушечной и интеркалярной меристемы) является одним из наиболее широко используемых, простых, надежных и недорогих методов. С помощью цитогенетических методов можно *анализировать как аберрации хромосом, так и геномные мутации.* Геномные мутации представляют собой изменение числа хромосом в клетке, которое может заключаться в увеличении копий всего гаплоидного набора хромосом (полиплоидия), либо в изменении числа индивидуальных хромосом (анеуплоидия). Структурные перестройки легче всего анализировать в анафазе и метафазе. Закономерности формирования цитогенетических эффектов идентичны в половых и соматических

клетках. Поэтому и половые (пыльцевые зерна на стадии мейоза и митоза) и соматические клетки (клетки меристемы кончика корня, интеркалярной и апикальной меристемы) могут быть использованы для цитогенетического анализа.

Цитогенетические нарушения многие годы использовались как мера репродуктивного успеха у растений. Частота цитогенетических нарушений коррелирует с морфологическими изменениями, фертильностью, стерильностью и другими характеристиками растений. Частота разных видов цитогенетических нарушений при действии агентов, различающихся механизмами биологического действия, может увеличиваться по-разному. Например, ионизирующее излучение увеличивает главным образом частоту аберраций хромосом (делеции, транслокации), в то время как химические агенты чаще индуцируют генные мутации или нарушения митотического аппарата (мультиполярные митозы, отставшие хромосомы). Вместе с частотой нарушений в митотических и мейотических клетках полезно оценивать также митотический индекс и долю клеток в разных фазах митотического цикла (профаза, метафаза, ана-телофаза). Продолжительность разных стадий митоза дает дополнительную информацию о специфических закономерностях биологического действия поллютантов.

Наиболее информативен *цитогенетический анализ в метафазе*. Он позволяет не только оценить общую частоту хромосомных перестроек, но и определить все виды хромосомных и хроматидных нарушений с высокой точностью. Если хромосом в кариотипе немного и они морфологически различны, метафазный анализ позволяет точно определить, какая из хромосом повреждена. Оценка цитогенетических нарушений облегчается при использовании видов растений, имеющих небольшое количество крупных хромосом, таких как *Crepis capillaries* ($2n = 6$), *Vicia faba* ($2n = 12$), *Hordeum vulgare* ($2n = 14$), *Allium cepa* ($2n = 16$), диплоидные ($2n = 12$) и триплоидные ($2n = 24$) клоны *Tradescantia*.

Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) предоставляет новые возможности для изучения аберраций хромосом, поскольку позволяет обнаруживать наследуемые в ряду клеточных поколений изменения, такие как реципрокные транслокации, инверсии и инсерции, которые сложно обнаружить стандартными цитогенетическими методами. Этот метод позволяет определить и более детально локализовать хромосомные перестройки в митозе и мейозе. В нем используют пробы ДНК, комплементарные к определенной хромосоме, определенному участку хромосомы или гену. Определение меченного флуоресцентными антителами участка осуществляется с помощью флуоресцентного микроскопа. Детальный анализ хромосомных перестроек в интерфазном ядре с помощью FISH-метода особенно актуален для тканей,

в которых мутагенное воздействие ведет к замедлению деления клеток.

Для быстрой оценки качества окружающей среды используют *анафазный метод* и *микроядерный тест*. Анафазный анализ дает информацию о разных типах цитогенетических нарушений: хроматидные (одиночные) и хромосомные (двойные) мосты и фрагменты, а также митотические аномалии (мультиполярные митозы и отставшие хромосомы). Источником хромосомных аберраций являются повреждения хромосом, в то время как митотические аномалии возникают вследствие нарушений в митотическом аппарате, в частности веретена деления. Микроядра представляют собой экстраядерные образования, источником которых могут служить поломки хромосом либо нарушения митотического аппарата. Оценивать частоту микроядер легче, чем аберрации хромосом. Несколько сравнительных исследований показали, что микроядерный тест по чувствительности к генотоксическим агентам не уступает тестам, основанным на аберрациях хромосом. Для формирования микроядер необходимо деление клеток, поэтому микроядерный тест не может быть использован, если деление клеток подавлено. Поэтому при разработке протокола микроядерного теста принимают во внимание продолжительность клеточного цикла и обусловленную воздействием возможную задержку деления. В микроядерном тесте на традесканции используется специфическая стадия развития пыльцевых зерен (ранние тетрады), поэтому информация о продолжительности воздействия и времени, необходимом для деления материнских пыльцевых клеток, должна быть включена в план эксперимента. При оценке цитогенетических эффектов в корневой меристеме должна быть определена локализация области меристемы, где клетки делятся после воздействия.

Алкалиновый *метод комет* позволяет определить одиночные и двойные разрывы ДНК, неправильно или не до конца репарированные участки ДНК и изменения конформации ДНК с помощью анализа миграции ДНК через агарозный гель в электрическом поле. Было развито много методик, и измерение нескольких показателей (длина хвоста, хвостовой момент и др.) обосновано для оценки повреждения ДНК методом комет. Этот метод может быть очень полезен при исследовании репарации повреждений ДНК, индуцированных различными агентами в клетках разных типов. Одна из специфических проблем, возникающих при применении метода комет на растениях, связана с необходимостью удаления клеточной стенки без повреждения ядра.

Соматические рекомбинации и *сестринские хроматидные обмены* являются результатом изменений в хроматидах, которые могут влиять на экспрессию генов. Эти события не приводят к

изменению генетической информации, но отражают дестабилизацию генома вследствие повышенной рекомбиногенной активности. Сестринские хроматиды становятся видимыми с помощью включения бромдезоксиуридина в ДНК вследствие разного прокрашивания хроматид, содержащих и не содержащих BrdU. Методика оценки соматической рекомбинации и сестринских хроматидных обменов разработана для клеток корней *Vicia faba* и *Crepis capillaries*, а также для трансгенных *Arabidopsis* и *Nicotiana tabacum*.

В целях генетического мониторинга окружающей среды оценивают частоту доминантных и рецессивных *эмбриональных леталей*. Доминантные эмбриональные летали у гетерозигот генерации М1 ведут к нарушениям эмбрионального развития или могут проявиться на стадии всходов. Рецессивные летальные мутации могут проявляться на гаплоидной стадии развития и приводить к летальности гомозигот генерации М2. Эмбриональные летали подразделяют на семь основных групп. Летали типов *sicca*, *brevis*, *vana* и *diffusa* приводят к нарушению развития эмбриона в начале стадии дифференциации семядолей. В созревших стручках такие эмбрионы могут быть обнаружены по коричневой пигментации растительных тканей. Эмбриональные летали *mucca*, *parva* и *fusca* проявляются в нежизнеспособности потомства на стадии проростков. Хлорофильные мутации (*albina*, *lutea*, *xantha chlorine*) можно регистрировать одновременно с эмбриональными леталями.

Флуктуирующую асимметрию определяют как ненаправленную изменчивость левой и правой стороны билатерального признака. Она может увеличиваться в результате неспособности контролировать онтогенетическое развитие в условиях генетического или внешнего стресса. Флуктуирующая асимметрия возрастает с увеличением загрязнения окружающей среды. Исключением являются устойчивые к загрязнению виды, такие как *Salix borealis*. Поскольку обладающие большей симметрией организмы демонстрируют бóльшую приспособленность, увеличение флуктуирующей асимметрии может рассматриваться как индикатор вредного воздействия.

Некоторые растения позволяют анализировать отклик на внешнее воздействие одновременно нескольких тест-систем. Такой подход дает возможность получить более реалистичную и глубокую картину действия поллютанта. Так, при обработке семян ячменя мутагеном одновременно можно определять следующие показатели: частоту мутаций в специфическом локусе (например, *waxy*) и множественных локусах; частоту аберраций хромосом в митозе и мейозе; частоту микроядер в мейотических тетрадах; стерильность; частоту эмбриональных леталей; частоту разрывов ДНК.

3.2. Базовые принципы генотоксических тестов на животных

За последние 25 лет достигнуты значительные успехи в области генотоксикологии с использованием млекопитающих, особенно с приходом молекулярных методов. Из млекопитающих в генотоксикологических исследованиях широко используются мелкие грызуны, такие, как мыши и крысы. Они приняты в качестве «золотого стандарта» при экстраполяции полученных данных на человека. Считается, что если вещество индуцирует мутации в половых клетках мышей, то оно с большой вероятностью будет индуцировать мутации в половых клетках человека. Если вещество проявляет мутагенную активность в соматических клетках мышей, то с большой вероятностью оно будет проявлять и канцерогенную активность. Данный принцип основан на многочисленных фактах и сформулирован как принцип «параллелограммы Собельса». Схемы поэтапного тестирования и построения батареи тест-систем для оценки потенциальности генетической опасности факторов среды основаны именно на этом простом принципе, поскольку нет никакой возможности прямого учета генетической активности факторов среды на человеке, кроме эпидемиологического исследования. Все методы с использованием мышей и крыс в качестве тест-объектов хорошо валидизированы на большом экспериментальном материале, в том числе на международном уровне. Периодически проводится процедура международной гармонизации этих методов с целью повышения воспроизводимости результатов, получаемых в разных странах и лабораториях при изучении одних и тех же агентов среды.

В отличие от генотоксикологии с использованием млекопитающих, сосредоточенной на ограниченном числе модельных видов, попытки оценки состояния морской среды с помощью генетических тест-систем недостаточно скоординированы, к тому же развиваются медленно и фрагментарно. В то же время на молекулярном уровне у морских беспозвоночных индуцируются повреждения, качественно схожие с повреждениями, обнаруженными у высших организмов (генные мутации, разрывы нитей ДНК и аберрации хромосом).

Многие виды морских беспозвоночных (двустворчатые моллюски, ракообразные, полихетные черви и т. д.) прямо или косвенно связаны с пищевой цепью человека. Многие из этих организмов способны трансформировать биологически активные метаболиты и аккумулировать токсиканты в своих клетках и тканях в значительно бóльших количествах, чем обнаруживается в окружающей среде.

Беспозвоночные, которые составляют более 90 % населяющих биосферу видов, играют важную роль в функционировании экосистем. Для мониторинговых исследований в морской среде особенно удобны неподвижные виды. В настоящее время особое внимание в национальных и международных программах обращено на морских моллюсков (*Mytilus* spp.). Двустворчатые моллюски, в основном *Mytilus edulis / Mytilus galloprovincialis*, широко используются для обнаружения и мониторинга химических поллютантов в прибрежных водах. Интересный аспект использования двустворчатых в водной токсикологии заключается в том, что в отличие от других беспозвоночных механизм стимуляции канцерогенеза (как опухолей, так и злокачественных заболеваний кроветворной системы) у них аналогичен таковому у млекопитающих.

В этой главе основное внимание уделяется тестам (скрининговым методам), которые применяются в последние 20—30 лет для оценки генотоксичности на уровне клетки и на ранних стадиях развития морских беспозвоночных. Для удобства все подходы разделены на две категории в соответствии с размерами мишени: 1) видимые эффекты на хромосомном уровне (макроповреждения); 2) изменения на биохимическом и молекулярном уровнях (микроповреждения). Первая группа методов предполагает, что клетки находятся в стадии деления: структурные и количественные аберрации хромосом, сестринские хроматидные обмены и микроядра. Вторая группа методов предполагает нахождение клеток в интерфазе.

Макроповреждения. Из всех генетических эффектов, индуцированных факторами окружающей среды, *структурные и количественные аберрации хромосом* дают наилучшую информацию о значимости воздействия как на клетки, так и на целый организм. Метод основан на знании количества и морфологии хромосом, полученном в таксономии и эволюционном учении в 1960—1970-х гг. Несмотря на то что метод учета *метафазных аберраций* является наилучшим способом обнаружения генетических повреждений, главное ограничение этого теста применительно к морским беспозвоночным исходит из недостаточного количества клеточных линий *in vitro* и недостаточной информации относительно кариотипа (табл. 3.1).

Более того, недостаток хорошо дифференцированных, интенсивно делящихся областей и низкая скорость обновления клеток, особенно в природных условиях, ограничивают применение этого подхода на беспозвоночных. Однако изучение эмбрионально-личиночных стадий развития представителей двух экологически важных таксонов беспозвоночных — двустворчатых моллюсков и полихет — расширило понимание хромосомных характеристик

Таблица 3.1. **Различия между клетками млекопитающих и морских беспозвоночных**

Признаки	Млекопитающие	Морские беспозвоночные
Терморегуляция	Гомойотермные	Пойкилотермные
Скорость деления клеток	Высокая	Низкая
Кроветворные органы	Костный мозг и т.д.	Отсутствуют или диффундированы
Чувствительность к митогенам	Известна	Нет
Клеточная культура	Много устоявшихся клеточных линий	Нет клеточных линий
Кариотипы	Хорошо изучены	Плохо изучены
Хромосомные группы	Есть	Нет
Красители хромосом	Есть	Нет
Репродуктивный выход	Низкий	Высокий, но сезонный

беспозвоночных, что дало новые возможности проводить анализ кариотипа с высокой степенью точности и надежности.

Два других фундаментальных различия между клетками морских беспозвоночных и млекопитающих вносят серьезные ограничения в использование и развитие хромосомных методов. Первое различие заключается в недостатке культур клеток и клеточных линий *in vitro* и отсутствии факторов роста, индуцирующих деление клетки морских беспозвоночных.

Другая группа различий состоит в том, что у морских беспозвоночных хроматин гомогенно диспергирован, тогда как у более высоких таксонов сгруппирован гетерогенно. Тем не менее уже получена жизнеспособная культура клеток жабр *Mytilus*, хотя этот подход пока не получил дальнейшего развития. Мало работ посвящено дифференциальному прокрашиванию хромосом (G, C и R группы). При проверке видовых данных дифференцированным прокрашиванием были выделены специфические хромосомные участки, показавшие, что большой объем кариотипа не дифференцирован. Таким образом, невозможность дифференциального прокрашивания ограничивает знания в

морфологии хромосом, что препятствует более точному анализу хромосомных аберраций.

Анафазный анализ (АА) был впервые рекомендован для использования в генотоксикологии млекопитающих три десятилетия назад. Метод анафазных аберраций для обнаружения нарушений хромосом, множественных анафаз, мостов или фрагментов применяется по отношению к морским беспозвоночным уже более двух десятилетий. Особенно часто используются эмбрионы морских ежей и личинки, которые продемонстрировали свою высокую чувствительность к воздействию мутагенов (например, бенз(а)-пирен) по тесту плодовитости и развития на личиночной стадии, включая высокочувствительный 48 ч-тест. Недавно АА был успешно применен на развивающихся эмбрионах *Pomatoceros lamarckii* — морских червях-трубочниках из семейства малощетинковых, чьи гаметы могут служить индикатором генотоксического воздействия и подходят для исследований в лабораторных и природных условиях.

В литературе по исследованию млекопитающих встречается мнение о важности *полиплоидии* как теста для оценки генотоксических эффектов. Показано, что эмбрионы моллюсков (*M. edulis*), развивавшихся в загрязненных доках, демонстрируют высокую частоту анеуплоидии, но не полиплоидии в отличие от животных, собранных в открытом море. В лабораторных условиях использовали эмбрионов полихеты *P. lamarckii*, и полиплоидия наблюдалась с частотой 0,5 % после острого воздействия би-бутилфталатом в концентрации не ниже 10^{-5} М. Основываясь на ограниченном числе работ в этой области, можно утверждать, что полиплоидия не может быть признана чувствительным генотоксическим тестом у морских беспозвоночных.

Методом *флуоресцентной гибридизации in situ* (FISH-метод) получено большое число последовательностей ДНК беспозвоночных, размещенных в общедоступной базе данных (ген-банк). FISH-метод был использован для изучения анеуплоидии в интерфазном ядре, полученном из эмбриона полихеты *P. lamarckii*, в анализе рибосомальной ДНК из пробы *M. galloprovincialis*, амфипод, моллюсков и полихет.

Эти исследования вскрыли две проблемы: 1) трудности разделения истинной анеуплоидии и реплицированных хромосом (проблема связана с несинхронностью клеточной популяции); 2) тенденцию неверной интерпретации некоторых результатов FISH-метода, когда хромосомы скрыты эмбриоцитоплазмой (это никогда не описывалось в исследованиях на млекопитающих). Если не обращать внимания на эти особенности, метод демонстрирует высокую пригодность для скрининга анеуплоидии. Этот и другие развивающиеся методы, основанные на молекулярной

цитогенетике, открывают новые возможности их применения в экогенотоксикологии.

Микроядерный (МЯ) *тест* с использованием морских беспозвоночных имеет важные особенности, и это главным образом относится к видам двустворчатых, тестируемых как в природных, так и в лабораторных условиях. В тесте МЯ часто используют жабры и гемолимфу (гемоциты) двустворчатых моллюсков. Использование гемоцитов имеет некоторые преимущества: 1) эти клетки относятся к открытой системе и являются удобной средой для равномерного воздействия токсикантом; 2) лабораторные исследования подтвердили, что эти клетки чувствительны к воздействию генотоксикантами; 3) эти клетки могут быть получены независимо от репродуктивной фазы развития животного (в отличие от эмбриональной и личиночной стадий); 4) метод может быть дополнен другими цитогенетическими и генетическими методами оценки степени повреждения ДНК; 5) метод подходит как для лабораторных, так и для природных исследований, включая изучение клеточных трансплантаций.

Несмотря на потенциальные преимущества использования гемоцитов двустворчатых моллюсков в МЯ-тесте, очевидно, что эта система должна быть опробована в лабораторных условиях, прежде чем ее использовать в природных условиях. В частности, индукция цитогенетических повреждений зависит от стадии клеточного цикла. В опытах, проводящихся в природных условиях, у моллюсков обнаружена тенденция к вариабельности еще до отбора образцов, создающая определенные трудности при сравнении и интерпретации результатов.

Одним из ограничений в использовании гемоцитов моллюсков является то, что большинство исследователей не смогли продемонстрировать специфику типа клеток. Это важно, потому что не хватает конкретных знаний о гемоцитах субпопуляций и их происхождении у беспозвоночных. У двустворчатых моллюсков гемоциты могут быть классифицированы морфологически как негранулированные и гранулированные клетки. Гемоциты *M. edulis*, например, могут быть разделены на базофильную и эозинофильную группы, включающие в себя негранулированные и гранулированные клетки, в меньшей степени только гранулированные. Гранулированные гемоциты *M. edulis* содержат два разных типа гранул, которые могут отличаться по размерам, содержанию лектина и энзимов. Несмотря на эти гематологические трудности, некоторые исследователи сделали попытку отделить популяцию негранулированных клеток для количественной оценки индуцированных МЯ и обнаружили, что гранулированные гемоциты менее чувствительны по сравнению с негранулированными. Предположительно индукция МЯ в гемоцитах двустворчатых имеет

некоторый предел, а уровень образования МЯ не превышает контроль более чем в три раза.

Использование клеток жабр двустворчатых моллюсков в МЯ-тесте также имеет ряд ограничений. Во-первых, в сравнении с гемоцитами клетки жабр могут быть получены от особи только один раз. Во-вторых, для анализа твердых тканей требуются обработка энзимами (например, протеазами или диспазами) плюс отмывание и инкубация в разных буферах для получения однородной клеточной суспензии, что делает метод более сложным в применении. Более того, клеточная суспензия из филаментов жабр гетерогенна по составу (подобно гемоцитам), что может повлиять на их чувствительность. По крайней мере, два типа клеток идентифицированы в жабрах моллюсков. Больше клеток круглых, с хорошо видимым ядерным хроматином, что отличает их от более мелких клеток, характеризующихся компактным ядром и более высоким соотношением ядро:цитоплазма. Для МЯ-теста важно, однако, что только крупные негранулированные сферические клетки с четко оформленным ядром подходят для исследования клеток жабр.

Несмотря на ограничения в использовании гемоцитов моллюсков, (1) система гемоцитов является должным образом апробированной в диапазоне концентраций загрязняющих морскую среду агентов, вызывающих генотоксический эффект (по критерию чувствительности, репродуктивности и достоверности); (2) можно проследить кинетику индукции микроядер после периода воздействия по разным сценариям; (3) внутриндивидуальная изменчивость, если такая имеется, оценивается систематически и многократно путем экстракции гемолимфы от нескольких особей, система гемоцитов которых адаптирована к природным условиям; (4) чувствительность биологического теста сопоставима с химическим анализом определения генотоксичности.

Биотест на морских ежах широко применяется как чувствительный индикатор токсичности при исследованиях морской среды. Морские ежи, подобно двустворчатым моллюскам, широко распространены. Виды, регулярно образующие гаметы, могут быть пригодны для тестирования в лабораторных условиях. Наряду с другими эмбрио-личиночными видами анализов преимущество описанной системы в том, что она позволяет изучать такие ключевые события в эмбриогенезе, как фертильность, эмбриональное и личиночное развитие. Эти ключевые точки могут быть изучены параллельно при обнаружении эффекта загрязнения на репродуктивность организма, одного из ключевых параметров экотоксикологии. Следовательно, предложенный экспресс-тест позволяет выполнить скрининг генотоксичности, тератогенности и эмбриотоксичности вместе, дополнительно к индукции МЯ. Этот тест также используется при изучении анафазных аберраций.

В отличие от аберраций хромосом и микроядер *сестринские хроматидные обмены* (СХО) предлагаются как возможные биомаркеры воздействия. Однако СХО остаются не более чем приложением к другим цитогенетическим методам.

Микроповреждения. Наиболее применяемым в генотоксикологии методом определения микроповреждений у морских беспозвоночных является *гельэлектрофорез отдельных клеток*, или *комета-тест*. Большинство работ проводят на морском моллюске *M. edulis*, лишь некоторые используют виды *Crossostrea virginica*, *Patinopecten yessoensis*, *Tapes japonica* и *Palaemonetes pugio*. По сравнению с другими методами комета-тест продемонстрировал высокую чувствительность, сопоставимую с наблюдениями на млекопитающих. Несмотря на небольшое количество природных экспериментов и полученных данных, ясно продемонстрировано, что комета-тест может быть использован для обнаружения химического загрязнения воды, а также синергического взаимодействия УФ-излучения и поллютантов. Однако и в лабораторных, и в природных экспериментах были продемонстрированы значительные уровни индивидуальной изменчивости, включая сезонные отличия. Это подчеркивает необходимость быть внимательными при планировании экспериментов и выборе контроля. Особое значение имеет правильная оценка количества повторностей в контроле при длительном эксперименте. Комета-тест может быть также использован, например, для визуализации повреждений ДНК в сперматозоидах полихет *P. lamarckii*, которые были подвержены различным воздействиям.

У млекопитающих комета-тест активно применяется при анализе репарации ДНК. По причине того, что повреждения ДНК могут иметь разнообразное и комплексное происхождение, изменение акцента с мутагенеза на кинетику репарации ДНК представляет привлекательную альтернативу как в отношении маркера воздействия, так и в плане преодоления сомнений относительно конечного этапа регистрации повреждений ДНК. Различия в репарации ДНК регулярно наблюдаются в природе в результате сезонной вариабельности уровней детоксикации энзимов, репродуктивного статуса и как части процесса старения. Именно поэтому им следует уделять особое внимание, чтобы правильно интерпретировать результат. Преимущества и недостатки метода показаны в табл. 3.2.

Главное преимущество комета-теста в том, что он чувствительный, быстрый и при этом относительно недорогой. Метод может быть применен *in vitro* и *in vivo* на разных видах клеток (жабры, пищеварительная железа, гемоциты, генеративные органы, эмбрионы и личинки) и, что важно, без каких-либо требований к делению клетки. К тому же тест используется в генотоксикологии

Таблица 3.2. **Преимущества и недостатки применения комета-теста**

Преимущества	Недостатки
Низкая стоимость. Относительно быстрый. Специальная компьютерная программа позволяет обеспечить высокую воспроизводимость. Высокая чувствительность. Необходимо только базовое оборудование для молекулярного анализа. Достаточно небольшого количества клеток (10^4—10^5). Работа с практически любыми типами клеток. Не требуется клеточного деления и знаний о кариотипе. Применим на автономном уровне, важном при работе с клетками, у которых проявляется гетерогенный ответ. Разделяет генотоксины и цитотоксины. Хороший результат в натурных экспериментах на природных популяциях. Не специфичен конечный результат (для биомониторинга)	Нет руководящих рекомендаций для работы с морскими беспозвоночными. Требователен ко времени установки образцов для проведения электрофореза. Не специфичен конечный результат

млекопитающих. Но стандартизованной методики для исследования морских беспозвоночных нет. Как было показано выше, различия в методике могут привести к принципиальным различиям в результатах. Состав лизирующего буфера, длина раскрутки и электрофорез, как и условия пробега, меняются, что может повлиять на результат. Другим важным элементом является выбор процедуры диссоциации. Потеря целостности ДНК описана для клеток, обработанных трипсином, который обычно используется для процедуры энзимной диссоциации, применяемой в анализе. Подобно этому, когда используется неэнзимный механический метод отделения клеток жабр моллюсков, наблюдается увеличение количества повреждений ДНК после длительного периода диссоциации.

В то время как предварительно замороженные клетки млекопитающих успешно применяются в исследованиях, высокое содержание соли в клетках морских беспозвоночных (до 3,5 %) приводит к повреждению клеток во время замораживания. Транспортировка живых животных может повести за собой увеличение уровня повреждений ДНК как результат стресса, происходящего, например, под действием лизосомальной дестабилизации. Зная эти проблемы на гель-агарозном этапе вплавления и при электрофорезе, необходимо одновременно отобрать животных, клетки которых комплексно наносятся на природные амплификаторы. Однажды сделанные слайды могут храниться в лизирующем буфере несколько месяцев без какого-либо появления признаков повреждения ДНК. После электрофореза слайды могут быть дегидратированы в абсолютном спирте и длительно храниться.

Изменяя pH буфера, можно добиться разделения двунитевых повреждений (используя нейтральный для клеток pH 8,3 в комета-тесте) от однонитевых разрывов (щелочная версия с pH > 13). Так, в щелочно-лабильных сайтах (таких как пурин/пиримидиновые сайты) происходят однонитевые разрывы ДНК при pH ≥ 12,5. Стандартная щелочная версия биотеста не позволяет найти отличия между природными щелочно-лабильными сайтами и повреждениями, индуцированными факторами окружающей среды. Однако, используя методологические усовершенствования, можно разделить природные щелочно-лабильные сайты (pH ≥ 13) и индуцированные однонитевые разрывы (pH 12,1). Возможность различить все три типа повреждений однозначно подчеркивает как чувствительность, так и пригодность метода.

Гель-электрофорезный тест (ГЭ) является официально утвержденным биотестом. На клетках млекопитающих продемонстрированы некоторые его ограничения, особенно при использовании в природных условиях. В отличие от комета-теста ГЭ-тест имеет ряд преимуществ. Он прост в исполнении, на результат не влияют длительность процедур и консервирование образцов. ГЭ-тест имеет много общего с комета-тестом в принципах и количественном обнаружении эффекта: измерении пробега и дисперсии фрагментов ДНК в электрическом поле. Но в случае ГЭ-теста это относится к совокупности клеток, а не к одиночным изолированным клеткам. Консервировать ткани можно в BLB-буфере (5 % SDS, 250 мМ EDTA, pH 8, 50 мМ трис, pH 8), который непохож на другие консерванты тем, что не приводит к высокому уровню повреждений ДНК. ГЭ-тест достаточно прост и состоит из пяти этапов: отбор образцов/воздействие, консервирование, экстракция ДНК, электрофорез и количественный анализ. ГЭ-метод имеет важное преимущество в том, что в нем могут быть использованы любые клетки или ткани, (0,1 — 3)%-й агарозный гель способен разделить фрагменты ДНК разных размеров по шкале (0,5 — 23,1 кб; > 23,1 кб).

С точки зрения токсикологии большинство повреждений ДНК и особенно однонитевых разрывов не эффективны, так как они быстро репарируются. Двунитевые разрывы — более серьезное последствие воздействия. Они являются основой многих структурных аберраций хромосом и разрушающих молекулу событий, которые могут иметь серьезные последствия для клетки, повреждений или неопластической трансформации. Двунитевые разрывы могут быть визуально обнаружены в гелях с нейтральным значением pH. В случае с морскими двустворчатыми и полихетами, имеющими природный высокий уровень щелочно-лабильных сайтов, использовать этот тип геля предпочтительнее, чем щелочную версию.

Подход, связанный с обнаружением *аддуктов ДНК*, в мониторинге окружающей среды был впервые применен на некоторых видах рыб. Имеются исследования с использованием ^{32}P-постмечения для обнаружения аддукторов ДНК у близкородственных видов *M. edulis* и *M. galloprovincialis*. Эти исследования продемонстрировали как чувствительность метода, так и возможность оценить биологическую составляющую эффекта. В настоящее время аддукты ДНК рассматриваются как *биомаркеры воздействия*.

В генотоксикологии млекопитающих применяется поэтапный скрининговый подход, который признан универсальным в тестах *in vitro* для обнаружения генотоксичности. Если генотоксичность выявлена одним или более тестами, примененными *in vitro*, то следует далее оценить, проявляется ли генотоксичность на более высоких уровнях биологической организации.

3.3. Критерии подбора тест-систем для генетического мониторинга

Несмотря на то что в настоящее время известно несколько сотен тест-систем, в реально осуществляемых программах биотестирования используется ограниченный набор хорошо зарекомендовавших себя тестов. Выбранные для оценки состояния экосистем тест-объекты и тест-системы должны отвечать ряду требований, важнейшие из которых — чувствительность, информативность и технологичность. В качестве показателя, характеризующего информативность тест-систем, используют величину отношения сигнал/шум, или инкремента отклика биологической системы. Из этого, в частности, следует, что генетические тест-системы, характеризующиеся низким уровнем спонтанного мутагенеза (волоски тычинок традесканции, лимфоциты человека), имеют высокую информативность и могут быть использованы для анализа биологических эффектов низких доз и концентраций.

Информативность использования некоторых тест-систем повышает возможность одновременной регистрации разных по механизмам возникновения биологических эффектов. Так, при анализе волосков тычиночных нитей традесканции одновременно можно оценивать мутагенные, токсические и тератогенные эффекты. Отсюда следует принцип комплексности тестов: при анализе внешних воздействий желательно использовать тест-системы, позволяющие одновременно регистрировать разные по механизмам возникновения биологические эффекты.

В условиях комбинированного техногенного загрязнения важное значение приобретает принцип идентификации действующих факторов, в соответствии с которым система используемых тестов должна позволить оценить вклад каждого фактора в наблюдаемую изменчивость. Оценка относительного вклада факторов в наблюдаемую изменчивость с помощью генетических тест-систем основана на том фундаментальном факте, что ни один из известных стрессоров не способен создавать новые биологические феномены (т. е. новые типы мутаций), однако частота выхода разных типов мутаций увеличивается под воздействием разных мутагенных факторов не в одинаковой степени. Существуют также определенные различия в относительных частотах спектров спонтанных и индуцированных внешними факторами мутаций.

Важно отметить, что действие повреждающих агентов не всегда приводит к увеличению частоты генетических нарушений. В то же время увеличение дисперсии индивидуальных частот аберраций хромосом в популяциях является одним из признаков хронического низкодозового генотоксического воздействия, даже если средние значения в сравниваемых группах статистически достоверно не различаются. Поэтому сравнение контрольной и экспериментальной выборок по средней арифметической величине наблюдаемого эффекта в условиях действия низких доз и концентраций может оказаться недостаточным. В этом случае необходимо проводить сравнение спектра мутаций и величины дисперсии.

Любой вид мониторинга не возможен без системы «просеивающих» тестов, поэтому исследователь должен располагать не только набором тест-объектов, но и точными и воспроизводимыми методами генетического скрининга. Биологические тест-системы должны отвечать следующим требованиям:

- выявлять все типы генетических повреждений, т. е. геномные, хромосомные и генные мутации;
- быть настолько чувствительными и специфичными, чтобы обнаружить эффекты даже малых доз мутагенов;
- быть достаточно экспрессивными, недорогими и давать устойчивые, воспроизводимые результаты;

• обнаруживать соединения, которые, будучи безвредными сами по себе, при попадании в живой организм способны становиться мутагенами за счет превращений, происходящих с ними в клетках и тканях;

• позволять экстраполировать полученные результаты при количественной оценке генетического риска на другие организмы.

Любая отдельная тест-система не может одновременно соответствовать всем этим требованиям. Обычно прибегают либо к ступенчатому тестированию генетически активных факторов, либо к использованию батареи тестов. Такой подход повышает надежность идентификации и оценки изучаемых факторов. Для вегетативно размножающихся культур системы тестирования будут связаны с оценкой состояния соматических клеток. Для генеративно размножающихся культур тест-системы используют при анализе генеративной сферы. При этом важно учитывать способ размножения. Растения могут быть как самоопылителями, так и перекрестно-опыляемыми культурами, где играют роль как качество, так и количество пыльцы. Важны также особенности онтогенеза. У однолетних культур он будет отличным от многолетних (например, пшеница и люцерна).

Чаще других используют следующие тесты:

• тесты на выявление генных мутаций (тест Эймса с бактериями *Salmonella typhimurium*, тест на индукцию рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций у *Drosophila melanogaster*, тест на индукцию соматических мутаций у дрозофилы, waxy-мутации пыльцевых зерен растений и др.);

• тесты на индукцию повреждений ДНК (метод ДНК-комет, анализ внепланового синтеза ДНК, метод щелочной элюции ДНК);

• цитогенетические исследования (тесты на индукцию аберраций хромосом у растений или в соматических клетках млекопитающих и человека, тест на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих);

• исследование потенциальной канцерогенности изучаемого фактора (тесты на трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у модельных животных, тест на нарушение метаболической кооперации в смешанной культуре соматических клеток млекопитающих).

Важным преимуществом цитогенетических тестов является то, что они характеризуют состояние всего генома, являются чувствительными и широко используются для оценки действия генетически активных факторов. Аберрации хромосом можно анализировать в митозе на стадиях метафазы и анафазы. При этом оценивают эффект на протяжении возможно большего времени после обработки с таким расчетом, чтобы оценить период, равный двум

митотическим циклам. Существует методика с использованием 5-бромдезоксиуридина, позволяющая выявить обмены между сестринскими хроматидами одной хромосомы.

Использование одного критерия не во всех случаях применимо и не всегда такие наблюдения могут дать полную информацию. Из-за этого дополнительно к ним необходимо разрабатывать и использовать новые критерии интегральной оценки, такие, например, как усиление или угнетение митотической активности, дезинтеграция пулов пролиферирующих клеток корневой меристемы, задержка клеток на стадии профазы и метафазы митоза, замена митоза на амитоз. Суммарное использование ряда критериев на одном объекте может увеличить чувствительность тест-системы. В настоящее время при проведении цитогенетического мониторинга рекомендуют следующие показатели: депрессия митотической активности; патологические митозы; ядрышковая активность; проявление остаточного ядрышка в митозе; остаточное ядрышко в цитоплазме неделящихся клеток; микроядерный тест.

В мейозе учитываются такие мутации, как транслокации, делеции, дупликации, нерасхождение хромосом. При изучении мейоза анализируют метафазу и анафазу I и II деления, стадию тетрад. В анафазе можно наблюдать хромосомные фрагменты, неравномерное расхождение хромосом к полюсам, хромосомные мосты; на стадии тетрад — наличие в клетках микроядер, триад, пентад, гексад вместо нормальных тетрад микроспор. Характеристиками цитогенетических нарушений на уровне кариотипа служат мейотический индекс и частота образования хиазм как цитологическое проявление кроссинговера и показатель генетической рекомбинации.

Для фитопопуляций (в том числе агрокультур) можно рекомендовать следующие генетические тесты.

Клеточный уровень

1. Анализ анафаз-метафаз в меристематических клетках.
2. Анализ метафазы, анафазы I и II деления, тетрад в генеративных клетках.
3. Анализ пыльцы.

Организменный уровень

1. Анализ хлорофильных мутаций.
2. Анализ морфологических изменений.
3. Оценка посевного качества материала.

Популяционный уровень

1. Анализ гетерозигот.
2. Анализ генного пула новых аллелей.
3. Анализ изменения генетической структуры популяции.
4. Анализ компонентного состава запасных белков семян.
5. Анализ жизнеспособности и продуктивности популяции.

3.4. Характеристика тест-систем для генетического мониторинга

3.4.1. Микроорганизмы в качестве тест-систем

Начинать исследование генетической активности различных факторов целесообразно с краткосрочных тестов с использованием микроорганизмов, поскольку такие тесты позволяют быстро получить результат и относительно дешевы. Чаще всего для выявления мутагенных химических веществ применяются тесты с использованием бактерий; эта группа тестов в целом наиболее апробирована. В отличие от эукариотических организмов, у которых ДНК организована в сложные хромосомные структуры, у бактерий присутствует лишь одна кольцевая молекула ДНК, легко доступная для химических веществ, проникающих сквозь клеточную стенку. Бактериальные тесты имеют также то преимущество, что в одном опыте может быть получена популяция, состоящая из многих миллионов клеток с относительно коротким периодом размножения. В классическом варианте используются штаммы бактерии, уже имеющие мутации по определенным генам. Мутации, индуцированные тестируемым веществом, так называемые обратные мутации, выявляются в результате роста таких ревертантных бактерий с образованием колоний в соответствующей селективной среде. Бактериальные тесты могут быть использованы для выявления мутагенных метаболитов в биологических жидкостях (например, в моче, цельной крови, плазме) животных или людей, подвергшихся воздействию химических факторов.

Таким образом, тесты на бактериях, не исключая и не заменяя исследований на других объектах, формируют их логику. Однако микроорганизмы в качестве тест-объектов имеют существенный недостаток: не существует надежной количественной связи между способностью повреждающего агента индуцировать мутации у бактерий с развитием повреждений ДНК у животных и человека, так как у бактерий отсутствует ряд ферментных систем, имеющихся у млекопитающих и способных метаболизировать чужеродные соединения. Как уже было показано выше, проблема заключается в том, что в организме млекопитающих и человека подавляющее большинство химических соединений является промутагенами и проканцерогенами. Это не позволяет регистрировать с помощью микроорганизмов мутагенную активность метаболитов химических соединений, образующихся в процессе биотрансформации. Для разрешения этой проблемы были разработаны методы метаболической активации химических соединений *in vivo* и *in vitro* и регистрации мутагенной активности метаболитов с помощью

индикаторных бактерий (см. подразд. 6.1 и 6.2). В результате применения таких методов было обнаружено, что многие известные канцерогенные соединения являются промутагенами. Например, к промутагенам относятся бенз(а)пирен, афлатоксин В1, бензидин и многие другие вещества.

В оценке степени мутагенности среды наиболее часто употребляется тест Эймса. На основе штаммов сальмонеллы были созданы полуколичественные и количественные тесты для оценки мутагенной активности. Количественные тесты целесообразно использовать в целях определения частоты мутаций, а также в тех случаях, когда исследуемые вещества высокотоксичны и вызывают гибель большей части клеток тест-систем. Поэтому наиболее широкое распространение получил ставший классическим полуколичественный тест Эймса с метаболической активацией *in vitro* (или, как его иногда еще называют, тест Эймса сальмонелла/микросомы).

В основе тест-системы лежит специально созданный Б. Эймсом и его сотрудниками набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*. Все штаммы происходят от лабораторного штамма LT-2, у которого были выделены ауксотрофные по гистидину мутанты hisG-46 (мутация замены оснований) и hisD-3052 (мутация типа сдвига рамки считывания) и др. Мутагенную активность оценивают по частоте возникновения обратных мутаций (реверсий) к прототрофности по гистидину (his^+). Мутация hisG-46 ревертирует под действием мутагенов, вызывающих замены оснований, hisD-3052 — под действием агентов, индуцирующих сдвиг рамки считывания. Для повышения чувствительности штаммов в них были введены следующие дополнительные мутации: протяженная делеция gal bio uvrB захватывает биотиновый оперон, часть галактозного оперона и ген *uvrB*. Последняя мутация вызывает нарушение системы эксцизионной репарации предмутационных повреждений ДНК. Мутация rfa приводит к нарушению структуры наружного липосахарида, что сопровождается увеличением клеточной проницаемости по отношению к ксенобиотикам и утратой патогенности. Так были созданы штаммы TA1535 *hisG-46 gal bio uvrB rfa* и TA1538 *hisD-3052 gal bio uvrB rfa*, активно используемые в исследованиях по генетической токсикологии. В дальнейшем чувствительность штаммов к мутагенам была дополнительно повышена за счет введения в них плазмиды pKM101 (Ap^r). Помимо гена устойчивости к ампициллину и карбенициллину pKM101 несет плазмидные гены *mucA* и *mucB*, соответствующие известным хромосомным генам *umuC* и *umuD*, играющим ключевую роль в мутагенной SOS-репарации. Участие SOS-репарации резко повышает чувствительность штаммов к мутагенным соединениям. В результате были получены высокочувствительные штаммы, наиболее широко используемые в тесте Эймса:

TA100 *hisG-46 gal bio uvrB rfa*, pKM101 amp^r (для учета мутаций типа замен оснований и частично типа сдвига рамки) и TA98 *hisD-3052 gal bio uvrB rfa*, pKM101 amp^r (для учета мутаций типа сдвига рамки).

Весьма перспективным объектом для создания более эффективных и в то же время недорогих тестов являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* — эукариоты, одноклеточные грибы, штаммы которых могут быть как диплоидными, так и гаплоидными. Дрожжи — один из наиболее хорошо изученных модельных объектов классической и молекулярной генетики (рис. 3.1), а геном этих микроорганизмов секвенирован первым среди всех эукариотических организмов в 1996 г. А. Гоффеу с соавторами. Это делает возможным создание разнообразных по своей специфичности тест-систем с использованием дрожжей, в том числе тесты на индукцию прямых и обратных мутаций, митотической внутригенной и межгенной рекомбинации, митохондриальных мутаций. Чувствительность дрожжевых тест-систем может быть повышена благодаря использованию штаммов с раз-

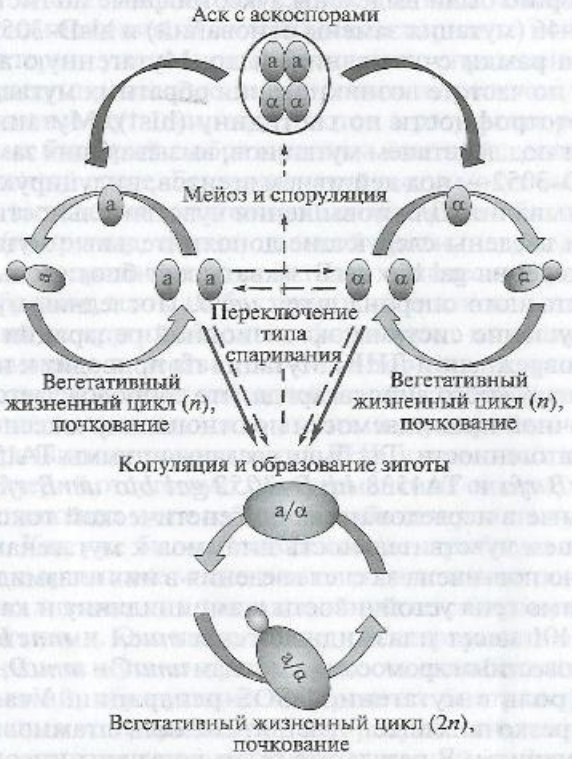

Рис. 3.1. Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

личными нарушениями репарации. Это не представляет труда, поскольку у дрожжей гены, контролирующие различные пути репарации, идентифицированы, их последовательность известна, а методы инактивации дрожжевых генов и внесения любых типов мутаций в геном дрожжей хорошо разработаны. Кроме возможности выявления различных типов наследственных изменений в дрожжевых тест-системах существует возможность использования метаболической активации промутагенов. Хотя в дрожжах были обнаружены зависимые от цитохрома Р-450 многофункциональные оксидазы, в ряде случаев рекомендуется для метаболической активации *in vitro* использовать фракции S-9 клеток печени млекопитающих. Ведутся работы по исследованию в дрожжевых системах генетических эффектов, опосредованных организмом хозяина. Методика тестирования генетической активности химических веществ на дрожжах приблизительно одинакова вне зависимости от того, какие события выявляют данным методом. Она включает три этапа: обработку клеток дрожжей мутагеном; высев клеток на селективную среду для отбора клеток с интересующим исследователя фенотипом и на полную среду для подсчета выживших клеток; учет результатов.

Как любые другие тест-ситемы, дрожжевые тесты не лишены недостатков. К ним относятся: необходимость использования более высоких концентраций мутагена, чем в тестах на бактериях; плохая проницаемость толстой полисахаридной оболочки для некоторых соединений, а также учет выживаемости, что делает тестирование несколько более трудоемким и дорогим. Работы по совершенствованию микробных тест-систем развиваются в направлении создания универсальных штаммов, позволяющих выявлять сразу несколько типов изменений наследственного материала. К одному из таких тестов можно отнести «альфа-тест», разработанный под руководством академика РАН С. Г. Инге-Вечтомова на кафедре генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета (см. подразд. 6.3).

Теоретические основы альфа-теста разработаны благодаря детальной изученности жизненного цикла и генетического контроля типов спаривания у дрожжей. Контроль гибридизации клеток *S. cerevisiae* осуществляет локус *MAT*, расположенный в правом плече вблизи центромеры III хромосомы (рис. 3.2, *а*). Гаплоидные клетки α-типа спаривания несут локус (идиоморф), содержащий гены *MAT*α1 и *MAT*α2, экспрессирующиеся с общего двустороннего промотора. Клетки а-типа спаривания несут в том же локусе идиоморф *MAT*a, также имеющий сложное строение. Ген *MAT*α1 является позитивным регулятором α-специфичных генов, экспрессирующихся в α-клетках. Ген *MAT*α2 является репрессором а-специфичных генов. В клетках а-типа спаривания

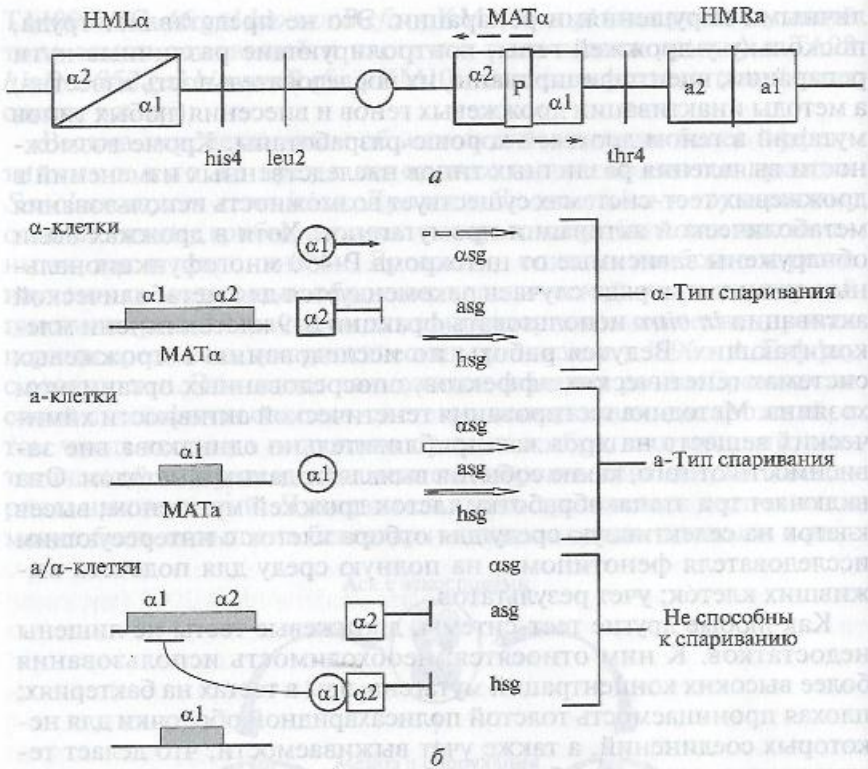

Рис. 3.2. Генетический контроль типа спаривания у дрожжей *S. cerevisiae*:

а — III хромосома S. cerevisiae, схема расположения локуса MAT и кассет, несущих молчащую информацию; *б* — регуляция экспрессии генов, контролирующих тип спаривания

а-специфичные гены экспрессируются конститутивно из-за отсутствия репрессора а-специфичных генов *MAT*α2 и активатора α-специфичных генов *MAT*α1 (рис. 3.2, *б*). Поэтому одновременные нарушения экспрессии генов *MAT*α1 и *MAT*α2 будут приводить к изменению типа спаривания с α на а. В III хромосоме локализованы также молчащие локусы (кассеты *MAT*a и *MAT*α): *HMR*a и *HML*α, которые, так же как *MAT*a и *MAT*α, содержат общие участки ДНК, что позволяет эффективно переключать тип спаривания у гомоталличных штаммов *S. cerevisiae* за счет сайт-специфичной конверсии, индуцируемой двунитевым разрывом в локусе *MAT* эндонуклеазой *HO*. У гетероталличных штаммов ген *HO* инактивирован рецессивной мутацией, поэтому они не способны к регулярному переключению типа спаривания.

Напомним, что у дрожжей способны к слиянию только клетки противоположных типов спаривания. «Незаконная» гибридизация клеток одинакового типа спаривания (α × α) может происходить как за счет рекомбинационных событий (конверсии генетического материала из кассеты *HMR*a в локус *MAT* или внутрихромосомной рекомбинации между этими локусами), так и за счет инактивации локуса *MAT*α в результате генных мутаций или первичных повреждений ДНК. Маркирование обоих плеч III хромосомы мутациями ауксотрофности позволяет разграничить события, приводящие к «незаконной» гибридизации, что делает альфа-тест удобной системой для изучения действия генетически активных факторов и анализа нарушения систем репарации в возникновении предмутационных и мутационных повреждений. Аналогичная система скрещиваний а × а такой возможности не предоставляет.

Использование «незаконнай цитодукции» при скрещивании α × α позволяет различать первичные повреждения ДНК и фиксированные генетические изменения (мутации, рекомбинации и др.) в локусе *MAT*α . Цитодукция — результат нарушенной гибридизации клеток, при которой происходит объединение цитоплазмы, но не происходит слияния ядер и образования диплоидов. Подбирая генетические маркеры и селективные среды, можно отбирать цитодуктантов — гаплоидные клетки со смешанной цитоплазмой и несущие ядро клетки-реципиента. При этом скрещиваемые штаммы делятся на реципиент цитоплазмы [rho$^-$], ядро которого подвергается воздействию, и донор цитоплазмы [rho$^+$] — обычно аутодиплоид. Тем самым появляется возможность клонирования непосредственно того ядра, которое подверглось изучаемому воздействию. В случае скрещивания α × α фенотип цитодуктантов позволяет разделить ненаследуемые повреждения локуса *MAT* (фенотип цитодуктантов — α) и фиксированные изменения генетического материала в этом локусе (фенотип цитодуктантов — а или а* — рецессивный а). В табл. 3.3 представлены фенотипы незаконных гибридов и цитодуктантов, возникающих в результате различных нарушений генетического материала на примере скрещивания двух штаммов дрожжей, несущих маркеры ауксотрофности в обоих плечах III хромосомы.

Казалось бы, парадоксальный результат — обнаружение цитодуктантов, не способных к спариванию (мутанты α1 или α2), показывает, что этот тест действительно выявляет первичные повреждения генетического материала, инактивирующие *MAT*α, которые в дальнейшем могут быть фиксированы как стабильные мутации или устранены репарацией (цитодуктанты типа спаривания альфа).

Таким образом, альфа-тест является удобным и эффективным инструментом для поиска факторов, обладающих повреждающим

Таблица 3.3. **Фенотипы незаконных гибридов и цитодуктантов, возникающих в результате различных нарушений генетического материала на примере скрещивания двух штаммов дрожжей, несущих маркеры ауксотрофности в обоих плечах III хромосомы: LEU2 MATα THR4 × leu2 MATα thr4**[1]

Нарушение генетического материала, приводящее к незаконной гибридизации	Фенотип незаконных гибридов	Фенотип незаконных цитодуктантов
Транспозиция кассеты в локус *MAT*	*n/m* Leu$^+$ Thr$^+$	a
Рекомбинация *MAT* с *HMR*a	*n/m* Leu$^+$ Thr$^-$	a
Потеря правого плеча III хромосомы	α Leu$^+$ Thr$^-$	—[2]
Потеря III хромосомы	α Leu$^-$ Thr$^-$	—[2]
Мутации в *MAT*α	α Leu$^-$ Thr$^+$	(a*), *n/m*[3]
Временная «репарируемая» инактивация *MAT*α	α Leu$^+$ Thr$^+$	α

[1] Экспериментальному воздействию подвергают первый (гаплоидный) из двух скрещиваемых штаммов, в качестве партнера для скрещивания тестерного штамма предпочтительно использовать автодиплоидный штамм, гомозиготный по MATα.

[2] Леталь.

[3] a* — мутация в двустороннем промоторе; *n/m* (не спаривающийся) — мутация в α1 или α2.

действием на ДНК и вызывающих различные типы наследуемых изменений генетического материала — генные мутации, потери части или целой хромосомы, генную конверсию. Что особенно важно, в альфа-тесте можно оценить частоту индукции первичных повреждений *in vivo*, а также эффективность их устранения при репарации. Альфа-тест показал свою чувствительность и эффективность в международной программе тестирования канцерогенов, чью мутагенную активность не удавалось зафиксировать. При определении генетической активности 10 известных мутагенов тест на индукцию «незаконной» гибридизации (разновидность α-теста) оказался наиболее чувствительным (36 % положительных ответов) по сравнению с классическими тестами на конверсию, реверсию и митотическую рекомбинацию (0—17 % положительных ответов).

Несмотря на указанные выше ограничения, тесты на микроорганизмах в высшей степени пригодны в качестве первичной

оценки мутагенных и канцерогенных эффектов, а также для анализа аддитивности, синергизма и антагонизма при комбинированных воздействиях факторов физической и химической природы.

3.4.2. Растения в качестве тест-систем

В настоящее время растительные тест-системы хорошо обоснованы и широко используются для оценки качества окружающей среды. Поскольку растения доминируют в любом ландшафте и составляют 99 % всей биомассы Земли, воздействие на них может изменить структуру и функции экосистемы, что ведет к снижению первичной продуктивности, увеличению поверхностного стока и эрозии почв, деградации среды обитания.

Чтобы быть хорошим биоиндикатором, тест-организм должен позволять получить информацию о возможной опасности воздействия прежде, чем произойдут экологически значимые нарушения. Растения постоянно реагируют на огромное количество параметров окружающей среды с высокой чувствительностью и могут быть эффективно использованы для оценки присутствия широкого круга поллютантов, особенно токсикантов, непосредственно действующих на мишенные структуры клетки. Ответная реакция растений на воздействие может быть оценена на разных уровнях биологической организации от ДНК и хромосом до организма и популяции (рис. 3.3). Эффекты загрязнения сначала проявляются на молекулярном уровне, что делает анализ ответных реакций клетки удобным инструментом для ранней диагностики воздействия. Изменения на уровне клетки могут быть менее очевидны, чем непосредственно видимые эффекты поллютантов, но в плане отдаленных последствий они являются более значимыми.

В мониторинге окружающей среды основным объектом исследования являются популяции и экосистемы, поэтому отклик используемых тест-систем должен быть тесно связан с эффектами на этих уровнях организации. Становится все более очевидным, что изменения на уровне клетки могут влиять на биологические параметры популяционного уровня, такие как здоровье и репродуктивные функции. Эти типы эффектов вызывают особое беспокойство, так как могут проявляться спустя долгое время после того, как источник воздействия исчезнет из среды обитания. Поэтому именно генетические тест-системы должны использоваться для ранней и надежной диагностики нарушений, возникающих в результате деятельности человека. Ниже перечислены преимущества использования высших растений в мониторинге окружающей среды.

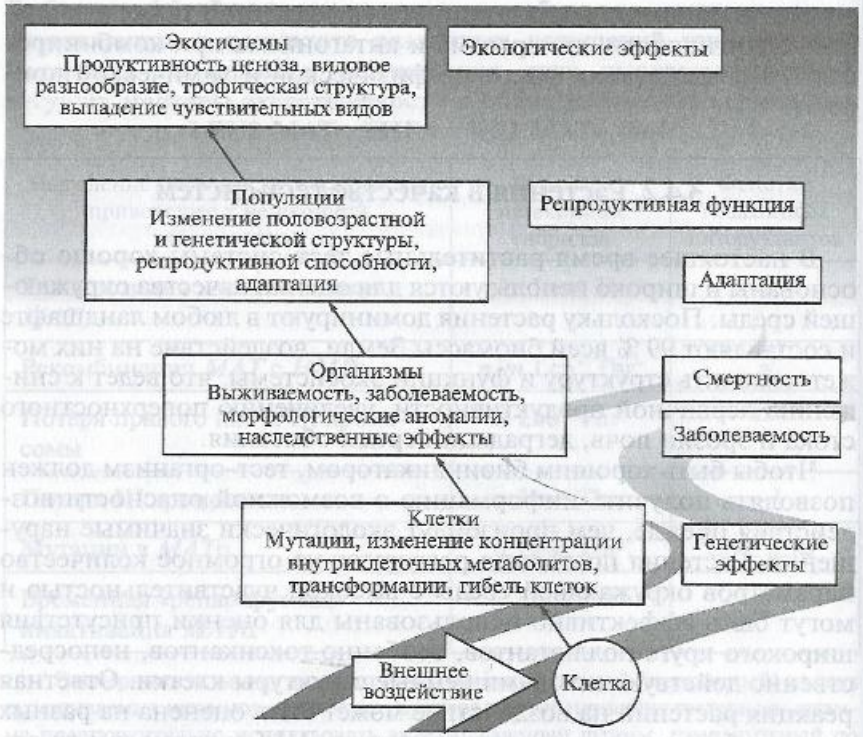

Рис. 3.3. Схема биологического мониторинга на разных уровнях организации живой материи

Растения — необходимый и обязательный компонент любой экосистемы. Вследствие прикрепленного образа жизни растения постоянно подвергаются воздействию находящихся в окружающей среде поллютантов и характеризуют экологическую ситуацию в месте своего произрастания наилучшим образом. Находясь в основании пищевых цепочек, растения испытывают воздействие токсических агентов раньше, чем организмы более высоких трофических уровней. Растения обладают способностью эффективно концентрировать и преобразовывать находящиеся в окружающей среде вещества, что увеличивает чувствительность и информативность их использования в целях контроля качества окружающей среды. Высшие растения могут быть эффективно использованы в полевых условиях для оценки качества воздуха, воды и почвы и для оценки эффектов хронического воздействия. Тест-системы высших растений могут быть объединены с микробиологическими тестами для выявления промутагенов. Хромосомы и клеточное ядро растений, млекопитающих и других эукариот сходны по

своему строению, функциям, жизненному циклу и реагируют на воздействие мутагенов сходным образом. Растительные тест-системы могут эффективно использоваться в широком диапазоне условий окружающей среды.

Для растений характерны высокие темпы развития, быстрая смена фаз онтогенеза. Они производят большое количество потомков, что открывает широкие возможности для исследования наследственных эффектов. Генетическая идентичность используемых в целях биоиндикации растений может быть достигнута путем вегетативного размножения.

Разработано значительное количество растительных тест-систем для оценки действия техногенных поллютантов на разных уровнях биологической организации. Методики работы с большинством растительных тест-систем детально отработаны, носят стандартизованный характер и не требуют высокой квалификации персонала. Использование большинства растительных тест-систем относительно недорого.

С другой стороны, существуют ограничения для использования растительных тест-систем в мониторинге. Жизненный цикл растений длиннее, чем у бактерий, дрожжей и дрозофилы. Существуют значительные фармакокинетические и биохимические различия между растениями и млекопитающими. Поэтому тест-системы растений не обладают чувствительностью к некоторым классам промутагенов, таким как нитрозамины, гетероциклические амины и полициклические ароматические гидрокарбонаты.

Такие растения, как конские бобы, лук, традесканция, кукуруза, ячмень и соя, обладают существенными преимуществами по сравнению с другими растительными тест-объектами (табл. 3.4).

Среди высших растений одним из наиболее перспективных объектов для изучения мутагенных факторов является ячмень (*Hordeum vulgare* L.). Ячмень — важная сельскохозяйственная культура, широко распространенная в разных странах мира. Его по праву можно назвать одним из наиболее генетически изученных растений, интенсивно используемых в самых разных исследованиях. Род *Hordeum* относится к семейству злаковых и отличается от остальных родов этого семейства строением колоса: его колоски одноцветковые. Большинство видов ячменя диплоидные ($2n = 14$), некоторые виды тетраплоидные ($2n = 28$) или гексаплоидные ($2n = 42$). Культурный ячмень — диплоид с семью парами хромосом. Небольшое число хромосом и диплоидное строение облегчают генетические исследования, поэтому ячмень часто служит растением-моделью. На сегодняшний день у ячменя охарактеризовано несколько сотен генов с самыми разными свойствами и характеристиками.

Таблица 3.4. **Наиболее часто используемые в скрининге мутагенов растительные тест-системы**

Растение	Тест-системы
Традесканция (*Tradescantia*, $2n = 24$)	Мутации в клетках тычиночных нитей. Изменения хромосом в митозе. Микроядерный тест
Бобы (*Vicia fabia*, $2n = 12$) Скерда (*Crepis capillaris*, $2n = 6$)	Изменения хромосом в митозе
Соя (*Glycine max*, $2n = 40$)	Соматический кроссинговер в специфических локусах ($Y_{55}y_{11}$). Мутации в специфическом локусе ($Y_{11}y_{11}$)
Ячмень (*Hordeum vulgare*, $2n = 14$)	Мутации во множественных локусах. Хлорофильные мутации. Хромосомные изменения в митозе и мейозе. Микроядра в тетрадах микроспор. Эмбриональные летали. Разрывы ДНК
Кукуруза (*Zea mays*, $2n = 20$)	Анеуплоидия. Мутации во множественных локусах. Хлорофильные мутации. Мутации в специфических локусах (Adh и *waxy*-пыльца, yg2). Хромосомные изменения в мейозе. Эмбриональные летали
Арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*, $2n = 10$)	Мутации во множественных локусах. Измения хромосом в митозе и мейозе. Хлорофильные мутации. Мутации в специфических локусах. Эмбриональные летали
Горох (*Pisum sativum*, $2n = 14$)	Мутации во множественных локусах. Хлорофильные мутации. Изменения хромосом в митозе
Лук (*Allium cepa*, $2n = 16$)	Изменения в митотических хромосомах. Изменения морфологии корней
Томат (*Lycopersicon esculentum*, $2n = 16$)	Мутации во множественных локусах. Хлорофильные мутации. Мутации в специфических локусах. Изменения хромосом в мейозе. Анеуплоидия

В последнее время широкое распространение приобрел экспресс-метод оценки загрязнения фитоценозов, основанный *на учете фертильности пыльцы* растений-биоиндикаторов (см. подразд. 6.5). Определение чувствительности мужского гаметофита к загрязнителям важно не только для характеристики реакции растения на действие агентов среды. Чувствительность микрогаметофита к загрязнению представляет и самостоятельный интерес, так как позволяет оценить устойчивость репродуктивных процессов и структур к поллютантам. Сущность метода заключается в выявлении зависимости между степенью стерильности пыльцы у растений и наличием загрязнителя и/или загрязнителей в элементах ландшафта (почве, воде, атмосфере) свыше предельно допустимых концентраций. Для корректного учета аберрантной пыльцы важным этапом является выбор эталонов сравнения для системы соответствующих фитотестов. В качестве эталонов отбирают растения, произрастающие на незагрязненных территориях.

Важным условием применения метода является умение отличить естественную стерильность от стерильности, индуцируемой различными генетически активными соединениями. Считается, что спонтанная стерильность растений на уровне 5—10 % не отражается на эффективности опыления. Основными критериями подбора видов для такого исследования являются: длительный период цветения, легкость сбора пыльцы и ее идентификации, низкий уровень спонтанного образования аберрантной пыльцы. Описываемый метод успешно применяется для декоративных и древесно-кустарниковых растений, а также для сельскохозяйственных культур. При использовании метода оценки аберрантной пыльцы следует учитывать плоидность культуры и особенности ее цветения.

При оценке качества окружающей среды с помощью традесканции чаще всего оценивают частоту соматических мутаций в волосках тычиночных нитей (Trad-SHM) либо частоту микроядер в активно делящихся тканях растения (Trad-MN). Trad-SHM-тест основан на гетерозиготности по цвету тычиночных нитей традесканции, поэтому мутации в клетках тычиночных нитей могут изменять пигментацию с голубого цвета (доминантный) на розовый (рецессивный) (рис. 3.4). Частоту мутаций принято оценивать числом мутационных событий на 1 000 просмотренных волосков. В этом тесте рост волоска рассматривается как эквивалент формирования микроорганизмами колонии, а недоразвитые волоски — как эквивалент невыжившей культуры клеток. Гигантские, двойные и тройные клетки, ветвление волоска и другие аномалии фиксируются вместе с потерей репродуктивной способности и являются индикаторами генотоксического действия. Хотя Trad-SHM-тест достаточно чувствителен для обнаружения эффектов

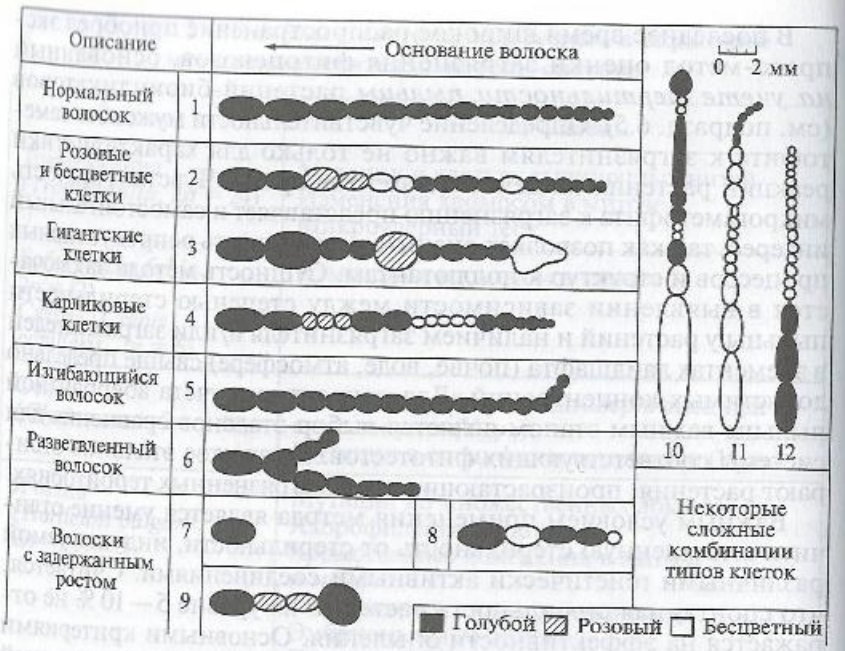

Рис. 3.4. Морфологические изменения тычиночных нитей традесканции

низких доз мутагенов, он уступает другим тестам удобством использования в полевых условиях, поскольку растения необходимо культивировать на экспериментальных участках не менее 14 дней.

Микроядерный тест (Trad-MN) приблизительно в 35 раз эффективнее по сравнению с Trad-SHM. Его экстраординарная чувствительность обусловлена гораздо меньшей специфичностью повреждений, индуцирующих микроядра, по сравнению с индукцией розовых мутаций. Действительно, огромное количество сайтов в любой из 12 хромосом *Tradescantia* могут служить мишенью воздействия, ведущего к формированию микроядер. В противоположность этому только один локус в одной хромосоме несет мутацию, ведущую к розовой пигментации волосков тычиночных нитей. Три вида микроядерных тестов отработаны на *Tradescantia* для скрининга мутагенов в окружающей среде, а именно частота микроядер в меристеме кончиков корня, в пыльцевых зернах и в материнских пыльцевых клетках. Все эти тесты технически просты, недороги и позволяют получить устойчивый результат за короткое время (36—72 ч). Тест на кончиках корня пригоден только для исследования жидких сред, в то время как пыльцевой тест — для тестирования как жидкостей, так и газов.

Существуют определенные ограничения на использование микроядерного теста. Транслокации, инверсии и другие типы хромосомных и хроматидных нарушений не могут быть обнаружены микроядерным тестом. Высокая чувствительность тест-системы, ведущая к ежедневной вариации спонтанного уровня микроядер, требует тщательного контроля экспериментальных условий и одновременной фиксации контрольных и тестируемых образцов. В целом оба теста подходят для мониторинга почвы, воды и воздуха *in situ*. Микроядерный тест в материнских пыльцевых клетках позволяет с высокой точностью обнаруживать хромосомные мутации, а розовые мутации в тычиночных нитях являются чувствительным индикатором соматических мутаций.

3.4.3. Животные в качестве тест-систем

Загрязняющие вещества можно классифицировать по способности индуцировать генетические нарушения у млекопитающих, других позвоночных, а также у беспозвоночных животных. Наиболее распространенной тест-системой является культура клеток млекопитающих. Можно использовать перевиваемую клеточную линию или культуру лимфоцитов человека (см. подразд. 6.8—6.9). Для изучения повреждения хромосом *in vivo* хорошо разработан метод анализа метафазных хромосом в клетках костного мозга крыс, мышей или хомячков (см. подразд. 6.10). Хромосомные фрагменты в клетках костного мозга и других тканей можно идентифицировать в виде микроядер. Микроядерный тест зарекомендовал себя как сравнительно простой метод выявления химических веществ, способных индуцировать хромосомные повреждения (см. подразд. 6.13).

Косвенным доказательством повреждения ДНК в клетках млекопитающих может служить увеличение репарационной активности. Его можно выявить с помощью простого теста на культивируемых клетках млекопитающих, основанного на измерении внепланового синтеза ДНК. Клетки, подвергшиеся внешнему воздействию, обрабатывают тимидином, меченным радиоактивным изотопом (тритием), на такой стадии клеточного цикла, когда конститутивного синтеза ДНК не происходит или он подавлен. Количество меченого тимидина, обнаруженного в ДНК, является показателем внепланового репарационного синтеза и, следовательно, отражает степень первичного повреждения ДНК.

Традиционным объектом генетических исследований является дрозофила (*Drosophila melanogaster*), чувствительность которой при оценке потенциальной мутагенности токсикантов очень велика. Мутации у дрозофилы можно регистрировать разными

способами: это тесты на доминантные летальные мутации (эмбриональный тест), доминантные и рецессивные видимые мутации, использующие специальные линии со сцепленными Х хромосомами, рецессивные летальные мутации, возникающие в Х хромосоме (метод Мёллер-5) или в аутосомах (*Cy/Pm*; *D/Sb*). Два последних основаны на использовании особых балансерных хромосом, несущих одну или несколько перекрывающихся инверсий.

Наиболее часто в практике используется метод Мёллер-5 (см. подразд. 6.7). В этом тесте первоначально использовалась синтезированная Г. Мёллером Х хромосома $In(1)sc^{S1}sc^{8R}+S$, $sc^{S1}\ sc^{8}\ w^{a}$ *B*, несущая инверсию *In(1)S = In(1)6A1–3; 10F10–11A1*. Именно эта хромосома и получила название хромосома Мёллер-5 (М-5, или Muller-5). Инверсия препятствует кроссинговеру, поэтому учитываемые события — это с большой достоверностью летальные мутации, а не следствия рекомбинации. Маркирующие ее мутации фенотипически проявляются в виде полосковидных глаз (мутация *B — Bar*), абрикосовой окраски глаз (мутация w^{a} — *white-apricot*) и отсутствия скутеллярных щетинок (мутации *sc — scute*), поэтому в специальной литературе эта хромосома известна под названием *Basc*. Несмотря на то что она до сих пор используется в экспериментах по количественному учету мутаций у дрозофилы, существуют и другие балансерные хромосомы, которые подавляют кроссинговер намного более эффективно. Это такие хромосомы, как $Binsc = In(1)sc^{S1L}sc^{8R}+dl–49$, $sc^{S1}\ sc^{8}\ B$, несущая инверсию *In(1) dl–49 = In(1)4D7–E1; 11F2–4*; $Binscy = In(1)sc^{S1L}sc^{8R}+dl–49$, $sc^{S1}\ sc^{8}\ v\ B$; $Binsn = In(1)sc^{S1L}sc^{8R}+dl–49$, $sc^{S1}\ sc^{8}\ sn^{X2}\ B$; $In(1)dl–49+B^{M1} = In(1)dl–49+B^{M1}$, $sc\ v\ B^{M1}$, $Insc = In(1)sc^{S1}+dl–49$, $sc^{S1}\ sc^{8}$; $Inscy = In(1)sc^{S1L}sc^{8R}+dl–49$, $y\ sc^{S1}\ sc^{8}$. Все они созданы Г. Мёллером в 1940 — 1950-е гг. Они основаны на инверсии *In(1)dl–49*, которая намного надежнее изначальной *In(1)S*, но отличаются по фенотипическим маркерам.

В настоящее время гораздо лучше использовать более современные балансерные хромосомы, несущие множественные инверсии, реинверсии и транспозиции отдельных фрагментов, почти полностью исключающих кроссинговер в Х хромосоме. Это хромосомы *FM3 — FM7* (first multiple) в различных вариантах. Они удобнее мёллеровских балансеров, потому что несут легко различимый невооруженным взглядом маркер *y* (*yellow* — желтая окраска тела), однако, как правило, включают мутацию *dm* (*diminutive* — уменьшенные и тонкие щетинки), которая в гомозиготном состоянии вызывает стерильность самок. Такие линии ведут в гетерозиготном состоянии. Эту особенность необходимо учитывать при постановке экспериментов (см. подразд. 6.7).

Для изучения действия химических мутагенов в естественных условиях могут быть пригодны амфибии, ареалы которых легко и

достоверно определяются экологическими методами. Тест-объект должен быть распространен в разных природных зонах (для получения сравнительного экспериментального материала). Поэтому наиболее массовым и доступным тест-объектом для биотестирования мутагенного действия, например пестицидов, в ряде регионов является лягушка озерная (*Rana esculenta*), имеющая в своем кариотипе 13 хромосом. Большие размеры хромосом и хорошая изученность делают ее удобным объектом при количественном учете аберраций хромосом.

3.5. Генетический мониторинг природных популяций

В 1960-х гг. Е. Б. Форд ввел термин «экологическая генетика». Экологическая генетика — это область знания, исследующая взаимовлияние генетических процессов и экологических отношений. Как раздел генетики эта наука опирается на мощную методологию генетического анализа и использует весь методический арсенал экологии.

Методы экологической генетики оказываются незаменимыми, если мы собираемся исследовать последствия хронического долговременного воздействия сложного комплекса природных и техногенных факторов. Собственно, генетический мониторинг — это единственный способ оценки такого рода эффектов. В ходе генетического мониторинга оценивают характеристики процесса, который по своей природе является вероятностным, поэтому генетические последствия техногенного загрязнения среды лучше всего анализировать на популяционном уровне.

Ограничения в численности природных популяций, внутрипопуляционный полиморфизм по анализируемым признакам, различия экологических условий, в которых находятся исследуемые популяции, определяют уровень техногенного загрязнения, ниже которого эффект в данной популяции становится практически невыявляемым. Поэтому для повышения эффективности генетического мониторинга контрольные и экспериментальные популяции должны находиться в сходных по структуре фитоценозах, одинаковых климатических, почвенных и гидрологических условиях.

При анализе воздействия техногенного загрязнения на популяции необходимо иметь в виду, что на высших уровнях биологической организации, в том числе популяционном, формируются эффекты, не сводимые к элементарным молекулярно-клеточным механизмам биологического действия техногенных поллютантов. Поддержание гомеостаза в природных системах обеспечивается не только адаптационными способностями отдельных организмов,

реализуемыми через коррекцию биохимических и физиологических процессов, но и популяционными механизмами.

Генетический мониторинг природных популяций проводится с целью получения ответа на два главных вопроса:

• Каков мутагенный эффект техногенного воздействия?

• Какова судьба индуцированных мутаций в измененных экологических условиях?

Исходя из этого, основными направлениями генетического мониторинга природных популяций являются:

• оценка интенсивности мутационного процесса в природных популяциях в зависимости от силы техногенного воздействия;

• построение дозовых зависимостей для разных видов генетических нарушений (генные, хромосомные и геномные мутации, частота рекомбинационных событий и т.д.);

• изучение динамики мутационного процесса в природных популяциях;

• анализ инициированных техногенным загрязнением микроэволюционных процессов в популяциях.

Наиболее простой и понятный способ исследования эффектов на популяционном уровне заключается в организации наблюдений за природными популяциями в течение как можно большего числа генераций. Наличие в природных популяциях растений и животных генетического полиморфизма по устойчивости к техногенным факторам и обусловленные этим различия в развитии и выживании составляющих популяцию особей способны запустить микроэволюционные процессы, ведущие к изменению генетической структуры и повышению устойчивости популяции к техногенному воздействию. Однако для оценки того, насколько важны эти процессы для состояния природных экосистем и насколько интенсивно они происходят, необходимы дополнительные исследования.

Удобным объектом для проведения таких исследований является водоросль *Chlorella vulgaris*. Именно в исследованиях на этом объекте в 1960 — 1970-е гг. Н. П. Дубининым и В. А. Шевченко были установлены основные закономерности динамики мутационного процесса в популяциях, которые оказались справедливыми и для других видов растений и животных. Исследования проводились на водорослях, выделенных из почвенных проб, собранных на контрастных по уровню радиоактивного загрязнения участках с территории Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРС). Уже в первых экспериментах было показано, что частота видимых мутаций (пигментных, морфологических, карликовых) у хлореллы возрастает с увеличением концентрации радионуклидов в почве. В то же время дополнительное γ-облучение позволило установить, что в условиях повышенных уровней радиоактивного загрязнения

обитает популяция хлореллы, в 1,5 — 2,0 раза более радиоустойчивая, чем контрольная. Применение ингибиторов репарации, анализ кривых доза — эффект при действии редко- и плотноионизирующей радиации, а также прямое определение активности репарационных процессов позволили заключить, что обитающие в условиях повышенного радиационного фона популяции хлореллы имеют более эффективные системы репарации. Дивергенция популяций по устойчивости к облучению была связана с отбором на эффективность систем репарации и не сопровождалась видимыми морфологическими изменениями.

Исследования на хлорелле позволили выявить основные закономерности динамики мутационного процесса в хронически облучаемых популяциях:

• увеличение числа мутантных особей; при возрастании мощности дозы продолжительность этапа увеличивается;

• стабилизация числа мутантных особей; установление равновесия между мутационным процессом и отбором, элиминирующим в каждом поколении часть менее приспособленных особей; возрастание мощности дозы ведет к увеличению значения равновесного уровня;

• адаптивная перестройка генетической структуры популяции; особи с пониженной радиорезистентностью устраняются из популяции, общая устойчивость популяции к облучению увеличивается;

• стабилизация популяции на новом уровне радиорезистентности, но с меньшей общей частотой мутаций по сравнению с любым из предыдущих этапов.

Таким образом, появление в среде обитания постоянно действующего техногенного фактора запускает генетические механизмы, результатом работы которых является направленная на повышение устойчивости к действующему фактору эволюция. Степень увеличения устойчивости растений определяется их видовой чувствительностью. В исследованиях на ВУРС было показано, что произрастающие в условиях высокого уровня радиоактивного загрязнения чувствительные виды (*Vicia angustifolia*) увеличивают радиоустойчивость в 3 — 4 раза, устойчивые (*Trifolium montanum*) практически не изменяют этот показатель (увеличение всего в 1,2 раза).

Каковы же механизмы повышения устойчивости популяций к новым условиям существования? У видов с открытой рекомбинационной системой (перекрестное опыление) имеет место увеличение внутрипопуляционной изменчивости по устойчивости к действующему фактору, и на этой основе осуществляется отбор более устойчивых генотипов. У видов с закрытой рекомбинационной системой (самоопылители) реализуется другой механизм

повышения устойчивости популяций, связанный с отбором исходно более устойчивых форм. Следует, однако, отметить, что скорость и сама возможность осуществления этого процесса могут существенно различаться в разных экологических условиях и критически зависят от наличия в популяции полиморфизма значений признака, по которому осуществляется отбор.

При оценке последствий техногенного воздействия для популяций растений следует учитывать, что их зародышевые клетки формируются в онтогенезе гораздо позже, чем у животных. Поэтому содержащие мутации соматические клетки могут впоследствии дифференцироваться в половые и наследоваться. Именно это фундаментальное свойство лежит в основе удивительной фенотипической и генотипической пластичности растений и их способности быстро адаптироваться к меняющимся условиям среды обитания, в том числе к высоким уровням техногенного загрязнения.

Генетический мониторинг природных популяций традиционно связывают с контролем за динамикой мутационного груза, т. е. с процессами возникновения и элиминации индуцированных мутаций. Не менее важны данные об изменении генетической структуры популяций, обитающих в условиях техногенного загрязнения. Такие исследования направлены на оценку индуцированных сдвигов в распределении аллельных частот, возникающих вследствие изменения приспособленности генотипов. Подобные наблюдения создают реальную основу для прогнозирования популяционно-генетических последствий техногенного загрязнения.

С появлением электрофоретических методов анализа, позволяющих установить число и частоту аллельных вариантов ферментов, участвующих в формировании генетической изменчивости по каждому из изученных локусов, а также соотношение гомозигот и гетерозигот, открылась возможность количественной оценки генетической изменчивости и дифференциации популяций, населяющих контрастные по экологическим условиям территории.

Уникальная возможность оценки интенсивности и направленности отбора на уровне гамет возникает при изучении биохимического полиморфизма хвойных растений. Особенностью репродуктивной системы хвойных является наличие в семени гаплоидного эндосперма (мегагаметофита), генетически идентичного материнской гамете, что делает возможным прямое определение гаплотипа и рецессивных мутаций. Мутации локусов, кодирующих синтез изоферментов, имеют кодоминантный тип наследования и проявляются в семенах первого поколения. Это позволяет изучать генетическую структуру популяций без проведения скрещиваний или изучения родословных, что значительно сокращает

необходимое для исследований время без потери информативности. В настоящее время анализ полиморфизма ферментов стал одним из важнейших методов изучения генетических процессов в природных популяциях.

Распределение аллельных частот в популяциях является результатом действия естественного отбора, который в течение многих поколений регулировал частоту спонтанно возникающих мутантных аллелей. Наблюдаемый в популяциях биохимический полиморфизм не является нейтральным и связан с ролью ферментов в механизмах нейтрализации поллютантов или токсических продуктов их опосредованного действия, т. е. разные аллели полиморфных локусов могут по-разному влиять на приспособленность к определенным условиям существования. Частота мутаций, обладающих селективным преимуществом в определенных генотипических сочетаниях, увеличивается, и они распространяются в популяции.

Поведение разных поллютантов в окружающей среде и их действие на популяции растений и животных имеют много общего. Прежде всего стрессовые воздействия повышают частоту рекомбинации и мутагенеза, т. е. общей реакцией популяции на стресс является увеличение генетической изменчивости. В случае количественных признаков стресс часто приводит к увеличению генетической компоненты дисперсии. В этой связи следует отметить, что в природных популяциях, населяющих техногенно загрязненные территории, не происходит, как можно было бы ожидать, накопление редких аллелей, но их частоты поддерживаются на практически постоянном (на порядок выше контроля) уровне. Почему это происходит? Сопоставление частоты возникновения редких аллелей мутационным путем с их концентрацией в репродуктивных органах хронически облучаемой популяции позволило сделать вывод, что против редких аллелей в ходе онтогенеза (при развитии растений от проростков до формирования репродуктивных органов) действует сильный отбор. При этом бóльшая часть редких аллельных вариантов подвергается отрицательному отбору, но частота некоторых комбинаций существенно возрастает, что свидетельствует об их селективном преимуществе в новых условиях.

В то же время высокие уровни техногенного загрязнения, ведущие к гибели наиболее чувствительных особей, снижают внутрипопуляционное разнообразие. Действительно, в зонах, где выживание растений и животных детерминировано степенью их индивидуальной толерантности, отмечено уменьшение генетического разнообразия. Снижение генетического разнообразия означает частичную потерю популяцией способности к адекватной реакции при последующих изменениях окружающей среды. Таким

тетрад в расчете на колос. При индексе 90—100 % растения генетически стабильны, ниже 90 % — нестабильны. Это затрудняет использование последних в селекционных программах.

При отработке критериев нормирования по генетическим показателям приходится сталкиваться с фактом, что мутагенная активность соединений в отдельности или в сочетании друг с другом не является универсальной и может меняться при переходе от клеток одного вида к клеткам другого, а также зависит от сорта и вида, т.е. мутационный процесс имеет видо- и тканеспецифичный характер.

Вопросы нормирования по генетическим показателям неразрывно связаны со стабильностью популяции, ее генетическим полиморфизмом. Единственным прямо измеряемым показателем в этом случае является частота мутаций в популяции независимо от того, учитывается ли она прямо либо косвенно, на феноменологическом или молекулярном уровне.

При решении задачи по уменьшению содержания генотоксикантов в среде информация, полученная в результате генетического мониторинга популяции, позволяет обеспечить защиту биоценоза.

Глава 4

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЧЕЛОВЕКА

4.1. Основные направления генетического мониторинга человека

Принципы генетического мониторинга человека были разработаны в 70—80-е гг. XX в. С одной стороны, предпосылкой к этому было то, что человечество осознало угрозу, связанную с загрязнением окружающей среды веществами, способными изменять наследственность всего живого на Земле. С другой стороны, появились технические возможности для проведения такого мониторинга. Большой вклад в разработку вопросов генетического мониторинга человека внесли известные ученые: на западе это Е. Фогель (E. Vogel), А. Мотульски (A. D. Motulsky), Дж. Нил (J. V. Neel), Дж. Кроу (J. F. Crow), М. Кан (M. N. Karn), Л. Пенроуз (L. S. Penrose), а в нашей стране В. П. Эфроимсон, Н. П. Дубинин, Н. П. Бочков, Ю. П. Алтухов, Ю. Г. Рычков, Е. В. Балановская и др.

Генетический мониторинг человека предполагает: систематическое наблюдение за состоянием популяционных генофондов; изучение генетических процессов, происходящих в популяциях человека; определение факторов, вызывающих эти изменения; разработку мероприятий по их предотвращению. В частности, осуществляются оценка существующего мутационного процесса в популяциях, прогнозирование его изменения во времени, определение пределов допустимых изменений и принятие мер в случае его увеличения.

Генофонд популяции — это совокупность наследственной информации всех входящих в нее особей. От качества генофонда зависит здоровье популяции. Наследственная информация индивидуумов, входящих в популяцию, характеризуется большим разнообразием. Оно определяет различие фенотипических признаков, наличие тех или иных заболеваний или предрасположенность к ним, индивидуальную реакцию на воздействия разных факторов внешней среды, в том числе на пищевые продукты и лекарства, а также является одним из факторов, влияющих на психологические особенности человека и т.д. Все генетическое разнообразие так или иначе объясняется следствием мутаций и рекомбинаций.

повторы и повторы, состоящие из семи или более пар нуклеотидов (минисателлиты). Наряду с полиморфизмом коротких участков ДНК большой интерес исследователей в последние годы привлекает изучение более протяженных структурных различий. Недавно был выявлен еще один тип изменчивости ДНК, получивший название *CNV-изменчивость* (*copy-number variation* — вариация числа копий). CNV-изменчивость представляет собой делеции или дупликации участка ДНК размером больше 1 кб. Установлено, что такой полиморфизм затрагивает не менее 3 000 генов и также сопряжен с изменением их функции.

Выявленные полиморфизмы послужили маркерами при создании генетической карты человека, при выявлении генов наследственных заболеваний, генов предрасположенности к различным заболеваниям, разной чувствительности к лекарственным препаратам в ходе изучения генетической структуры отдельных популяций. Результаты таких исследований помогают оптимизировать медико-генетическую помощь населению, ориентируя здравоохранение на региональные особенности наследственной патологии.

Помимо вышеперечисленных направлений генетический мониторинг проводится также с целью изучения истории развития и происхождения народов, путей их расселения по планете, оценки генетического расстояния между группами и скорости эволюции. В ходе таких исследований удалось выявить эволюционно «древние» аллели и совсем «молодые» гены. Сейчас в подобных исследованиях в качестве генетических маркеров широко используют полиморфные последовательности ядерной и митохондриальной ДНК. Все эти и многие другие вопросы были широко представлены в рамках программы «Генетическое разнообразие человека», инициированной в 1991 г. как ответвление проекта «Геном человека». Многие вопросы в этой области остаются еще в стадии разработки, и для их решения необходим комплексный подход с использованием новейших технологий и разработкой новых, более информативных методов.

Важным аспектом изучения генетической структуры популяций является выявление факторов, влияющих на эту структуру. Установлено, что главными факторами, изменяющими генетическую структуру современных популяций человека, являются мутационный процесс, отбор и миграция населения.

4.1.2. Мутационный процесс в популяциях

Когда речь идет о мутационном процессе в популяциях, то имеют в виду мутации, происходящие в половых клетках, так как только они могут попадать в генофонд популяции. Мутации в

соматических клетках приводят к возрастанию риска возникновения злокачественных новообразований и, таким образом, снижают жизнеспособность организма, но не передаются по наследству.

Большинство вновь возникающих генных мутаций и практически все аберрации хромосом неблагоприятны как для индивида, так и для популяции в целом: они приводят к гибели в период эмбрионального развития или к патологии разной степени тяжести в постнатальный период. Мутации, в той или иной мере снижающие жизнеспособность их носителей, относятся к генетическому грузу популяции. Размер генетического груза популяции определяется величиной мутационного груза (вновь возникающие мутации) и сегрегационного груза (наличие в популяции гетерозиготных генотипов полиморфных (сегрегирующих) локусов, выщепляющих менее приспособленные гомозиготные генотипы) (рис. 4.1). Выделяют также субституционный груз, который выявляется при изменении адаптивной ценности генотипа (например, при переселении в другие условия).

Часть генных мутаций не проявляется на уровне структуры белка или приводит к таким изменениям аминокислотной последовательности, которые не вызывают явной функциональной недостаточности белков, как, например, в случае разных вариантов гемоглобина. Такие нейтральные мутации составляют огромный генетический полиморфизм, однако, строго говоря, нейтральных мутаций не существует. Так, долгое время считалось, что аллели, определяющие группы крови по системе АВ0, нейтральны в отношении приспособительного значения. В настоящее время это представление полностью опровергнуто. Установлено, что наличие того или иного аллеля определяет предрасположенность его носителя к развитию определенных мультифакториальных заболеваний.

В некоторых случаях, хотя достаточно редких, мутации могут оказаться полезными. Например, известно, что СПИД, вызываемый вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), у части инфицированного населения развивается медленно, а у отдельных лиц вообще не развивается. Установлено, что такие различия обусловлены мутациями в гене *CCR5*. Изменение или отсутствие произ-

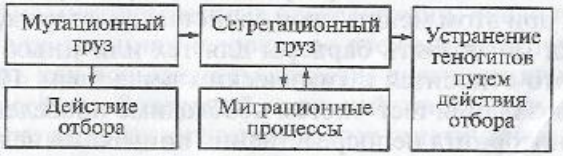

Рис. 4.1. Мутационный процесс в популяциях

4.1.1. Изучение генетической структуры популяций

Изучение структуры генофондов популяций человека является отправной точкой генетического мониторинга человека. В ходе таких исследований был выявлен огромный генетический полиморфизм. Под полиморфизмом подразумевается наличие в популяции нескольких аллелей одного локуса, самый редкий из которых встречается с ощутимой частотой и не может поддерживаться лишь давлением повторяющихся мутаций. Сначала явление полиморфизма было установлено для фенотипических признаков, затем для аллозимов[1] и, наконец, для отдельных отрезков ДНК и нуклеотидов. Источником полиморфизма в популяции, очевидно, являются мутации, однако механизмы его формирования до конца еще не изучены. Существует несколько моделей для объяснения путей и механизмов возникновения генетического полиморфизма. Согласно одной из них полиморфизм — это результат действия разнонаправленных приспособительных процессов.

Каждая популяция имеет свою генетически отличающуюся структуру, являющуюся результатом эволюционной адаптации человека. Распределение частот полиморфных аллелей и частот мутаций по популяциям носит неравномерный характер. Оно определяется историей популяции, демографическими, социальными факторами, действием факторов окружающей среды и т. д. В одних случаях основатели популяции имели скрытые (рецессивные) или нескрытые гены патологии. Например, у людей из секты меннонитов, обособленно проживающих в штате Пенсильвания (США), наблюдается большая концентрация рецессивного гена карликовости. В других случаях возникали условия, благоприятные для жизнеспособности гетерозигот по патологическому аллелю (всем известный пример распространения гена серповидноклеточности в регионах, характеризующихся наличием малярийного плазмодия). Патологии отмечались также там, где были распространены родственные браки (как в Турции) и т. д.

Загрязнение окружающей среды новыми чужеродными человеку факторами породило особый класс патологии, связанный с непереносимостью определенных химических соединений. Это явление обусловлено широким полиморфизмом так называемых генов детоксикации, кодирующих ферменты, ответственные за процессы биотрансформации ксенобиотиков в организме человека. Полиморфные варианты этих генов обусловливают индивидуальную реакцию организма на пищевые продукты, препараты бытовой химии, лекарственные препараты, действие никотина,

[1] Белки, отличающиеся по первичной структуре и кодируемые разными аллелями одного гена.

алкоголя и т. д. Существуют гены, обусловливающие предрасположенность к развитию профессиональных заболеваний на вредных производствах. Наследственные особенности могут влиять также на чувствительность людей к действию ионизирующей радиации. По-видимому, особенно важно это учитывать в случае действия малых доз радиации, поскольку таким воздействиям подвергается значительная часть людей (население, проживающее на загрязненных радионуклидами территориях, работники предприятий атомной промышленности, люди других профессий, связанных с ионизирующим излучением). Изучение особенностей распространения частот аллелей, определяющих разную чувствительность человека к факторам окружающей среды, выявление людей с повышенной чувствительностью к внешним воздействиям и ограничение контакта с неблагоприятными агентами позволят снизить количество возможных патологий.

Установлено, что последовательности геномов разных людей, даже относящихся к разным расам, на 99,9 % идентичны. В то же время каждый человек обладает уникальным геномом. Эта уникальность обусловлена наличием полиморфизма отдельных участков ДНК.

Большинство таких вариаций представлено однонуклеотидными заменами (ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, или *SNP — single nucleotide polymorphism*), когда у одного человека в определенной позиции находится один нуклеотид, а у другого — другой. SNP встречается примерно через каждые 1 000 нуклеотидов. Они могут быть как внутри генов, так и в некодирующих последовательностях ДНК. Установлено, что такие замены могут служить маркерами предрасположенности к различным заболеваниям, а также маркерами разной реакции организма на действие внешних факторов. Кроме того, SNP могут приводить к появлению или исчезновению сайтов рестрикции, меняя набор фрагментов ДНК, получаемых при проведении рестрикционного анализа. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, или *RFLP — restriction fragment length polymorphism*) был использован для получения генетической карты генома человека. В последнее время установлено, что группы SNP наследуются совместно с низким уровнем рекомбинации внутри группы. Это так называемые гаплотипные блоки. Выявление таких гаплотипов упрощает анализ их связи с заболеваниями.

Еще одной вариацией структуры ДНК является полиморфизм простых повторов или микросателлиты (*STR — short tandem repeat or microsatellite*). Это короткие последовательности (например, CA), повторенные различное число раз (обычно 5 — 50). Для каждого повтора существует большое количество аллелей в зависимости от числа повторов. Известны также тринуклеотидные

водимого им белка существенно затрудняет или делает невозможным проникновение патогенного вируса в клетки.

Увеличивающиеся масштабы техногенного загрязнения подвергают современных людей существенно большим рискам неблагоприятной изменчивости, чем это было на протяжении всего предшествующего периода развития человеческой цивилизации. Вследствие этого может увеличиваться мутационная составляющая генетического груза.

Одним из мощных факторов, приводящих к изменениям в структуре ДНК, является ионизирующая радиация. Постепенное повышение фонового уровня радиации в окружающей среде происходит под влиянием атомных взрывов, при бытовом и медицинском использовании ионизирующих излучений, при работе АЭС и т.д. Фон радиации резко повышается на территориях, затронутых последствиями аварий, связанных с поступлением радионуклидов в окружающую среду.

Другим фактором, влияющим на структуру генофонда, являются химические мутагены. Районы особенно интенсивного загрязнения имеются в США, России, Японии и других странах. Доказано, что в таких условиях растет число спонтанных абортов, мертворождений, количество новорожденных с дефектами развития, раковых заболеваний и т.д. Физические, химические, а также биологические (вирусные) мутагены несут серьезную угрозу для генетической структуры популяции в будущем, поэтому одними из актуальнейших задач мониторинга являются изучение процессов генетической изменчивости человека и разработка системы мер для предотвращения развития неблагоприятных тенденций. Своевременное и грамотное использование имеющихся знаний может сохранить приемлемый уровень здоровья будущих поколений.

К настоящему времени разработано большое количество тест-систем для обнаружения мутагенной активности компонентов окружающей среды. Однако следует отметить, что тест-системы, основанные на использовании микроорганизмов, растений или животных, не всегда дают адекватные представления о динамике мутационного процесса непосредственно в популяциях человека. Это связано с тем, что, во-первых, попадая в организм человека, мутаген может испытывать превращения, характерные только для человека, и при этом менять свои свойства; во-вторых, в организме человека могут быть барьеры для тех или иных мутагенов. Особенно это относится к химическим веществам. Поэтому помимо использования тест-систем необходимо проведение генетического мониторинга непосредственно популяций человека. При этом полученные показатели будут являться индикаторами состояния окружающей среды и самой популяции.

В основе модели генетического мониторинга, разработанной профессором Ю. П. Алтуховым в середине 1980-х гг., лежит представление о нормальном и неблагоприятном генетических процессах в популяции. Нормальным генетическим процессом считается такой процесс, когда объем генетического груза остается постоянным, неблагоприятным — когда он увеличивается. Примером популяции с неблагоприятными процессами может быть популяция большого города. В такой популяции происходит постоянное изменение структуры генофонда, увеличение доли генетического груза за счет усиления мутационного процесса, обусловленного загрязнением окружающей среды и ослаблением действия отбора благодаря большей доступности использования современных достижений медицины. Отмечается снижение смертности, но при этом снижается и плодовитость. Анализ популяционно-генетических процессов у городского населения выявил их несоответствие критерию нормальности. Это проявляется в том, что генофонд коренных горожан не воспроизводится в последующих поколениях, внутрипопуляционное генетическое разнообразие растет. Этот процесс можно назвать дезадаптивным. В этом случае необходима разработка мер, способных обеспечить воспроизводство здорового генофонда и сохранение оптимального уровня генетического разнообразия.

На сегодняшний день для изучения генетических процессов в человеческом сообществе наиболее часто применяется локальный генетический мониторинг — мониторинг локальных популяций человека (население определенной области или района). Наблюдая за динамикой генетической структуры таких популяций, можно характеризовать генетическую опасность, связанную с загрязнением более обширных территорий (например, население страны или географического региона). При этом можно использовать цитологические, биохимические, молекулярно-генетические и другие удобные для анализа методы. Важно только, чтобы материал исследования адекватно отражал существующие сообщества и происходящие в них процессы.

4.1.3. Действие отбора в современных условиях

По данным многочисленных исследований, число патологических генов в популяциях человека во всем мире растет. Это можно объяснить как повышением качества диагностики и регистрации генетических заболеваний, так и действительным увеличением частоты патологических генов за счет генетических процессов, происходящих в популяциях. Считается, что помимо действия неблагоприятных факторов окружающей среды данное увеличение

может происходить при отсутствии естественного отбора у человека из-за повышения уровня медицинской помощи беременным, младенцам и лицам с наследственной патологией. Однако это утверждение справедливо лишь отчасти. По подсчетам Л. Пенроуза, выполненным для европейского населения, отбор существует на всех стадиях эмбрионального развития (спонтанные аборты, мертворождения) и на дальнейших стадиях постнатального развития (смертность до наступления репродуктивного возраста, отсутствие потомства). В результате не менее половины генофонда не воспроизводится в следующем поколении. Никаким лечением до сих пор не удавалось предотвратить последствия синдромов Дауна, Клайнфельтера и др. Для этих состояний действие естественного отбора не изменилось. Существуют многие другие наследственные заболевания, для которых удовлетворительной терапии нет, и естественный отбор действует еще в полную силу. В качестве примеров можно привести нейрофиброматоз, туберозный склероз, миопатию Дюшенна и т.д. По мере того как эффективность лечения этих болезней будет увеличиваться, отбор будет ослабевать.

Отбор действительно ослаблен для некоторых патологических признаков. Существуют наследственные заболевания, которые сохранились до сих пор благодаря генетическому равновесию между мутацией и отбором (например, гемофилия А). Проведение заместительной терапии позволяет вести больным почти нормальный образ жизни. Значительно возросла продолжительность жизни, увеличилась возможность иметь детей.

Наиболее заметный успех в терапии наследственных заболеваний достигнут по отношению к рецессивным дефектам ферментных систем. Лечение позволяет лицам, пораженным некоторыми из этих заболеваний, вырасти здоровыми настолько, что они могут иметь детей. По мнению Е. Фогеля и А. Мотульски, большое влияние на генетическую структуру будущих поколений окажет ослабление отбора против заболеваний мультифакториальной природы. Уже сейчас наблюдается рост частоты «болезней века» — сердечно-сосудистых, онкологических, аллергических, психических.

В популяции существует изменчивость не только для четко определенных генетически детерминированных признаков, но и для функциональных систем, работа которых осуществляется в результате сложного, упорядоченного взаимодействия разных генов в период эмбрионального развития. В качестве примера можно привести сердечно-сосудистую, зрительную, слуховую, иммунную системы. Эволюционно эти системы развивались под постоянным и интенсивным действием отбора. По мере снижения этого давления накапливаются мутации, приводящие к небольшим

функциональным недостаткам, и постепенно эти системы начинают деградировать. Например, сейчас в популяциях широко распространены многочисленные дефекты зрения и слуха. Не менее опасные последствия для человечества может иметь медленное повреждение иммунной системы. До недавнего времени высокая смертность среди детей была обусловлена главным образом инфекционными заболеваниями, и тем самым из популяции удалялись индивиды, имеющие ослабленную иммунную систему. Теперь широкое применение мощной антибактериальной терапии в лечебной практике может привести к постепенной функциональной деградации иммунной системы, следствием чего будут снижение устойчивости к инфекционным агентам и возможное возрастание частоты новообразований.

Успехи современной медицины создают условия для выживания и размножения индивидов со слабой степенью умственной отсталости, генетическая обусловленность которой у части лиц в настоящее время признается большинством ученых. В будущем это также может внести свой вклад в ухудшение структуры генофондов популяций человека.

Следует еще раз отметить, что во всех случаях ослабления действия отбора корректируется только фенотип, а генотип остается неизменным, и гены, ответственные за наследственные заболевания, передаются в следующие поколения, что способствует росту сегрегационного груза популяции. Накопление генетического груза снижает приспособленность популяции, что при «ужесточении» среды обитания (психоэмоциональный стресс, повышение уровня загрязнения и т.д.) может привести к росту смертности.

4.1.4. Миграционные процессы

На структуру и динамику генофондов популяций человека помимо перечисленных факторов оказывают влияние и миграционные процессы. Однако во многом их роль еще недостаточно изучена. Сейчас происходит резкое изменение популяционно-генетической организации вида *Homo sapiens*. Это обусловлено тем, что на протяжении длительного времени вид был представлен множеством достаточно изолированных субпопуляций. Миграция генов между этими субпопуляциями была незначительна, что приводило к гипертрофированным межпопуляционным различиям. Сейчас такой тип структуры встречается крайне редко, у так называемых малых народов. Примером могут быть коренные монголоидные популяции Северной Азии и Америки. Для остальной части населения Земного шара характерны интенсивные миграции. Причем поток генов в некоторых случаях (например, в боль-

ших городах) настолько мощный, что за 5—10 поколений может произойти практически полная замена исходного генофонда. Такие города, уже не воспроизводящие свой генофонд, являются центрами депопуляции. Ученые едины во мнении, что этот процесс в будущем может привести к созданию единой гигантской панмиктической популяции со смешением разных этнических компонентов, что представляет собой аутбридинг, приводящий к росту гетерозиготности популяции.

В настоящее время нет единого мнения о последствиях этого процесса. Одна точка зрения заключается в том, что повышение геторозиготности популяции благоприятно для индивидов, так как скрываются неблагоприятные рецессивные мутации и может проявляться эффект гетерозиса (В. П. Эфроимсон, Н. П. Дубинин, В. А. Шевченко). Согласно противоположной точке зрения (Н. П. Бочков) аутбридинг ведет к разрушению устоявшихся отшлифованных временем комплексов генов. Также есть данные, что при аутбридинге происходит повышение уровня спонтанного мутационного процесса. Если проводить аналогию с популяциями природных видов, то оба крайних состояния (инбридинг и аутбридинг) ведут к снижению приспособленности. Это так называемая плата за «примитивный образ жизни» или плата за «цивилизацию».

Миграционные потоки могут менять частоту аллелей в популяциях, в том числе и аллелей, связанных с развитием патологии или предрасположенностью к развитию различных заболеваний. Поэтому большое значение имеет прогноз динамики генетической изменчивости в популяции. Особенно актуально это в случае определения изменения спектра наследственных болезней в будущем. Так, для Москвы прогнозируется увеличение доли гетерозиготности для локусов, контролирующих системы малярийнозависимых полиморфизмов. У коренного русского населения аномальные варианты белков этих локусов практически отсутствуют, однако они встречаются с повышенной частотой у населения Кавказа и Средней Азии, откуда сейчас наблюдается большой поток мигрантов. Таких примеров много. Прогноз изменения частот наследственных патологий является основой для планирования объема и характера медицинской помощи и целенаправленной подготовки специалистов.

Кроме наследственной патологии миграция может оказывать влияние и на другие стороны жизни. Эмиграция наиболее образованных и квалифицированных кадров неблагоприятна для генофонда страны: установлено, что уровень интеллекта в определенной степени зависит от генетических факторов. Помимо изменения структуры генофонда популяции миграция приводит и к другим проблемам. Зачастую снижается приспособленность

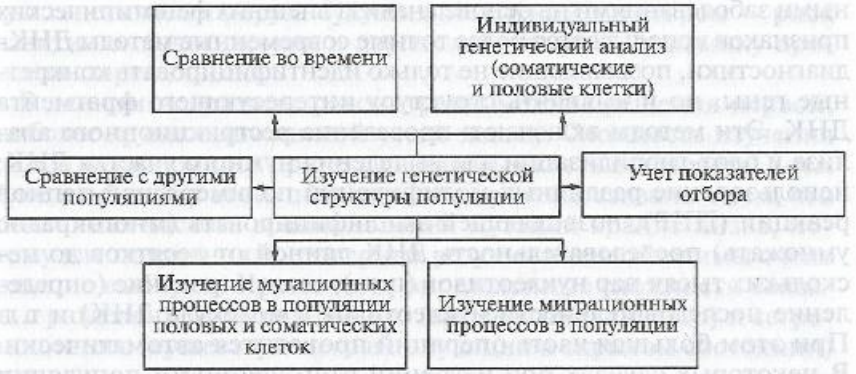

Рис. 4.2. Основные направления генетического мониторинга человека

«дальних» мигрантов к жизни в новом месте. Это обусловлено тем, что генофонды коренного населения формировались в процессе длительного приспособления к условиям существования (определенный тип физической активности, восполнение энергозатрат, своеобразие факторов окружающей среды и т. д.). В случае резкого отличия условий среды на новом месте у мигрантов может наблюдаться снижение жизнеспособности, проявляющееся в росте заболеваемости. Таким образом, в новых условиях изменяется адаптивная ценность генотипов, и аллели, которые у коренного населения благоприятно влияли на жизнеспособность, при миграции могут попасть в группу генетического груза (субституционный груз). На рис. 4.2 представлены основные направления, по которым ведется генетический мониторинг человека.

4.2. Методы генетического мониторинга человека

Совершенствование методов мониторинга человека шло параллельно с накоплением данных в области генетики человека, развитием представлений о генетических процессах в популяциях и разработкой методов анализа генетического материала половых и соматических клеток человека.

4.2.1. Методы изучения генетической структуры популяций

В настоящее время для изучения генетической структуры популяций используют самые разнообразные методы. Наряду с изучением полиморфизма и отягощенности популяции наследствен-

ными заболеваниями на основе анализа внешних фенотипических признаков используются более точные современные методы ДНК-диагностики, позволяющие не только идентифицировать конкретные гены, но и выявлять структуру интересующего фрагмента ДНК. Эти методы включают: проведение рестрикционного анализа и блот-гибридизации для выделения нужного участка ДНК; использование различных модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей амплифицировать (многократно умножать) последовательность ДНК длиной от десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов (п. н.), секвенирование (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК) и т. д. При этом бóльшая часть операций проводится автоматически. В некоторых случаях при изучении отягощенности популяции разными наследственными заболеваниями или исследовании распределения частот аллелей других маркерных генов уже можно использовать коммерческие пробы или ДНК-тесты. Путем сравнения участков геномов больных и здоровых лиц ведется поиск и картирование генов, ответственных за наследственные заболевания, а также маркеров предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям. При сравнении генофондов различных популяций широко используются ДНК-маркеры, такие как SNP, микросателлитные последовательности, Alu-повторы последовательности митохондриальной ДНК и т. д. Среди популяционно-генетических методов можно отметить такие, как изучение уровня гетерозиготности, степени генетической подразделенности популяции, анализ генетического расстояния между изучаемыми группами. Для выявления трендов (скрытых закономерностей) в пространственной изменчивости признаков проводится картографический анализ. Используются стандартные методы популяционной статистики. Большое значение отводится созданию общедоступных, легко читаемых банков данных, содержащих информацию о спектре мутаций генов человека. На Международной конференции по программе «Геном человека» было одобрено создание единой компьютеризованной базы данных по мутациям разных генов человека с целью использования ее учеными всего мира.

4.2.2. Исследование мутационного процесса в половых клетках человека и снижение генетического груза популяции

В рамках генетического мониторинга проводится анализ мутационного процесса как в половых, так и в соматических клетках. Это позволяет оценить в первом случае мутационную составляющую генетического груза будущих поколений, во втором — риск развития онкологических и других заболеваний, динамику процессов старения и т. д.

В данном подразделе рассмотрены методы решения первой, наиболее трудновыполнимой части задачи. Сложность изучения темпов мутационного процесса в половых клетках человека, а тем более изменения этого показателя во времени связаны с тем, что спонтанная частота возникновения мутаций крайне низка, поэтому для получения достоверных результатов необходимы очень большие выборки. Кроме того, определенные сложности связаны с разделением мутационного (вновь возникающего) и сегрегационного (существующего в популяции в скрытом состоянии) груза.

Предпринимались попытки изучения темпов мутационного процесса на основе как массового скрининга большого количества лиц, так и обследования специально отобранных групп населения (например, повышенного профессионального риска, имеющих аномалии развития и т. д.). При этом использованы цитологические, биохимические, молекулярно-генетические и другие удобные для анализа методы.

Первую программу мониторинга темпов мутационного процесса у человека предложил Дж. Нил в 70-е гг. XX в. Она была основана на анализе электрофоретических вариантов белков крови как маркеров соответствующих структурных генов. Благодаря успехам биохимической генетики было установлено, что в популяциях человека наблюдается большой белковый полиморфизм (структурные гены белков имеют два и более аллелей). Частота встречаемости таких аллелей в популяции достаточно высока. Вместе с тем для ряда белков характерен мономорфизм. При этом редкие уклоняющиеся варианты белков представляют собой мутантные формы генов. Дж. Нил исходил из селективной нейтральности вновь возникающих мутаций и учитывал редкие электрофоретические варианты белков, проводя массовый скрининг населения. Выявленный темп мутирования соответствовал 10^{-5} на ген на поколение. Чтобы получить этот результат, пришлось провести около миллиона тестов.

Н. П. Дубинин предложил другой подход к решению вопроса. Он основан на том, что вновь возникающие мутации, находясь в гетерозиготном состоянии, снижают жизнеспособность их носителей. Это положение позволило сократить объем выборки. Исследовались образцы крови только недоношенных детей, детей с пороками развития, а также материал спонтанных абортов, а затем проводился пересчет с учетом доли аномальных детей в популяции и с поправкой на электрофоретически «молчащие» аллели (изменения в структуре гена не приводят к изменению электрофо-

ретической подвижности). Частота мутирования при таком исследовании получилась вдвое больше, чем у Дж. Нила. Исходя из этого, был сделан вывод, что без учета давления отбора против вновь возникающих мутаций оценка темпов мутирования может быть занижена. Тем не менее следует отметить, что оба подхода (массовый и селективный скрининг) нуждаются в дальнейшем совершенствовании, так как оба имеют как свои преимущества, так и недостатки.

Существует много других подходов к оценке темпов мутирования. Трудности связаны с тем, чтобы вычленить вновь возникающие мутации от сегрегационного груза (мутации, передающиеся из поколения в поколение). Например, можно взять за основу аномалии хромосом у новорожденных. Дети с такими нарушениями погибают либо не дают потомства, поэтому все мутации будут новыми. Однако из-за низкой частоты возникающих мутаций для получения надежных результатов необходимо обследовать огромное количество новорожденных. Установлено, что хромосомные мутации составляют 4 % генетического груза. Остальные 96 % приходятся на генные мутации. Но если взять за основу анализ возникновения определенных генных мутаций, то проблемы, связанные с величиной выборки, не исчезают, так как частота мутаций в каждом отдельном локусе крайне низка (10^{-5}—10^{-7}). Можно проводить мониторинг по моногенным доминантным мутациям, влияющим на плодовитость их носителей, или по мутациям генов, сцепленных с полом (при этом анализ следует проводить среди мальчиков). Во всех случаях также нужны очень большие выборки.

Среди новых предложенных методов — метод двухмерного электрофореза, позволяющего разделить от 500 до 1 000 белков, а также прямой анализ структуры генома через анализ ДНК с помощью рестрикции эндонуклеазами, секвенирования и молекулярной гибридизации. Эти методы достаточно дорогостоящие и при огромном масштабе генетического мониторинга пока неприемлемы.

Более простой способ наблюдения за мутационными процессами в популяции был предложен Н. П. Дубининым. Он заключается в анализе доминантных мутаций, вызывающих дефекты внутриутробного развития. Генетический мониторинг при этом может быть осуществлен путем анализа динамики спонтанных абортов, мертворождений и врожденных пороков развития.

Еще один подход был предложен Ю. Е. Дубровой: проводить анализ гипервариабельной мини-сателлитной ДНК человека. Мини-сателлитная ДНК представляет собой тандемный повтор с изменяющимся числом повторяющихся единиц, каждая из которых имеет одинаковую длину (семь или более пар нуклеотидов).

При изучении темпов мутационного процесса следует учитывать, что в случаях, когда этот показатель не увеличивается, но ослабевает отбор вследствие достижений терапевтической медицины, величина генетического груза увеличивается, и генетические процессы в такой популяции будут неблагоприятными.

Для уменьшения объема мутационного груза в популяции необходимо принимать меры по снижению действия неблагоприятных факторов окружающей среды. В экстремальных случаях (проживание на территории, загрязненной радионуклидами или химическими мутагенами, работа на вредном производстве и т. д.) можно обозначить фактор, влияющий на появление новых мутаций. Однако во многих случаях вычленить такой фактор из всего многообразия окружающих человека факторов очень сложно или почти невозможно.

Наряду с мерами, обеспечивающими снижение действия неблагоприятных факторов окружающей среды, наиболее распространенным и эффективным подходом к снижению доли генетического груза в популяции является профилактика наследственных болезней. Основная роль здесь отводится медико-генетическому консультированию, и в частности проспективному консультированию, когда риск рождения больного ребенка определяется еще до наступления беременности или в ранние ее сроки.

Основная причина, которая заставляет людей обращаться к врачу-генетику, — это желание узнать прогноз здоровья будущего потомства относительно наследственной патологии. Как правило, в консультацию обращаются семьи, где имеется ребенок с наследственным или врожденным заболеванием (ретроспективное консультирование) или его появление предполагается (проспективное консультирование) в связи с наличием наследственных заболеваний у родственников, кровнородственным браком, возрастом родителей (старше 35—40 лет), воздействием вредных средовых факторов на кого-либо из супругов незадолго до наступления беременности или в первые недели ее (лечебное или диагностическое облучение, тяжелые инфекции). Эффективность консультации как врачебного заключения зависит в основном от трех факторов: точности диагноза, точности расчета генетического риска и уровня понимания генетического заключения консультирующимися.

При диагностике наследственных патологий широко применяют цитогенетические, биохимические, иммунологические, молекулярно-генетические и другие методы. Следует отметить, что эффективность диагностики по белкам, а тем более по продуктам обмена веществ весьма ограничена. Этот метод может приводить к ошибкам и обычно не позволяет распознать разные (обусловленные разными генными дефектами) формы одной и той же

болезни. К тому же белки и метаболиты появляются не все сразу, а каждый в свое время на определенной стадии развития организма, что делает порой невозможным сверхраннюю диагностику. По мере развития наших знаний о структуре и функционировании генома человека совершенствуются и разрабатываются новые методы диагностики и профилактики наследственных заболеваний. Уже сейчас установлена структура и хромосомная локализация многих генов, необычные варианты которых служат причиной заболеваний или благоприятствуют их развитию. Появилась возможность в ряде случаев ставить диагноз по ДНК или по синтезированной на ней РНК. По сути дела, на наших глазах происходит технологическая революция, которая позволит осуществлять раннюю диагностику наследственных болезней как в индивидуальном порядке, так и в порядке массового генетического тестирования (просеивания, или скрининга). В настоящее время с помощью ДНК-диагностики можно выявлять не менее трехсот наследственных болезней.

В ходе такого тестирования обнаруживается мутантный ген, являющийся причиной болезни. Идентифицировать его можно на любой стадии развития организма. Это очень важно ввиду тенденции к расширению объемов дородовой (пренатальной) и преимплантационной диагностики. Особенно важно генетическое тестирование при искусственном зачатии на преимплантационной стадии, т.е. предшествующей внедрению зародыша в матку. Если заболевание наследуется по женской линии, то у женщины берут несколько овуляционных яйцеклеток и оплодотворяют в пробирке. Затем клетки отдельных зародышей исследуют на хромосомном уровне, отбирают здоровую оплодотворенную яйцеклетку, не несущую мутаций, и имплантируют обратно в матку. В этом случае рождается заведомо здоровый ребенок.

В нашей стране основные работы по молекулярной диагностике наследственных заболеваний ведутся в медико-генетических центрах в Москве, Санкт-Петербурге, Томске, Уфе и Новосибирске. Проводится идентификация мутаций, изучение полиморфизма генов, обусловливающих наследственные заболевания, создаются коллекции клонированных ДНК-последовательностей, которые могут быть использованы как ДНК-пробы. Однако введение молекулярно-генетических методов в медицинскую практику осуществляется еще очень медленно.

С социальной точки зрения целью генетического консультирования в целом является уменьшение частоты патологических генов в популяциях человека, а целью конкретной консультации — помощь семье в решении вопроса о возможности деторождения. При широком внедрении генетического консультирования может быть достигнуто некоторое уменьшение частоты наследственных бо-

лезней, а также смертности, особенно детской. Однако уменьшение частоты тяжелых доминантных заболеваний в популяциях не будет существенным, потому что 80—90 % из них составляют новые мутации.

В разных странах в зависимости от преобладания определенных наследственных заболеваний разрабатывают различные скрининговые программы, позволяющие ограничивать распространение нежелательных аллелей в популяции и тем самым уменьшать величину сегрегационного груза. Так, в Англии анализ сыворотки крови матери на содержание альфа-протеина с последующим абортом в случае выявления патологии снизил частоту дефектов нервного ствола у новорожденных на 50 %.

Одна из мер профилактики наследственных заболеваний — избегание браков между гетерозиготными носителями рецессивных дефектов. В Западной Европе около 4 % евреев гетерозиготны по рецессивному аллелю, приводящему к тяжелому заболеванию, получившему название болезнь Тая-Сакса. Носителя данного аллеля можно выявить биохимическим анализом. Внедрение программы скрининга по данному заболеванию в ряде стран привело к значительному снижению частоты его появления.

На Кипре, где часто встречается талассемия, введено обязательное добрачное тестирование на гетерозиготность по соответствующему гену. При вступлении в брак двух носителей патологического гена проводят диагноз плода, и в случае обнаружения заболевания плод подвергается аборту.

4.2.3. Оценка миграционных потоков аллелей

При исследовании состояния генофонда той или иной популяции в случаях, когда имеет место большой поток мигрантов, проводят анализ возможного изменения частот жизненно важных аллелей. Такой прогноз строится на основе данных о частотах этих аллелей в исходных популяциях, между которыми происходит обмен материалов миграционной службы и знаний о закономерностях генетических процессов в популяциях.

По мере разработки новых, более информативных методов анализа как структуры генофонда популяций, так и генетического материала конкретного человека будут открываться новые возможности, расширяться задачи и сферы приложения генетического мониторинга. Сейчас создаются массивы данных о частотах разных генов в популяциях человека, разрабатываются компьютерные технологии хранения и обработки полученной информации. Это позволит в будущем проводить широкомасштабный мониторинг генофондов всего населения Земли.

4.2.4. Оценка мутагенеза в соматических клетках человека

Важность анализа мутационного процесса в соматических клетках не вызывает сомнения, так как генетические повреждения в соматических клетках ассоциируются с высоким риском развития злокачественных новообразований и некоторых соматических заболеваний.

При изучении мутагенеза в соматических клетках могут решаться следующие задачи генетического мониторинга:

- биологическая индикация генотоксических факторов окружающей среды (путем сравнения уровня мутагенеза у населения разных регионов);
- биологическая дозиметрия генотоксических воздействий разной природы, включая прежде всего радиационное воздействие;
- оценка эффектов действия генотоксических факторов в динамике (например, сравнение уровня соматического мутагенеза у населения одного и того же региона в разные годы в случае наличия такого фактора в окружающей среде или у лиц, контактирующих с такими факторами при выполнении профессиональных обязанностей);
- выявление лиц с повышенной чувствительностью к генотоксическим факторам (формирование группы риска возникновения онкологических заболеваний среди жителей загрязненных мутагенами территорий, работников вредных производств и т. д.);
- выявление лиц с высоким уровнем спонтанного соматического мутагенеза вследствие наследственных особенностей (например, генетического полиморфизма или мутаций генов, продукты которых принимают участие в работе систем репарации повреждений ДНК, поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза, элиминации поврежденных клеток и т. д.) в целях профессионального отбора и/или формирования группы риска возникновения онкологических заболеваний;
- выявление отдаленных эффектов действия генотоксических факторов.

Анализ соматического мутагенеза включает выявление всех типов мутаций — геномных, хромосомных и генных.

Для изучения соматического мутагенеза чаще всего применяется цитогенетический метод. Он позволяет определять *частоту аберраций хромосом* в соматических клетках человека. Наиболее часто наблюдаемые типы аберраций показаны на рис. 4.3. В зависимости от «времени жизни» в организме выделяют два типа аберраций: стабильные и нестабильные. Нестабильные аберрации «исчезают» при прохождении клетки через митоз. Как правило,

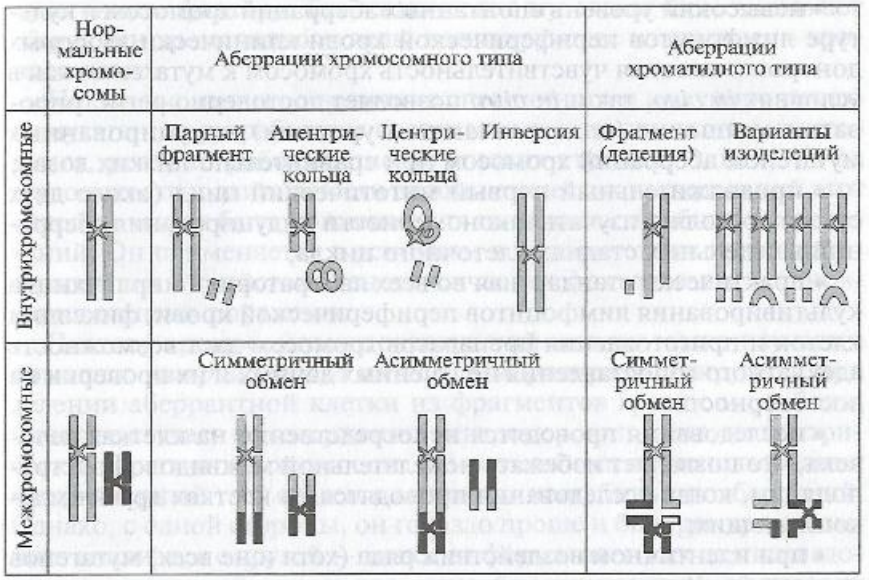

Рис. 4.3. Наиболее часто встречаемые типы аберраций хромосом

это аберрации, приводящие либо к утрате хромосомой центромеры (лишенные центромеры фрагменты могут «потеряться» при делении), либо к формированию хромосом с двумя (или более) центромерами (наличие таких хромосом может привести к образованию «мостика» в анафазе митоза, делая деление клетки невозможным и приводя к ее гибели). Клетки со стабильными аберрациями могут проходить через митоз, если они не несут других мутаций, влияющих на их жизнеспособность и деление.

Во время цитогенетического исследования проводится, как правило, анализ метафазных хромосом, поэтому необходимым условием такого исследования является получение делящихся клеток. В подавляющем большинстве случаев используют культуру лимфоцитов человека периферической крови, которая обладает рядом достоинств:

- простота и доступность получения исходного материала;
- высокая исходная концентрация клеток в материале: в 1 мл крови содержится $1 - 3 \times 10^6$ малых лимфоцитов, способных трансформироваться при культивировании с митогеном, что определяет небольшой объем крови, необходимый для анализа;
- в периферической крови организма лимфоциты не делятся, находясь в покоящемся состоянии (в стадии G_0), поэтому перед «стартом» в культуре популяция лимфоцитов является естественно синхронизированной (за очень редким исключением);

• невысокий уровень спонтанных аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови клинически здоровых доноров и высокая чувствительность хромосом к мутагенам как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* позволяет достоверно регистрировать повышение (над спонтанным уровнем) индуцированных мутагеном аберраций хромосом при сравнительно низких дозах;

• продолжительный первый митотический цикл (около двух суток) позволяет изучать закономерности индуцирования аберраций в отдельных стадиях клеточного цикла;

• практически стандартная во всех лабораториях мира техника культивирования лимфоцитов периферической крови, фиксации клеток и приготовления препаратов хромосом дает возможность адекватного сопоставления полученных данных и их проверки на достоверность;

• исследования проводятся непосредственно на клетках человека, что позволяет избежать нежелательной межвидовой экстраполяции, когда исследования проводятся на клетках других млекопитающих;

• при идентичном воздействии ряда (хотя и не всех) мутагенов *in vivo* и *in vitro* не только типы, но и количество индуцированных аберраций хромосом практически одинаково.

Традиционный вариант окрашивания хромосом (с помощью красителей азур-эозин или Гимза) позволяет выявлять геномные и структурные мутации (главным образом нестабильные хромосомные аберрации). Для анализа стабильных аберраций применяются методы дифференциального окрашивания хромосом и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Принцип FISH-метода заключается в денатурации ДНК метафазных хромосом в препарате и ДНК-пробы (меченые последовательности, гомологичные участкам ДНК изучаемого хромосомного района/хромосомы) с последующей совместной ренатурацией, в результате которой формируются дуплексы меченой ДНК и ДНК-препарата. Поскольку в качестве метки используют флуоресцентные красители или соединения, которые выявляются с помощью флуоресцентных красителей, изучаемый хромосомный район (или хромосому) можно идентифицировать с помощью флуоресцентного микроскопа. Использование разных флуорохромов для промечивания хромосомоспецифических ДНК-проб позволяет идентифицировать несколько хромосом одновременно и даже все хромосомы для полного анализа кариотипа. Стабильные хромосомные аберрации выявляются достаточно легко при обнаружении хромосом, разные части которых окрашены в разные цвета.

В случаях, когда цитогенетические методы используют для выявления действия мутагенных факторов на организм человека, по преобладающему типу аберраций можно грубо оценивать характер

мутагенного фактора. Так, химические мутагены чаще вызывают аберрации хроматидного типа, ионизирующее излучение — хромосомного.

На основе данных о величине спонтанного и индуцированного мутагенеза разработаны системы цитогенетического мониторинга, реально работающие во многих странах. Однако из-за трудоемкости и длительности цитогенетических исследований этот метод не может быть применен для широкомасштабных исследований. Он применяется в основном в приоритетных группах пострадавших от действия генотоксических факторов для установления степени поражения.

Частоту хромосомных повреждений можно также изучать с помощью *микроядерного теста*. Микроядра формируются при делении аберрантной клетки из фрагментов хромосом, в большинстве случаев не содержащих центромер, или, реже, из центрических фрагментов хромосом. По возможностям использования микроядерный тест сходен с анализом нестабильных аберраций. Однако, с одной стороны, он гораздо проще и быстрее хромосомного анализа, а с другой — менее информативен как для исследовательских целей, так и для задач биодозиметрии, поскольку имеет место большая индивидуальная вариабельность по частоте клеток с микроядрами, а также отмечаются некоторые неопределенности дозовых зависимостей.

К методам цитогенетического анализа относится также определение частоты *сестринских хроматидных обменов* (СХО). В соответствии со своим названием СХО представляют собой обмены генетическим материалом между гомологичными участками сестринских хроматид (рис. 4.4). Для выявления СХО используют специальную обработку хромосомных препаратов, позволяющую получить дифференциальную окраску сестринских хроматид. СХО не являются аберрациями, так как не изменяют морфологию хромосомы, однако их частота (в норме 6 — 12 обменов на клетку)

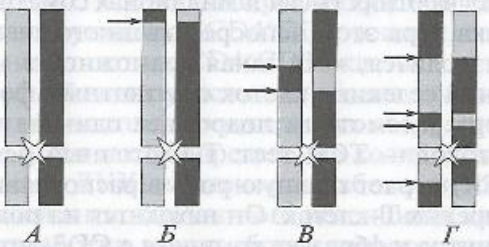

Рис. 4.4. Сестринские хроматидные обмены (места обменов указаны стрелками):

А — дифференциально окрашенная хромосома без СХО; *Б* — терминальный СХО; *В* — интеркалярный СХО; *Г* — множественные СХО

достоверно возрастает при облучении клеток (или воздействии иными мутагенами) на предсинтетической стадии цикла.

Наконец, как отмечалось выше, одним из способов анализа соматического мутагенеза является исследование *генных мутаций*. Относительно недавно были разработаны методы, позволяющие определять частоту клеток с соматическими мутациями по отдельным генным локусам, причем делать это в полуавтоматическом режиме и достаточно быстро обследовать большие группы людей. Эти методы используются пока значительно реже, чем анализ структурных мутаций, хотя они, по всей видимости, обладают не меньшей информативностью. Мутации в отдельных локусах происходят с очень низкой частотой. В большинстве локусов при отсутствии генотоксических воздействий находят одну мутацию на 10^5—10^7 клеток на одну генерацию. Это обстоятельство определяет необходимость анализировать огромное число клеток, чтобы достаточно надежно вычислить частоту мутантных клеток. Для этого используют, как правило, два подхода. Во-первых, культивируют в селективных средах несколько миллионов клеток, из которых выживают только редкие мутантные, число которых бывает уже нетрудно подсчитать. Второй подход основан на использовании *метода проточной цитометрии*, который позволяет анализировать 2—5 тыс. и более клеток в секунду и, таким образом, за 10—20 мин получать информацию о нескольких миллионах клеток.

Существует несколько методов *исследования генных соматических мутаций* в эритроцитах и лимфоцитах периферической крови человека. Чаще всего применяются методы определения мутаций генов гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), Т-клеточного рецептора (TCR) и гликофорина А (GPA). Все эти методы основаны на выявлении изменений белковых продуктов вследствие мутаций в соответствующих генах. Методы позволяют установить наличие или отсутствие изучаемого белка, его способность связывать другие молекулы или его функциональную активность в сотнях тысяч и миллионах соматических клеток одного человека. При этом непосредственного анализа ДНК или РНК не производится, хотя такая возможность имеется после предварительной селекции клеток с мутантным фенотипом.

Для примера рассмотрим подробнее один из часто использующихся методов — TCR-тест. Т-клеточный рецептор (T-cell receptor — TCR) играет главную роль в распознавании антигена и активации зрелых Т-клеток. Он находится на поверхности зрелых Т-лимфоцитов и образует комплекс с CD3-антигеном. TCR-гены имеют аутосомную локализацию. Однако в большинстве зрелых Т-клеток экспрессируется только один аллель каждого из TCR-генов. Мутации, происходящие в активном аллеле, могут быть выявлены по изменению способности Т-клеточного рецептора образовывать комплекс с CD3-антигеном. В случае такой мутации на поверхности Т-клеток отсутствует TCR/CD3-комплекс. Поэтому мутантные Т-клетки (в отличие от немутантных) не связывают антитела к CD3-антигену и по этому признаку регистрируются с помощью проточной цитометрии. Как известно, кроме Т-клеток в периферической крови находятся и другие субпопуляции лимфоцитов, которые, как и мутантные Т-клетки, характеризуются отсутствием CD3-антигена. По этой причине одновременно с выявлением CD3-антигена необходимо очень точно выявить сами Т-клетки. Это делают с помощью антител к CD4-антигену. В итоге получают распределение лимфоцитов периферической крови по интенсивности связывания указанных антител, как показано на рис. 4.5. Анализируя это распределение, определяют количество мутантных $CD4^+CD3^-$-клеток и вычисляют их частоту среди немутантных $CD4^+CD3^+$-клеток.

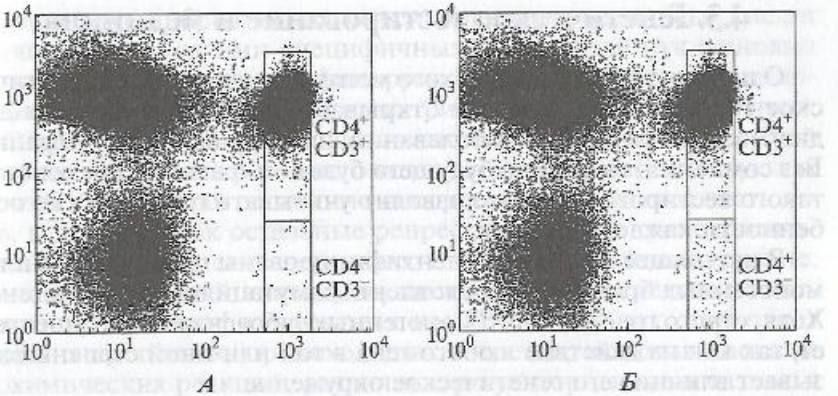

Рис. 4.5. Типичное распределение лимфоцитов по интенсивности связывания антител к CD3/CD4-антигенам:

А — низкая частота $CD4^+CD3^-$ мутантных клеток у донора; *Б* — высокая частота $CD4^-CD3^-$ мутантных клеток после облучения высокой дозой. По оси абсцисс: интенсивность связывания с антителами к CD4-антигену; по оси ординат: интенсивность связывания с антителами к CD3-антигену

Для более полной оценки состояния генома соматических клеток наряду с анализом частоты хромосомных аберраций или генных мутаций проводится также определение количества одно- и двутяжевых разрывов ДНК, активности работы систем репарации ДНК, показателей антиоксидантного потенциала клеток и др.

По мере разработки новых, более информативных методов анализа как структуры генофонда популяций, так и генетического материала конкретного человека будут открываться новые возможности, расширяться задачи и сферы приложения генетического мониторинга.

4.3. Генетическое тестирование и медицина

Одной из задач генетического мониторинга является генетическое тестирование, которое открывает новые возможности для диагностики различных заболеваний, их профилактики и терапии. Без сомнения, медицина будущего будет опираться на результаты такого тестирования, что позволит учитывать генетические особенности каждого человека.

В настоящее время уже идентифицированы гены большинства моногенных болезней (обусловленных мутациями в одном гене). Хотя, строго говоря, чисто моногенных заболеваний не существует, так как на действие любого гена в той или иной степени оказывает влияние его генетическое окружение.

Ведется поиск генов, ответственных за мультифакториальные моногенные и полигенные заболевания (заболевания обусловлены изменениями в одном или нескольких генах, но проявляются только при наличии специфического внешнего фактора). Разработка тестов, позволяющих выявлять предрасположенность к таким заболеваниям, важна, так как дает возможность человеку с такой предрасположенностью избегать вредных для него факторов окружающей среды. В результате он может не заболеть или значительно оттянуть начало болезни. Примерами таких болезней являются диабет, гипертония, атеросклероз и некоторые онкологические заболевания.

В случае всех наследственных заболеваний наблюдается большая генетическая гетерогенность. Одна и та же болезнь (одинаковое клиническое проявление) может быть обусловлена аллелями разных генов или разными аллелями одного гена. Установлено, что в разных популяциях частота встречаемости разных аллелей одного и того же заболевания различна. Поэтому для большей эффективности диагностики наследственных заболеваний необходимо предварительное изучение структуры популяции по данному заболеванию (определение преобладающих аллелей у людей с этим заболеванием). На основе таких исследований создаются ДНК-тесты.

В основе современных генетических тестов, применяемых для молекулярной диагностики различных заболеваний, лежит технология ДНК-матриц, или ДНК-биочипов. Матрица ДНК представляет серию различных коротких олигонуклеотидных последовательностей, помещенных в ячейки миниатюрной пластины так, что на 1 $см^2$ поверхности можно разместить до 10 000 таких последовательностей. Эти последовательности предназначены для гибридизации с исследуемыми образцами ДНК. Их позиция на пластине четко определена и хорошо идентифицируется в автоматическом режиме. Используя этот метод, можно проводить

параллельную гибридизацию смеси меченых нуклеиновых кислот (мишеней) с тысячами специфичных фрагментов нуклеиновых кислот (зондами), индентифицируемых пространственным положением в отдельных ячейках на матрице, в одном эксперименте.

С помощью ДНК-матриц возможно получение полной и точной картины экспрессии огромного количества генов в анализируемых образцах. В клетках постоянно экспрессируется только часть генов, в то время как остальные репрессируются на транскрипционном или, что менее вероятно, на трансляционном уровне. Транскрипционный анализ, осуществляемый посредством экспрессионного профилирования на ДНК-матрицах, позволяет судить о процессах, происходящих в клетке, включая каскады биохимических реакций, различные регуляторные механизмы, а также механизмы патогенеза.

Биотехнологические методы используются при молекулярной диагностике различных заболеваний. Олигонуклеотидные последовательности избирательно взаимодействуют с гомологичными фрагментами, давая возможность количественно и качественно определить искомый компонент в анализируемых пробах. Такие биочипы позволяют обнаружить микроорганизмы и вирусы в плазме крови, определить предрасположенность к наследственным и онкологическим заболеваниям, установить индивидуальную непереносимость тех или иных лекарственных препаратов и т.д.

В настоящее время в клинической практике уже могут применяться около 200 генетических тестов; разработаны панели генетических тестов для наиболее частых мультифакториальных заболеваний, таких как гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, сахарный диабет, эндометриоз и др.

Открытие новых генных сетей увеличивает возможности генетического тестирования наследственной предрасположенности к тем или иным заболеваниям.

Перспективы многопараметрического анализа на основе ДНК-матриц связаны с прогрессом в области нанотехнологий. Достижения в исследовании генома человека обеспечивают значительное увеличение информации относительно механизмов заболеваний, роли целевых генов и белков в патогенезе, в связи с чем все больше дополнительной информации (генов) должно добавляться к индивидуальным ДНК-матрицам. Это может быть достигнуто за счет уменьшения размеров ген-специфических фрагментов ДНК (зондов) до одного микрона или меньше. Обычные системы нанесения ДНК на матрицу позволяют формировать ДНК-матрицу, состоящую из элементов (зондов) размером 100 мкм, в то время как на коммерческих фотолитографических установках можно получать элементы размером до 20 мкм. Вероятно, что на-

нотехнологии будут использоваться для создания ДНК-чипов следующего поколения.

Кроме диагностических целей ДНК-биочипы можно использовать для выявления новых биологических маркеров различных заболеваний. Сравнительный анализ ДНК лиц, отягощенных определенным наследственным заболеванием, и лиц без этого заболевания позволяет выявить маркеры данной патологии. В качестве одной из вариаций ДНК-матриц был разработан метод анализа SNP. Подробнее об изготовлении и применении ДНК-биочипов на современном этапе развития биотехнологий см. подразд. 5.6.

Новая отрасль — фармакогенетика, изучающая как те или иные особенности строения ДНК могут ослабить или усилить воздействие лекарств, в своих исследованиях также опирается на использование микрочипов. Из лечебной практики известно, что большинство рецептурных препаратов эффективно действует менее чем на половину людей, принимающих их. При этом могут наблюдаться побочные эффекты, в ряде случаев достаточно драматичные.

В настоящее время получены данные, которые свидетельствуют о том, что разные аллели одного гена могут обусловливать разную реакцию пациентов на одно и то же лекарство. Уже появляются генные чипы для определения реакции пациентов на широкий спектр лекарственных препаратов. Тест обнаруживает наличие вариаций генов, контролирующих выработку определенных энзимов, отвечающих за расщепление попавших в организм лекарственных препаратов.

У некоторых людей встречается так называемый сверхбыстрый метаболизм, когда переизбыток таких энзимов приводит к слишком быстрому выведению лекарства из организма, и оно не успевает подействовать. Другие люди страдают недостатком этих энзимов, и лекарственные препараты быстро накапливаются в организме, так что даже прием лекарства в обычной дозировке может привести к опасной передозировке. Недавно ученые обнаружили мутации в двух генах, отвечающих за степень разжижения крови при приеме определенной дозы варфарина. Анализ на такие мутации с последующей корректировкой дозы может стать серьезным прорывом в медицине, потому что позволит избежать кровотечений в результате избытка лекарства и образования тромбов при его нехватке.

Большую роль отводят генетическому тестированию в борьбе с болезнью века — раком. Исследования молекулярно-генетических причин и механизмов злокачественной трансформации, а также ранняя диагностика рака становятся все более актуальными, поскольку частота онкологических заболеваний стремительно растет. Достижения генетики и молекулярной биологии последних десятилетий оказали огромное влияние на понимание природы возникновения и прогрессии злокачественных новообразований. Окончательно установлено, что рак представляет собой гетерогенную группу заболеваний, каждое из которых вызывается комплексом генетических нарушений, определяющих свойство неконтролируемого роста и способность к метастазированию. Эти современные знания открыли принципиально новые возможности в диагностике и лечении злокачественных новообразований. Для ряда опухолей выявлено наличие конкретных генетических нарушений, лежащих в основе опухолевого роста, что позволило обнаружить специфические молекулярные маркеры и разработать на их основе тесты ранней диагностики опухолей.

ДНК-тестирование успешно применяется при различных наследуемых опухолях: ретинобластоме, полипозе кишечника, множественных эндокринных опухолях второго типа (*MEN2*). Вслед за клонированием генов предрасположенности к раку молочной железы и яичников (*BRCA 1*, *BRCA 2*) развернулось широкое обследование групп риска семейного рака данных локализаций. Генетическое тестирование онкологического риска стало возможным в связи с открытием генов предрасположенности к онкологическим заболеваниям, что оказалось особенно актуальным для оценки риска среди членов так называемых «высокораковых» семей.

4.4. Генетический мониторинг будущего

Генетический мониторинг будущего, по-видимому, будет базироваться на создании генетического паспорта каждого человека, в котором будет отмечено наличие аллелей наследственных заболеваний, предрасположенность индивидов к разным заболеваниям, непереносимость тех или иных химических веществ, повышенная чувствительность к различным факторам внешней среды и другая информация, необходимая для обеспечения здоровья как каждого индивида, так и популяции в целом. Создание баз данных, содержащих огромное количество информации, а также обработка всей этой информации возможны только с помощью мощных компьютеров.

Понимание генетических основ широко распространенных заболеваний будет способствовать развитию скрининговых инструментов и медицинских средств, которые помогут предотвратить распространение этих болезней. При этом в будущем большие надежды возлагаются на генную терапию.

Использование полученной информации практической медициной пока только прогнозируется в достаточно отдаленном будущем. Должна быть создана благоприятная инфраструктура здраво-

охранения, гарантирующая доступ к новым скрининговым тестам, вакцинам и лекарствам, должны быть преодолены культурные, экономические и политические преграды на пути перемен.

Для начала необходимо осуществить возможность секвенирования (определения последовательности) ДНК отдельных людей в максимально короткие сроки и за разумную цену. Основную надежду на преодоление скоростного и стоимостного барьера связывают с новыми технологиями. Многообещающим может стать новый метод секвенирования, разработанный группой ученых под руководством Массимилиано Ди Вентра (M. Di Ventra) из университета штата Калифорния (г. Сан-Диего). Метод позволяет секвенировать геном человека в течение нескольких часов и с относительно небольшими финансовыми затратами.

Последние достижения в области генетики человека и современные методы генетического мониторинга создают базу для зарождения новой, персонализированной медицины, учитывающей генетические особенности пациентов. Задача состоит в том, чтобы осуществлять профилактику, более раннюю диагностику и более эффективную терапию за счет осуществления процедур, соответствующих конкретным генным характеристикам пациента.

Определенные практические шаги к воплощению в жизнь идеи о персонализированной медицине уже делаются. Однако для ее осуществления необходимо пройти длинный путь исследований и контрольных экспериментов. Процесс персонификации лечения будет состоять из последовательных этапов. И первым этапом станет генетический скрининг, который позволит поставить более точный диагноз и подобрать наиболее безопасное и эффективное лекарство.

В будущем совершенствование «целевой терапии», ориентированной на биологические основы заболевания, должно резко улучшить безопасность и эффективность лечения.

В настоящее время накоплен огромный материал по генным мутациям у человека. Часть из них уже внесена в базы данных, однако нет глобальных систематических способов сбора и распространения этой информации среди ученых мира. Создание такой базы данных значительно продвинуло бы исследования в области диагностики и эффективного лечения наследственных заболеваний.

Помимо вышеперечисленных аспектов проведение генетического мониторинга человека открывает возможности изучения и других сторон жизни человека. Так, например, большой интерес представляет возможность выявлять способности и таланты человека по наличию у него тех или иных аллелей определенных генов. В настоящее время исследования в этом направлении уже ведутся.

4.5. Генетический мониторинг и этика

По мере осуществления программ генетического мониторинга человека с использованием новейших методов анализа мы получаем все более полную картину генетической структуры разных популяций и отдельных составляющих их индивидов. Наряду с положительными сторонами данного процесса могут возникнуть проблемы этического плана. Например, не приведут ли сведения о распространенности в той или иной популяции определенных аллелей (патогенности, предрасположенности, непереносимости и т.д.) к ее дискриминации и, соответственно, преобладанию других популяций, характеризующихся иной структурой генофонда. Еще больше проблем возникает в отношении сохранения неприкосновенности частной жизни людей. Разглашение информации о генетическом статусе человека может принести ему вред. Если будет известна генетическая предрасположенность человека к какому-либо тяжелому заболеванию, ему может быть отказано в страховании жизни, медицинской страховке и даже в приеме на работу. Да и вообще, очень уж некомфортно самому человеку жить в постоянном ожидании болезни.

Очевидно, что в ряде случаев интересы общества и интересы индивида не совпадают. Повышение жизнеспособности лиц с тяжелыми наследственными патологиями, вплоть до возможности иметь детей — благо для человека, но не для популяции в целом, так как приводит к увеличению объема генетического груза. Именно на этой основе возникали евгенические программы насильственной стерилизации людей с отклонениями в умственном и физическом развитии. Современные моральные принципы основаны на компромиссе между интересами общества и индивида, а иногда интересы индивида ставятся выше интересов общества. Сейчас для решения возникающих проблем создаются этические комитеты. В 1996 г. Советом Европы была подписана Конвенция о правах человека и биомедицине, в которой были установлены положения о генетических исследованиях и геномных технологиях. Ведется работа по созданию биоэтических регламентаций в области генетики человека, эмбриологии, репродукции и социальным аспектам здравоохранения.

Глава 5

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ТРАНСГЕНОВ

«Открытие способности клеток одного вида трансформировать ДНК совершенно других организмов, принадлежащих даже иному биологическому царству, и проявлять чужеродные гены следует назвать одним из главных чудес XX в. Ведь еще совсем недавно невозможно было себе представить, что можно передавать гены животных или дрожжей бактериям, и наоборот, гены бактерий — животным или дрожжам, и они будут работать, как у себя дома, заменяя или дополняя собственные гены реципиентных клеток», — писал Р. Б. Хесин-Лурье в книге «Непостоянство генома» (1984).

Проблемы агробиологии и генетической инженерии растений заключаются в необходимости в ближайшие несколько десятилетий увеличить в 2—3 раза объем продукции растениеводства, а также в невозможности решения этой задачи классическими селекционно-генетическими и агротехническими методами. Генетический потенциал растений практически исчерпан для классической селекции, при этом существует необходимость быстрого введения в практику новых сортов высокопродуктивных устойчивых растений.

Генетическая инженерия растений решает эти задачи путем, принципиально сходным с классическим селекционно-генетическим процессом.

Для создания генетически модифицированных организмов (ГМО) используются природные гены, которые на протяжении эволюции участвовали в рекомбинационном процессе, подвергаясь отбору и элиминации. Это позволило выработать на всех уровнях организации биологических объектов механизмы, обеспечивающие устойчивый характер репарации нарушенных процессов биосинтеза белков. Разработка и постоянное применение эффективных методов мониторинга за качеством созданных трансгенных организмов, и прежде всего за составом и свойствами белковых компонентов вновь созданных генотипов, позволяют заблаговременно, на этапе создания ГМО, выявлять опасные для человека и окружающей среды генотипы и не допускать их выпуска из лаборатории для использования в производстве и продовольственном обороте. Отбор известных, проверенных природных генов и их регуляторных генетических структур, создание трансгенов с заданными свойствами, обеспечивают безопасность современных биотехнологий по созданию трансгенных организмов.

Эта глава посвящена вопросам оценки экологических рисков и контролю интродукции трансгенных растений в агросистемы, описанию основных подходов генетического мониторинга трансгенов и законодательству в области ГМО.

5.1. Общий статус трансгенных культур в мире

В 2007 г. общая площадь посевов генетически модифицированных культур (ГМ-культур) в мире составила 114,3 млн га (рис. 5.1). По сравнению с 2006 г. прирост составил 12 %, или 12,3 млн га. Поскольку в одно растение может быть встроено одновременно два или три новых гена, придающих растению ряд преимуществ («комбинированные свойства», «стекерные признаки»), то 114,3 млн га в пересчете на «гектары с комбинированными свойствами» составляют 143,7 млн га, т. е. на 22 %, или на 26 млн га, больше, чем исходные 114,3 млн га.

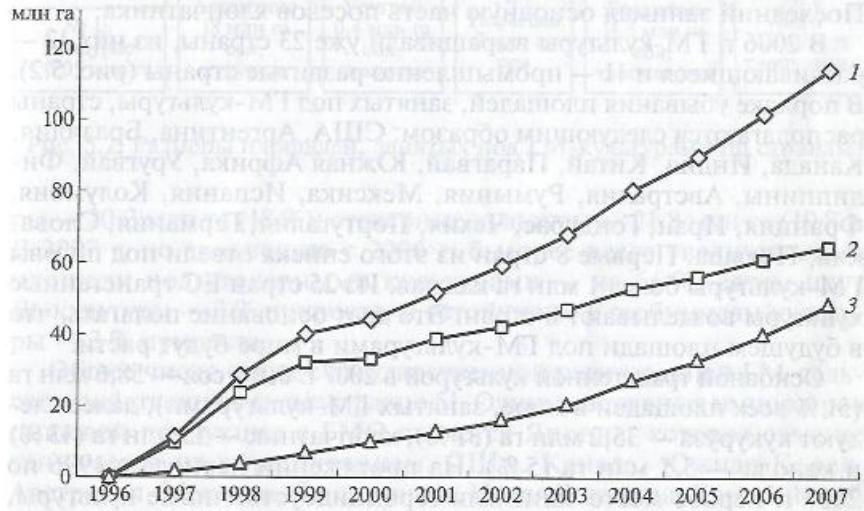

Рис. 5.1. Общая площадь посевов ГМ-культур в мире за период 1996—2007 гг. (по К. Джеймсу, ISAAA).

Данные по 23 странам, где выращиваются ГМ-культуры: *1* — в целом; *2* — индустриальные страны; *3* — развивающиеся страны

в 18 странах; устойчивый к вредителям хлопчатник MON 531/757/1076 — в 16 странах.

Будущее ГМ-культур выглядит многообещающим. Ожидается, что число стран, использующих четыре основные трансгенные культуры, будет расти, площади ГМ-культур и число фермеров, их выращивающих, будет увеличиваться. Сейчас на рынок выходит второе поколение ГМ-культур с новыми свойствами. Согласно прогнозам, к 2015 г. площади под ГМ-культурами в 40 странах мира достигнут 200 млн га, а число выращивающих их фермеров составит 20 млн. Засухоустойчивые растения должны быть получены примерно в 2010 — 2011 гг. Они будут особенно востребованы в развивающихся странах, в наибольшей степени страдающих от засухи. Будет расти спрос на комбинированные свойства. Комбинации признаков станут более обширными, особенно это касается качественных признаков. Такие культуры уже начинают выходить на рынок. Выйдут на рынок также фармацевтические ГМ-продукты и растения-вакцины.

5.2. Риски, связанные с интродукцией трансгенных растений в окружающую среду

Среди потенциальных рисков внедрения трансгенных растений в окружающую среду основными являются следующие.

- Станут ли трансгенные растения сорняком?
- Будут ли гены от трансгенных растений переноситься к природным близким видам и приобретут ли их гибридные потомки свойства сорняков?
- Причинят ли трансгенные растения вред культурным растениям?
- Будут ли отрицательно влиять на состояние природных популяций (включая человека) трансгенные растения или производные?
- Будут ли трансгенные растения отрицательно влиять на биоразнообразие экосистем?

В биоинженерии генетически модифицированных организмов (ГМО) существует определенный генетический риск, который ученые связывают:

— с трудностью точной адресной вставки чужеродного гена или группы генов в ДНК реципиентной клетки;

— нормальным функционированием таких генов — их экспрессией;

— генетическим риском получения мутантов с токсичными или аллергенными для человека белками или другими соединениями, что может быть обусловлено плейотропным эффектом, или индукцией эндогенных систем рекомбинации и активации

щих генов».

Риск получения таких мутантов значительно воз

использовании искусственных синтетических генов.

Для того чтобы максимально исключить генетич

прежде всего необходимо выяснить степень сходства

го растения с аналогичным нетрансгенным (изогенны

ем, относительно которого существует уверенность в

безопасно. Также нужно установить степень его экви

исходной и безопасной нетрансгенной форме расте

го оценивают:

- генетическую стабильность трансгенного растен

генные растения должны стабильно продуцировать

русные трансгенами, в течение ряда поколений;

- риск превращения трансгенного растения в сорн

факторы устойчивости, обусловливаемые трансгенами у

к вредным насекомым, гербицидам, другим биотически

тическим стрессорам, могут повышать риск того, что со

щее трансгенное растение может стать сорняком; п

следует установить, не повысился ли репродуктивный

трансгенного растения в результате генетической моди

- риск переноса трансгенов в родственные растен

грессия трансгенов из трансгенных растений предста

ную опасность только в том случае, если донорное и а

растения способны к перекрестному опылению, а обр

ся вследствие этого гибриды жизнеспособны; особу

ность могут вызывать ситуации, когда в результате и

нетрансгенное растение сможет приобрести новые эк

преимущества (устойчивость к гербициду, энтомоци

вышенную жизнеспособность);

- риск переноса трансгенов от трансгенных расте

риям — перенос генов от растений к бактериям, про

очевидно, в природных условиях, воспроизвести пока

в то же время перенос генов от бактерий к растениям

вестен, детально изучен и применяется для получения т

растений путем их трансформации Ti-плазмидами *Ag*

tumefaciens; предполагается, что если перенос генов

к бактериям в природе и происходит, то с крайне ма

ностью, достоверно оценивать которую современн

знаний пока не позволяет; необходимо также напоми

создания ГМ-культур используются природные гены

спечивает устойчивый характер репарации нарушенны

биосинтеза белков.

Разработаны критерии, показатели и методы оцен

ности ГМО, в том числе:

Число фермеров, выращивающих ГМ-культуры во всем мире, в 2006 г. впервые превысило 10 млн, а в 2007 г. уже составило 12 млн. Из них 90 % — мелкие фермеры из развивающихся стран, сумевшие увеличить свои доходы за счет использования ГМ-культур. Из 11 млн фермеров, бóльшая часть которых выращивает Bt-хлопчатник, 7,1 млн работают в Китае, 3,8 млн — в Индии, 100 тыс. — на Филиппинах, несколько тысяч — в Южной Африке (выращивают хлопок, кукурузу, сою), остальные — в других развивающихся странах. Крупные фермеры из индустриальных стран, таких как Канада, и из развивающихся стран, например из Аргентины, составляют 1 млн. Суммарная площадь посевов трансгенных растений с 1996 по 2007 г. составила 690 млн га, что означает беспрецедентное 67-кратное увеличение и самый быстрый в новейшей истории темп внедрения новой сельскохозяйственной технологии.

В 2007 г. в США впервые вышла на рынок новая ГМ-культура — устойчивая к гербицидам RR-люцерна. Это первое многолетнее растение, которое в первый же год выпуска на рынок заняло 80 000 га, или 5 % из 1,3 млн га всех площадей люцерны в США. Кроме того, в 2006 г. на рынке появился устойчивый к гербицидам хлопчатник RR® Flex, который сразу же занял 800 000 га. Его выращивали и как культуру с одним новым признаком, и как стекерный продукт (в сочетании с устойчивостью к вредителям). Последний занимал основную часть посевов хлопчатника.

В 2006 г. ГМ-культуры выращивали уже 23 страны, из них 12 — развивающиеся и 11 — промышленно развитые страны (рис. 5.2). В порядке убывания площадей, занятых под ГМ-культуры, страны располагаются следующим образом: США, Аргентина, Бразилия, Канада, Индия, Китай, Парагвай, Южная Африка, Уругвай, Филиппины, Австралия, Румыния, Мексика, Испания, Колумбия, Франция, Иран, Гондурас, Чехия, Португалия, Германия, Словакия, Польша. Первые 8 стран из этого списка отвели под посевы ГМ-культуры более 1 млн га каждая. Из 25 стран ЕС трансгенные культуры возделывают 8 стран. Это дает основание полагать, что в будущем площади под ГМ-культурами в мире будут расти.

Основной трансгенной культурой в 2007 г. была соя — 58,6 млн га (51 % всех площадей в мире, занятых ГМ-культурами), далее следуют кукуруза — 35,2 млн га (31 %), хлопчатник — 15 млн га (13 %) и канола — 5,5 млн га (5 %). На протяжении периода с 1996 по 2007 г. первое место занимали гербицидоустойчивые культуры, затем следуют культуры, устойчивые к вредителям, за ними — культуры со стекерными генами, имеющие два новых признака. В 2007 г. устойчивые к гербицидам культуры (соя, кукуруза, рапс, хлопчатник и люцерна) суммарно занимали 72,2 млн га (63 % из 114,3 млн всех площадей в мире под ГМ-культурами); Bt-культуры — 20,3 млн га (18 %); стекерные культуры — 21,8 млн га (19 %). В 2007 г. по сравнению с 2006 г. быстрее всего увеличивались площади под стекерными культурами — на 66 %; затем идут Bt-культуры — 7 % прироста, и устойчивые к гербицидам культуры — 3 % прироста.

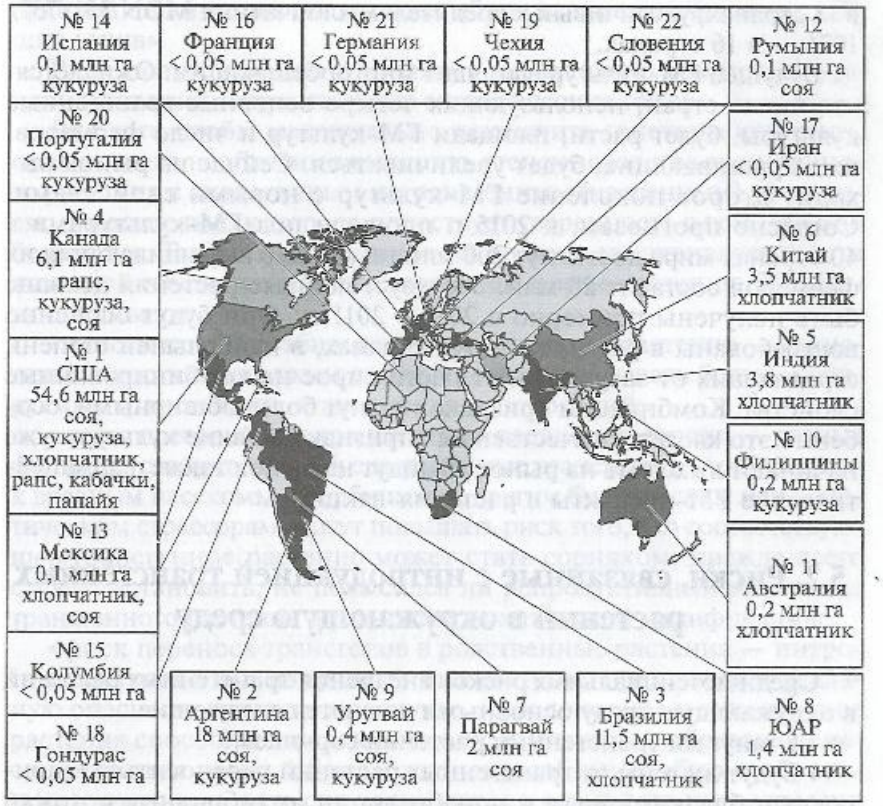

Рис. 5.2. Размеры площадей, занятых под ГМ-культурами по странам

Общее число стран с государственной регистрацией ГМ-сельскохозяйственных культур равно 51. Одним из главных импортеров пищевой продукции с ГМО является Япония, которая сама не занимается их выращиванием. США, Канада, Южная Корея, Австралия, Мексика, Филиппины, Новая Зеландия, Европейский союз и Китай выращивают ГМ-кукурузу (40 трансформационных событий), хлопчатник (18), канолу (15), сою (8). Лидирует гербицидоустойчивая соя GTS-40-3-2, которую выращивают в 24 странах. Затем идут устойчивая к вредителям кукуруза MON 810 и устойчивая к гербицидам кукуруза NK603 — они выращиваются

– химического состава трансгенных растений по сравнению с исходными;

– биологической ценности и усвояемости продуктов, приготовленных из ГМО;

– влияния ГМО на репродуктивные функции животных и человека;

– влияния новых генов на устойчивость растений к болезням и вредителям;

– а также методы выявления токсичных, канцерогенных, мутагенных и аллергенных веществ в продуктах, полученных на основе использования ГМО;

– проверки генов, интегрированных в геном растений, на способность наследования в потомстве и их переноса в другие организмы;

– выявления и анализа характера изменчивости почвенной микрофлоры и других составляющих биоценозов под влиянием трансгенных растений.

На основе полученных показателей дается медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из ГМО.

5.3. Контроль внедрения генетически модифицированных организмов в агроэкосистемы

Целью мониторинга в биотехнологических процессах по созданию и внедрению ГМО является в первую очередь учет отдаленных последствий для состояния природных популяций и здоровья человека. В учебном пособии особое внимание отведено мониторингу внедрения ГМО в аграрный сектор. Ниже приведена последовательность действий при расчетах рисков внедрения ГМО на сельскохозяйственные поля.

I этап	Исследования в лаборатории и теплице, идентификация рисков
II этап	Полевые исследования. Изучение рисков и их оценка
III этап	Оценка специфических рисков
IV этап	Общая оценка

Выполняя первый этап работы, важно учитывать особенности природных популяций и их реакций на вмешательство извне. Известно, что ответная реакция на внешнее воздействие может варьировать у разных видов в зависимости от их жизненного цикла и структуры популяции. Модель ответной реакции и частота ее проявления связаны с масштабом и интенсивностью изменений среды. Все это может осложнить истинную оценку рисков в условиях теплицы или лаборатории. Для устранения этих недостатков на втором этапе проводят анализ полевых опытов с большим количеством выборок анализируемых организмов, а также с большим количеством факторов. Третий этап заключается в наблюдении неожиданных и непредсказуемых эффектов. Этот вид мониторинга должен проводиться с учетом особенностей условий среды. На четвертом этапе объединяют и анализируют результаты и делают прогноз рисков интродукции чужеродной ДНК в природные популяции или популяции культурных растений.

Оценку риска необходимо проводить с привлечением генетического мониторинга, элементы которого для аграрного сектора приведены на рис. 5.3. На этапе выбора стратегии мониторинга A проводят оценку прямых, косвенных, немедленных и отдаленных эффектов внедрения ГМО в массовую культуру. Этап оценки риска A_1 включает процедуру разработки гипотезы последствий внедрения. Этап A_2 охватывает сбор информации по способам обработки поля, фазам роста растений, системе защиты и т. п. На этапе A_3 выбирают наиболее приемлемые методы генетического контроля трансгенов. На этапе A_4 анализируют взаимосвязи биологических систем, вовлеченных в процесс внедрения ГМО в массовую культуру.

Выбор методов оценки B_1 должен быть основан на наиболее важных параметрах, характеризующих природные экосистемы. Например, проводят оценку их биоразнообразия. На этапе B_2 необходимо проводить идентификационный контроль как ГМО, так и природных видов. Методы анализа должны соответствовать современному уровню знаний в данной области, так как при анализе результатов C выбранные методы должны быть обоснованы.

При проведении мониторинга агросистем важно учитывать следующие параметры: климат (осадки, температуру); размер и расположение полей; число растений на единицу площади; имеющиеся болезни бактериального, грибного и вирусного происхож-

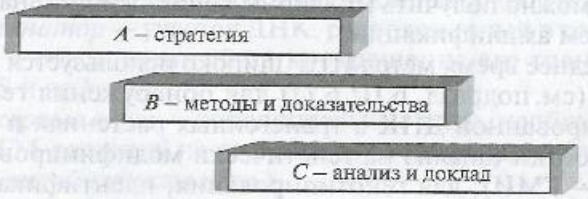

Рис. 5.3. План проведения генетического мониторинга ГМО (подробности см. в тексте)

дений; время и виды обработки полей (когда и какие удобрения и подкормки вносились); уровень плодородия почв и севооборот.

Обнаружение трансгенов в популяциях культурных растений является главной задачей мониторинга агросистем. Случайное (неконтролируемое) перенесение генов можно обнаружить *in vivo* методом маркирования, применяемым для анализа обмена генов, и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (использование ПЦР в генетическом мониторинге трансгенов подробно описано в подразд. 6.12).

При оценке эколого-генетических последствий применения ГМО в сельскохозяйственном производстве необходимо учитывать «терминаторность» и возможность горизонтального переноса незаявленных генов. Классический перенос генов происходит от родителей к потомству, т.е. по вертикали. Горизонтальный перенос предусматривает перенос генов от одних видов к другим, даже принадлежащих к разным биологическим царствам. Известно, например, о встраивании плазмидного гена агробактерии в геном культурных видов растений. Этот процесс может проходить не только в лабораторных, но и в естественных условиях.

5.4. Основные методы генетического мониторинга трансгенов

В настоящее время наиболее интенсивно развиваются ДНК-технологии, направленные на разработку методов изучения и целенаправленного изменения ДНК. Осуществляются клонирование и искусственный синтез ДНК, проводится идентификация как собственных, так и чужеродных генов у разных организмов, изучаются последовательности ДНК путем секвенирования и изменения направленным мутагенезом, а также оптимизируется экспрессия синтезированных молекул ДНК. Все эти сложные процессы можно осуществлять *методом полимеразной цепной реакции*, позволяющей за несколько часов с его помощью в одной пробирке можно получить миллионы копий одного гена или фрагмента путем амплификации.

В последнее время метод ПЦР широко используется в мировой практике (см. подразд. 6.11; 6.12) для обнаружения генетически модифицированной ДНК в трансгенных растениях и продуктах их переработки (анализ на генетически модифицированные источники — ГМИ); для генотипирования, идентификации и паспортизации посевного материала; для ДНК-маркирования генов устойчивости и ДНК-диагностики наличия возбудителей важнейших заболеваний сельскохозяйственных растений. Метод ПЦР

нашел широкое применение при анализе геномов растений разных сельскохозяйственных культур как инструмент для маркирования генов и проведения маркерной селекции.

Маркерная селекция отличается от классической тем, что проводит оценку генов в организме молекулярными методами и позволяет исследователю выбрать лучшую комбинацию для скрещивания. Таким образом, селекционный процесс идет более целенаправленно и ускоренными темпами. Маркерную селекцию в своей работе широко используют ведущие в области агропромышленных технологий компании Advanta Seeds UK Ltd. и Syngenta.

Молекулярное маркирование осуществляется, как правило, на основе метода ПЦР, дающего исследователю большие возможности:

- поскольку для постановки ПЦР используется ДНК, анализ не зависит от физиологического состояния растения и условий внешней среды;
- метод характеризуется высокой мобильностью, что позволяет быстро внести коррективы при изменении задачи исследования;
- для проведения ПЦР-анализа необходим минимальный набор оборудования, который обеспечивает стабильную работу в течение длительного срока;
- при помощи ПЦР можно проводить большой объем исследовательских работ за небольшие сроки (до 100 анализов в сутки).

Одним из вариантов проведения генетического мониторинга трансгенов может являться их ПЦР-анализ по конкретной специфической вставке, внедренной в геном трансгенных растений. О генно-инженерном происхождении организма свидетельствуют следующие элементы синтетических ДНК-конструкций:

1) *целевой ген* (*трансгены*) — ген, вводимый в клетку организма для придания ему свойства (устойчивость к гербицидам, вредителям и др.);

2) *регуляторные элементы*:

— *промотор* — участок ДНК, расположенный в начале трансгена и инициирующий его транскрипцию (35S и др.);

— *терминатор* — участок ДНК, расположенный в конце трансгена и ответственный за прекращение его транскрипции (NOS и др.);

3) *маркерные гены* — дополнительные гены, необходимые для селекции ГМ-растений на первых этапах их создания (гены устойчивости к антибиотикам и др.).

Наиболее часто используемый трансген npt II из транспозона 5 *E. coli*. Этот ген отвечает за устойчивость к антибиотику канамицину. На втором месте ген cp4 epsps, отвечающий за устойчи-

вость к гербициду Раундап. И на третьем — δ-эндотоксины *Bacillus thuringiensis* с признаками устойчивости к насекомым. Часто встречаются в генетических конструкциях гены cry1Ab и cry3A.

Один из самых важных факторов для достижения желательных уровней экспрессии трансгена — выбор промотора, который регулирует транскрипцию трансгена. Многие из коммерческих трансгенных культур содержат в своей конструкции 35S промотор вируса мозаики цветной капусты или один из его производных, поэтому амплификацию участка 35S промотора широко используют в методах обнаружения трансгенной вставки.

Наиболее часто используемый терминатор в ГМ-растениях — T-nos гена нопалин-синтетазы из *A. tumefaciens*.

Для генетического мониторинга ГМ-зерна и кормов неизвестной природы необходим универсальный подход. Таковым является ПЦР-анализ с одновременным использованием двух пар праймеров: к промотору — P35S и терминатору NOS-3, так как подавляющее большинство ГМ-сортов сельскохозяйственных культур содержат в своей генетической конструкции хотя бы один из указанных генетических элементов.

При проведении реакции амплификации с целью генетического мониторинга трансгенов очень важно проведение нескольких контролей. В реакции используют два отрицательных контроля: в первом случае в реакционную смесь не добавляется ДНК, во втором — ГМ-несодержащая ДНК. Наличие продуктов амплификации в данном случае будет свидетельствовать о загрязнении препаратов ДНК во время выделения компонентов ПЦР или о некорректности выполнения самой процедуры ПЦР. Такие ложно положительные результаты, получаемые вследствие загрязнения образцов или реагентов, часто представляют проблему при массовой ПЦР-диагностике. При этом ложноотрицательные результаты более редки и связаны с высокой чувствительностью метода ПЦР.

В качестве положительного контроля берут ДНК известного стандартного ГМ-содержащего образца. В дополнение к этому предлагается использовать амплификацию участка гена, который в любом случае будет находиться в данном образце. Это делается для проверки качества (чистоты) препарата выделенной ДНК, а также для проверки других химических компонентов ПЦР-реакции во избежание ложноотрицательных результатов.

ПЦР-детекция трансгенов позволяет проводить быстрый скрининг большого количества неизвестных образцов и разделять их на «ГМИ-содержащие» и «несодержащие ГМИ». В подразд. 6.12 представлена методика ПЦР-анализа на примере ГМ-сои, кукурузы и картофеля.

5.5. Технология изготовления и применения ДНК-биочипов в целях генетического мониторинга трансгенов

В настоящее время широкое распространение в молекулярных и биотехнологических исследованиях получило использование *генных чипов*. Это один из подвидов микроэрреев[1], элементами которого являются микроскопические пятна ДНК. Каждое пятно содержит ДНК определенного вида, соответствующую гену или участку гена, который является предметом анализа.

Использование генных чипов основано на явлении *гибридизации*. Для гибридизации используют меченые пулы мРНК, выделенные из разных источников (культур клеток, тканей модельных организмов, образцы биопсии и т.д.), а также продукты ПЦР. В процессе гибридизации молекулы нуклеиновых кислот формируют устойчивые двухцепочечные структуры благодаря комплементарным связям между нуклеотидами. Комплементарность приводит к «слипанию» двух молекул ДНК, одна из которых закреплена на подложке и является элементом ДНК-чипа. Чем больше в образце молекул, комплементарных элементам чипа, тем больше их будет связываться с чипом и тем выше будет интенсивность сигнала, воспринимаемого от данного элемента.

Типы микроэрреев. На сегодняшний день наиболее распространенными являются *генные чипы низкой плотности*, содержащие на своей поверхности до 50 000 пятен ДНК. Поэтому приемы конструирования и создания генных чипов будут рассмотрены на примере чипов именно этого типа, применяющихся для исследования дифференциальной экспрессии геномов различных организмов. Для простоты изложения будем использовать следующие термины: элементы генного чипа (зонды), меченые молекулы образца (молекулы-мишени).

Существует два варианта ДНК-чипов низкой плотности. В первом из них на подложке закреплены двухцепочечные последовательности ДНК, в другом варианте — короткие одноцепочечные молекулы, называемые олигонуклеотидами. Процедура гибридизации для обоих типов чипов примерно одинакова. На чип наносится меченый образец, гибридизуется, избыток образца смывается. Последующее сканирование поверхности чипа выявляет окрашенные участки поверхности. Окрашивание демонстрирует, что в этих участках успешно прошла гибридизация последовательностей ДНК, закрепленных на поверхности (зонды), и молекул

[1] Микроэрреи (microarrays) представляют собой упорядоченные наборы детектирующих элементов, закрепленных на твердой подложке.

ДНК образца, комплементарных им (мишень). Фундаментальное отличие описанных систем лежит в размере закрепляемой на подложке молекулы ДНК. В первом варианте ДНК-мишень получают путем ПЦР амплификации клонов из библиотек кДНК. Размер таких фрагментов составляет 100 и более нуклеотидных пар. Фрагменты иммобилизуются на твердом основании микроэррея, мембране или стекле при помощи высокоскоростных печатающих роботизированных устройств. На поверхность одного чипа можно нанести до 50 тыс. пятен ДНК. Чипы данного типа относительно дешевы, их просто изготавливать и возможно адаптировать к нуждам конкретной задачи. К недостаткам этого типа ДНК-чипов можно отнести их малую избирательность. Использование длинных молекул ДНК несет с собой высокую вероятность перекрестной гибридизации между родственными генами и, как следствие, снижает чувствительность и селективность метода в целом.

В случае олигонуклеотидных ДНК-чипов последовательности 14—70 нуклеотидов, зондов первоначально разрабатываются с использованием компьютерных алгоритмов, снижающих вероятность неспецифической перекрестной гибридизации. Зонды заданной структуры затем синтезируют химическим путем и иммобилизуют на подложке.

Чипы на основе олигонуклеотидов отличаются высокой избирательностью, однако основным фактором, ограничивающим их применение, до сегодняшнего дня остается высокая цена химического синтеза ДНК. Тем не менее снижение стоимости химического синтеза олигонуклеотидов в ближайшем будущем может обусловить рост популярности этого вида ДНК-чипов. Схема, описывающая изготовление генных чипов на основе библиотек кДНК и подготовку образца к процедуре гибридизации, изображена на рис. 5.4.

Существуют также *генные чипы высокой плотности* (50 тыс. пятен ДНК и больше). Примером этого вида чипов являются изделия известной компании «Аффиметрикс». Эти чипы могут содержать на своей поверхности более 300 тыс. пятен ДНК соответствующих десяткам тысяч разных генов. Высокая плотность размещения зондов стала возможной благодаря отказу от применения механических печатающих устройств. По технологии компании «Аффиметрикс» ДНК зонда синтезируется непосредственно на поверхности чипа. При этом длина одноцепочечного олигонуклеотида составляет 14—24 азотистых основания. Генные чипы высокой плотности позволяют получить в одном эксперименте картину экспрессии всех генов, составляющих геном изучаемого организма. На сегодняшний день компанией «Аффиметрикс» предлагаются генные чипы, содержащие полные геномы 13 организмов, в том числе человека.

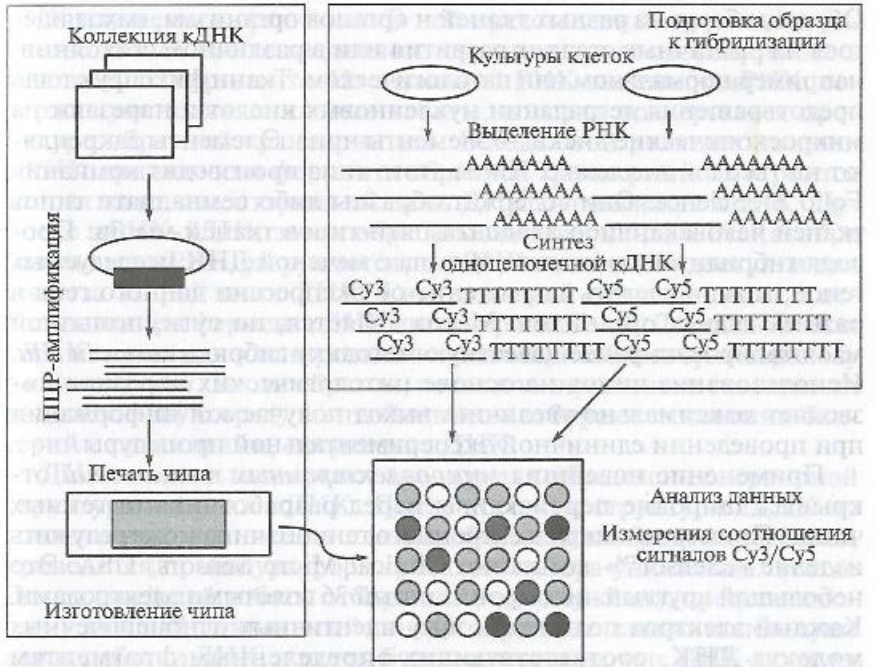

Рис. 5.4. Схема изготовления генных чипов на основе библиотек кДНК и подготовки образца к процедуре гибридизации

Чипы, на поверхность которых нанесены *белковые молекулы*, предполагается использовать для измерения количества разных белков в образце, а также для изучения белок-белковых взаимодействий, т.е. обнаружения пар белков, образующих в клетках комплексы, необходимые для выполнения их биологических функций. В настоящее время активно ведется тестирование белковых микроэрреев, несущих на своей поверхности антитела[1]. Антитело, закрепленное на поверхности чипа, связывает антиген, к которому, в свою очередь, прикрепляется антитело, несущее метку. Таким образом, становится возможным распознавание наличия в образце антигенов заданной структуры. Преимуществом этого метода является возможность проводить идентификацию нескольких сотен антигенов в рамках одной аналитической процедуры.

Помимо белков и нуклеиновых кислот на поверхности чипа могут быть закреплены *фрагменты цитологических препаратов*.

[1] *Антитела* — это белки, способные специфически связываться с другими белками-антигенами строго определенной структуры, уникальной для каждого антитела.

Образцы берут из разных тканей и органов организма, находящегося на различных стадиях развития или в различном состоянии, например нормальном или патологическом. Ткани фиксируют для предотвращения деградации нуклеиновых кислот и нарезают на микроскопические диски — элементы чипа. Элементы закрепляют на твердой подложке. Чипы этого типа производит компания Folio BioScience. Они содержат образцы либо семнадцати типов тканей человека, либо двадцати пяти типов тканей мыши. Проводя гибридизацию тканевого чипа с меченой ДНК исследуемых генов, можно сделать заключение об экспрессии данного гена в разных тканях организма. Метод является, по сути, попыткой масштабировать ранее известную методику гибридизации *in situ*. Использование чипов на основе цитологических образцов позволяет максимально увеличить выход получаемой информации при проведении единичной экспериментальной процедуры.

Применение новейших *микроэлектронных технологий* открывает широкие перспективы перед разработчиками генных чипов. Примером микроэлектронного генного чипа может служить изделие «eSensor™» компании Clinical Micro Sensors, USA. Это небольшой круглый чип, пронизанный 36 золотыми электродами. Каждый электрод подведен к пулу идентичных одноцепочечных молекул ДНК, соответствующих определенным фрагментам ДНК, — к улавливающим зондам. Когда молекула улавливающего зонда входит в соприкосновение с комплементарной молекулой-мишенью, они образуют дуплекс. Участок молекулы-мишени, не спаренный с дуплексом, связывается с молекулой детектирующего зонда, предварительно добавленной в раствор. Эта молекула ковалентно связана с молекулами ферроцена, обладающими электропроводящими свойствами. Местоположение молекулы ферроцена относительно электрода изменяет электропроводные свойства электрода. Измеряя силу тока на электроде, можно оценить, сколько и какая ДНК была обнаружена в образце.

Электронные генные чипы, несомненно, заслуживают внимания, поскольку эта технология позволяет не только автоматизировать процесс анализа, но и создать генные чипы многоразового использования.

Создание микроэрреев на примере генных чипов низкой плотности. Термин «набор уникальных генов» (*unigen set*) является ключевым понятием в дизайне микроэрреев. Имеется в виду набор последовательностей ДНК, в котором каждый исследуемый ген, известный для данного организма, представлен в единственном экземпляре. «Уникальность» важна для снижения затрат на производство чипа.

Создание библиотеки кДНК является первым шагом на пути конструирования генного чипа. Для этого выделяют тотальную

РНК изучаемого организма. В ней представлены в разном количестве копий все гены данного организма, экспрессируемые в условиях эксперимента. Из тотальной РНК выделяют мРНК, содержащую полиадениловые хвосты, которая подвергается процедуре обратной транскрипции. В ходе этой реакции на цепи мРНК при помощи фермента обратной транскриптазы строится вторая комплементарная ей цепь ДНК, называемая кДНК. Дуплекс мРНК-кДНК затем обрабатывают ферментом РНКазой, в результате мРНК разрушается, и кДНК становится доступна для синтеза второй цепи ДНК. Синтез второй цепи проводят с использованием фермента ДНК-полимеразы *E. coli*. Двухцепочечная кДНК готова для клонирования в плазмидный вектор и переносу в клетки *E. coli*. Таким образом, после клонирования и помещения на селективную среду с антибиотиком отбираются колонии бактерий с плазмидами, несущими кДНК.

ДНК плазмид подвергают анализу для определения первичной структуры вставки кДНК. После того как структура кДНК из достаточного количества плазмид библиотеки была определена, проводится процедура формирования набора уникальных генов. Для дальнейшей работы отбирают по одному клону, представляющему каждый уникальный ген. Отобранные клоны используют для наработки ДНК, которая будет нанесена на чип. ДНК-продукт производится в ходе ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок плазмиды, несущей вставку кДНК. Структура этого участка у всех плазмид библиотеки одинакова, поэтому одна пара праймеров может амплифицировать кДНК-вставку во всех клонах библиотеки. Этот прием позволяет значительно упростить и удешевить процедуру амплификации. Одна реакция амплификации дает материал, достаточный для нанесения «уникального гена» на 700—900 экземпляров чипа. Работа по амплификации генов проводится в формате 96 луночных иммунологических планшетов при выращивании бактериальных культур и 96 луночных ПЦР-плашек для ПЦР-амплификации. Процедура наработки материала роботизирована и требует постоянного компьютерного мониторинга.

Разработка набора зондов для олигонуклеотидных генных чипов производится с использованием различных компьютерных алгоритмов. Многие из этих алгоритмов являются свободно распространяемым программным обеспечением и могут бесплатно использоваться учебными и научными учреждениями. Свою работу исследователь начинает с того, что создает коллекцию известных нуклеотидных последовательностей для генов данного организма. Для этого он может воспользоваться информацией с интернет-сайтов NCBI (National Center for Biotechnology Information) или Tigr (The Institute for genomic research). На основе по-

лученных данных создается набор уникальных генов — отсеиваются повторяющиеся последовательности ДНК. Компьютер анализирует набор таких уникальных генов и создает на его базе набор олигонуклеотидных зондов. Затем он выбраковывает последовательности, не отвечающие критериям специфичности, т. е. встречающиеся в других генах и способные приводить к перекрестной гибридизации и ложным сигналам. Прошедшие отбор олигонуклеотиды формируют набор зондов, позволяющий точно детектировать интересующие гены. Разработанные олигонуклеотиды синтезируют химически, доводят до одинаковой концентрации, фасуют в 96- или 384-луночные планшеты, лиофилизируют и поставляют заказчику готовыми для немедленного нанесения на поверхность чипа.

С помощью печатающих устройств ДНК-зонд помещают на поверхность генного чипа. Технология «струйной печати» базируется на технологии, заимствованной из струйных принтеров. Образец ДНК впрыскивается на поверхность чипа через маленькое сопло печатающей головки. В настоящее время используют два типа устройств для «бесконтактной» «струйной печати». «Пьезоэлектрический тип» использует колебания пьезокристалла для выталкивания из сопла порции наносимого образца. Размер капли в этом случае колеблется от 50 до 500 пкл. Печатающие устройства, построенные на технологии «nQUAD», состоят из микроскопических шприцев, управляемых соленоидами, и наносят на поверхность чипа капли одинакового размера. Объем капли в этих устройствах можно точно установить. Как правило, он составляет несколько нанолитров. Таким образом, пьезоэлектирические устройства позволяют работать с каплями меньшего объема, но они менее точны и постоянны в отношении объема наносимых капель по сравнению с более дорогими «nQUAD»-устройствами.

Струйная печать имеет несколько неоспоримых преимуществ:

1) возможность регулировать объем наносимого образца;

2) работа распыляющего механизма не зависит от свойств поверхности, на которой производится печать;

3) устройства могут наносить образцы на пористые поверхности (мембраны);

4) отсутствие опасности загрязнения образцов через контакт с поверхностью чипа;

5) отсутствие опасности повреждения поверхности чипа в ходе печати.

При использовании струйной печати необходимо учитывать специфические проблемы, присущие этой технологии, во-первых, влияние статического заряда поверхности подложки на траекторию движения распыляемых капель. Чтобы нейтрализовать это влияние, поверхность чипа нужно искусственно ионизировать

либо значительно повышать влажность воздуха в рабочей зоне. Если этого не делать, наносимые капли будут отталкиваться от поверхности чипа, и расположить их в правильном порядке станет невозможно. Вторая проблема — разбрызгивание крупных капель при соударении с поверхностью чипа. Перечисленных недостатков лишены устройства «контактной печати».

Принцип контактной печати (пин-принтинг) основан на использовании твердых стержней. Их обмакивают в раствор образца, при этом небольшие объемы наносимого раствора остаются на кончике стержня. Стержень касается поверхности чипа и оставляет на ней микроскопическое пятно. Диаметр пятна зависит от силы поверхностного натяжения раствора наносимого образца, свойств поверхности чипа и материала печатающего стержня. Типичный объем наносимой капли измеряется нанолитрами. В начале развития технологии контактной печати стержни оканчивались острием и позволяли напечатать только одно пятно после каждого обмакивания стержня в раствор. Позже в теле стержня стали делать микроскопический канал. Таким образом, после обмакивания в раствор стержень забирает и удерживает в этом углублении некоторый объем раствора зонда. Эта конструктивная особенность позволяет наносить пятна на поверхности нескольких десятков чипов после каждого обмакивания стержней в раствор. Преимущества технологии контактной печати: простота печатающих устройств, относительно низкая стоимость, маленький размер наносимых пятен, отсутствие разбрызгивания при печати, экономное расходование наносимого материала. Продукта одной реакции ПЦР-амплификации достаточно для печати пятен соответствующего гена на поверхности примерно 700—900 слайдов. Иллюстрируя экономичность данной технологии, можно привести технические характеристики печатающих стержней TeleChem ChipMaker 2: объем образца, удерживаемого во внутреннем объеме стержня, — 100—250 нл; диаметр отпечатка на поверхности слайда — 75—200 мкм; объем наносимого образца — 0,2—1,0 нл. Устройства контактной печати в настоящее время активно завоевывают рынок и становятся индустриальным стандартом в производстве генных чипов низкой плотности.

Иммобилизация образцов на поверхности чипа. После того как ДНК нанесена на чип, она должна быть химически закреплена на его поверхности. Это достигается благодаря химическим реакциям между зондом и покрытием поверхности чипа. В настоящее время стандартным форматом подложки ДНК-чипов стали предметные стекла, используемые в микроскопии. Их поверхность покрывают разного рода химическими агентами для обеспечения ковалентного связывания ДНК. Многие химико-биологические фирмы (Corning Microarray Technology, Cel,

TeleChem International, USA) производят и продают стеклянные слайды, поверхность которых модифицирована и несет реакционно-способные альдегидные или аминогруппы. Стекла, подобные «коммерческим», можно изготовить в лабораторных условиях путем нанесения полилизина на поверхность предметных стекол.

Технология так называемого «концевого закрепления» позволяет ковалентно пришивать на поверхность чипа «аминомодифицированную» ДНК-зонда. В этом случае для печати чипа используют зонды, полученные реакцией ПЦР-амплификации с праймерами, содержащими на 5′-конце аминомодифицированный нуклеотид или синтетические олигонуклеотиды, «аминомодифицированные» с 5′-конца.

Гибридизация. После того как чип изготовлен или приобретен, наступает время его использования, т.е. гибридизации чипа с меченой ДНК-мишенью. Выбор метки в общем случае зависит от используемой системы сканирования. Как правило, используют пару флуоресцентных красителей Cy3 и Cy5, излучающих свет с разной длиной волны. Красители включаются в структуру ДНК-мишени либо в процессе обратной транскрипции (если для мечения используется мРНК), либо в результате реакции мультипрайминга, если метится геномная ДНК. Процедура мечения может проводиться в одну стадию или быть двухстадийной.

В начале 2004 г. компания Invitrogen вышла на рынок с новой технологией RLS (*Resonance Light Scattering*). Эта технология имеет большое будущее и, возможно, скоро заменит красители Cy3 и Cy5. RLS базируется на использовании коллоидного золота и серебра для мечения молекул мишеней. Будучи возбуждены, они испускают свет в разных спектральных диапазонах и могут быть легко детектированы. Преимущества данной технологии: отсутствие ослабления сигнала после повторных проходов сканера; возможность длительного хранения: чипы, помеченные системой золото—серебро, могут храниться годами без потери качества сигнала. И наконец, система примерно в 10 раз более чувствительна по сравнению с основанной на красителях Cy3 и Cy5.

Считывание информации. После завершения процедуры гибридизации меченые молекулы ДНК, комплементарно связанные с зондами на поверхности чипа, будут испускать флуоресцентные сигналы, которые должны быть измерены и проанализированы. Флуоресцентные сигналы детектируют, освещая поверхность чипа светом с длиной волны, возбуждающей флуоресценцию, и затем измеряют излучаемый сигнал. Системы прямого считывания состоят из источника возбуждающего излучения (как правило, это дуговая лампа, облучающая всю поверхность слайда) и высокочувствительной цифровой CCD камеры, снабженной необходимыми оптическими фильтрами. Таким образом, интенсивность

сигнала от определенного пикселя матрицы соответствует интенсивности излучения соответствующей зоны чипа. Основные достоинства данной системы: простота, отсутствие подвижных частей и высокая скорость считывания данных (весь слайд считывается за один раз). К недостаткам можно отнести низкое разрешение и чувствительность. Сканирующий детектор представляет собой конфокальный флуоресцентный микроскоп, движущийся над поверхностью слайда. Микроскоп освещает маленький участок поверхности слайда через объектив и собирает излучаемый флуоресцентный сигнал через тот же объектив. Достоинства сканирующих систем — высокая чувствительность и превосходное разрешение.

Применение ДНК-чипов. Для исследования дифференциальной экспрессии генов ПЦР-продукты клонов библиотеки кДНК известной первичной структуры наносят на поверхность чипов. Затем мРНК из исследуемого и контрольного образцов подвергаются обратной транскрипции для того, чтобы получить смесь меченых кДНК-мишеней. В ходе обратной транскрипции флуоресцентный краситель включается в синтезируемые молекулы кДНК (краситель одного типа используется для экспериментального образца, краситель другого типа — для контрольного). Смесь двух типов мишеней затем используется для гибридизации с чипом. Измеряя соотношение флуоресценции двух разных красителей, можно сделать заключение о том, какие гены в экспериментальном образце экспрессируются сильнее или слабее по сравнению с контрольным образцом. Метод позволяет исследовать закономерности генной экспрессии в организмах или тканях в ответ на внешние стимулы (лекарственные препараты, токсины, стрессы) и изучать изменение картины транскрипции в ходе протекания биологических процессов, таких, например, как клеточная дифференцировка.

В случае генного картирования генные чипы используют для поиска полиморфизма последовательностей ДНК, генных мутаций, небольших делеций или, наоборот, включений фрагментов ДНК в определенные места исследуемой хромосомы. Упорядоченные клоны ДНК из исследуемой хромосомы наносятся на подложку чипа. Затем чип гибридизуется с меченой ДНК двух организмов. Один из них проявляет симптомы наследственного заболевания или является носителем мутантного фенотипа, второй используется в качестве контроля. Различия гибридизационной картины позволяют идентифицировать различия и выявить изменения в гене, ответственном за наблюдаемую симптоматику.

Одной из самых простых, но и наиболее востребованных областей применения генных чипов является анализ многокомпонентных биологических систем (организм — патоген, хозяин — паразит и т.д.). Для одновременного детектирования присутствия

нескольких молекул мишеней биологические микрочипы обладают неоспоримым преимуществом перед системами, где каждая из мишеней анализируется индивидуально.

Частным случаем данной модели можно считать анализ пищевых продуктов на наличие в них генетически измененных источников. Пищевой продукт является сложной смесью биологических образцов, а трансгенный источник — одним из ее компонентов. Закрепив на поверхности чипа зонды, соответствующие разным трансгенным источникам, можно определить, какой из них был использован в производстве. Мишенями в данном случае являются ПЦР-продукты маркерных и целевых генов. Использование для гибридизации ПЦР-продуктов позволяет одновременно решить несколько задач: ввести в ДНК-мишень метку, получить молекулу нуклеиновой кислоты, способную гибридизоваться с зондом, и усилить сам сигнал, поднимая, таким образом, чувствительность метода.

Первый генный чип «*GMOChip Test Kit*», предназначеный для определения генетически модифицированных составляющих в продуктах питания, был разработан и успешно представлен на рынок немецкой компанией GeneScan Europe AG в 2001 г. Тестовый набор выпускается в двух комплектациях на 25 и 50 генных чипов. Кроме необходимых для работы химических реагентов набор комплектуется программным обеспечением для анализа результатов (Signalyse®). Версия «Европа» детектирует присутствие ДНК нескольких видов растений, вирусов, элементов генетических конструкций и предназначен для идентификации сортов растений, разрешенных к применению на территории Евросоюза. Среди элементов чипа: ДНК, видоспецифичная для растений сои, кукурузы, масличного рапса, риса, нескольких рас вируса мозаики цветной капусты, ряда трансгенных сортов кукурузы и сои. Чип определяет присутствие в образце ДНК промотора 35SCaMV, терминатора nos, генов *bar* и *pat*.

5.6. Законодательство в области трансгенных организмов

В 1974 г. 11 ведущих молекулярных биологов мира во главе с П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную ДНК, обратились с письмом через журнал «Science» с предложением отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК. Однако в 1975 г. на конференции в г. Асиломар (США) ученые пришли к выводу о необходимости проведения экспериментов в области генной инженерии — новейшей биотехнологии, соблюдая строгий контроль за биобезопасностью внедрения ГМО.

В настоящее время методы оценки риска производства трансгенных растений продолжают совершенствоваться. Для успешного решения актуальных задач государственного регулирования интродукции трансгенных растений в России приняты федеральные законы от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов». Приняты постановления Правительства Российской Федерации от 22.11.2000 № 883 «Об организации и проведении мониторинга качества, безопасности пищевых продуктов и здоровья населения»; от 21.12.2000 № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий»; от 21.12.2000 № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов» и от 16.02.2001 № 120 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов».

Разработан ряд нормативных документов по оценке безопасности пищевых продуктов, требования которых являются обязательными при постановке на производство, реализации и импорте пищевых продуктов. Разработано более 7 000 санитарно-химических и санитарно-микробиологических показателей, гармонизированных с международным законодательством.

Создана и функционирует методическая база оценки качества и безопасности пищевых продуктов, основанная на применении современных высокочувствительных и селективных методов анализа (масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, ПЦР, иммуноферментный анализ), обеспечивающая контроль за показателями безопасности и качества пищевой продукции (более 150 методов) и внедренная в работу более чем 14 тыс. лабораторий разной ведомственной подчиненности.

Разработана и внедрена многоуровневая система наблюдений, позволяющая получать объективные данные об основных показателях питания и здоровья разных групп населения.

Создана и функционирует законодательная, нормативная и методическая база для регулирования оборота пищевых продуктов, содержащих генно-модифицированные организмы, организован и проводится мониторинг за ее оборотом. Разработана система оценки безопасности пищевой продукции, полученной из ГМО, основанная на проведении комплексных медико-биологических, медико-генетических и технологических исследований.

В постановлении «О совершенствовании надзора за пищевыми продуктами, содержащими ГМО» (от 03.04.2006) указывалось, что в Российской Федерации имеется необходимая нормативно-методическая база, а также разработаны методы лабораторных иссле-

дований для организации и проведения эффективного надзора за пищевыми продуктами, содержащими компоненты, полученные с применением ГМО.

В соответствии с законодательством Российской Федерации (федеральные законы от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»; от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов»; от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения») пищевая продукция из ГМО относится к категории «новой пищи» и подлежит обязательной оценке на безопасность и последующему мониторингу за оборотом.

Пищевые продукты, полученные из ГМО, прошедшие медико-биологическую оценку и не отличающиеся по изученным свойствам от своих аналогов, полученных традиционными методами, безопасны для здоровья человека, разрешены для реализации населению и использования в пищевой промышленности без ограничений.

Согласно письму Роспотребнадзора от 24.01.2006 № 0100/446-06-32 содержание в пищевых продуктах 0,9 % и менее компонентов, полученных с применением ГМО, является случайной или технически неустранимой примесью, и пищевые продукты, содержащие указанное количество компонентов ГМО, не относятся к категории пищевых продуктов, содержащих компоненты, полученные с применением ГМО, и не подлежат этикетированию.

В настоящее время в Российской Федерации прошли полный цикл всех необходимых исследований и разрешены для использования 14 видов пищевой продукции растительного происхождения, полученных с применением трансгенных технологий: 6 линий кукурузы, 3 линии сои, 3 сорта картофеля, 1 линия сахарной свеклы, 1 линия риса, а также 5 видов генетически модифицированных микроорганизмов.

Исследования пищевых продуктов на наличие ГМИ проводятся в соответствии с государственными стандартами Российской Федерации: ГОСТ Р 52173—2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения» и ГОСТ Р 52174—2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа», а также в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1913—04 «Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания», утвержденными в 2004 г. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации:

– МУК 4.2. 1917—04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги»;

– МУК 2.3.2.1935—04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием генетически модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генетически модифицированные аналоги»;

– МУК 4.2. 1902—04 «Методы определения конкретных линий ГМО в пищевых продуктах»;

– МУ 2.3.2. 1830—04 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов».

Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.12.2004 № 13 «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из ГМИ» определены головные центры по количественному определению ГМО в продуктах питания в федеральных округах Российской Федерации, в функции которых входит укомплектование необходимым оборудованием, обучение специалистов методам и проведению исследований по количественному содержанию ГМО в пищевых продуктах на территории соответствующего федерального округа Российской Федерации.

Согласно перечисленным документам генно-инженерная деятельность должна осуществляться на следующих принципах:

– безопасность граждан и окружающей среды;

– общедоступность сведений о безопасности генно-инженерной деятельности;

– сертификация продукции, содержащей результаты генно-инженерной деятельности, с указанием полной информации о методах получения и свойствах данного продукта.

В 2001 г. был создан Экспертный совет по вопросам биобезопасности — постоянно действующий орган, обеспечивающий объективность и надлежащее качество проверки представляемых в Минпромнауки РФ сведений о биобезопасности ГМИ. Экспертный совет организует и проводит экспертизу представленных заявителями материалов и дает по согласованию с Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности заключение о безопасности модифицированных организмов и возможности их государственной регистрации либо об отказе признать безопасность ГМО. Свое заключение Экспертный совет представляет в установленном порядке в Департамент науки о жизни и земле Минпромнауки РФ.

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2003.

Алтухов Ю. П. Наследственность человека и окружающая среда / Ю. П. Алтухов, О. Л. Курбатова. — М.: Наука, 1984.

Арефьев В. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / [В. А. Арефьев и др.]; под ред. Л. И. Петрушева. — М.: Изд-во ВНИРО, 1995.

Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. — М.: Мир, 1978.

Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / [О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева, Т. И. Евсеева и др.]; под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Сарапульцевой. — М.: Издательский центр «Академия», 2008.

Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии. — М.: Колосс, 2004.

Бочков Н. П. Клиническая генетика. — М.: Медицина, 1997.

Генетические критерии загрязнения окружающей среды / под ред. Н. П. Дубинина. — М.: Наука, 1975.

Генетически-модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / под ред. акад. РАМН В. А. Тутельяна. — М.: Изд-во РАМН, 2007.

Геномика — медицине / под ред. В. И. Иванова, Л. Л. Киселева. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.

Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / [Б. Глик и др.]. — М.: Мир, 2000.

Дейнеко Е. В. Легко ли быть создателем. Реалии трансгенеза растений. — Новосибирск: Академкнига, 2005.

Дейпер Дж. Генная инженерия растений: лабораторное руководство / [Дж. Дейпер и др.]. — М.: Мир, 1991.

Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю. П. Алтухова. — М.: Наука, 2004.

Дубинин Н. П. Потенциальные изменения ДНК и мутации. Молекулярная цитогенетика. — М.: Наука, 1978.

Дубинин Н. П. Некоторые проблемы современной генетики. — М.: Наука, 1994.

Дубинин Н. П. Избранные труды. — Т. 3. Экологическая и космическая генетика. Селекция. — М.: Наука, 2001.

Дубинин Н. П. Мутагенез и окружающая среда / Н. П. Дубинин, Ю. В. Пашин. — М.: Наука, 1978.

Дубинин Н. П. Индукция мутагенов в окружающей среде / [Н. П. Дубинин и др.]. — Экологическое прогнозирование. — М.: Наука, 1979.

Егорова Т. А. Основы биотехнологии / [Т. А. Егорова и др.]. — М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Зайнуллин В. Г. Генетические эффекты хронического облучения в малых дозах излучения. — СПб.: Наука, 1998.

Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. — М.: Высшая школа, 1989.

Инге-Вечтомов С. Г. Экологическая генетика. Что это такое? // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 2.

Илариошкин С. Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. — М.: Медицинское информационное агентство, 2004.

Кайданов Л. З. Генетика популяций / под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. — М.: Высшая школа, 1996.

Клайв Дж. Краткое содержание отчета «Глобальный статус коммерциализованных биотехнологических/ГМ-культур в мире». — ISAAA — 2006 — № 35. http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html.

Лутова Л. А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды. // Соровский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6. — № 10.

Материалы интернет-сайта Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека http://www.gsen.ru и Минсельхоза РФ http://www.mcx.ru.

Патрушев Л. И. Экспрессия генов. — М.: Наука, 2000.

Порошенко Г. Г. Антропогенные мутагены и природные антимутагены / Г. Г. Порошенко, С. К. Абилев // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Сер. Общая генетика. — 1988. — Т. 12.

Примроуз С. Геномика. Роль в медицине / [С. Примроуз и др.]. — М.: БИНОМ «Лаборатория знаний», 2008.

Радиация и патология / [А. Ф. Цыба и др.]; под общ. ред. А. Ф. Цыба. — М.: Высшая школа, 2005.

Рапопорт И. А. Гены, эволюция, селекция. — М.: Наука, 1996.

Робинсон К. Технология генетической модификации и пищевые продукты. Здоровье и безопасность потребителей. — Амстердам: ILSI, 2001.

Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. — Женева: ВОЗ, 1989.

Савченко У. К. Геносфера — генетическая система биосферы. — Минск: Сфера, 1991.

Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. С. Шевелухи. — М.: Высшая школа, 2003.

Сингер М. Гены и геномы / [М. Сингер и др.]. — М.: Мир, 1998.

Современная биотехнология. Мифы и реальность / сост. Ю. Н. Елдышев. — М.: Тайдекс Ко, 2004.

Цаценко Л. В. Генетический мониторинг / Л. В. Цаценко, И. Б. Резникова. — Краснодар: КубГУ, 2007.

Глава 6

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

В этой главе представлены хорошо апробированные или наиболее перспективные с точки зрения авторов учебного пособия генетические методы контроля окружающей среды, в том числе мониторинга ГМО. Генетический мониторинг имеет в своем арсенале значительно больше тест-систем и методов, позволяющих объективно оценить качество окружающей среды. По причине ограниченности объема широкий спектр перспективных методов не был включен в пособие. Мониторинг позволяет выявить неблагополучные в отношении генетической опасности факторы и территории, однако не решает проблемы оценки генетической опасности и последующего регламентирования. Для этого существуют валидизированные методы тестирования, методы отбора проб из среды (вода, аэрозоли воздуха, пробы почв и т. д.), методы концентрирования образцов, способы расчета и экстраполяции и т. п. В качестве примера приведен метод, позволяющий оценить генетическую опасность лекарственных препаратов с использованием клеток костного мозга мышей, которые наряду с крысами являются «золотым стандартом», так как результаты, полученные в экспериментах на млекопитающих *in vivo*, могут быть экстраполированы на человека.

Выполнение практических работ, предложенных в учебном пособии, основано на знании курсов «Общая биология», «Ботаника», «Зоология», «Микробиология», «Физиология растений», «Физиология человека и животных», «Генетика и селекция», «Современные биотехнологии», читаемых студентам вузов по направлениям «Биология» и «Агрономия» подготовки бакалавров, магистров и специалистов.

6.1. Тест Эймса (В. М. Глазер, С. К. Абилев)

Тест-система Эймса имеет ряд преимуществ перед другими тестами на мутагенность. Это быстрота проведения, высокая чувствительность, возможность дифференцировать оба типа генных

мутаций — замены оснований и вставки/выпадения, приводящие к сдвигу рамки считывания. Хотя бактерии имеют существенный недостаток, заключающийся в отсутствии у них системы микросомного окисления, его удалось преодолеть путем введения в тест-систему препарата, содержащего микросомы и кофакторы микросомного окисления (микросомная активирующая смесь — МАС). Добавление этой смеси обеспечивает мутагенную активность (МА) ксенобиотиков *in vitro*. Пробы без МА позволяют выявить прямую мутагенную активность, пробы с МА — промутагенную. При использовании тест-системы Эймса обнаруживается высокая (порядка 90 %) корреляция между мутагенной и канцерогенной активностями ксенобиотиков. Эти достоинства обеспечили широкое использование теста Эймса в тысячах лабораторий по всему миру и определили его место на первом этапе анализа химических соединений на генотоксичность в качестве скринингово теста.

Быстрое выполнение теста в значительной мере определяется тем, что он является полуколичественным: частота мутаций выражается на общее количество клеток в обработанной суспензии без учета их выживаемости, а не на количество выживших после обработки клеток, как это делается в количественном тесте. В случаях, когда исследуемое вещество обладает заметной токсичностью для индикаторных бактерий, ставят количественный тест. Поскольку такие случаи достаточно редки, в этой главе предложен наиболее распространенный полуколичественный вариант теста.

В основе тест-системы лежит специально созданный Б. Эймсом и его сотрудниками набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* (см. подразд. 3.4.1).

Принцип метода Эймса заключается в регистрации способности испытуемого соединения и (или) его метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов бактерий в системе метаболической активации *in vitro*. Индикаторные бактерии вместе с исследуемым препаратом и МАС вносят в слой верхнего полужидкого агара на чашки Петри. Под влиянием ферментов микросомного окисления, содержащихся в МАС, препарат может претерпевать ряд метаболических превращений. Как исходное вещество, так и его метаболиты, если они обладают мутагенной активностью, индуцируют мутации у микроорганизмов.

В табл. 6.1 и 6.2 представлены схемы постановки эксперимента в качестве примеров.

Для проведения теста необходимы следующие материалы, оборудование и реактивы:

минимальная среда А (4-кратный солевой раствор) (см. Справочный материал); 10%-й $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 40%-я глюкоза; раствор L-гистидина (0,96 мг/мл); раствор биотина (0,7 мг/мл); среда LB (см. Справочный

материал); стерильный расплавленный агар (12 г в 750 мл дистиллированной воды); стерильный полужидкий агар (6 г агара и 6 г NaCl в 1 л дистиллированной воды с добавлением биотина и гистидина); ампициллин или карбенициллин; автоклав; центрифуга; стеклянные колбы на 1 и 0,5 л; пробирки; чашки Петри; штамм *S. typhimurium* TA100; штамм *S. typhimurium* TA98; растворы мутагенов и испытуемых химических соединений в нужных концентрациях; микросомная активирующая смесь (МАС) (см. Справочный материал); термостатированная водяная баня.

• Перед постановкой теста Эймса необходимо провести следующую предварительную работу. Колбу с полужидким агаром выдержать на кипящей водяной бане до полного расплавления агара. Затем добавить растворы L-гистидина и биотина из расчета 10 мл на 1 л агара. Смесь перемешать и разлить по 2,5 мл в пробирки. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками и стерилизовать в автоклаве.

• Биотин необходимо добавлять в среду, так как индикаторные штаммы ауксотрофны по нему. Гистидин вносят с таким расчетом, чтобы дать возможность бактериальным клеткам пройти 1—2 цикла деления, что необходимо для фиксации мутаций. Перед опытом столбики расплавляют на кипящей водяной бане и помещают в термостатированную водяную баню при 44—46 °С.

• Перед постановкой эксперимента клетки индикаторных штаммов выращивают в LB-среде в течение ночи при 37 °С при интенсивном перемешивании. Желательно добавлять в среду ампициллин или карбенициллин в конечной концентрации 25 мкг/мл. Полученную культуру штамма *S. typhimurium* TA100 развести непосредственно перед экспериментом в 25 раз физиологическим раствором. Клетки штамма *S. typhimurium* TA98 осадить центрифугированием и ресуспендировать в таком объеме физиологического раствора, чтобы повысить концентрацию клеток в 2—3 раза. Различия в концентрациях суспензий обусловлены отличиями частот спонтанных реверсий между штаммами.

• Растворы мутагенов, приготовленные на диметилсульфоксиде (ДМСО) или других органических растворителях, не стерилизуют; водные растворы стерилизуют пропусканием через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,2—0,45 мкм.

• МАС готовят непосредственно перед опытом в ледяной бане и выдерживают в ней в течение всего эксперимента.

• Растворы НАДФ и глюкозо-6-фосфата готовят путем растворения навески вещества в стерильной воде в стерильной пробирке без дополнительной стерилизации. Для приготовления проб без МА из смеси МАС исключают фракцию S9 (заменяют на равный объем 0,1М KCl) и растворы НАДФ и глюкозо-6-фосфата (заменяют на равные объемы дистиллированной воды).

• Все операции можно проводить в помещении, предварительно обработанном ультрафиолетовыми лучами, без использования горелок.

Удобно ставить опыт в порядке нумерации проб одновременно в 6—12 пробирках.

Ход определения

В колбу с расплавленным агаром внести 250 мл 4-кратного солевого раствора; 0,5—1 мл раствора $MgSO_4$ и 8 мл 40%-й глюкозы, перемешать и после охлаждения до ≈50 °С разлить по 25 мл в стерильные чашки Петри. Разливку проводить на горизонтальной поверхности, стеклянные чашки расставлять слоем по одной.

С пробирок, содержащих расплавленный на водяной бане полужидкий агар, снять пробки и (не вынимая пробирки из водяной бани) в каждую добавить 0,1 мл растворителя (H_2O или ДМСО) для контрольных проб или 0,1 мл раствора исследуемого соединения; 0,1 мл суспензии индикаторных бактерий; 0,5 мл МАС (для проб с МА) или 0,5 мл смеси без фракции S9, НАДФ и глюкозо-6-фосфата (для проб без МА).

Внимание! Ввиду лабильности МАС в момент ее добавления пробирку вынуть из водяной бани (для проб без МА эта предосторожность не нужна).

Содержимое пробирок быстро перемешать 3—4 резкими круговыми движениями пробирки между ладонями и вылить на поверхность минимальной среды в чашке Петри. Осторожными, но быстрыми покачиваниями чашки верхний слой полужидкого агара равномерно распределить по поверхности, и чашку поставить на горизонтальную поверхность. Верхний слой не должен застыть до его распределения по поверхности агара. Через 20 мин чашки перевернуть вверх дном и поместить в термостат на 35—37 °С на 40—48 ч.

После инкубации подсчитать колонии ревертантов His^+. Результаты внести в рабочие таблицы, аналогично табл. 6.1 и 6.2.

Одновременно поставить две контрольные пробы: 1) содержащую растворитель вместо химического соединения (показывает спонтанный уровень реверсий); 2) на активность МАС. В этом качестве удобен промутаген 2-аминоантрацен (0,5 мкг на пробу), который не повышает частоту реверсий в пробах без МА, но в присутствии МА продуцирует широкий спектр мутагенов, резко повышающих частоту реверсий у обоих индикаторных штаммов. В случае если МА активна, продукты метаболизма 2-аминоантрацена повышают частоту реверсий у штамма TA100 в 5—10 раз, у штамма TA98 в сотни и более раз.

Заполнить рабочие таблицы аналогично представленным в качестве примера табл. 6.1 и 6.2 для каждого индикаторного штамма.

Оценку результатов произвести, исходя из критериев, предложенных в табл. 6.3.

Если индукция мутаций проявляется в пробах без МА, сделать заключение о прямой мутагенной активности исследуемых химических препаратов, если только в пробах с МА — о промутагенной активности.

Справочный материал

Приготовление среды LB

Состав среды (в г/л дистиллированной H_2O): бактотриптон или бактопептон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 6.

Приготовление минимальной среды А

Готовят 4-кратный солевой раствор: $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (натрий лимоннокислый трехзамещенный) — 2,24 г; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 55 г; KH_2PO_4 — 18 г; $(NH_4)_2SO_4$ — 4 г; вода дистиллированная H_2O — 1 л; pH раствора доводят KOH до 7,2—7,3. Раствор разливают порциями по 250 мл и стерилизуют в автоклаве.

Приготовление микросомной активированной смеси (МАС)

Для получения 50 мл МАС требуется чуть больше компонентов (все растворы стерильные): 0,2 М фосфатный буфер, pH 7,4 — 25 мл; раствор НАДФ (32 мг/мл) — 5 мл; глюкозо-6-фосфат (15 мг/мл) — 5 мл; 9,85%-й KCl — 1,25 мл; 6,5%-й $MgCl_2$ — 1,25 мл; фракция S9 — 15 мл.

Приготовление фракции S9

Индукцию синтеза микросомных ферментов печени самцов белых беспородных крыс производят внутрибрюшинной инъекцией 0,5 мл раствора Aroclor 1254 (или Совола) в оливковом масле из расчета 100 мг на 1 кг массы животного. Через 48 ч крыс, получавших все это время только воду, забивают после предварительного наркоза декапитированием (согласно протоколу по работе с лабораторными животными). Все остальные операции проводят в стерильных условиях.

Печень извлекают, взвешивают, промывают раствором 0,1 М KCl, измельчают ножницами и растирают в гомогенизаторе Поттера с

Примеры заполнения таблиц

Таблица 6.1. **Испытание химических соединений на мутагенную активность в полуколичественном тесте Эймса *Salmonella*/микросомы**

Штамм *Salmonella typhimurium* TA98. Фракция S9 из печени крыс, индуцированных Aroclor 1254

Испытуемое вещество	Доза препарата, мкг/на чашку	Метаболическая активация											
		Прямая мутагенная активность (пробы без МА)						Промутагенная активность (пробы с МА)					
		№ чашки	повторности			среднее		№ чашки	повторности			среднее	
			1	2	3				1	2	3		
Контрольные вещества													
H_2O	0,1 мл	1						2					
2-Нитрофлуорен	10 мкг	3						4					
2-Аминоантрацен	0,5 мкг	5						6					
Бромистый этидий	50 мкг	7						8					
	10 мкг	9						10					
	1 мкг	11						12					
	0,1 мкг	13						14					
Фурацилин	50 мкг	15						16					
	20 мкг	17						18					
	5 мкг	19						20					
	1 мкг	21						22					
n-Нитрозоморфолин	1 мг	23						24					
	0,1 мг	25						26					

Таблица 6.2. **Испытание химических соединений на мутагенную активность в полуколичественном тесте Эймса *Salmonella*/микросомы**

Индикаторный штамм *Salmonella typhimurium* TA100. Фракция S9 из печени крыс, индуцированных Aroclor 1254

Испытуемое вещество	Доза препарата, мкг/на чашку	Метаболическая активация											
		Прямая мутагенная активность (пробы без МА)						Промутагенная активность (пробы с МА)					
		№ чашки	повторности			среднее		№ чашки	повторности			среднее	
			1	2	3				1	2	3		
Контрольные вещества													
H_2O	0,1 мл	1						2					
Азид Na	10 мкг	3						4					
2-Аминоантрацен	0,5 мкг	5						6					
Фурацилин	50 мкг	7						8					
	20 мкг	9						10					
	5 мкг	11						12					
	1 мкг	13						14					
Бромистый этидий	50 мкг	15						16					
	5 мкг	17						18					
	0,5 мкг	19						20					
n-Нитрозоморфолин	1 мг	21						22					
	0,5 мг	23						24					
	0,1 мг	25						26					
	0,01 мг	27						28					

Таблица 6.3. **Оценка мутагенной активности химических веществ по тесту Эймса**

Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в данной опытной пробе над контролем				
Штамм TA98 Штамм TA100	≤ 2,0 ≤ 1,8	2,0 — 10 1,8 — 10	10 — 100 10 — 100	≥ 100 ≥ 100
Мутагенная активность	Не выявлена	Слабая	Средняя	Сильная

тефлоновым пестиком. Перед гомогенизацией печень заливают пятью объемами 0,1 М KCl. Все операции проводят на холоде. Растворы и инструменты должны быть стерильными.

Гомогенат центрифугируют при 9 000 g в течение 30 мин при +2 °С и надосадочную жидкость (фракция S9) разливают на холоде (в емкости со льдом) порциями по стерильным пробиркам, после чего сразу используют в опыте или быстро замораживают. Полученная таким образом фракция S9 содержит широкий набор цитозольных и микросомных ферментов, в том числе ферменты НАДФН-генерирующей системы, обеспечивающие протекание реакций микросомного окисления. В 1 мл приготовленной таким образом фракции с концентрацией белка около 40 мг/мл содержатся микросомы из 250 мг печени. Образцы фракции следует проверять на бактериальное загрязнение. В случае загрязнения следует выделить новую фракцию. Фракцию можно хранить в замороженном состоянии при –20 °С и ниже в течение нескольких месяцев. Не допускается повторное замораживание неиспользованной фракции после оттаивания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абилев С. К. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений. Итоги науки и техники, ВИНИТИ / С. К. Абилев, Г. Г. Порошенко // Токсикология. — 1986. — Т. 14.

Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976.

Тарасов В. А. Принципы качественной и количественной оценки генетической опасности химических веществ / Материалы Междунар. симп. «Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека» (Москва, 18—21 октября 1994 г.). — М., 1994. — Ч. I.

Фонштейн Л. М. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на Salmonella: методическое указание / [Л. М. Фонштейн и др.]. — М.: Наука, 1977.

Фонштейн Л. М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания / [Л. М. Фонштейн и др.]. — М.: ВИНИТИ, 1985.

McCann J. Detection of carcinogens and mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay 300 chemicals / [J. McCann et al.] // Prac. Nat. Acad. Sci. USA. — 1975. — V. 72.

6.2. SOS-хромотест (тест на индукцию SOS-ответа в клетках *Escherichia coli*)

(В. М. Глазер, С. К. Абилев)

Различные факторы, повреждающие ДНК или нарушающие ее репликацию, индуцируют в клетках *E. coli* ряд изменений, объединенных под названием «SOS-ответ». SOS-ответ включает следующие основные проявления: задержку клеточного деления, замедление клеточного дыхания, индукцию профагов, деградацию ДНК и SOS-мутагенез, обусловленный работой так называемой «ошибочной» SOS-репарации.

С молекулярно-генетической точки зрения SOS-ответ является результатом дерепрессии координированно регулируемой системы генов, продукты которых, по всей вероятности, способствуют сохранению жизнеспособности клетки, получившей повреждения ДНК. Система SOS-ответа находится под контролем двух основных генов — *recA* и *lexA*. Ген *lexA* кодирует белок LexA — репрессор 20 генов, составляющих SOS-регулон. Ген *recA* кодирует белок RecA, который играет ключевую роль в регуляции SOS-ответа, поскольку именно этот белок в активированной форме (копротеаза RecA) способствует саморасщеплению репрессора LexA и таким образом индуцирует экспрессию генов SOS-системы.

Идея о возможности тестирования мутагенной и канцерогенной активности химических соединений по их способности индуцировать SOS-ответ первоначально была реализована в 70-х гг. XX в. в тесте на индукцию профага в лизогенных клетках бактерий. Позднее, в результате использования методов генетической инженерии, были созданы специальные штаммы бактерий, несущие слияние промотора одного из индуцибельных генов SOS-системы с геном β-галактозидазы (*lacZ*), у которого удален собственный промотор. В результате ген *lacZ* попадает под контроль промотора SOS-гена и экспрессируется в ответ на воздействие факторов, вызывающих SOS-ответ. В этом случае *lacZ* выступает как ген-репортер.

П. Киллардэ и другие использовали хромосомный ген *sfiA E. coli*, детерминирующий одну из SOS-функций клетки — контроль

клеточного деления. Экспрессия гена *sfiA* приводит к подавлению формирования перегородок (септ) в процессе клеточного деления и, как результат, к возникновению филаментов (нитевидный рост). Авторы встроили фаг Mudlac, несущий беспромоторный ген *lacZ*, в хромосомный ген *sfiA*. Таким образом был получен штамм *E. coli* PQ37, позволяющий оценивать SOS-индуцирующий эффект различных химических агентов путем определения активности β-галактозидазы. Метод получил название «SOS-хромотест». В нем использована способность β-галактозидазы гидролизовать бесцветный субстрат ОНФГ (*о*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид), высвобождая *о*-нитрофенол желтого цвета. Об активности фермента можно судить по интенсивности желтой окраски реакционной смеси. Для нормализации активности β-галактозидазы дополнительно проводят определение активности конститутивного фермента щелочной фосфатазы, уровень которой постоянен и не зависит от условий эксперимента (конститутивный фермент).

Для выполнения теста необходимы следующие материалы, реактивы и оборудование:

штамм *Escherichia coli* PQ37, имеющий следующий генотип: F- *thr leu his-4 pyrD thi galE galK(galT) lacU169 srl300*::*Tn10 rpoB rpsL sfiA*::*Mud(Ap,lac)cts rfa uvrA trp*:: *Muc*$^+$ *Pho*; питательная среда LB (см. Справочный материал); микросомная активирующая смесь (МАС); буферы Z и P; раствор *пара*-нитрофенилфосфата (ПНФФ); раствор ОНФГ (см. Справочный материал); термостат; тестируемые вещества; спектрофотометр или фотоэлектроколориметр (ФЭК).

Из перечисленных генетических маркеров *E. coli* PQ37 для настоящей задачи принципиально важными являются: 1) слияние промотора *sfiA* с геном *lacZ*; 2) мутация rfa, приводящая к нарушению структуры наружного липосахарида и, соответственно, повышающая проницаемость клетки для различных полициклических соединений; 3) мутация uvrA, которая вызывает нарушение системы эксцизионной репарации предмутационных повреждений ДНК; 4) Pho — конститутивная экспрессия гена щелочной фосфатазы.

Ход определения

Накануне постановки эксперимента клетки индикаторного штамма выращивают в питательной среде LB с ампициллином (50 мкг/мл) при 37 °С в течение ночи при интенсивном перемешивании.

Перед началом эксперимента 1 мл ночной культуры разбавляют в 50 мл среды LB и инкубируют при 37 °С в течение 2 ч до плотности $2 \cdot 10^8$ клеток/мл. Затем 1 мл культуры разбавляют в 9 мл свежей среды LB в случае проб без метаболической активации или в 9 мл МАС в случае проб с метаболической активацией.

Затем порции разбавленной растущей культуры по 0,6 мл разливают в пробирки, содержащие по 20 мкл раствора тестируемого вещества в концентрациях, соответствующих условиям эксперимента. Все пробы ставят в трех повторностях. Вещества тестируют в нескольких концентрациях. В качестве позитивного контроля используют 4-нитрохинолин-N-оксид (4-НХО) в концентрации 0,1—0,2 мкг на пробу.

Водонерастворимые соединения растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация в пробе с бактериальными клетками не превышала 10 %.

Смеси инкубируют 2 ч при 37 °С. По завершении инкубации из каждой смеси отбирают аликвоты по 0,3 мл для определения активности β-галактозидазы и по 0,3 мл для определения активности щелочной фосфатазы.

В пробы для *определения β-галактозидазной активности* (0,3 мл) добавляют по 2,7 мл буфера Z. Пробы инкубируют при 37 °С в течение 5—10 мин и добавляют по 0,6 мл раствора ОНФГ (0,4 мг/мл). Реакцию останавливают после изменения цвета (от бесцветного до желтого) раствора добавлением 2 мл 1 М раствора Na_2CO_3. Затем измеряют поглощение при 420 нм (оптическая плотность — $ОП_{420}$). Продолжительность реакции, в течение которой изменяется цвет раствора, определяют с помощью секундомера и записывают. Окраска раствора остается стабильной в течение 1 ч после остановки реакции. За это время необходимо измерить оптические плотности всех проб.

В пробы для *определения активности щелочной фосфатазы* (0,3 мл) добавляют по 2,7 мл буфера Р, инкубируют при 37 °С в течение 5—10 мин, после чего добавляют по 0,6 мл раствора *пара*-нитрофенилфосфата (ПНФФ) в концентрации 0,4 мг/мл. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 2,5 н HCl. Все остальные операции для определения активности щелочной фосфатазы такие же, как и при определении активности β-галактозидазы.

Расчет активностей ферментов ведется по упрощенной формуле вычисления единиц активности ферментов, по Миллеру:

$$\text{Ед. активности} = \frac{1000 \cdot ОП_{420}}{t},$$

где $ОП_{420}$ — оптическая плотность инкубационной смеси при 420 нм после завершения реакции с ОНФГ; t — продолжительность времени инкубации с субстратом (ОНФГ или ПНФФ), мин.

Все первичные и расчетные данные занести в табл. 6.4.

В качестве меры удельной активности β-галактозидазы используют отношение активностей β-галактозидазы (индуцибельный фермент — экспрессия под контролем промотора гена *sfiA*) и щелочной фосфатазы (конститутивный фермент). Величина отношения β-галактозидазы к щелочной фосфатазе отражает индукцию гена *sfiA*, даже когда тестируемое вещество ингибирует синтез белка. Это отношение, нормализованное относительно необработанного контроля, названо *фактором индукции* (*IF*). Фактор индукции для определенной концентрации (C) вещества вычисляется по формуле

$$IF(C) = \frac{R(C)}{R(0)},$$

где $R(C)$ и $R(0)$ — отношение активности β-галактозидазы к активности щелочной фосфатазы при данной концентрации вещества и в контроле соответственно.

Пример заполнения таблиц

Таблица 6.4. **Анализ SOS-индуцирующей активности химического соединения на *E. coli* PQ37**

Вариант, соединение, мкг/мл	Повторность	Активность галактозидазы (Gal)		Активность щелочной фосфатазы (AP)		Отношение $Ед_{Gal}/Ед_{AP}$	Фактор индукции, IF*
		$ОП_{420}$	$Ед_{Gal}$	$ОП_{420}$	$Ед_{AP}$		
Контроль (растворитель)	1						1,0
	2						
	3						
Позитивный контроль — 4-НХО, 0,2 мкг/проба	1						
	2						
	3						
Тестируемое соединение, доза 1	1						
	2						
	3						
Тестируемое соединение, доза 2	1						
	2						
	3						

* Примечание. Для расчета *IF* берется среднее отношение $Ед_{Gal}$ / $Ед_{AP}$ из трех повторностей в контроле и в опытных вариантах.

Таблица 6.5. **Оценка SOS-индуцирующей активности химических веществ в SOS-хромотесте**

Величина фактора индукции SOS-ответа, *IF*	≤ 1,5	1,6—2,0	2,0—5,0	≥ 5,0
SOS-индуцирующая активность	Не выявлена	Слабая	Средняя	Сильная

По величине фактора индукции тестированного вещества можно оценить степень его ДНК-повреждающей активности как слабую, среднюю или сильную (табл. 6.5). Такое ранжирование желательно проводить по результатам одновременного тестирования с известным ДНК-повреждающим соединением.

Другим способом сравнения активностей тестированных соединения является определение SOS-индуцирующего потенциала (SOSIP). Для этого полученные для каждого вещества значения *IF* откладывают на графике против соответствующей концентрации и определяют наклон линейного участка кривой «доза-эффект». Величина этого наклона представляет собой приращение фактора индукции на единицу массы тестируемого вещества и является количественным выражением способности вещества индуцировать SOS-ответ.

Справочный материал

Питательная среда LB

Триптон бакто — 10 г; дрожжевой экстракт бакто — 5 г; NaCl — 6 г; вода — 1 л. При необходимости вносят ампициллин до конечной концентрации 20 мкг/мл.

Буфер Z

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$— 16,1 г; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ — 5,5 г; KCl — 0,75 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,25 г; додецилсульфат натрия (SDS) — 1 г; β-меркаптоэтанол — 3,4 мл; вода — до 1 л, довести pH до 7,0.

Буфер P

Трис(гидроксиметил)-аминоэтан — 121 г; SDS — 1 г, вода — до 1 л; pH 8,8.

Раствор ОНФГ

400 мг ОНФГ в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,0).

Приготовление фосфатного буфера

61 мл 0,1 М Na_2HPO_4 + 39 мл 0,1 М NaH_2PO_4.

Раствор ПНФФ

400 мг ПНФФ в 100 мл буфера P.

Активирующая смесь

Перед экспериментом готовят активирующую смесь, в 10 мл которой содержится: 0,2 мл солевого раствора (1,65 М KCl + + 0,4 М $MgCl_2 \cdot 6H_2O$); 0,05 мл 1М глюкозо-6-фосфата; 0,15 мл 0,1 М НАДФ; 2,5 мл 0,4 М трис-буфера (pH 7,4); 1 мл фракции S9 (см. Справочный материал к подразд. 6.1) и 6,1 мл среды LB.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Quillardet P. The SOS-Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures / P. Quillardet, M. Hofnung // Mutation Res. — 1985. — V. 147.

Quillardet P. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds / [P. Quillardet et al.] // Mutation Res. — 1985. — V. 147.

6.3. Альфа-тест на дрожжах

(Е. И. Степченкова, С. Г. Инге-Вечтомов)

Теоретические основы альфа-теста разработаны на кафедре генетики и селекции Санк-Петербургского государственного университета благодаря детальной изученности жизненного цикла и генетического контроля типов спаривания у дрожжей и подробно приведены в подразд. 3.4.1.

Для проведения теста необходимы следующие материалы, оборудование и реактивы:

два штамма дрожжей одинакового типа спаривания альфа, несущие маркеры ауксотрофности для отбора «незаконных гибридов» (например, мутации по генам *URA3*, *LYS2*, *LYS5*, *ADE2* и др.), а также маркеры обоих плеч III хромосомы дрожжей *leu2*, *thr4* и *his4* (*примерный генотип штаммов*: штамм № 1 *MATα lys2 ade2*; штамм № 2 *MATα ade2 ura3 leu2 thr4 his4*; *селективные маркеры* для отбора гибридов — в данном случае *ura3* и *lys2* — должны быть стабильными; частоты ревертирования по каждому из них не должны быть выше $1 \cdot 10^{-8}$); штаммы-тестеры типа спаривания 2Г-П2345 *MATα his5* и 78А-П2345 *MATα his5*; стерильная жидкая и твердая полная среда YAPD (см. Справочный материал); три серии минимальных твердых сред на основе среды SD (см. Справочный материал); растворы стандартных мутагенов, например этилметансуль-

illegitimate mating induction / [S. G. Inge-Vechtomov et al.] // Progress in mutation research. V. 5 Ed. by Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985.

Zakharov I. A. Cytoduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast / [I. A. Zakharov et al.] // Mol. Cell. Biochem. — 1977. — V. 14.

6.4. Аллиум-тест

(С. А. Гераськин, Н. В. Амосова)

Среди растений удобным, чувствительным и отвечающим основным требованиям, предъявляемым к тест-объектам для генетического мониторинга, является лук репчатый *Allium cepa*. Другие виды лука (*A. carinatum*, *A. fistulosum*, *A. sativum*, *A. schoenoprasum*) также используют для оценки качества окружающей среды, но намного реже. Лук удобен для цитогенетического анализа, потому что имеет 16 крупных, кариотипически изученных хромосом. Крупные, хорошо различимые придаточные корни луковиц можно использовать также в качестве морфометрических показателей при оценке воздействия факторов разной природы.

Токсичность оценивают в 96-часовом тесте. После прекращения воздействия измеряют длину корня. Для этого вида токсического эффекта типична сигмоидная форма кривой «доза — эффект».

Хорошим индикатором токсичности является также митотический индекс. Частоту аберраций хромосом в ана-телофазах клеток рекомендуется оценивать, только если митотический индекс превышает 10, иначе слишком мало будет клеток в нужной фазе для выполнения анализа. Продолжительность *Allium*-теста составляет три-четыре недели, включая оценку токсичности, цитогенетический анализ и статистическую обработку данных. Этот простой и надежный тест может быть использован для оценки токсичности и генотоксичности загрязненных вод, почв и сложных смесей токсикантов.

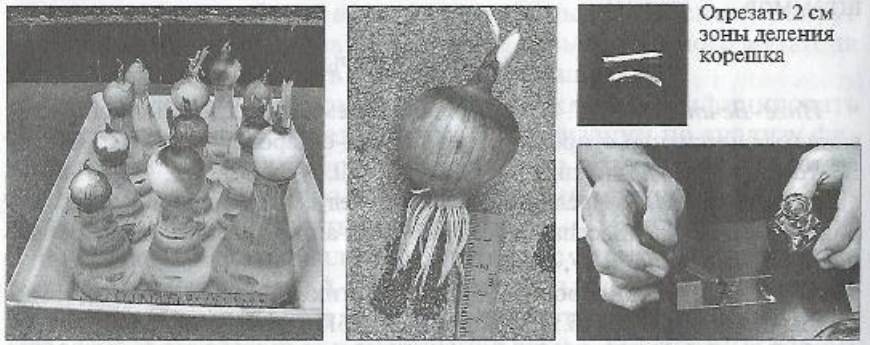

Рис. 6.1. Схема постановки аллиум-теста (этапы работы)

Для проведения теста необходимы следующие материалы и оборудование: приблизительно одинаковые по размеру и массе луковицы; предметные и покровные стекла; микроскоп или бинокулярная лупа МБС-10; фиксатор «уксусный алкоголь» (см. Справочный материал); скальпель; пинцет; пенициллиновые флаконы; краситель ацетокармин или ацетоарсеин (см. Справочный материал).

Луковицы поместить в специально подготовленные пластиковые контейнеры, в крышках которых вырезаны отверстия диаметром, совпадающим с диаметром донца луковиц, и проращивать в течение 2 сут (рис. 6.1).

Ход определения

Генотоксичность оценивают по частоте аберрантных ана- и телофаз, наблюдаемых в первом митозе в корневой меристеме лука. Для этого необходимо корешки длиной 15—20 мм фиксировать в смеси спирта и ледяной уксусной кислоты (соотношение 1:3, фиксатор «уксусный алкоголь» — см. Справочный материал).

Приготовить временные давленые препараты, окрасить ацетоорсеином (или ацетокармином) по стандартной методике.

Анализ спектра аберраций проводить с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) мостов и фрагментов, трехполюсных и К-митозов, а также отставаний хромосом (рис. 6.2). При оценке отставаний учитывать хромосомы, лежащие отдельно от разошедшихся «шапок» на расстоянии, не менее чем вдвое превышающем толщину хромосомы.

Увеличение числа генетически аномальных клеток говорит о высокой мутагенной активности среды и снижении защитных свойств организма. Наиболее чувствительны к воздействию внешней среды молодые делящиеся клетки.

Цитотоксичность оценивают по изменению митотической активности клеток корневой меристемы лука. Митотический индекс (МИ) определяют по формуле

$$МИ = \frac{П + М + А + Т}{П + М + А + Т + И} \cdot 100\%,$$

фонат (ЭМС); стерильные диски фильтровальной бумаги диаметром 1 см; стеклянные колбы и пробирки; чашки Петри; пинцеты; микробиологические петли; стеклянные шпатели для втирания культур клеток в среду; бархатные печатки; пипетки; термостат на 30 °С.

Внимание! При работе с мутагенами следует соблюдать технику безопасности, не допускать попадания опасных веществ на кожу и в глаза, следует работать в халате.

Ход определения

Родительские штаммы № 1 и 2 выращивают до стационарной фазы в жидкой среде YAPD, при этом конечная концентрация клеток составляет приблизительно 10^7 кл/мл.

По 100 мкл суспензии клеток штаммов № 1 и 2 совместно высевают на твердую среду YAPD. В центр чашки с помощью стерильного пинцета помещают небольшой диск фильтровальной бумаги, на который наносят раствор испытуемого мутагена.

Негативным контролем в эксперименте служит растворитель, который использовали при приготовлении растворов мутагена, чаще всего стерильная вода или диметилсульфоксид (ДМСО). В качестве позитивного контроля обычно используют заведомо мутагенное соединение, например этилметансульфонат, нитрозогуанидин и др.

Чашки инкубируют одни сутки при температуре 30 °С, затем перепечатывают на селективную среду для отбора незаконных гибридов и инкубируют 2—3 дня в термостате при 30 °С.

Проводят учет результатов. О повышенной генетической активности изучаемых химических веществ судят по появлению характерного кольца гибридов, индуцированных мутагеном, вокруг места нанесения мутагена. Для каждой дозы изучаемого мутагена необходимо использовать не менее трех чашек.

На следующем этапе эксперимента можно идентифицировать события, приведшие к незаконной гибридизации по анализу фенотипа незаконных гибридов. Для этого возникшие гибриды нужно отсеять на полную среду отдельными штрихами, а на следующий день перепечатать на серию сред — С, С-ade, С-lys, С-ura, С-thr, С-leu, С-his, параллельно скрестив с тестерами на тип спаривания (2Г-П2345 и 78А-П2345). Нормальные гибриды от скрещивания штаммов № 1 и № 2 должны иметь фенотип Ade^-, Ura^+, Lys^+, Thr^+, Leu^+, His^+ и тип спаривания альфа. Незаконные гибриды такого фенотипа возникают в результате временных или наследуемых изменений в локусе *MAT*. При потере III хромосомы у таких гибридов происходит потеря прототрофности по всем трем

маркерам III хромосомы (Thr^-, Leu^-, His^-). При потере правого плеча теряется прототрофность только по маркеру этого плеча (his4), и у гибридов появляется ауксотрофность по гистидину. При транспозиции кассеты HMRα в локус *MAT* гибриды теряют способность к дальнейшему скрещиванию и сохраняют прототрофность по всем маркерам III хромосомы. При рекомбинации между *HMR*α и *MAT* гибриды теряют способность к скрещиванию и теряют прототрофность по треонину (см. табл. 3.3).

Справочный материал

Приготовление полной среды YAPD

D-глюкоза — 20 г/л; пептон — 20 г/л; дрожжевой экстракт — 5 г/л; для твердой среды агар — 20 г/л.

Приготовление минимальной твердой среды на основе среды SD

Yeast Nitrogen Base фирмы Difco 6,7 г/л; D-глюкоза — 20 г/л; агар — 20 г/л:

1) серия сред для проверки фенотипа штаммов: полная, содержащая все необходимые для роста аминокислоты, азотистые основания и витамины (С), среда без аденина (С-ade), среда без лизина (С-lys), среда без урацила (С-ura), среда без треонина (С-thr), среда без лейцина (С-leu), среда без гистидина (С-his);

2) селективная среда для отбора гибридов, возникших в том числе в результате потери III хромосомы, — без урацила и лизина, но с аденином, лейцином, гистидином и треонином;

3) минимальная среда, не содержащая каких-либо аминокислот и оснований (С-0), — для проверки типа спаривания дрожжевых штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Инге-Вечтомов С. Г. Селективная система цитодукции с использованием рецессивных супрессоров у дрожжей-сахаромицетов / [С. Г. Инге-Вечтомов и др.] // Генетика. — 1984. — Т. 20. — № 3.

Репневская М. В. Наследуемые и ненаследуемые изменения типа спаривания у дрожжей Saccharomyces cerevisiae: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Ленинград: ЛГУ, 1989.

Худолей В. В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. — СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999.

Goffeau A. Life with 6 000 genes / [A. Goffeau et al.] // Science. — 1996. — V. 274.

Inge-Vechtomov S. G. Tests for genetic activity in the yeast Saccharomyces cerevisisae: study of forward and reverse mutation, mitotic recombination and

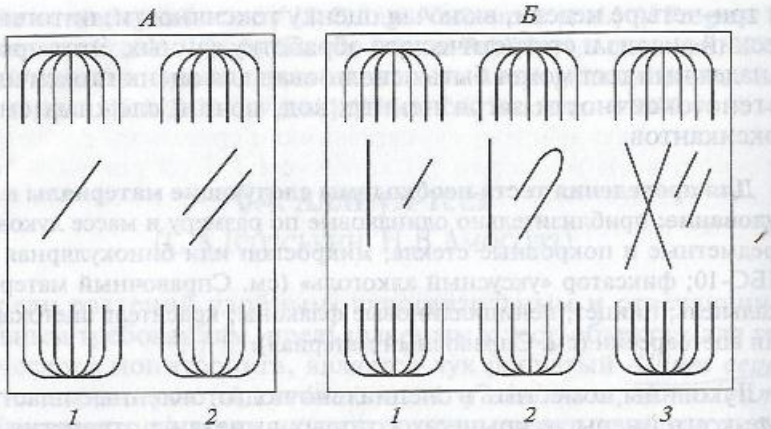

Рис. 6.2. Схемы хромосомных аберраций на стадии анафазы:
А — одиночный (*1*) и парный (*2*) фрагменты; *Б* — хроматидный (*1, 2*) и хромосомный (*3*) мосты

где П — количество клеток, находящихся на стадии профазы; М — количество клеток, находящихся на стадии метафазы; А — количество клеток, находящихся на стадии анафазы; Т — количество клеток, находящихся на стадии телофазы; И — неделящиеся клетки, находящиеся на стадии интерфазы.

Справочный материал

Фиксаторы

Фиксация материала, т. е. быстрое умерщвление клеток в специально подобранных растворах реактивов — фиксаторах, прерывает тот или иной процесс в клетке, вызывая необратимые изменения. При этом коллоиды протопласта переходят в нерастворимое состояние. Известно много фиксаторов, но каждый из них имеет определенное назначение. Очень важно выбрать такой фиксатор, который, убивая клетку, минимально искажает ее прижизненную структуру и отвечает целям исследования. Обычно фиксатор представляет собой смесь нескольких реактивов, каждый из которых редко используется для фиксации вследствие одностороннего действия.

В цитологических исследованиях широко применяют, особенно для изготовления давленых препаратов, «уксусный алкоголь», или фиксатор Кларка (3:1). Материал выдерживают в фиксаторе от 2 до 12 ч, а иногда и хранят в нем при температуре 0—3 °С.

Состав фиксатора Кларка: абсолютный этиловый спирт, или его 96%-й раствор, — 3 части, ледяная уксусная кислота — 1 часть.

Красители

Ацетокармин. Растворить 1—2 г кармина (красящего вещества, состоящего из карминовой кислоты) в 45 мл ледяной уксусной кислоты и 55 мл дистиллированной воды. Растворение проводить в колбе с обратным холодильником на водяной бане с подогревом в течение 3 ч. При отсутствии обратного холодильника в колбу вставить воронку. После остывания темно-красный раствор кармина отфильтровать и поместить в посуду с притертой крышкой. Остатки кармина на фильтре можно использовать повторно.

Ацетоорсеин. Готовят из орсеина — красителя, полученного из лишайника. Растворить 1—2 г орсеина в 45 мл горячей уксусной кислоты и добавить 55 мл дистиллированной воды. Кипятить на водяной бане в течение 3 ч, остудить и отфильтровать.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. — 1985. — V. 102. — P. 99—112.

Rank J. The method of Allium anaphase-telophase chromosome aberration assay // Ekologija. — 2003. — N 1. — P. 38—42.

6.5. Пыльцевой тест

(Л. В. Цаценко)

В основу метода положена способность пыльцы (мужских половых клеток цветковых растений) реагировать на действие полютантов. Известно, что химические мутагены способны нарушать прохождение стадий мейотического деления, в результате чего возникает стерильная пыльца, не способная к оплодотворению.

В природе у цветковых растений встречаются виды с естественной стерильностью, поэтому для выявления видов-индикторов необходимо определить виды, способные реагировать изменением количества фертильных пыльцевых зерен на антропогенное воздействие. Известно, что около 70 % видов цветковых растений являются гермафродитами, у которых доля стерильных пыльцевых зерен не превышает 5—10 %. Небольшое количество дефектных пыльцевых зерен позволяет считать такую пыльцу фертильной. Стерильная пыльца в норме наблюдается у 30—40 % видов цветковых растений, примерно у 10 % видов дефектность пыльцы связана с дифференциацией половых форм и у 3—5 % — дефектность стерильности связана с отдаленной гибридизацией, полиплоидией, цитоплазматической мужской стерильностью и влиянием среды.

Цель работы: определение реакции мужской генеративной сферы у цветковых растениий на поллютанты в экологически неблагополучных районах.

Для проведеня теста необходимы следующие материалы, реактивы и оборудование:

цветущие растения, произрастающие в различных районах; фиксаторы: Карнуа (6:3:1) (этиловый спирт : хлороформ : уксусная кислота) или раствор глицерина (50 % воды и 50 % чистого глицерина); красители: ацетокармин или ацетоарсеин (см. Справочный материал к подразд. 6.4); йодный раствор по Граму (см. Справочный материал); препаровальные иглы; ножницы; скальпель; пинцет; предметные и покровные стекла; микроскоп световой или бинокулярная лупа МБС-10; эпиндорфы (если соцветия маленькие) или пенициллиновые пузырьки (объемом 20—30 мл).

Ход определения

Соцветия или отдельные цветки отбираются с заранее намеченных техногенно загрязненных территорий, где предположительно имеется влияние поллютантов на среду. Для каждого вида отбирают по десять растений с каждого участка. Для анализа используют пыльники, которые к этому моменту должны быть светло-желтого или насыщенно-желтого цвета. Определяют эталон или относительно чистый участок, не подверженный загрязнению, и с него тоже отбираются анализируемые виды.

Собирают соцветия или цветки, содержащие зрелую, но еще не высыпавшуюся пыльцу; фиксируют и хранят материал в фиксаторе Карнуа или в растворе глицерина. Окрашивают в ацетокармине (рис. 6.3; 6.4). Если окрашивание происходит в йодном растворе, то полная окраска пыльника наступает через 1—6 ч.

Количество стерильной пыльцы определяют для каждого растения отдельно, что позволяет учесть неоднородность популяции, а затем рассчитывают средний процент стерильных пыльцевых зерен. Общее количество пыльцевых зерен для каждой популяции варьирует от 1 500 до 3 000.

Для каждого растения готовят индивидуальный препарат зрелых пыльцевых зерен. Пыльники одного цветка переносят из фиксатора на предметное стекло в каплю 45%-й уксусной кислоты и при малом увеличении бинокулярной лупы препаровальными иглами вытаскивают из них пыльцу полностью. Пустые оболочки удаляют, добавляют каплю красителя, перемешивают все иглой и накрывают покровным стеклом. Для окраски пыльцы используют красители, связываемые цитоплазмой и ядрами: кармин и йодный раствор по Граму.

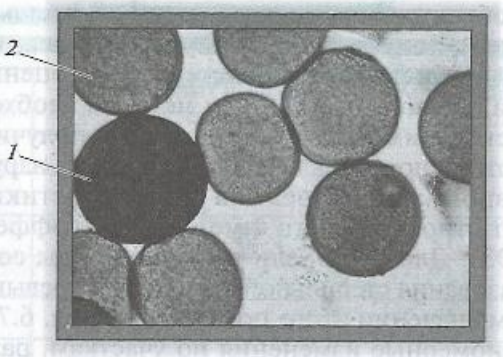

Рис. 6.3. Пыльцевые зерна ржи после окраски ацетокармином:
1 — фертильное (окрашенное); *2* — стерильное (неокрашенное или слабо окрашенное)

Все пыльцевые зерна разделяют на группы согласно классификации М. А. Нечкиной и В. С. Журкова: нормального размера, мелкие и крупные. Зерна нормального размера могут быть хорошо окрашены (тип А), слабо окращены (тип Б) и неокрашены (тип В). Мелкие зерна делят на хорошо окрашенные (тип Г), слабо окрашенные (тип Д) или неокрашенные (тип Е). Крупные подразделяют на хорошо окрашенные (тип Ж), слабо окрашенные (тип З) и неокрашенные зерна (тип И). Результаты наблюдений записывают в табл. 6.6.

В настоящее время, к сожалению, не отработаны научно обоснованные методы оценки ПДК загрязняющих веществ ни для агроэкосистем, ни для природных систем. Однако мониторинг

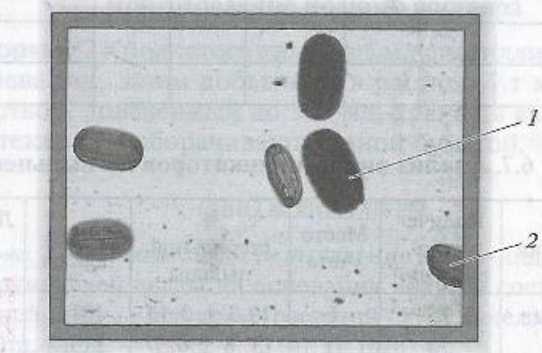

Рис. 6.4. Пыльцевые зерна донника лекарственного:
1 — фертильное (окрашенное, вытянутое); 2 — стерильное (сморшенное и неокрашенное)

загрязнения объектов окружающей среды с помощью пыльцевого теста позволяет получить первичную информацию о степени генетической стабильности экосистемы. При оценке гаметоцидного эффекта поллютантов данным методом необходима информация по нескольким видам, что позволяет получить более объективную картину потенциальных генетических нарушений. В качестве основной количественной характеристики используют коэффициент относительного гаметоцидного эффекта загрязнителей (КОГЭЗ). Для этой цели отбирают виды со спонтанным уровнем образования стерильной пыльцы, не превышающим 10 %. При большом значении этого показателя (табл. 6.7 и 6.8) трудно уловить закономерные изменения по участкам, различающимся по уровню загрязнения. Значение КОГЭЗ предлагается определять как среднее значение абортивных пыльцевых зерен видов-индикаторов с одного участка относительно эталона.

Примеры заполнения таблиц

Таблица 6.6. **Типы пыльцевых зерен при анализе территорий, подвергшихся мутагенному воздействию**

№ растения, вид	Размер зерен								
	Нормальные			Мелкие			Крупные		
	хорошо окрашенные (*А*)	слабо окрашенные (*Б*)	неокрашенные (*В*)	хорошо окрашенные (*Г*)	слабо окрашенные (*Д*)	неокрашенные (*Е*)	хорошо окрашенные (*Ж*)	слабо окрашенные (*З*)	неокрашенные (*И*)

Таблица 6.7. **Анализ видов-индикаторов по пыльцевому тесту**

Семейство, вид	Количество растений	Место учета	% стерильной пыльцы	Дисперсия	Достоверность разницы с эталоном
Сем. Бобовые	25	I	19,3 ± 0,43	181,6	—
Клевер	30	II	13,.8 ± 0,37	215,7	> 0.01
полевой	25	III	27,9 ± 0,41	452,4	> 0.01

Примечание. I — заказник «Камышанова поляна» (эталон); II — ОПХ «Колос»; III — опытно-селекционный участок ВНИТТИ (г. Краснодар).

Таблица 6.8. **Фертильность пыльцы у сортов пшеницы при различных агрофонах полевого мониторинга**

Вариант	% стерильных пыльцевых зерен		Коэффициент стерильности пыльцы, %	
	Руфа	Победа 50	Руфа	Победа 50
000	10,1 ± 0,32	8,7 ± 0,28	—	—
111	17,7 ± 0,58	4,2 ± 0,20	1,7	0,5
222	12,0 ± 0,66	11,5 ± 0,03	1,2	1,3
333	26,8 ± 0,38	14,7 ± 0,35	2,6	1,7
200	15,8 ± 0,91	5,1 ± 0,22	1,6	0,6
020	30,6 ± 2,63	13,7 ± 0,24	3,0	1,6
002	21,7 ± 1,05	15,0 ± 0,34	2,1	1,7
220	14,4 ± 0,42	13,8 ± 0,36	1,4	1,6
202	22,1 ± 0,73	9,4 ± 0,29	2,2	1,1
022	13,1 ± 0,46	15,2 ± 0,34	1,3	1,7

Примечание. Коэффициент стерильности пыльцы

$$K_{сп} = \frac{C_{пн}}{C_к},$$

где $C_{пн}$ — процент стерильной пыльцы на исследуемом агрофоне; $C_к$ — процент стерильной пыльцы на контроле (вариант 000).

Справочный материал

Приготовление йодного раствора

Растворяют 2 г йодистого калия в 5 мл дистиллированной воды при нагревании, затем добавляют в раствор 1 г металлического йода. Раствор, доведенный до 300 мл, хранят в склянке из оранжевого стекла или оборачивают черной бумагой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Веселова Т.Д. О возможности выявления видов-индикаторов загрязнения окружающей среды на основании анализа состояния мужской генеративной сферы у цветковых растений / [Т.Д. Веселова и др.] // Бюлл. МОИП. Отд. Биол. — 1996. — Т. 101. — Вып. 4.

Нечкина М.А. Способ биоиндикации мутагенов почв / [М.А. Нечкина и др.] // Гигиена и санитария. — 1997.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980.

Цаценко Л. В. Биологическая индикация и генетический скрининг загрязнения компонентов агроценоза / Л. В. Цаценко, О. Д. Филипчук // Сельскохозяйственная биол. — 1997. — № 5.

Цаценко Л. В. Генетический мониторинг фитопопуляции: подходы и методы // Сельскохозяйственная биол. — 2001. — № 1.

6.6. Тест на соматические мутации в волосках тычиночных нитей традесканции (клон 02)

(Т. И. Евсеева, С. А. Гераськин)

Обилие доступной исследователям информации о генетике и физиологии традесканции является хорошей основой для использования этого растения в программах оценки качества окружающей среды. В биоиндикационных исследованиях наиболее часто используют диплоидные (02, 4430, 2091 и 0106, $2n = 12$) и триплоидные (RU 7, KU 9 и KU 20, $2n = 24$) клоны *Tradescantia*, размножающиеся вегетативно и генетически гомогенные. Гибриды (клоны 02 и 4430) имеют низкую частоту и узкий диапазон изменчивости спонтанных мутаций, что по сравнению с негибридными клонами обеспечивает большую надежность оценки качества окружающей среды.

Традесканция принадлежит к сем. коммелиновых (*Commelinaceae*). Растение названо по имени английского ботаника и естествоиспытателя начала XIX в. Джона Традесканта — садовника герцога Букингемского и основателя одного из первых ботанических садов, а также Музея естественной истории в Лондоне. Многие виды рода *Tradescantia* произрастают в природных условиях Северной Америки. Большое число этих видов или их межвидовых гибридов были выведены и собраны в Национальной лаборатории в г. Брукхейвене (США). Клон 02 ($2n = 12$), гетерозиготный по окраске цветков, впервые обнаружен в 1958 г. профессором W. V. Brown среди коллекции традесканции, произрастающей на открытом воздухе в Университете штата Техас в г. Остине.

Клон 02 является гибридом между *Tradescantia occidentalis* и *T. ohiensis*. Листья ланцетные, собраны в розетку. Высота цветоноса взрослых растений достигает 40—45 см. Двустороннее соцветие состоит из нескольких бутонов на разных стадиях развития. При оптимальном режиме выращивания ежедневно в каждом соцветии распускается один цветок, состоящий из трех лепестков и трех чашелистиков, шести тычинок и одного пестика (рис. 6.5). Дикий тип окраски цветков и клеток волосков тычинок — голубой — является доминантным, розовый — рецессивным. Голубая

Рис. 6.5. Цветок традесканции

окраска цветков у клона 02 обусловлена пигментом — антоцианом. *In vivo* окрашивание цветков начинается за 5—6 дней до начала цветения после завершения деления терминальных клеток каждого волоска. Окончание деления, таким образом, является сигналом к началу окрашивания клеток волосков. Первыми окрашиваются терминальная или субтерминальная клетки и в последнюю очередь — у основания волоска. За три дня до начала цветения окрашивание завершается, поэтому бутоны, прошедшие эту стадию к моменту начала воздействия, не должны учитываться в эксперименте.

На каждой тычинке формируется в среднем 45 волосков. Волосок представляет собой меристематические, последовательно расположенные клетки, развивающиеся из одной эпидермальной посредством деления терминальных и субтерминальных клеток. Количество волосков зависит от возраста соцветия и условий окружающей среды. Тычинки последних цветков в старых соцветиях имеют 30 — 32 волоска. Число волосков на 64 % определяется генетически и только на 36 % обусловлено влиянием факторов внешней среды.

Традесканция относится к растениям длительного светового дня, и в условиях высоких широт без специального освещения невозможно круглый год поддерживать ее цветение. В таком случае экспериментальные работы следует планировать только на весенне-летнее время. Хорошие результаты дает комбинированная подсветка в течение 16—18 ч лампами Reflux 70W и Phillips TLD 36W/840, создающими интенсивность света 12—25 тыс. люкс. При указанном режиме растения цветут непрерывно и дают много побегов. Рекомендуемая влажность воздуха 80 %. Если такие условия создать сложно, учащают полив.

Традесканция размножается преимущественно вегетативно, поэтому ее генетическая изменчивость минимальна. Взрослые растения хорошо развиваются в грунте, состоящем из почвы, песка и перегноя (1:1:1). Для быстрого размножения можно укоренять черенки и затем высаживать их в приготовленную указанным способом почвенную смесь с добавлением вермикулита. В грунт нельзя вносить навоз или другие свежие органические удобрения, поскольку при этом значительно повышается частота соматических мутаций. Предполагается, что мутагенами в этом случае являются радикалы пестицидов или продукты жизнедеятельности грибов, такие как нитрозамины. Подкормки производят, заменяя воду при поливе на минеральные питательные среды (например, Кнопа) или растворы солей гуминовых кислот (например, гумат натрия).

Поскольку спонтанная частота мутаций клеток волосков тычинок традесканции изменяется при колебаниях температуры воздуха, следует контролировать и поддерживать на одном уровне температурный режим в помещении. При температуре 21 °С частота соматических мутаций в клетках волосков тычинок традесканции (клон 02) составляет (0,09 ± 0,04) %, а при 24 °С — (0,12 ± 0,04) %. По данным разных авторов, спонтанная частота мутаций для клона 02 изменяется в зависимости от температуры и освещенности в пределах от 0,048 до 0,15 %.

Для проведения теста в лабораторных условиях необходимы следующие материалы и оборудование:

цветущие растения традесканции (не менее трех черенков на каждый вариант опыта); пробы воды (объемом не менее 500 мл); пробирки (объем 50 мл); штатив; предметные стекла; пинцет; препаровальная игла; лезвие; вазелиновое масло; бинокулярная лупа МБС-10; компрессоры с отводящей системой (при наличии).

Примечание. Учет нарушений в волосках тычинок традесканции проводят ежедневно в течение 15 — 17 дней.

Ход определения

Подготовка проб и растений к эксперименту. Отфильтрованную с помощью бумажного фильтра пробу воды разлить в три установленные в штативе пробирки. Объем воды во всех пробирках должен быть одинаковым (желательно не менее 25 мл). Пробы воды можно отобрать вблизи дорог или промышленных предприятий из поверхностных водоемов, ручьев, рек и т. п. При возможности лучше протестировать пробы не менее чем в трех повторностях. В следующие три пробирки разлить дистиллированную воду (контроль) в том же объеме (по 25 мл на пробирку). Еще три пробирки заполнить раствором стандартного мутагена (положительный контроль), например 1 мМ раствором малеинового гидразида.

Срезать девять черенков традесканции с соцветиями, в которых распустился первый цветок. Длина черенка 20 см от соцветия. Распределить по одному черенку на каждую пробирку.

Зафиксировать время начала эксперимента. Через 24 ч (время воздействия регулируется в зависимости от степени токсичности образца и целей эксперимента) все растения перенести в чистые пробирки со свежей дистиллированной водой.

На четвертый день *от начала эксперимента* начать анализ соматических мутаций и потери репродуктивной способности клеток волосков тычинок.

Подготовка препаратов для микроскопических исследований. Распустившийся цветок, время жизни которого ограничено несколькими часами, срезать непосредственно перед экспериментом. Аккуратно отвернуть лепестки и, зажав их указательным и большим пальцами левой руки, срезать тычинки, держа лезвие в правой руке. Тычинки необходимо срезать по одной у самого основания, не повреждая клетки волосков. Затем тычинки положить на заранее приготовленное предметное стекло в вазелиновое масло (рис. 6.6). Следует использовать небольшое количество вазелинового масла, чтобы препарат не «плавал» в нем, иначе волоски сложно равномерно распределить по обеим сторонам тычинки.

Настроить бинокулярную лупу обычным способом. Используя увеличение не более 10×4 и матовый фильтр, приступить к анализу препаратов. Левая рука при этом находится на винте настройки изображения, а в правой экспериментатор держит препаровальную иглу, пользуясь которой при необходимости поправляет волоски тычинок.

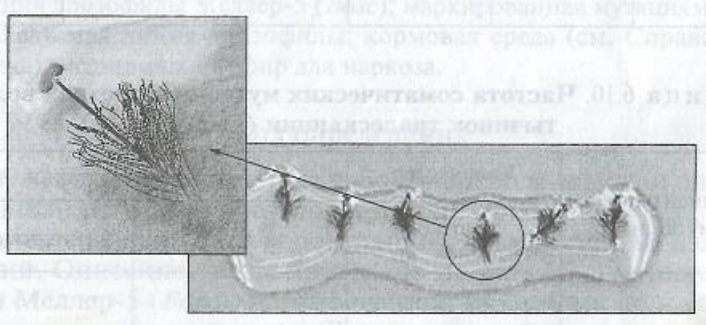

Рис. 6.6. Фиксация тычинок традесканции в вазелиновом масле

Клетки волосков имеют голубую окраску, поэтому трудностей с распознаванием розовых мутантных клеток (секторов) не возникает. Одна розовая клетка или сектор (несколько идущих подряд розовых клеток, не разделенных голубыми) регистрируются как одно мутантное событие. Результаты заносят в табл. 6.9 и 6.10. После чего приступают к анализу следующего цветка.

Обработка результатов. Частота соматических мутаций и потеря репродуктивной способности клеток могут быть рассчитаны либо по дням для каждого варианта опыта, либо для каждого растения за весь период наблюдений. Для расчетов используют следующую формулу: частота соматических мутаций (%) умножается на число всех зарегистрированных для данного варианта опыта розовых мутантных секторов, деленное на сумму проанализированных волосков тычинок.

Справочный материал

Примеры заполнения таблиц

Таблица 6.9. **Оценка мутагенного и токсического действия образцов природных вод**

Код препарата	Порядковый номер цветка	Количество волосков на тычинку	Количество волосков в цветке	Розовые мутантные события	Количество волосков, остановившихся в росте

Таблица 6.10. **Частота соматических мутаций в клетках волосков тычинок традесканции (клон 02)**

Концентрация мутагена	Количество просмотренных волосков тычинок, шт.	Соматические мутации, %	
		$\overline{X} \pm S\overline{x}$	инкремент

Евсеева Т. И. Сочетанное действие факторов радиационной и нерадиационной природы на традесканцию / [Т. И. Евсеева и др.]. — Екатеринбург: УрО РАН, 2001.

Сперроу А. Х. Возникновение соматических мутаций в *Tradescantia* под действием химических мутагенов ЭМС (этилметансульфонат) и ДБЭ (1,2-дибромэтан) и специфических загрязнителей атмосферы — O_3, SO_2, NO_2 / [А. Х. Сперроу и др.] // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. — М.: Наука, 1977.

Sparrow A. H. Spontaneous somatic mutation frequencies for flower color in several Tradescantia species and hybrids / [A. H. Sparrow et al.] // Environ. Exp. Bot. — 1976. — V. 16.

6.7. Тест на сцепленные с полом рецессивные летальные мутации у дрозофилы

(А. И. Ким)

Одним из самых удобных и широкоупотребимых тестов на мутагенность с использованием дрозофилы до сих пор остается метод, разработанный Г. Мёллером в 1930—1940-е гг. Он позволяет с высокой чувствительностью улавливать рецессивные сцепленные с полом летальные мутации, а именно спонтанные или индуцированные летальные мутации, возникающие в Х-хромосоме. Как правило, летальные мутации, улавливаемые в этом тесте, — это генные мутации и хромосомные микроаберрации (делеции и дупликации небольших фрагментов Х-хромосомы). Хромосомы и линии, которые можно использовать в тесте Мёллер-5, приведены в подразд. 3.4.3.

Для проведения теста необходимы следующие материалы: тестерная линия дрозофилы Мёллер-5 (*Basc*); маркированная мутациями w^a и *B*; исследуемая линия дрозофилы; кормовая среда (см. Справочный материал); медицинский эфир для наркоза.

Ход определения

Тест Мёллер-5 представляет собой гибридологический опыт по скрещиванию в трех последовательных поколениях особей из линии тестера и линии (или популяции), исследуемой на наличие мутаций. Описание схемы приведено на рис. 6.7 для тестерной линии Мёллер-5 (*Basc*), маркированной мутациями w^a и *B*.

В родительском поколении (Р) массово скрещивают виргинных (девственных) самок из линии тестера и самцов анализируемой линии (по нескольку самок и самцов).

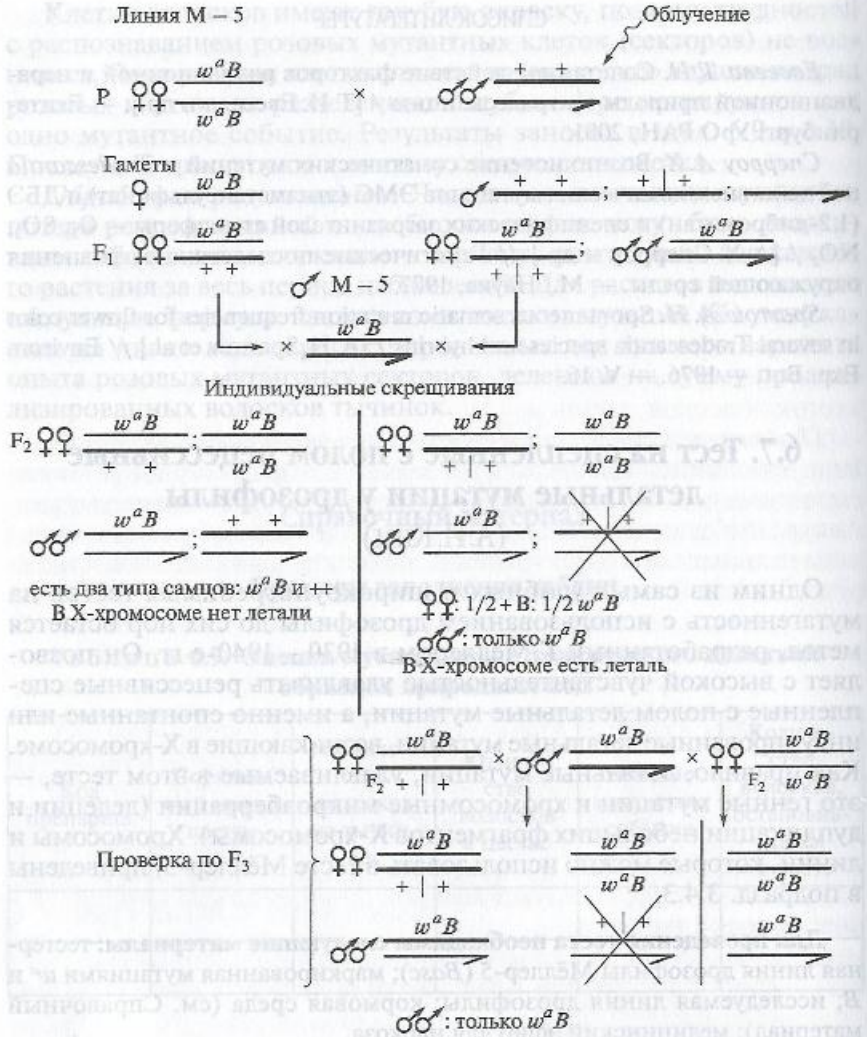

Рис. 6.7. Схема постановки теста Мёллер-5 (количественный учет рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций) у *Drosophila melanogaster* (по Н. Н. Орловой, 1991).

Приведен случай по исследованию частоты индуцированных мутаций. Объяснения в тексте

В первом поколении (F_1) виргинных самок не отбирают, так как их самцы-братья генотипически одинаковы и гемизиготны по тестерной хромосоме. На третий — пятый день лёта культуры F_1 мух наркотизируют серным (медицинским) эфиром или углекислым газом и ставят индивидуальные скрещивания (в пробирки

небольшого диаметра с кормовой средой помещают по одной уже оплодотворенной самке и по 2 — 3 самца). Каждая самка несет две Х-хромосомы: тестерную (Мёллер-5) и анализируемую (как правило, дикого типа).

Во втором поколении проводят учет результатов. При отсутствии летальной мутации в пробирке будут находиться самцы двух фенотипов, соответствующих тестерному (Мёллер-5, маркеры w^a и B) и анализируемому генотипам. Если же в исследуемой хромосоме имеется летальная мутация, то в пробирке обнаруживаются самцы только одного фенотипа, соответствующего генотипу Мёллер-5 (w^a и B), тогда как самцы дикого типа отсутствуют.

При анализе второго поколения (F_2) необходимы определенные навыки для быстрого и надежного различения используемых маркеров. Анализ проводят, не вскрывая пробирок, а мух рассматривают через стекло при ярком освещении. При этом в руку берут сразу несколько пробирок, что существенно ускоряет процедуру. Число просмотренных культур и число культур с летальными мутациями записывают. В сомнительных случаях мух из отдельной культуры (мухи, развившиеся в одной пробирке) необходимо обездвижить и рассмотреть их фенотип под бинокулярным микроскопом.

Если в пробирке обнаруживается несколько самцов дикого типа (2 — 3), то этот случай классифицируют как полулетальную (семилетальную) мутацию. Летальные и полулетальные мутации проверяют в третьем поколении (F_3). Для этого ставят индивидуальные скрещивания нескольких самок (порядка 10) только из подозрительных культур, которые в дальнейшем анализируют, как во втором поколении.

Для быстрого получения результатов все эксперименты рекомендуется проводить при температуре, максимально ускоряющей развитие дрозофилы (24 — 25 °С) (см. Справочный материал). В случае изучения температурочувствительных летальных мутаций схему эксперимента необходимо модифицировать под поставленные цели.

В случае использования в качестве тестерных линий не Мёллер-5 (*Basc*), а других, перечисленных в подразд. 3.4.3, необходимо обратить внимание, что в F_1 отбирают по фенотипическим маркерам и ставят на F_2 таких самок (гетерозигот), которые несут балансерную тестерную и исследованную хромосомы.

Все эксперименты по исследованию частот спонтанных и индуцированных летальных мутаций должны сопровождаться контрольными опытами.

Расчет частоты возникновения летальных мутаций. Объем эксперимента (число культур F_2) определяется частотой возникновения мутаций. Обычно исследуют не менее 1 000 культур F_2.

При этом число культур F_2 равно числу анализируемых Х-хромосом. В таком случае частоту летальных мутаций рассчитывают путем деления числа культур, не содержащих самцов дикого типа, на общее число проанализированных культур. Например, из 1 000 пробирок, проанализированных в F_2, самцов дикого типа не обнаружено в 23. В таком случае частота летальных мутаций составляет $23/1\,000 \cdot 100\,\% = 2{,}30\,\%$.

Пределы случайного отклонения от полученной величины рассчитывают при помощи вычисления ошибки по формуле

$$m = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}},$$

где p — частота летальных мутаций; n — общий объем выборки. В данном примере ошибка составляет 0,47. При уровне значимости 0,95 частота летальных событий составляет

$$2{,}30 \pm 1{,}96 \cdot 0{,}47 = 2{,}30 \pm 0{,}93.$$

Справочный материал

Характеристика тест-объекта

Drosophila melanogaster относится к организмам, претерпевающим полный метаморфоз. Из яиц вылупляется личинка, которая затем претерпевает две линьки, таким образом, личиночный период включает три возрастные стадии. Третья личиночная стадия превращается в куколку, которая, в свою очередь, развивается в имаго, или в половозрелую форму. В зависимости от температуры среды эта муха завершает цикл развития за 9—20 дней. При 25 °С (а именно такую температуру в большинстве лабораторий предпочитают для культивирования дрозофилы) жизненный цикл дрозофилы делится на следующие главные стадии: эмбриональное развитие — 1 сут; первая личиночная стадия — 1 сут; вторая личиночная стадия — 1 сут; третья личиночная стадия — 2 сут; предкуколка — 4 ч; куколка — 4,5 сут. Таким образом, при температуре 25 °С продолжительность развития одной генерации занимает всего 9—10 сут.

Ведение основной культуры

Для основных культур дрозофилы используют стеклянные молочные бутылочки объемом около 200 мл. Для более мелких вторичных культур, получаемых при спаривании мух в ходе проведения теста, используют пробирки объемом около 40 мл.

Приготовление кормовой среды

Наиболее часто применяют изюмно-дрожжевую среду: на 1 л воды берут 12 г агара, 10 г манной крупы, 10 г сахарного песка, 72 г пекарских дрожжей, 40 г изюма без косточек и 7 г метил-*пара*-гидроксибензоата или 5 мл пропионовой кислоты (для предотвращения роста плесневых грибов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мёллер Г. Избранные работы по генетике. — М.; Л.: Сельхозгиз, 1937.

Орлова Н. Н. Генетический анализ. — М.: Изд-во МГУ, 1991.

Lindsley D. Genetic variations of Drosophila melanogaster / D. Lindsley, E. H. Grell / Carnegie Institution of Washington publication. — 1968. — N 627.

6.8. Метод «ДНК-комет», или щелочного гель-электрофореза изолированных клеток

(С. К. Абилев)

Число доступных методов для исследования макромолекулярных изменений ДНК, вызванных генотоксичным веществом, ограниченно. Наиболее традиционными методами являются седиментация ДНК в градиенте щелочной сахарозы и щелочная элюция ДНК с мембранных фильтров. Однако эти методы требуют специального оборудования и определенных технических навыков. В настоящее время наибольшее распространение получил метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток, или метод «комет» (single-cell gel electrophoresis assay, или comet assay). Метод комет первоначально был предложен в 1984 г. О. Остлингом и К. Иохансоном для оценки индуцированных повреждений ДНК в клетках млекопитающих. Позже была предложена модификация метода с щелочным гель-электрофорезом, которая вследствие высокой чувствительности получила наибольшее признание у исследователей и сейчас является основным методом выявления и оценки повреждений ДНК в изолированных клетках млекопитающих и человека. Высокая чувствительность, небольшое количество материала, требуемого для исследования, и применимость практически к любым клеткам обусловливает широту использования метода комет для решения разнообразных задач в области генетической токсикологии.

Преимущество данного метода заключается в его относительной простоте и малом времени, затрачиваемом на получение результатов генотоксических воздействий на широкий спектр клеточных биологических моделей. Данный метод (наряду с широко распространенными методами — аберрации хромосом, СХО,

генные мутации и др.) нашел свое применение в оценке генотоксичности широкого спектра антропогенных экологически значимых факторов химической и физической природы.

Принцип метода основан на регистрации разной подвижности в постоянном электрическом поле ДНК и возможных фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (рис. 6.8), параметры которого зависят от степени поврежденности исследуемой ДНК. Исследуемые клетки заключают в агарозный гель и наносят на подготовленные гель-слайды (предметные стекла). После затвердевания геля клетки подвергают лизису, в процессе которого происходят диссоциация клеточных структур и выпетливание хроматина в поры агарозы. Далее препараты подвергаются щелочной денатурации (pH > 13), в результате которой щелочно-лабильные сайты в ДНК реализуются в однонитевые разрывы. При электрофорезе под влиянием электрического поля фрагменты ДНК мигрируют к аноду, формируя хвост кометы, длина которого является показателем поврежденности ДНК («ДНК-кометы»). После завершения щелочного электрофореза слайды нейтрализуют/фиксируют, окрашивают, микроскопируют под флуоресцентным микроскопом и измеряют длину кометы, диаметр головы и длину хвоста кометы. Измерения могут быть выполнены непосредственно под микроскопом, с микрофотографий или с сохраненных цифровых изображений. Использование компьютерного анализа цифровых изображений позволяет измерить также такие показа-

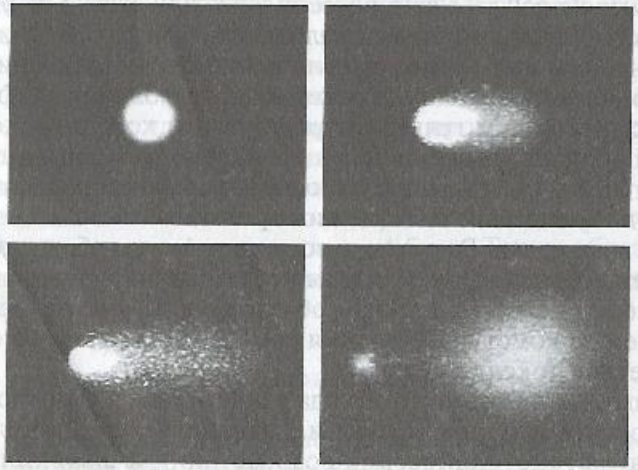

Рис. 6.8. «ДНК-кометы» ядер клеток с различной степенью поврежденности ДНК

тели, как общее содержание ДНК в комете, доля материала в голове кометы, доля материала в хвосте кометы.

Для оценки ДНК-повреждающей активности *in vitro* методом комет в качестве тест-объекта используют клетки первичных и перевиваемых клеточных культур животных и человека: лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, гепатоциты грызунов, перевиваемые клетки китайского хомячка (CHL, V79, CHO), клетки мышиной лимфомы L5178Y и др. Широкое применение в качестве тест-объекта получили лимфоциты периферической крови человека, что обусловлено простотой процедуры получения материала и синхронизированностью популяции клеток.

Для проведения экспериментов *in vivo* используют мелких лабораторных животных — мышей и крыс. При этом можно анализировать клетки самых различных тканей и органов, что позволяет исследовать органную специфичность ДНК-повреждающего действия тестируемого соединения.

Для тестирования ДНК-повреждающей активности необходимы следующие материалы, оборудование, реактивы:

растворители; контроли; лабораторные животные (см. Справочный материал); исследуемые мутагены; микроцентрифужные пробирки; микроцентрифуга; стеклянные пробирки для отбора органов и тканей для анализа; микротермостат; предметные и покровные стекла; пинцет; электроплитка; емкость со льдом; камера для горизонтального гель-электрофореза; реактивы для электрофореза (см. Справочный материал); флуоресцентный краситель (акридиновый оранжевый); эпифлуоресцентный микроскоп; совмещенная с микроскопом высокочувствительная CCD-камера и специализированное программное обеспечение для анализа «ДНК-комет».

Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого соединения с забоем животных через 3—6 ч. Более длительная экспозиция используется для соединений, требующих большего времени для биотрансформации. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводятся. Многократное введение используют при оценке генотоксического действия соединений, обладающих кумулятивным эффектом. В этом случае исследуемое соединение вводится ежедневно в течение 7—14 дней с забоем животных через 3—6 ч после последнего введения.

Ход определения

Выбор органов и тканей для анализа. Анализ ДНК-повреждающей активности чаще всего проводят в клетках печени, являющейся основным органом биотрансформации ксенобиотиков

и высокочувствительной к действию генотоксикантов. При изучении органной специфичности генотоксического действия анализ проводят в разных органах: печени, костном мозге, легких, печени, толстой кишке, мочевом пузыре.

Выделение клеток. Выделение клеток — один из ключевых моментов при методе комет в экспериментах *in vivo*. Методом цервикальной дислокации умерщвляют животное, вскрывают и по возможности быстро выделяют анализируемые органы/ткани. Печень, почки и легкие (150—200 мг ткани) измельчают на льду, переносят в стеклянные пробирки с 3 мл охлажденного до 4 °С фосфатно-солевого буфера (pH 7,5), содержащего 20 мМ EDTA-Na_2 и 10 % ДМСО. Дважды отмывают от клеток крови и раздавливают стеклянной палочкой в свежем буфере. Пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 1 000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 1 мл охлажденного буфера.

Необходимые буферы и растворы для проведения гель-электрофореза изолированных клеток приведены в справочном материале.

Получение микропрепаратов. Готовят 1%-й раствор легкоплавкой агарозы ($Т_{пл}$ < 42 °С) в ФСБ (см. Справочный материал). Полученный гель разливают на аликвоты по 240 мкл в микроцентрифужные пробирки, помещенные в микротермостат при 42 °С.

Далее в микроцентрифужные пробирки с агарозным гелем вносят 60 мкл клеточной суспензии и два раза прокачивают дозатором. На заранее подготовленные предметные стекла с агарозой (см. Справочный материал) грифельным карандашом по шероховатой поверхности нанести шифр. Стекла раскладывают на плитке с нагретой до 42 °С поверхностью.

В центральную часть нагретого на плитке предметного стекла наносят 60 мкл полученного агарозного геля с клетками и накрывают покровным стеклом под углом так, чтобы не было пузырей.

Предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют на 10 мин для затвердевания геля.

Аккуратно снимают покровные стекла (тянут за край) и предметные стекла помещают в стеклянную кювету.

Внимание! Далее все манипуляции проводят только в затемненном помещении при свете желтой или зеленой лампы.

В кювету с предметными стеклами заливают предварительно охлажденный до 4 °С лизирующий раствор, накрывают кювету фольгой и помещают в холодильник. Проводят лизис в течение не менее 1 ч. Допускается нахождение препаратов в лизирующем растворе до 24 ч.

По окончании лизиса стекла вынимают из раствора, дают стечь жидкости под углом. Бумажной салфеткой вытирают нерабочую поверхность (без агарозы).

Предметные стекла раскладывают на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Стекла должны лежать точно перпендикулярно краю емкости шероховатым краем в сторону минуса, нешероховатым — плюса.

В камеру заливают раствор для электрофореза: сначала в углубление емкости около минуса, потом около плюса и далее медленно вливают оставшийся раствор, пока он не покроет предметные стекла на 2—3 мм. Стекла не должны изменить положение при внесении жидкости для электрофореза, в случае поворота их поправляют пинцетом. Микропрепараты оставляют на 20 мин без включенного аппарата для электрофореза.

Проводят электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1 В/см и 300 мА.

По окончании электрофореза химическим стаканом удаляют из углублений камеры бóльшую часть раствора для электрофореза, пока не покажутся стекла. Пинцетом вытаскивают стекла, дают стечь жидкости под углом. Протирают бумажной салфеткой нерабочую поверхность.

Стекла помещают в стеклянную кювету и заливают раствором для фиксации. Фиксируют в течение 15 мин.

Микропрепараты высушивают при комнатной температуре (1—2 ч) и хранят до анализа в сухом темном месте в течение не более 2—4 месяцев.

Окрашивание микропрепаратов. Для окраски микропрепаратов используют флуоресцирующие красители, применяемые при визуализации ДНК. Использование акридинового оранжевого предпочтительнее, поскольку в отличие от остальных красителей он имеет одинаковое сродство как к двухцепочечной (желто-зеленая флуоресценция), так и к одноцепочечной ДНК (красная флуоресценция), представленной главным образом в хвосте кометы, что увеличивает точность и воспроизводимость анализа.

Готовят стоковый раствор акридинового оранжевого концентрацией 200 мкг/мл на бидистиллированной воде. Раствор стабилен в течение 2 мес при хранении в темном прохладном месте.

Непосредственно перед окрашиванием готовят рабочий раствор красителя. Для этого 100 мкл стокового раствора красителя смешивают с 900 мкл 50 мМ ацетатного буфера (pH 4,5). Рабочий раствор красителя хранится в защищенном от света месте.

Микропрепараты погружают в стеклянный стакан с ацетатным буфером приблизительно на 20 с. Дают стечь жидкости под углом, края микропрепарата промокают о бумажные салфетки и протирают нерабочую поверхность.

Рабочий раствор красителя в количестве 60 мкл наносят на микропрепарат, покрывают покровным стеклом и содержат в горизонтальном положении в затемненном месте в течение 30 мин.

Покровные стекла удаляют, микропрепараты промывают в дистиллированной воде и микроскопируют в течение не более 24 ч.

Микроскопический анализ. Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами (для акридинового оранжевого: возбуждающий фильтр 490 нм, дихроичное зеркало 510 нм, отсекающий фильтр 530 нм). Рекомендуемое увеличение 200— 400×. Перед проведением анализа микропрепараты шифруют двойным слепым методом. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ядер на наличие «ДНК-комет» без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические клетки, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих «ДНК-комет» с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой». Результаты анализа заносят в табл. 6.11.

В зависимости от технических возможностей экспериментатора анализ «ДНК-комет» может проводиться визуально или с помощью программно-аппаратного комплекса, включающего совмещенную с микроскопом высокочувствительную CCD-камеру

Пример заполнения таблицы

Таблица 6.11. **Результаты оценки ДНК-повреждающей активности химического соединения** *in vivo*

Условия эксперимента (вещество, доза)	№ животного	Орган или ткань	Проанализировано клеток		Средний показатель по группе	Уровень значимости
			всего	с «ДНК-кометой»		
Контроль	1	Печень				
	2					
	3					
	4					
	5					
Метилметан-сульфонат, 80 мг/кг	1	Печень				
	2					
	3					
	4					
	5					

и специализированное программное обеспечение. Он позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров «ДНК-комет», характеризующих целостность структуры ДНК — длину «кометы», длину «хвоста», диаметр «головы», процентное содержание ДНК в «голове» или «хвосте» (% ДНК) и т.д. (рис. 6.9). На

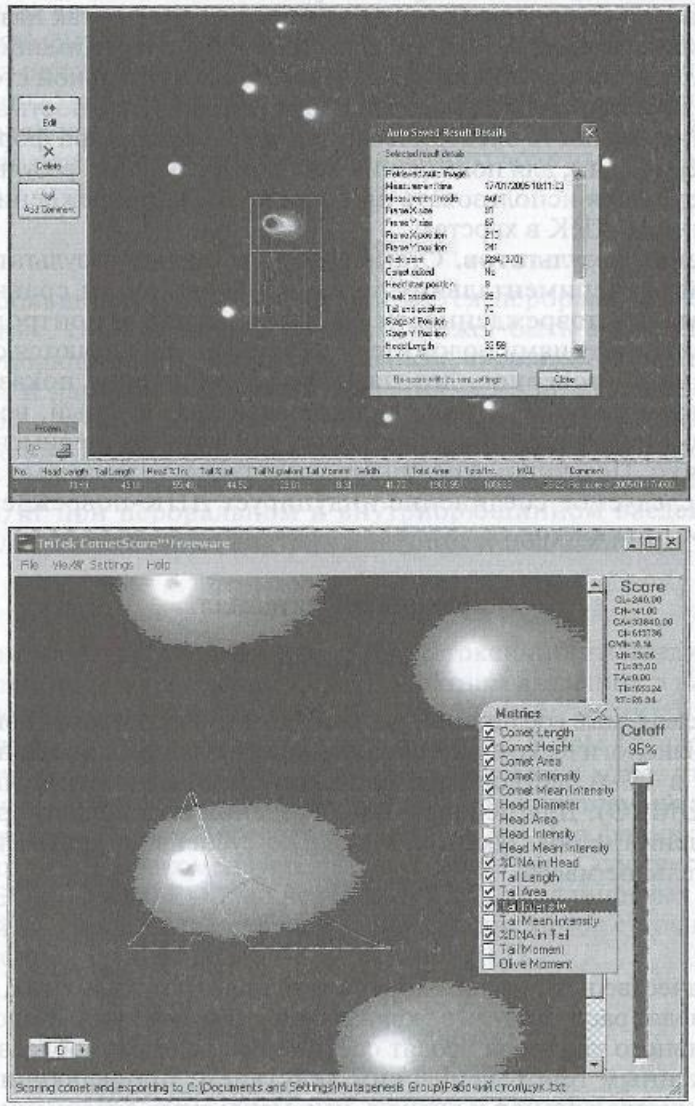

Рис. 6.9. Автоматизированный учет результатов тестирования методом комет

сегодняшний день разработано около десятка программ для анализа «ДНК-комет», некоторые из них находятся в свободном доступе. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров «ДНК-комет» проводится в режиме реального времени либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК чаще всего используют длину «хвоста», «% ДНК в хвосте» или их произведение — так называемый «момент хвоста» (tail moment). Принимая во внимание, что показатель длины «хвоста» «ДНК-комет» в значительной степени может зависеть от экспериментальных условий (плотность агарозы, напряженность электрического поля, температура форезного буфера и т.д.), для повышения воспроизводимости результатов рекомендуется использовать при оценке ДНК-повреждений показатель «% ДНК в хвосте».

Оценка результатов. Статистическую оценку результатов по каждой экспериментальной точке проводят путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной и контрольной группах. Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект, по-крайней мере, для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток.

Справочный материал

Растворители

Исследуемые соединения растворяют в дистиллированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые соединения вводят в 1%-м растворе этилового спирта или диметилсульфоксида (ДМСО). Для перорального введения водонерастворимых соединений используют 1%-ю водную суспензию крахмала или растительное масло.

Контроли

В качестве негативного контроля используют животных, которым вводят растворитель в эквивалентных количествах. Животным позитивного контроля вводят соединение, заведомо обладающее выраженным генотоксическим действием, проявляющимся в большинстве органов и тканей. Рекомендуемые соединения: метилметансульфонат (40 — 80 мг/кг), N-нитрозодиметиламин (80 — 140 мг/кг), N-этил-N-нитрозомочевина (15 — 50 мг/кг).

Лабораторные животные

Эксперименты проводят на половозрелых самцах или самках крыс и мышей. Используются животные, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает ±10 %. Животных содержат в соответствии с действующими Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (виварием). Полученные из питомника животные рандомизированно распределяются в группы по 5 — 10 особей и до использования в эксперименте проходят карантин и акклиматизацию в течение 10 — 14 дней. Каждая контрольная и подопытная группы должны содержать не менее 5 особей.

Способ введения

В большинстве случаев используется пероральный способ введения. Оценка генотоксичности может быть проведена при внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном, ингаляционном и накожном способах введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одновременный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг при пероральном и внутрибрюшинном введениях и не более 10 мл/кг при внутримышечном и подкожном.

Дозы

При наличии сведений об острой токсичности соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей 1/10 — 1/5 LD_{50}, и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними. В том случае, если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу LD_{50} невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2 000 мг/кг. Для фармакологических средств рекомендуется использовать дозы, соответствующие ED_{50}, 10 и 100 ED_{50}, но не выше 1/2 LD_{50}; для пищевых соединений — дозы, соответствующие ДСП (допустимое суточное потребление), 0,1 и 10 ДСП, но не выше 1/2 LD_{50}.

Буферы и растворы

Приготовление лизирующего раствора

Готовится основной лизирующий раствор — 10мМ трис-HCl (pH 10); 2,5М NaCl; 100мМ EDTA-Na_2. Раствор хранится при

комнатной температуре в течение 1 мес. Непосредственно в день эксперимента (забоя животных) готовится рабочий лизирующий раствор путем добавления к основному лизирующему раствору Triton X-100 и диметилсульфоксида (ДМСО) до конечных концентраций 1 и 10 % соответственно. Готовый раствор перед использованием охлаждают в холодильнике до 4 °С.

Приготовление раствора для электрофореза

Готовятся основные 10 М раствор NaOH (*раствор А*) и 200 мМ раствор EDTA-Na_2 (*раствор Б*). Растворы хранятся при комнатной температуре в течение 2 мес. Непосредственно в день эксперимента готовится рабочий раствор для электрофореза: 300 мМ NaOH; 1 мМ EDTA-Na_2, (pH > 13). Для этого в 2-литровую бутылку с узким горлышком наливают 500 мл бидистиллированной воды, добавляют 100 мл раствора для электрофореза *А* и 10 мл раствора для электрофореза *Б*. Добавляют бидистиллированной воды до конечного объема 2 л (необходимый объем зависит от используемого аппарата для электрофореза). Готовый раствор перед применением охлаждают до 4 °С.

Приготовление раствора для фиксации

70%-й раствор этилового спирта готовится непосредственно перед применением.

Приготовление фосфатно-солевого буфера (ФСБ)

50 мг KCl; 50 мг KH_2PO_4; 2 г NaCl; 720 мг Na_2HPO_4 в 250 мл деионизованной воды pH 7,4; стерилизуют фильтрованием, хранят в холодильнике.

Подготовка предметных стекол

Используются традиционно применяемые в световой микроскопии предметные стекла с шероховатой на 1/4 поверхностью. Во избежание искажений фона флуоресценции не рекомендуется использование полностью шероховатых стекол.

В стеклянный флакон с 10 мл бидистиллированной воды вносят 100 мг универсальной агарозы ($T_{пл}$ < 65 °С). Флакон с агарозой ставят в химический стакан на 50 мл, в который наливают дистиллированную воду так, чтобы она наполовину закрывала агарозный раствор.

Взвесь помещают в микроволновую печь и нагревают при мощности 150 Вт в течение 2 мин 30 с. При этом раствор не должен кипеть, гель должен быть полностью прозрачным. При отсутствии

микроволновой печи растворение агарозы проводят на водяной бане, аналогично контролируя процесс растворения.

На поверхность плитки, нагретой до 65 °С, кладут предметные стекла так, чтобы вся нешероховатая поверхность находилась на поверхности плитки. На плитку ставят также флакон с агарозным гелем. На край стекла, противоположный шероховатому, наносят дозатором 150 мкл агарозного геля. Наконечником дозатора плашмя растягивают гель по всей нешероховатой поверхности и на 3—5 мм по шероховатой. Обязательно следует контролировать полное заполнение всей поверхности агарозой. Не допускается образование пузырей. Предметные стекла с агарозой помещают плашмя на плоский планшет с выступами. После затвердевания агарозы (1—2 ч) на шероховатой поверхности делается пометка (только грифельным карандашом) для запоминания локализации слоя агарозы. Предметные стекла могут храниться до использования в течение 1 мес при комнатной температуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. — М.: РАМН, РСНХН, 2006.

Ostling O. Microelectroforetic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells / [O. Ostling et al.] // Biochem. Biophis. Res. Comm. — 1984. — V. 123.

Singh N. P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / [N. P. Singh et al.] // Exper. Cell Res. — 1998. — V. 175.

Olive P. L. The Comet Assay: An overview of techniques // Methods in Molecular Biology. — 2001. — V. 203.

Hartmann A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay / [A. Hartmann et al.] // Mutagenesis. — 2003. — V. 18.

6.9. Метод учета аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*

(Г. Ф. Михайлова)

Основу метода составляет регистрация видимых нарушений хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* на стадии метафазы. Исследование выполняется на базе стандартной цитогенетической лаборатории.

Для проведения теста необходимы следующие материалы, реактивы и оборудование:

венозная кровь; микроцентрифуга; культуральная среда Карреля (см. Справочный материал); термостат; гипотонический раствор 0,75 М KCl; фиксатор «уксусный алкоголь»: смесь метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в пропорции 3:1; предметные стекла; красители азур-эозин или Гимза (см. Справочный материал); микроскоп с эмерсионным объективом.

Ход определения

Для культивирования лимфоцитов и приготовления препаратов хромосом берут кровь из локтевой вены человека, помещают в стерильную пробирку, содержащую раствор гепарина (200 ЕД на 1 мл крови) для предотвращения свертывания). В стерильных условиях образцы крови переливают по 0,8 мл в приготовленные для культивирования флаконы Карреля (см. Справочный материал).

После окончания культивирования флаконы встряхивают, чтобы перевести клетки, осевшие на дне и стенках, во взвешенное состояние, и переливают в центрифужные пробирки. Культуру центрифугируют при 1 000 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеток; надосадочную жидкость удаляют водоструйным насосом. К осадку добавляют предварительно подогретый до 37 °С гипотонический раствор (0,75 М KCl) и ресуспендируют в нем осадок. Пробирки вновь помещают в термостат (37 °С) на 30 мин. По окончании гипотонизации пробирки с культуральной смесью центрифугируют при тех же условиях с последующим удалением надосадочной жидкости.

По окончании гипотонизации производят фиксацию клеток, для чего осадок ресуспендируют в оставшихся 1—2 каплях гипотонического раствора с помощью пастеровской пипетки и к нему добавляют свежеприготовленный холодный фиксатор. Первые капли фиксатора следует добавлять медленно, тщательно перемешивая на шейкере. Увеличивая скорость подачи фиксатора, доводят его объем до 10 мл.

Смену фиксатора с последующим центрифугированием производят трижды. После последнего центрифугирования водоструйным насосом отсасывают надосадочную жидкость. Для анализа методом стандартного окрашивания хромосом в пробирках оставляют по 150—250 мкл клеточной суспензии.

Препараты, предназначенные для стандартного анализа нестабильных аберраций, готовят непосредственно после приготовления клеточной суспензии. Клетки в этом случае тщательно ресуспендируют в оставшемся фиксаторе с помощью пастеровской пипетки. Суспензию (0,3—0,4 мл) раскапывают на смоченные, предварительно охлажденные предметные стекла. После высыхания препараты гидролизуют в 5N раствора соляной кислоты в течение 10 мин, высушивают и окрашивают азур-эозином или красителем Гимза.

Для регистрации нестабильных аберраций хромосом предметное стекло покрывают краской на 10—15 мин, затем смывают проточной водой и высушивают. Анализ препаратов проводят под иммерсионным объективом.

Исследуют основные типы нестабильных аберраций хромосом: ацентрики, центрические кольца, дицентрики, делеции, изоделеции, хроматидные обмены (см. рис. 4.3).

Внимание! Для регистрации нестабильных аберраций хромосом считаются пригодными метафазные пластинки, удовлетворяющие следующим *требованиям*.

1. Все хромосомы должны быть четко окрашены и равномерно разбросаны.

2. Не допускается наличие в поле зрения нескольких случайных (из других метафаз) хромосом.

3. Уровень конденсации хромосом должен находиться в следующих пределах: *max*-малые акроцентрические хромосомы видны в виде четко выраженных структур, но не в виде точек, так как в этом случае их легко можно принять за точечные фрагменты; *min*-хромосомы разделены на две хроматиды и лежат отдельно друг от друга.

4. Не допускается наличие в метафазной пластинке хромосом, вошедших в анафазу, поскольку их трудно дифференцировать от парных фрагментов.

5. Из анализа исключаются пластинки с большим количеством хромосом с наложениями, особенно с продольными, так как их ошибочно можно принять за обменные аберрации. В случае наложения хромосом формы обеих хромосом и их центромеры должны быть хорошо выражены.

6. В анализ включаются метафазы, содержащие 45—47 хромосом. Метафазы с числом хромосом менее 45 не учитываются по двум причинам: во-первых, такие клетки, как правило, артефактной природы, т.е. являются следствием механического повреждения метафаз в процессе приготовления препаратов; во-вторых, таким образом исключается вероятность потери дицентрика; этот тип аберраций считается маркером радиационного воздействия.

Справочный материал

Приготовление культуральной среды Карреля

На 0,8 мл крови: 6,16 мл среды МЕМ (Sigma, США); 1,6 мл инактивированной телячьей сыворотки; 0,08 мл L-глютамина;

0,08 мл раствора антибиотиков (пенициллина и стрептомицина); 0,15 мл фитогемагглютинина.

Приготовленные таким образом флаконы помещают в термостат при 37 °С для инкубации клеток в течение 48 ч. С целью блокирования митоза на стадии метафазы за 2 ч до окончания инкубации во флаконы добавляют раствор демеколцина в концентрации 0,2 мкг на 1 мл среды.

Приготовление краски азур-эозин для сплошного окрашивания хромосом

0,1 %-й раствор эозина (Serva, США); 0,1 %-й раствор азура (Merck, Германия); дистиллированная вода соответственно в соотношении 1:2:3,5; несколько капель 5%-го раствора соды (для доведения pH среды до 7,0—7,2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Захаров А. Ф. Хромосомы человека (Атлас) / [А. Ф. Захаров и др.]. — М.: Медицина, 1982.

6.10. Исследование лекарственных препаратов на мутагенность

(Г. Ф. Михайлова)

Метод учета аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови человека

Тест для проверки исследуемого лекарственного препарата на мутагенность можно проводить на клетках периферической крови человека, как показано в подразд. 6.9.

Для проведения тестирования потребуются те же реактивы, материалы и оборудование, которые использовались в предыдущей работе.

Минимальная концентрация исследуемого препарата — максимальная разовая терапевтическая доза для человека (N_{max}), выраженная в миллиграммах на литр среды. Максимальная концентрация — это высшая доза, используемая при тестировании исследуемого препарата на животных (1/2 LD_{50}). Две средние точки соответствуют концентрациям, превышающим максимальную разовую терапевтическую дозу в 5 ($5N_{max}$) и 15 ($15N_{max}$) раз. Изучаемые препараты разводят в дистиллированной воде. В случае, когда испытуемый препарат нерастворим в воде, следует использовать другие растворители. Для этих целей чаще всего применяют диметилсульфоксид с конечной концентрацией его в культуре 1 %.

Ход определения

Первый этап эксперимента предполагает выявление возможного эффекта, при этом однократно используется максимальная концентрация препарата. Обработка культур клеток исследуемым препаратом проводится на 48-й час роста культуры без отмыва. Материал фиксируют через 72 ч от начала культивирования. В случае отсутствия эффекта эксперимент прекращают. При наличии эффекта переходят к изучению зависимости доза-эффект (второй этап). При этом используют шкалу концентраций, описанную выше.

Цитогенетический анализ осуществляют визуально, при этом подсчитывают общее число хромосом или центромер в клетке при общем кариотипировании. Результаты анализа вносят в регистрационный журнал, где отмечают типы наблюдаемых перестроек хромосом и другие наблюдения исследователя. Анализируют метафазные пластинки, имеющие 46 центромер с хорошо окрашенными и отделенными друг от друга хромосомами.

Для идентификации хромосом и анализа структуры мутаций хромосом можно пользоваться примером, приведенным на рис. 4.3 или в атласе «Хромосомы человека» (см. Список литературы).

При оценке эффекта лекарственного препарата следует проводить 2—3 повторности по 100 метафаз каждая (повторность — проба крови от одного донора).

Достоверность различий между уровнем спонтанных мутаций и их количеством в опыте оценивается статистическими методами анализа. Результаты опыта по оценке исследуемого препарата вносят в сводную табл. 6.12 (с. 179). Ранжирование препарата по степени мутагенного эффекта проводят следующим образом: отсутствие статистически значимых различий в опыте и контроле оценивают баллом 0, превышение наблюдаемого эффекта над спонтанным уровнем мутирования до 10 раз (при наличии статистически достоверных различий) оценивают как слабый (1 балл), от 10 до 25 раз — средний (2 балла), свыше 25 раз — сильный мутагенный эффект (3 балла). Графу «индекс мутагенной активности» заполняют в соответствии с принятыми рангами доз; эти данные используют для определения уровня мутагенной опасности.

Метод учета аберраций хромосом в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Регистрацию лекарственного препарата на мутагенность можно проводить на клетках костного мозга мышей. В основе метода лежит регистрация видимых нарушений хромосом на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности. Частота клеток с аберрациями хромосом составляет около 1 % (спонтанный уровень).

Для проведения тестирования необходимы следующие материалы и оборудование: лабораторные животные — самцы мышей линии C57B1/6 или гибриды первого поколения CBA×C57B1/6; препараты костного мозга; физиологический раствор или дистиллированная вода; этиловый спирт или ДМСО (конечная концентрация до 2 %); 0,025%-й раствор колхицина; красители — водный азурэозин (см. Справочный материал к работе 6.9) или краситель Гимза. Исследование проводят на базе стандартной цитогенетической лаборатории.

Необходимым условием получения надежных воспроизводимых данных является использование генетически однородного материала. Поэтому рекомендуется вводить исследуемый препарат самцам мышей линии C57B1/6 или гибридам первого поколения CBA×C57B1/6. Допускается возможность использования мышей-тетрагибридов, или рандомбредных животных.

Пути введения исследуемого препарата выбираются соответственно способам приема лекарств человеком. В тех случаях, когда предполагается возможность непарентерального и парентерального введения препарата, предпочтителен внутрибрюшинный способ обработки млекопитающего. Для препаратов, использующихся исключительно перорально, следует применять внутрижелудочный путь введения.

Для некоторых препаратов (ингаляционные анстетики, мази и т.д.) целесообразно изучение мутагенности как в условиях предполагаемого применения (ингаляционный, накожный и прочие пути введения), так и при внутрибрюшинном введении в наибольшей из используемых доз.

Наиболее употребимыми растворителями служат дистилированная вода или физиологический раствор. При работе с водонерастворимыми препаратами возможно использование этилового спирта или ДМСО (конечная концентрация до 2 %), для перорального введения порошкообразных лекарств можно пользоваться 1 %-м раствором крахмала.

Оптимальный объем введения растворов исследуемого препарата и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) — 0,5 мл.

При выборе доз руководствуются следующими соображениями. Низшая доза должна соответствовать максимальной однократной терапевтической для человека, высшая — ½ от LD_{50} (для мышей). Две промежуточные желательно подбирать так, чтобы одна из них превышала максимальную однократную терапевтическую (для человека) в 5 раз, а другая — в 15 раз для последующего ранжирования препаратов по степени их мутагенной активности в разных и сопоставимых интервалах доз.

Ход определения

Растворы исследуемых препаратов готовят непосредственно перед введением. На каждый вариант эксперимента берут 4—5 животных, анализируя по 80—100 клеток от каждого. За 2—2,5 ч до забоя мышам внутрибрюшинно вводят 0,025%-й раствор колхицина. Методика приготовления препаратов костного мозга описана в справочном материале. Производят окраску препаратов. Первый этап эксперимента предполагает выявление возможного эффекта. Используется однократная доза, составляющая ½ LD_{50} при экспозиции 6, 24 и 48 ч. Если статистически значимых различий между опытом и контролем не найдено, эксперимент прекращают.

При обнаружении эффекта проводят второй этап исследования. Задачей его являются подтверждение наличия мутагенной активности у исследуемого препарата и изучение зависимости эффекта от дозы. Препарат вводят в дозах, кратных терапевтической в 1, 5 и 15 раз, и в дозе, составляющей ½ LD_{50}. Экспозиция принимается равной той, при которой на первом этапе исследования выявлен максимальный эффект.

Для анализа отбирают неразрушенные клетки округлой формы с хорошим разбросом хромосом без наложений с числом хромосом не менее 38 и не более 42. Каждая метафазная пластинка анализируется на наличие в ней хромосомных аберраций: фрагментов и обменов. Поврежденные клетки, в которых невозможно точно идентифицировать и подсчитать количество аберраций хромосом, регистрируются отдельно как клетки с «множественными аберрациями».

Заключение о мутагенном действии изучаемого препарата выносят путем сравнения доли клеток со структурными нарушениями хромосом в опыте и контроле. Статистическую значимость различий в опыте и контроле по показателям процента клеток со структурными аберрациями хромосом определяют статистическими методами анализа. Данные эксперимента вносят в табл. 6.13. Изученный препарат ранжируют по степени мутагенного эффек-

та от 0 до 3 баллов. Результаты исследования мутагенности препаратов используют для характеристики степени мутагенной активности этих препаратов и их ранжирования по уровням потенциальной генетической опасности для человека.

Прежде всего оценивают уровень мутагенного эффекта исследуемого препарата, для чего в табл. 6.12 и 6.13 приведена графа «Степень мутагенного эффекта». Исходным показателем при характеристике степени мутагенного эффекта исследуемого препарата является превышение частоты мутаций по данному тесту над спонтанным фоном.

Индекс мутагенной активности определяют отнесением степени выраженности мутагенного эффекта исследуемого препарата к определенным рангам доз. Исходным показателем при определении ранга доз является кратность превышения данной дозы над максимальной разовой терапевтической дозой для человека (табл. 6.14). В случае узкого терапевтического индекса при изучении мутагенности высокотоксичных препаратов возможна ситуация, когда препарат нельзя использовать в дозе, превышающей терапевтическую в 15 раз. В таком случае используют дозу в диапазоне 5 — 15-кратного превышения над терапевтической. Эта доза соответствует рангу II.

Графу «Индекс мутагенной активности» заполняют для каждого опытного варианта. Например, при работе одним из вышеназванных методов была зарегистрирована степень мутагенного эффекта, соответствующая баллу 3. Этот эффект наблюдался при использовании дозы, превышающей терапевтическую в 15 раз (ранг II). Индекс мутагенной активности препарата в этом случае составил 3, II.

Получение индексов мутагенной активности позволяет определить один из трех уровней мутагенной опасности: А, Б или В. Отнесение препарата к тому или иному уровню опасности определяется показателем максимального индекса мутагенной активности (уровнем максимально регистрируемого эффекта при минимальной дозе или ранге).

В табл. 6.15 представлены индексы мутагенной активности, соответствующие описанным уровням опасности. Индексы мутагенной активности 3, I и 2, I (соответственно сильный и средний мутагенный эффекты при использовании доз, превышающих терапевтическую в 1 и 5 раз), а также 3, II (сильный мутагенный эффект при дозе, превышающей терапевтическую не более чем в 15 раз) составляют уровень опасности А.

К уровню опасности Б относят ситуации, соответствующие индексам мутагенной активности 1, I (слабый мутагенный эффект при дозах, превышающих терапевтическую в 1 и 5 раз), 2, II (средний мутагенный эффект, регистрируемый при дозе, превышающей

Примеры заполнения таблиц

Таблица 6.12. **Учет структурных нарушений хромосом в лимфоцитах периферической крови человека**

Вариант опыта	Число проанализированных метафаз	Метафазы со структурными аберрациями		Степень мутагенного эффекта (в баллах)	Индекс мутагенной активности
		число	% ± m		

Таблица 6.13. **Учет структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга мышей**

Вариант*, доза препарата	Экспозиция,** часы	Число проанализированных метафаз	Метафазы со структурными аберрациями***		Степень мутагенного эффекта (в баллах)	Индекс мутагенной активности
			число	% ± m		

* Графа используется при оценке результатов второго этапа исследований.
** Графа используется при оценке результатов первого этапа исследований.
*** В том числе с «множественными повреждениями»

Таблица 6.14. **Ранжирование диапазонов доз**

Диапазон доз (в единицах кратности превышения над терапевтической)	Ранг дозы
1 — 5	I
> 5 — 15	II
> 15	III

Таблица 6.15. **Определение уровней мутагенной опасности**

Индексы мутагенной активности	Уровень мутагенной опасности
3, I; 2, I; 3, II	А
1, I; 2, II; 3, III	Б
1, III; 1, II; 2, III	В

терапевтическую в 15 раз) и 3, III (слабый мутагенный эффект при использовании доз, превышающих терапевтическую более чем в 15 раз).

Индексы мутагенной активности 1, III и 1, II (соответственно слабый мутагенный эффект при дозах, превышающих терапевтическую в 1,5 и 15 раз), а также 2, III (средний мутагенный эффект, регистрируемый при дозах, более чем в 15 раз превышающих терапевтическую) определяют уровень опасности В. В том случае, если при работе данным методом во всем иссследованном диапазоне доз (концентраций) не выявлено достоверного мутагенного эффекта, оценка препарата по данному тесту определяет уровень опасности 0 (безопасность).

Таким образом, исходным показателем при отнесении препарата к определенному уровню опасности является максимально выраженный индекс мутагенной активности, регистрируемый во всем исследованном диапазоне доз (анализ кривой «доза — эффект»).

Справочный материал

Методика приготовления препаратов клеток костного мозга мышей

Исследования на клетках костного мозга мышей выполняются на молодых животных (16 — 18 г масса, 60 — 90 дней возраст). Высокая пролиферативная активность клеток костного мозга и низкое содержание жира способствуют получению качественных препаратов. Мышам гибридам F_1 (СВА×C_{57}Bl) за 2 ч до забоя вводят раствор колхицина внутрибрюшинно (2,5 мг/кг массы). Затем животных забивают и вынимают берцовые кости. С помощью марли кости освобождают от мышц и небольшим натяжением отделяют от большой берцовой кости. Проксимальный конец бедренной кости укорачивают ножницами до вскрытия костномозгового канала. Шприц заполняется теплым раствором KCl (0,075 М). Игла вводится в просвет проксимальной части костномозгового канала.

Вымытые клетки костного мозга в 5 мл раствора KCl переносятся в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем пробирки центрифугируют при 1 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют и приливают фиксатор (3:1 — метиловый спирт:ледяная уксусная кислота).

Фиксатор меняют дважды. Готовят препараты методом раскапывания на холодные предметные стекла. Препараты высушивают и окрашивают красителем Гимза (5 % при pH 6,8). Окрашенные препараты промывают водопроводной водой и высушивают.

На препаратах под иммерсией анализируют число и тип аберраций хромосом в метафазных пластинках.

Внимание! Число хромосом у мышей равно 40. Все хромосомы акроцентрические.

На каждое животное анализируется по два стекла, по 100 клеток на каждое.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Малашенко А. М. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах. Методические указания. — М.: Минздрав СССР, 1977.

Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств. — М.: Минздрав СССР, 1982.

Захаров А. Ф. Хромосомы человека (Атлас) / [А. Ф. Захаров и др.]. — М.: Медицина, 1982.

6.11. Метод ПЦР для обнаружения ДНК

(Л. Н. Комарова)

В работе описаны этапы постановки полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для обнаружения ДНК, в том числе генетически модифицированных источников, в биологических пробах, продуктах питания, сырье и др.: 1) выделение ДНК; 2) амплификация; 3) электрофорез.

1. Выделение ДНК из проб исследуемого материала

Перед проведением процедуры выделения ДНК независимо от метода экстракции осуществляют первичную обработку проб исследуемого материала. При анализе мягких материалов, легко поддающихся измельчению (мясо и мясные полуфабрикаты, фарши, колбасные и консервные изделия и др.), отбирают усредненную пробу продукта массой 1 г, измельчают при помощи стерильных скальпеля, ножниц и одноразового шпателя и гомогенизируют фарфоровым пестиком в керамической ступке, тщательно перемешивая содержимое.

После этого пробу переносят в чистую пробирку типа «Эппендорф» в количестве приблизительно 100 — 150 мкл по объему. Пробы сухих сыпучих материалов (кормовая мука, яичный порошок и др.), жидких или полужидких материалов (молоко, молочные изделия, мясное пюре и прочее), не требующих измельчения и одно-

родных по составу, при помощи одноразового шпателя или пипетированием вносят в чистую пробирку типа «Эппендорф» в количестве 100—150 мкл по насыпному объему (5—7 мм от дна пробирки).

Для предотвращения перекрестной контаминации (лат. *contaminatio* — смешение) инструменты для измельчения материала используют однократно.

Существует множество различных методик выделения ДНК из изучаемых образцов. Здесь приведены лишь некоторые из них, наиболее часто используемые в лабораторной практике: методы фенольной и щелочной экстракции, а также экстракции ДНК с применением гуанидинтиоцианата и сорбцией ДНК на силикагеле.

Метод фенольной экстракции ДНК

Для фенольной экстракции ДНК необходимы следующее оборудование, материалы и реактивы: буфер для экстракции: 0,1 М NaCl; 0,1 М трис-HCl (pH 8,0); 5 мМ EDTA; 1,0 % SDS; фенол, нейтрализованный 0,5 М трис-HCl (pH 8,0); хлороформ; хлорид лития 10 М; буфер ТЕ (pH 8,0); гомогенизатор Поттера; твердотельный термостат; микроцентрифуга; пробирки «Эппендорф»; морозильная камера.

Ход определения

1. Приготовление рабочих растворов ТЕ, трис-HCl, EDTA, фенола и хлороформа осуществляют по стандартным химическим методикам.

2. В пробирку с исследуемым образцом добавляют 1 000 мкл буфера для экстракции. Перемешивают содержимое при помощи гомогенизатора Поттера до полного смачивания пробы.

3. Пробирку с пробой инкубируют в твердотельном термостате «ТЕРМО 24-15» («Биоком») при 65 °С в течение 45 мин.

4. В пробирку вносят 400 мкл хлороформа и эмульгируют содержимое вручную, переворачивая пробирку в течение 5 мин.

5. Центрифугируют пробирку при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин; полученную верхнюю водную фазу переносят в чистый «Эппендорф».

6. К надосадку добавляют равный объем фенола и эмульгируют содержимое вручную, переворачивая пробирку в течение 5 мин.

7. Центрифутируют пробирку при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин; полученную верхнюю водную фазу переносят в чистый «Эппендорф».

8. К надосадку добавляют $^1/_2$ объема фенола и $^1/_2$ объема хлороформа и эмульгируют содержимое вручную, переворачивая пробирку в течение 5 мин.

9. Центрифугируют пробирку при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин; полученную верхнюю водную фазу переносят в чистый «Эппендорф».

10. Добавляют к надосадку равный объем хлороформа и эмульгируют содержимое вручную, переворачивая пробирку в течение 10 мин.

11. Центрифугируют пробирку при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин; полученную верхнюю водную фазу переносят в чистый «Эппендорф».

12. Повторяют действия, описанные в пп. 10 и 11.

13. Добавляют к надосадку $^1/_{10}$ объема хлорида лития и 2 объема 96%-го этилового спирта, аккуратно перемешивая содержимое переворачиванием пробирки.

14. Помещают пробирку в морозильную камеру (–20 °С) до выпадения осадка (30—40 мин), после чего проводят центрифугирование в течение 1—2 мин при 10 тыс. об/мин.

15. Удаляют супернатант, а осадок ДНК в пробирке просушивают в термостате при 65 °С до полного высыхания.

16. Растворяют осадок ДНК, добавляя 50—200 мкл буфера ТЕ, в течение ночи при комнатной температуре.

Метод щелочной экстракции ДНК

Для проведения щелочной экстракции ДНК необходимы следующее оборудование, материалы и реактивы: буфер для экстракции: 0,5 М NaOH; 0,01 М EDTA; фенол, нейтрализованный 0,5 М трис-HCl (pH 8,0); хлороформ; хлорид лития 10 М; буфер ТЕ (pH 8,0); гомогенизатор Поттера; твердотельный термостат; пробирки «Эппендорф».

Ход определения

1. Приготовление рабочих растворов ТЕ, фенола и хлороформа осуществляют по стандартным химическим методикам.

2. В пробирку с исследуемым образцом вносят 1 000 мкл буфера для щелочной экстракции. Перемешивают содержимое при помощи гомогенизатора Поттера до полного смачивания пробы.

3. Пробу инкубируют в твердотельном термостате 7 мин при 100 °С.

4. Осуществляют фенольную депротеинизацию ДНК согласно пп. 4—16 протокола фенольной экстракции ДНК.

Метод экстракции ДНК с использованием гуанидинтиоцианата и сорбцией ДНК на силикагеле

Для проведения экстракции ДНК необходимы следующее оборудование, материалы и реактивы: этиловый спирт; гомогенизатор

5. Во избежание испарения влаги, в каждую пробирку добавляют по 20—25 мкл (2 капли) минерального масла так, чтобы оно полностью покрывало содержимое пробирок.

6. Пробирки с готовой ПЦР-смесью помещают в многоканальный амплификатор и запускают программу амплификации согласно инструкции к разным видам праймеров. Допустимый режим амплификации приведен ниже.

Режим амплификации	94 °С — 3 мин — однократно
	94 °С — 30 с 65 °С — 30 с 72 °С — 30 с 35 циклов
	72 °С — 3 мин — однократно

7. По завершении амплификации пробирки извлекают из амплификатора, помещают в штатив и переносят в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

Детекцию продуктов амплификации проводят методом электрофоретического разделения продуктов ПЦР в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей их идентификацией в ультрафиолетовом свете.

Для электрофоретического анализа необходимы следующее оборудование, материалы и реактивы: мерная колба; прибор для горизонтального электрофореза; видеосистема «ViTran», совмещенная с компьютером; в качестве реагентов можно использовать коммерческий набор фирмы «Биоком» (Россия), включающий в себя сухую смесь буфера ТБЕ для электрофореза (m = 10 г); навеска агарозы (m = 2,25 г); раствор бромистого этидия и краска-лидер (бромфеноловый синий).

Ход определения

1. Согласно инструкции к набору для электрофореза готовят рабочий раствор буфера для электрофореза: 10 г сухой смеси ТБЕ-буфера переносят в мерную колбу, растворяют в 600—800 мл дистиллированной воды и доводят объем полученного раствора до 1 л дистиллированной водой.

2. Подготавливают прибор для горизонтального электрофореза к работе в соответствии с прилагаемым к нему техническим описанием:

а) размещают прибор на столе; с помощью регулируемых по высоте ножек и ориентируясь по уровням, устанавливают прибор в фиксированное, строго горизонтальное положение;

б) собирают кювету для заливки геля; устанавливают в нее 1—2—3 гребенки в зависимости от количества анализируемых проб так, чтобы расстояние между зубцами соседних гребенок и одной из стенок кюветы составляло не меньше 3 см.

3. Готовят агарозный гель:

а) навеску агарозы (m = 2,25 г) переносят в коническую стеклянную колбу, прибавляют 150 мл готового раствора буфера для электрофореза и 10 мкл раствора бромистого этидия;

б) суспензию агарозы в колбе доводят до кипения на электроплитке, периодически помешивая и продолжая нагревать до получения абсолютно прозрачного расплава;

в) расплав охлаждают до 55—60 °С и наливают в кювету электрофоретической камеры для геля, не допуская образования воздушных пузырьков, так, чтобы толщина слоя расплава была не менее 5 мм, а зубцы гребенок были погружены в него не менее чем на 4 мм;

г) после полного застывания геля кювету с готовым агарозным гелем и гребенками переносят в электрофоретическую камеру. Извлекают гребенки из агарозного геля, осторожно, легким и плавным движением вверх, стараясь не повредить образовавшиеся карманы.

4. Проводят электрофорез. В электрофоретическую камеру заливают готовый раствор буфера для электрофореза так, чтобы жидкость покрывала гелевую пластину слоем 2—3 мм.

Из-под слоя минерального масла отбирают 10 мкл образца ПЦР-продукта и осторожно переносят в карман гелевой пластины. Внесение анализируемых образцов проводят в следующем порядке: сначала содержимое пробирки с отрицательным контролем, затем исследуемые пробы в строго фиксированной последовательности (порядок нанесения проб отображается в журнале) и, наконец, содержимое пробирки с положительным контролем. Для контроля за продвижением продуктов ПЦР в последний карман гелевой пластины вносят 4—6 мкл краски-лидера.

После закрывания крышки прибора для электрофореза подключают его к источнику постоянного напряжения, строго соблюдая полярность электродов и учитывая, что при электрофоретическом разделении движение фрагментов ДНК происходит в направлении от катода к аноду.

Устанавливают напряжение 100—150 В и проводят электрофорез в таком режиме около 30 мин, наблюдая, чтобы красящий компонент ПЦР-смеси голубого цвета продвинулся в геле не более чем на 1—1,5 см от старта.

По окончании электрофореза отключают источник напряжения; сняв крышку с прибора для электрофореза, извлекают гель из кюветы и помещают в «кабинет» видеосистемы для компьютерного документирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

МУК 4.2. 1902—04 «Методы определения конкретных линий ГМО в пищевых продуктах».

Генетически-модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / под ред. акад. РАМН В.А. Тутельяна. — М.: Изд-во РАМН, 2007.

6.12. Метод ПЦР-диагностики трансгенных сортов сои, кукурузы и картофеля

(Д.В. Крутенко)

Для детекции трансгенов в посевном материале используют подход, который заключается в проведении ПЦР-анализа с одновременным применением двух пар праймеров: к промотору P35S и терминатору NOS-3, так как подавляющее большинство генетически модифицированных (ГМ) сортов сельскохозяйственных культур содержит в своей генетической конструкции хотя бы один из указанных генетических элементов.

Объект исследования: ПЦР-диагностику можно проводить на Раундап-устойчивой сое Stine 2254 RR (Монсанто, США); Bt-защищенном картофеле Супериор Ньюлив (Монсанто, США); Раундап-устойчивой кукурузе ДК 493 RR (Монсанто, США) или других трансгенных линиях при наличии разрешения на работу с ГМ-культурами.

Для проведения теста необходимы следующее оборудование, материалы и реактивы: pH метр-милливольтметр pH-150M; электроды стеклянные комбинированные лабораторные — ЭСКЛ-08, ЭСКЛ-08СР, ЭСКЛ-08М, ЭСКЛ-08М.1; центрифуга для микрообъемов «MiniSpin» (Эппендорф) до 13 400 об/мин (12 100 g) — 12 мест; трансиллюминатор; термостат, программируемый для проведения ПЦР-анализа, — четырехканальный ТП4-ПЦР-01-«Терцик»; термостат электрический суховоздушный ТС-80М-2; весы лабораторные равноплечие — 2 класса модели ВЛР-200; набор Г-2-210; спектрофотометр «М-124»; аппарат для горизонтального электрофореза «SE-2»; источник питания Pharmacia Destainer Power Supply DPS; водяные бани моделей LW-8, LW-4; аквадистиллятор

электрический АЭ-10 МО; двухлучевой спектрофотометр «Perkin-Elmer Model 124» (Hitachi); стерилизатор паровой ГК-10-1; манометр, показывающий М-1/4; бытовые холодильники и бытовой морозильник «Stinol-131Q»; мешалка магнитная ММ-3М; весы ВТ-1000; набор гирь Е-4 III-10; сушильный шкаф 2В-151; термостат ВТ-120; источник питания для электрофореза ПЭФ-3 УХЛ 4.2; фотоаппарат «Зенит TTL»; чашки Петри; цилиндры мерные 250 — 1 000 см^3; фильтры бумажные; химические стаканы емкостью 1 000 мл; цилиндры стеклянные емкостью 100 мл; пробирки Эппендорф 1,7 мл, 0,5 мл; одноканальные пипетки переменного объема «Колор» 0,5 — 10, 5 — 50, 20 — 200, 100 — 1 000 мкл и 1 — 5 мл; «Gilson» Pipetman P 2 — 20, 2 — 200, 200 — 1 000 мкл и наконечники к ним. В работе также можно использовать и другое аналогичное оборудование. Для проведения ПЦР-анализа можно использовать набор реагентов фирм «Диалат», «Биоком» (Россия).

Ход определения

Выделение ДНК из растительной ткани

Подготовка образцов. Семена (проростки) стерилизуют в 15%-й коммерческой «белизне» в течение 5 — 10 мин с последующим двукратным промыванием дистиллированной автоклавированной водой. Затем семена по одному помещают в пробирки типа Эппендорф и выдерживают в течение ночи в дистиллированной автоклавированной воде.

На следующий день образец извлекают с помощью пинцета и переносят в чистую пробирку, затем добавляют 400 мкл экстракционного буфера (см. Справочный материал). Проростки помещают в буфер сразу после стерилизации.

Выделение ДНК. Содержимое пробирок гомогенизируют при комнатной температуре с помощью стеклянного пестика или гомогенизатора. Гомогенизацию завершают интенсивным встряхиванием на Vortex в течение 5 с.

Пробирки инкубируют на водяной бане 15 мин при 65 °С, периодически перемешивая. После экстракции в них добавляют по 200 мкл 5М предварительно охлажденного ацетата калия, тщательно перемешивают и инкубируют 10 мин во льду.

После инкубации пробирки центрифугируют в центрифуге типа Эппендорф («MiniSpin») при 13 400 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант переносят в чистые пробирки и осаждают двумя объемами предварительно охлажденного 96%-го этанола.

Затем двукратно промывают 70%-м этанолом и растворяют осадок ДНК в 100 мкл элюирующего ТЕ-буфера. Добавляют в

каждую пробирку аликвоту рабочего раствора РНКазы и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С. Затем добавляют 100 мкл смеси хлороформ/фенол (1:1) и 2 мкл изоамилового спирта, перемешивают, центрифугируют 1—3 мин при 8 000 об/мин. Отбирают супернатант в чистые пробирки (если препараты ДНК сильно загрязнены белками, очистку фенолом рекомендуется проводить дважды). К супернатанту добавляют 0,1 объема 3 М ацетата натрия и 2,5 объема охлажденного при –20 °С 96%-го этанола, перемешивают, оставляют на ночь при –20 °С (либо на 2 ч при –70 °С).

Замороженную смесь достают из холодильника, размораживают при комнатной температуре и центрифугируют 10 мин при 8 000 об/мин, осадок промывают дважды 70%-м этанолом и растворяют в 100 мкл ТЕ-буфера. Концентрацию ДНК измеряют на двухлучевом спектрофотометре «Perkin-Elmer Model 124» (Hitachi).

Амплификацию ДНК проводят в 25 мкл реакционной смеси (см. Справочный материал). Все перечисленные компоненты, кроме ДНК, входят в набор для амплификации фирмы Dialat Ltd. Приготовить реакционную смесь можно самим путем последовательного добавления в одну из пробирок компонентов, представленных в табл. 6.16, а затем аликвоты реакционной смеси (Master mix) разлить по пробиркам.

В предложенной работе используют следующие праймеры: SA и SS (35S-промотор); NA и NS (NOS-терминатор). Последовательность праймеров соответствует ГОСТ Р 52173—2003.

Пробирки подписывают, вносят в них выделенную ДНК, перемешивают и центрифугируют несколько секунд для удаления пузырьков, после чего поверх реакционной смеси наслаивают 17 мкл минерального масла.

Далее пробирки помещают в амплификатор «Терцик» («ДНК-Технология») и запускают следующую программу:

Таблица 6.16. **Компоненты реакционной смеси**

Компоненты реакционной смеси	Количество на 1 пробу, мкл
H_2O	18,6
Реакционный буфер без $MgCl_2$ (10X)	2,5
$MgCl_2$	0,75
Смесь dNTP's	0,5
Праймеры	По 0,25
Taq-полимераза	0,125
ДНК	2

1) 94 °С — 3 мин 30 с; 2) 40 циклов: 94 °С — 20 с, 54 °С — 40 с, 72 °С — 60 с; 3) 72 °С — 3 мин (режим амплификации для 35S-промотора (195 п. н.) и NOS-терминатора (180 п. н.). Этапы ПЦР приведены на рис. 6.10—6.12.

Визуализацию продуктов амплификации осуществляют в 2%-м агарозном геле. Для этого к 100 мл 0,5%-го ТВЕ-буфера (см. Справочный материал) добавляют 2 г агарозы и перемешивают. Колбу помещают на водяную баню или в микроволновую печь до полного кипения. Расплавленную агарозу охлаждают до 40—45 °С и заливают в камеру для приготовления геля (толщина геля около 0,5 см).

После застывания гель переносят в камеру для электрофореза с 0,5%-м ТВЕ-буфером. К 3 мкл буфера — 0,25%-й бромфеноловый синий, 0,25%-й ксилолцианол, 30%-й глицерин в H_2O — добавляют 15 мкл реакционной смеси, перемешивают и вносят в лунки агарозного геля. В крайнюю лунку помещают маркер молекулярной массы 100.

Электрофорез проводят при напряженности электрического поля 5 В/см (около 4 ч). Для визуализации амплифицированной

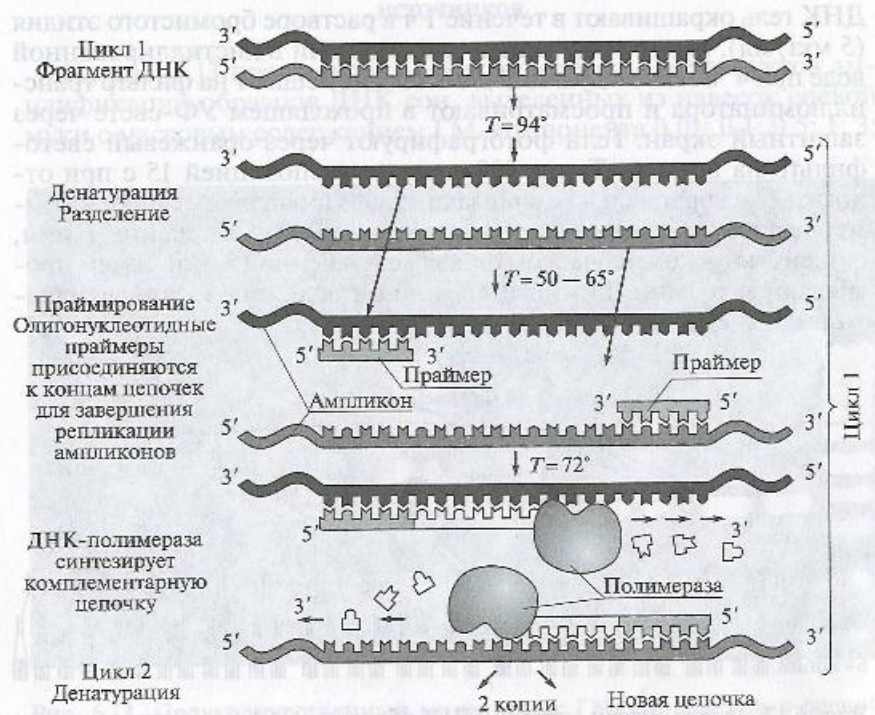

Рис. 6.10. Полимеразно-цепная реакция: цикл 1

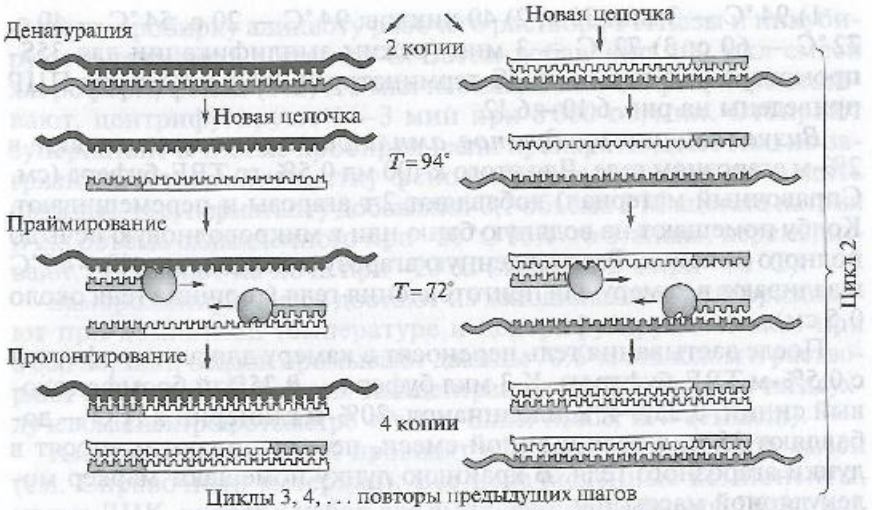

Рис. 6.11. Полимеразно-цепная реакция: цикл 2

ДНК гель окрашивают в течение 1 ч в растворе бромистого этидия (5 мкг/мл), затем отмывают в течение ночи в дистиллированной воде при 4 °С. На следующий день гель помещают на фильтр трансиллюминатора и просматривают в проходящем УФ-свете через защитный экран. Гели фотографируют через оранжевый светофильтр на пленку «Tasma 100 super» с экспозицией 15 с при открытой диафрагме и 45 с при закрытой. Проявляют пленку в коммерческом проявителе метол-гидрохиноновый в течение 7 мин, фиксируют в коммерческом фиксаже в течение 15 мин. Затем промывают в течение 15 мин в проточной воде, ополаскивают дистиллятом и сушат.

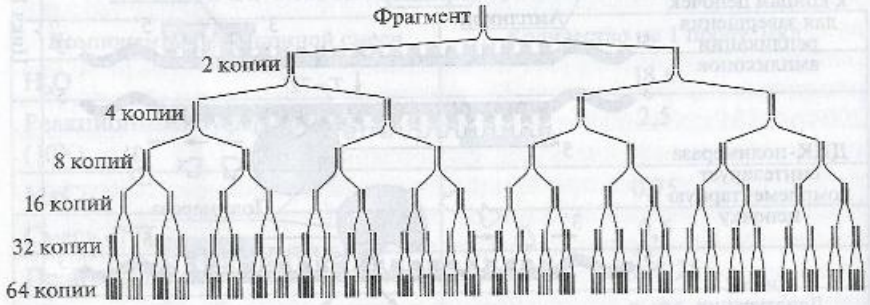

Рис. 6.12. После шести циклов ПЦР образуется 64 идентичные копии исходного генетического локуса (ампликона)

ПЦР-идентификацию трансгенных растений можно проводить по нуклеотидным последовательностям, кодирующим участки целевых генов — CP_4 *EPSPS* — 356 п.н. и $Cry_{III}A$ — 117 п.н., ответственных за устойчивость к гербициду Раундап и колорадскому жуку соответственно.

Данный подход позволяет не только разделять образцы на «ГМИ-содержащие» и «несодержащие ГМИ», но и ответить на вопрос: какая именно трансгенная вставка содержится в образце?

В качестве дополнительных положительных контролей при идентификации картофеля можно использовать амплификацию участка гена пататина (216 п.н.), в случае сои — амплификацию участка гена лектина (318 п.н.) и для кукурузы — амплификацию участка гена актина (350 п.н.) и гена зеин-19 (387 п.н.).

Внимание! Гель-электрофорез продуктов амплификации при идентификации Bt-картофеля проводят в 3%-м агарозном геле вследствие того, что амплификоны имеют небольшой размер (117 п.н.).

Полуколичественный мониторинг генетически-модифицированных источников

На рис. 6.13 представлена электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК сои, выделенных из навесок соевой муки с массовым содержанием ГМ-компонента 0,01; 0,1; 0,5; 1; 3;

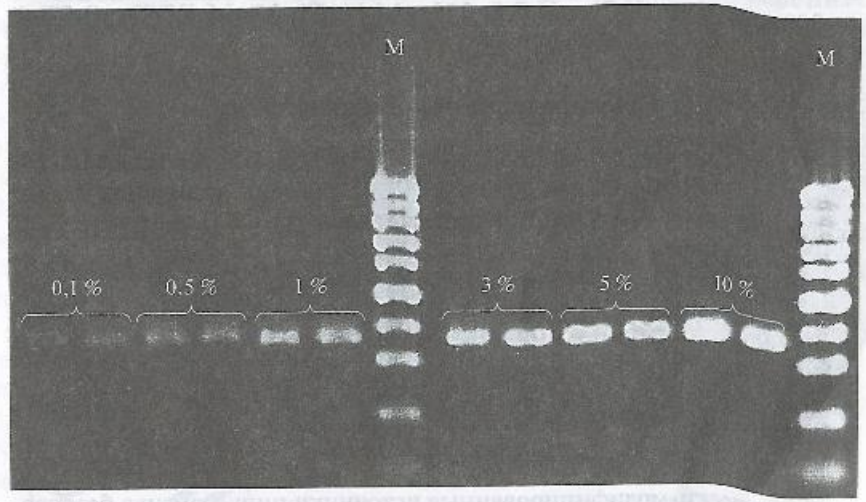

Рис. 6.13. Полуколичественный мониторинг ГМ-компонента в соевой муке на примере амплификации участка целевого гена *EPSPS* (356 п.н.)

5; 10 %. Предварительные исследования электрофореграмм продуктов амплификации выявили, что нижняя граница чувствительности данного метода полуколичественной оценки составила около 0,1 %. Как видно из рисунка, интенсивность полос падает с уменьшением содержания ГМ-компонента в образце. Смеси соевой муки с массовым содержанием ГМ-компонента 0,01; 0,1; 0,5; 1; 3; 5; 10 % можно использовать в качестве стандартов для полуколичественного анализа пищевых продуктов и кормов на предмет содержания RR-сои. Для этого:

1) выделяют ДНК из испытуемого образца (как минимум в двух повторностях) и из стандартов (с содержанием ГМ-компонента 0,01; 0,1; 0,5; 1; 3; 5 или 10 %);

2) проводят амплификацию выделенных образцов ДНК одновременно и в одинаковых условиях;

3) далее на электрофореграмме сравнивают интенсивность полос стандартных и испытуемых образцов.

Данный метод при подборе определенных условий, вероятно, можно использовать для полуколичественного мониторинга не только RR-сои, но и RR-кукурузы и других раундап-защищенных культур.

Справочный материал

Приготовление экстракционного буфера

200 мМ трис-HCl, pH 7,5; 250 мМ NaCl; 25мМ EDTA; 0,5%-й SDS.

Приготовление реакционной смеси

67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 2 мМ $MgCl_2$; 0,01 % Tween-20; по 200 мМ каждого dNTP; 10 пМ/мкл праймера; 25 мкг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы.

Приготовление TBE-буфера

0,089 М трис-борат; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА (5X) разводится в 10 раз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Генетически-модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / под ред. акад. РАМН В.А. Тутельяна. — М.: Изд-во РАМН, 2007.

6.13. Краткое изложение методов генетического мониторинга окружающей среды

Анафазный метод. Метод заключается в подсчете нормальных и аномальных анафаз и телофаз в делящихся клетках (рис. 6.14). Вычисляют процент клеток с аберрациями от общего числа клеток, находящихся в тех же фазах деления. Метод удобен для анализа растений с большим числом хромосом и/или с плохо изученной морфологией.

Рассчитывается частота цитогенетических нарушений (Ч, %) по формуле

$$Ч = \frac{А \cdot 100}{В},$$

где А — число клеток с нарушениями; В — общее число просмотренных клеток.

Метафазный метод. Принцип метода основан на учете аберраций хромосом в клетках растений, животных и человека после обработки мутагенами.

Рассчитывается спектр аберраций (К, %):

$$К = \frac{Д \cdot 100}{В},$$

где Д — число аберраций определенного типа (см. рис. 4.3); В — число просмотренных клеток.

Наблюдение за мутациями в популяции по изменению спектров запасных белков. Такая система удобна тем, что по-

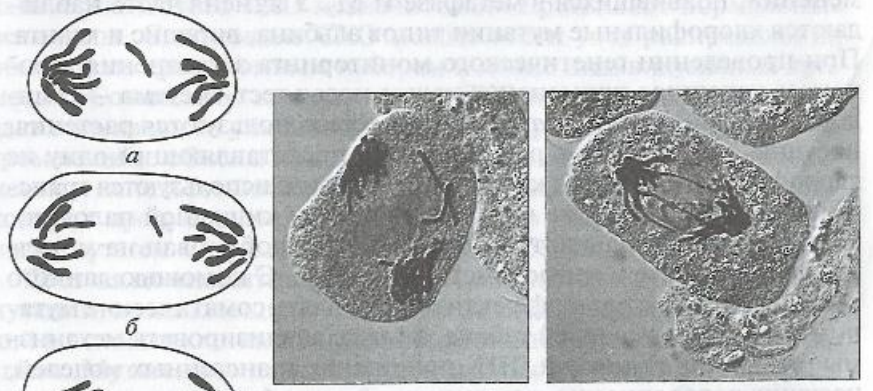

Рис. 6.14. Целая хромосома (*а*), хромосомный фрагмент (*б*) и мост (*в*), наблюдаемые анафазным методом

зволяет оценить состояние многих генов, мутации которых внешне никак не проявляются. Несмотря на ряд преимуществ данного метода, общим недостатком электрофоретического анализа является то, что с синтезом белковых молекул связано лишь 10 % генетической информации, содержащейся в геноме. Из этого числа для мониторинга доступна лишь небольшая часть информационных последовательностей ДНК, включающая гены нескольких десятков белковых систем. Использование двумерного электрофореза значительно повышает разрешающую способность метода, но не устраняет его недостатков.

Известно, что запасные белки растений являются хорошими маркерными системами для выявления спектра индуцируемых мутаций. Изоферменты растений также являются удобными маркерами: они характеризуют состояние контролирующих их структурных генов, и поэтому изменения в этих белках могут служить критериями для оценки динамики и частоты генов в популяциях и их изменчивости при разных антропогенных воздействиях. Анализ компонентного состава запасных белков семян успешно применяется для растений, подвергшихся радиационному воздействию. Популяции ячменя (*Hordeum brevisubulatum* Link.; *H. jubatum* L.; *H. bogdanii* Will.) и житняка гребенчатого (*Agropyron cristatum* B.), подвергшиеся облучению, отличались значительной полиморфностью белков по сравнению с контролем.

Для анализа генетических изменений в популяции используют такие показатели, как качество семенного материала, масса семян, хлорофильные мутации у проростков. Критериями мутагенного эффекта служат частота и спектр видимых морфологических изменений, появившихся в метафазе II M_2. У ячменя часто наблюдаются хлорофильные мутации типов альбина, виридис и ксанта. При проведении генетического мониторинга загрязнения агроценоза успешное применение нашла новая тест-система — семядоли табака (*Nicotiana tabacum*). В тесте используются растения, несущие ген *Sulphur* в разных дозах, представляющий одну из хлорофильных мутаций; кроме того, в анализе используются трансгенные линии, несущие ген *ada* (из генома кишечной палочки), кодирующий О6-алкилтрасферазу. Тест апробирован на метилметинсульфанате и нитрозометилмочевине. С помощью данного теста удается быстро и эффективно выявлять соматические мутации в клетках семядолей табака, а также анализировать механизмы репарации геномной ДНК при оценке трансгенных моделей, несущих репарационно-компетентные гены (такие как *ada*).

Микроядерный тест. Тест основан на появлении под воздействием мутагенов в культуре клеток человека, растений или животных микроядер вследствие аберраций и нерасхождения хромосом (рис. 6.15). Специфичность теста составляет примерно 80 %. Ми-

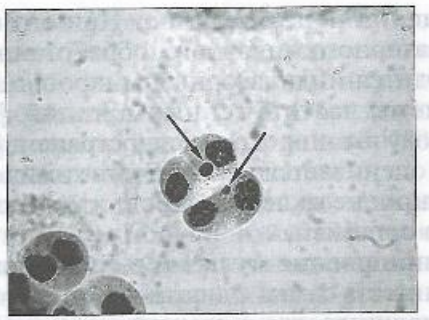

Рис. 6.15. Микроядра в соматических клетках традесканции (указаны стрелками)

кроядерный тест может быть эффективен при установлении генетического риска для плода при воздействии на беременных самок различных вредных факторов окружающей среды. В настоящее время большой популярностью при оценке состояния окружающей среды пользуется тест на микроядра в материнских клетках пыльцы традесканции, являющийся показателем генотоксичности.

Тест на сестринские хроматидные обмены (СХО). Это точный метод выявления структурных изменений хромосомного материала, поскольку сам обмен морфологически ясно виден (см. рис. 4.4). Спонтанные СХО встречаются почти в каждой клетке, но они крайне редки, и их нормальные пороговые величины почти в 100 раз ниже частот спонтанных аберраций хромосом. Это позволяет учитывать мутагенное действие испытуемых веществ, даже если частота СХО незначительно превышает нормальные величины. С помощью СХО можно вести учет распределения обменов по хромосомным наборам и длине индивидуальных хромосом. Совместное использование СХО и микроядерного тестов дает возможность учитывать аберрации хромосом и сестринские хроматидные обмены на одних и тех же препаратах. При одновременном использовании обоих тестов выявляются такие мутагены, которые продуцируют мало СХО и много разрывов хромосом, а также мутагены, повышающие СХО без аберраций хромосом.

Тест на доминантные летали. Заключается в учете летальных мутаций, возникающих в основном за счет хромосомных аберраций в половых клетках самцов, обработанных исследуемым веществом. Мутагенное действие оценивается по частоте до и после имплантационной гибели эмбрионов, полученных от скрещивания подвергнутых действию ксенобиотиков самцов с интактными самками. Этот тест наиболее быстрый и недорогой из используемых, однако он не дает полной информации для оценки генетического риска.

Тест проведения через хозяина. При его использовании в организм лабораторного животного, обработанного исследуемым веществом, вводится индикаторный микроорганизм, у которого затем определяется частота генных мутаций. Тест проведения через хозяина получил широкое распространение. Однако при его использовании оценивается способность химического агента индуцировать мутации не в клетках самого животного, а у микробов, введенных в его организм.

Тест на возникновение мутаций в специфических локусах. При проведении теста самец с диким фенотипом обрабатывается мутагеном и скрещивается с самкой, гомозиготной по группе рецессивных генов, проявляющихся фенотипически. Сходные изменения в фенотипе у потомства первого поколения указывают на возникновение мутаций в контролируемом локусе. Однако при использовании этого теста анализируется не весь генотип, а только исследуемый ген или группа генов.

Определение генных мутаций по локусу Т-клеточного рецептора (TCR). TCR-метод основан на использовании моноклональных антител, меченных разными флуорохромами к CD3- и CD4-антигенам. На поверхности Т-лимфоцитов экспрессирован комплекс Т-клеточного рецептора и CD3-антигена. Так как TCR-гены функционально гемизиготны, на поверхности лимфоцитов представлены продукты только одного аллеля. Мутация в функционирующем аллеле приводит к тому, что CD3-комплекс не экспрессируется на поверхности Т-лимфоцита. Такие мутанты определяются с помощью проточной цитометрии как CD3-негативные клетки среди CD4-позитивных Т-хелперов.

Венозная кровь обследуемых помещается в пробирки с гепарином («Becton Dickinson», США). С помощью центрифугирования на растворе плотности фиколл-урографина («Панэко», Россия, плотность 1,077) из 3 мл крови выделяют мононуклеарную фракцию клеток. При этом указанный объем крови разбавляют в два раза раствором Хенкса («Панэко», Россия), наслаивают на 3 мл раствора фиколл-урографина и центрифугируют в течение 30 мин при 250×g. Клетки из слоя мононуклеаров собирают и отмывают два раза 0,01 М фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl (фосфатный буфер — ФБ, pH 7,2), с помощью центрифугирования при 350×g в течение 15 мин. Для последующего окрашивания отбирают $(1,0-1,5)\cdot 10^6$ клеток.

К клеткам приливают по 10 мкл моноклональных антител к CD4, меченных флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ), к CD3 и HLA-DR, меченных фикоэритрином («Becton Dickinson Immunocytometry Systems» — «BDIS», США), и инкубируют в темноте 30 мин. Затем клетки отмывают в 1,0 мл ФБ, содержащего 1,0 % бычьего сывороточного альбумина («Sigma», США) и 0,1 % NaN_3

(«Sigma», США), с помощью центрифугирования (300×g, 5 мин). К осадку добавляют 0,5 мл ФБ, затем суспензию клеток фильтруют через нейлоновый фильтр (Д-45 мкм) и фиксируют в 0,5 мл 1%-го раствора формальдегида в ФБ. Образцы анализируют на проточном цитофлуориметре, оборудованном 488 нм лазером, не позднее чем через 24 ч после окрашивания.

Анализ клеток в образце проводят по четырем параметрам: интенсивности прямого и бокового светорассеяния (линейная шкала), флуоресценции флуоресцеинизотиоционата (ФИТЦа) и фикоэритрина (логарифмическая шкала). Для измерения флуоресценции ФИТЦа используют узкополосные фильтры 530/30 нм, фикоэритрина — 575/26 нм. Мощность лазера составляет примерно 30 МВт.

Компьютерную обработку проводят с использованием программы «Lysys» («BDIS», США). На графике распределения клеток по интенсивности светорассеяния выбирают регион неповрежденных лимфоцитов и в дальнейшем оценивают флуоресценцию клеток, меченных ФИТЦем и фикоэритрином, только в этом регионе. На графике распределения клеток по интенсивности флуоресценции определяют количество клеток с иммунофенотипом $CD3^+CD4^+$, характерным для Т-хелперных лимфоцитов, и с вариантным иммунофенотипом $CD3^-CD4^+$, который соответствует клеткам с мутациями по локусу Т-клеточного рецептора (см. рис. 4.5). Частоту мутантных клеток определяют как отношение числа клеток с фенотипом $CD3^-CD4^+$ к числу $CD3^+CD4^+$-клеток. В каждом образце анализируют 2×10^5 лимфоцитов.

Трансгенные растения в качестве биосенсоров. Мониторинг с использованием трансгенов основан на интеграции в растительный геном маркерного гена известной последовательности, который служит мишенью для мутагена. Выбранный трансген должен кодировать легко распознаваемый признак. Промотор, усиливающий экспрессию выбранного трансгена, должен быть достаточно сильным для обеспечения визуализации ферментативной активности маркерного белка и активен в тканях, выбранных для анализа мутаций. Для осуществления корректной экстраполяции частоты мутаций в трансгене на весь геном трансген не должен кодировать существенные для растения функции. Это исключит влияние селекционного процесса на частоту мутаций в трансгене. В настоящее время главным образом трансгенные растения арабидопсиса и табака используют для оценки частоты точковых мутаций и гомологичной рекомбинации. Однако, если анализ внешнего воздействия должен быть проведен на определенном виде растений, необходимая тест-система может быть легко разработана.

Ограниченность краткосрочных лабораторных тестов связана с условиями тестирования, которые коренным образом отлича-

ются от природных (короткое время воздействия, благоприятные условия лаборатории и отсутствие взаимодействия токсикантов с другими факторами окружающей среды). Это делает необходимым развитие альтернативных методов биомониторинга, базирующихся на полевых наблюдениях.

Полевые наблюдения на популяциях дикорастущих и культурных растений. Для правильной оценки биологических эффектов загрязнения нужно обратить внимание на то, что же действительно происходит в полевых условиях. Поэтому наиболее приемлемый способ оценки качества окружающей среды связан с использованием растений, непосредственно растущих на загрязненных территориях. Полевые исследования особенно полезны для оценки отдаленных биологических эффектов, индуцируемых хроническим низкодозовым и комбинированным воздействием. До настоящего времени об ответных реакциях популяций растений и животных на воздействие поллютантов в природных условиях известно немного. Хотя радионуклиды, тяжелые металлы, пестициды и другие поллютанты индуцируют первичные повреждения на молекулярном уровне, накопление этих нарушений ведет к формированию эффектов на популяционном уровне, и их невозможно прогнозировать, основываясь только на информации о молекулярно-клеточных механизмах действия поллютантов. Полевые исследования позволяют получить уникальные данные, увеличивающие наше понимание микроэволюционных процессов и закономерностей формирования ответной реакции растений и животных на стрессовое воздействие.

Преимуществами использования диких растений для биотестирования являются их доступность и наличие разнообразных тестов, отбор материала для которых можно осуществлять в разные периоды времени. Обязательные условия для биоиндикации *in situ*: использование стандартизованной методологии и хорошо обоснованный выбор тест-объектов из широкого спектра видов. Виды, выбранные для биоиндикации *in situ*, должны отвечать следующим требованиям: широкий ареал распространения и многочисленность, быстрый ответ на техногенное воздействие, высокая чувствительность при низкой индивидуальной вариабельности, генетическая гомогенность, возможность одновременно регистрировать разные по механизмам формирования биологические эффекты и оперативно получать информацию. Контрольная и опытные популяции должны отбираться в фитоценозах с одинаковой структурой, в одинаковых климатических, почвенных и гидрологических условиях.

Суровые условия окружающей среды часто ведут к гибели наиболее ослабленных особей. Альтернативный эффект связан с изменением численности потомков. Пластичность растений и расположение их репродуктивных органов на краях веток и стеблей ведут к тому, что растения, как правило, отвечают на внешние стрессы изменением процесса репродукции. При этом семенная продуктивность многих растений может изменяться в 200 раз. Аналогичная изменчивость репродуктивных свойств существует лишь у незначительного числа представителей животного мира. Особенностью растений является также то, что лишь малая часть продуцируемых семян разовьется в дальнейшем во взрослые растения, а изменения в частоте определенных генотипов связаны с их селективными свойствами в конкретной окружающей среде. Важно различать потенциальные последствия генетических изменений в вегетативных и репродуктивных органах. Первые воздействуют на взрослые растения и, таким образом, на популяцию в данный момент времени. Вторые гораздо менее многочисленны, но могут влиять на будущие поколения. Оба вида изменений влияют на генетическую композицию популяции, но совершенно разными способами.

Наиболее простой подход к изучению эффектов на популяционном уровне связан с наблюдением за популяцией в течение многих генераций. Такой подход позволяет отслеживать состояние популяции во времени и определить, когда популяция достигнет требующего вмешательства человека критического уровня. Ограниченная численность природных популяций, внутрипопуляционный полиморфизм по изучаемому признаку, различия в экологических условиях населяемых популяциями участков определяют минимальный уровень техногенного загрязнения, ниже которого эффект не может быть достоверно выявлен. Хотя сублетальные концентрации поллютантов могут заметно не влиять на популяционную динамику, их воздействие может изменять генетическое разнообразие популяций, изменяя, таким образом, их генетическую структуру.

Древесные виды перекрестно опыляющихся растений, представленные большими популяциями с высоким уровнем генотипической и фенотипической изменчивости, произрастающие в разнообразных экологических условиях, являются удобным тест-объектом для биологического мониторинга. Сосна, ель, береза и тополь — наиболее подходящие для использования в биомониторинге техногенного воздействия. Эти виды широко распространены в природе, они хорошо изучены и обладают достаточно чувствительными и информативными тест-системами.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) — доминантный древесный вид на севере Европы и Азии. Поскольку хвойные деревья характеризуются высокой задерживающей способностью и медленным самоочищением наземной фитомассы от выпавших из атмосферы поллютантов, оценки флуктуирующей асимметрии хвоинок и цитогенетических аномалий в интеркалярной мериете-

ме молодых хвоинок являются перспективными тест-системами. Наиболее чувствительны к повреждающим воздействиям репродуктивные органы хвойных растений, отличающиеся сложностью организации и длительностью генеративного цикла. Наличие в семени хвойных растений гаплоидного эндосперма (мегагаметофита), генетически идентичного материнской гамете, делает возможным прямое определение у них гаплотипа и рецессивных мутаций. Если у большинства покрытосеменных видов репродуктивный цикл длится несколько месяцев, то у сосны с момента закладки генеративных органов до созревания семян проходит 18—20 месяцев. В условиях хронического действия техногенных факторов столь длительный цикл развития приводит к накоплению в неспециализированных инициальных клетках семян достаточного для индикации внешнего воздействия количества повреждений ДНК, реализация которых в аберрации происходит главным образом в первом митозе. Следовательно, частота цитогенетических нарушений в первом митозе клеток корневой меристемы прорастающих семян является тест-системой, прекрасно приспособленной для биоиндикации кумулятивного техногенного воздействия.

Семена сосны проращивают в термостате при 24 °С в чашках Петри на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге. Как у большинства дикорастущих растений, прорастание семян и развитие проростков у сосны происходит крайне неравномерно. При определении длины корешков с максимальным числом делящихся клеток в первом митозе надо учитывать, что в первый период прорастания их размеры увеличиваются за счет дифференциации и растяжения клеток зачатка корня, образовавшихся еще при формировании зародыша. При указанных условиях проращивания пик первых митозов наблюдается в корешках длиной 7—10 мм, второй — при 20 мм и более. Корешки проростков семян длиной 7—14 мм и молодую хвою сосны обыкновенной фиксируют в ацетоалкоголе (1:3), окрашивают ацетоорсеином и готовят временные давленые препараты. В каждом препарате анализируют все ана-телофазные клетки (обычно от 2 500 до 16 500 ана-телофаз на вариант опыта) и рассчитывают долю клеток с цитогенетическими нарушениями. Анализ спектра нарушений проводят с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) мостов и фрагментов, многополюсных митозов, а также отставаний хромосом (см. рис. 6.14). Анафазным методом в клетках корневой меристемы проростков регистрируются нарушения, возникшие в период от образования гамет до созревания и сбора семян, поскольку индуцированные на вегетативной стадии (до цветения) хромосомные перестройки элиминируются в мейозе, за исключением не регистрируемых этим методом симметричных транслокаций и инверсий. Сосна обыкновенная является превосходным объектом для изучения индуцированных мутаций в пыльцевых зернах. Преимущество использования пыльцевых зерен как биоиндикатора загрязнения окружающей среды двоякое: гаплоидное состояние пыльцы очень чувствительно к воздействию поллютантов, кроме того, пыльца представлена большим количеством фенотипов, которые удобно изучать под микроскопом.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Аберрация хромосомная (или *хромосомная аномалия*) — обобщенное название любого из типов хромосомных мутаций: делеций, транслокаций, инверсий, дупликаций.

Акроцентрик — хромосома, у которой центромер присутствует на конце или близко к концу хрмосомы.

Аллель — одна из двух или более альтернативных форм гена, занимающая строго определенный локус конкретной хромосомы.

Альфа-частица — устойчивая система из двух нейтронов и двух протонов (ядро атома гелия). Альфа-частица испускается ядрами тяжелых радиоактивных элементов: плутоний-239, 238, уран-235, радон-222 и др. Альфа-частицы обладают высокой относительной биологической эффективностью и низкой проникающей способностью в биологичских тканях. Облучение альфа-частицами ведет к гибели клеток, индукции мутаций и преканцерогенных изменений.

Амейоз — отсутствие мейоза и его замещение ядерным делением без изменения числа хромосом.

Анафазное движение — движение хромосом или хроматид к полюсам веретена деления в результате мейоза или митоза.

Анеуплоид — клетка или организм, ядра которых обладают числом хромосом бóльшим или меньшим по сравнению с нормальным набором хромосом.

Анеуплоидия — измененный набор хромосом, в котором одна или несколько хромосом из обычного набора или отсутствуют, или представлены дополнительными копиями.

Анеуцентрик —аберрантная хромосома, имеющая более одного центромера.

Анизоплоид — организм с нечетным числом хромосом в соматичесских клетках.

Антимутагенез — процесс предотвращения закрепления мутации, т. е. возврат поврежденной хромосомы или гена в исходное состояние.

Асинапсис — хромосомы в мейозе I, конъюгации которых недостаточно или она неполная.

Аутосома — любая хромосома набора, кроме половых (X- и Y-хромосом).

Аутоэкология — раздел экологии, изучающий отношения организмов со средой.

Ахроматичные участки, или *пробелы* — неокрашенные участки хромосомы (или участки с очень светлой окраской), присутствующие в одной из хроматид (одиночный пробел) или в обеих сестринских хроматидах недалеко друг от друга (парные пробелы).

Ацентрик — хромосомный фрагмент, у которого отсутствует центромера.

Бендинг — метод окраски хромосом, приводящий к их поперечной исчерченности; характер расположения поперечных полос специфичен для отдельных хромосом и видов организмов; обычно применяют для выявления обмена генетическим материалом между отдельными хромосомами (например, транслокаций).

Бета-частицы — электроны и позитроны, испускаемые ядрами атомов при распаде. Способны индуцировать в клетках мутации и преканцерогенные изменения.

Брахиомейоз — нарушения мейоза, характеризующиеся отсутствием второго деления.

Внутрихромосомный обмен — обмен материалом между сестринскими хроматидами (т. е. хроматидами одной хромасомы) или внутри одной хроматиды.

Гаплоидное число — число хромосом в гаметах; одинарный набор хромосом.

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

Генетически модифицированные организмы (*ГМО*), или *трансгенные* — организмы, геном которых был изменен методами генной инженерии с целью создания новых свойств, которые не встречаются у данного вида.

Генная инженерия, или *генетическое модифицирование* — набор технических методик, приводящих к (чаще всего наследуемой) модификации генетического кода организма путем неполового переноса ранее отобранного генетического материала. Гены могут передаваться от одного организма другому того же вида (внутривидовой перенос) или другого вида (межвидовой перенос). Под генной инженерией понимают также целенаправленное изменение генетических программ половых клеток с целью придания исходным формам организмов новых свойств или создания принципиально новых форм организмов. Основной метод генной инженерии состоит в извлечении из клеток организма гена или группы генов, обладающих нужными свойствами, создании на их основе гибридных молекул и внедрении их в клетки другого организма.

Генотипическая изменчивость — возникает в результате новых генетических комбинаций, в результате любого полового размножения,

кроссинговера либо других перестроек на хромосомном уровне или под влиянием мутаций (мутационная изменчивость).

Гетероаллель — диплоидная клетка, несущая два неидентичных аллеля какого-либо гена.

ГМИ — генетически модифицированные источники.

Гомоаллель — диплоидная клетка, несущая два идентичных аллеля какого-либо гена.

Двунитевой разрыв — разрыв обеих нитей двойной спирали ДНК недалеко друг от друга.

Делеция — хроматидная или изохроматидная аберрация, при которой часть хромосомы теряется в результате разрыва; делеция может затрагивать участок вблизи конца хроматиды (терминальная делеция) или в ее средней части (интерстициальная делеция).

Десинапсис — преждевременное разделение конъюгирующих хромосом в течение диплотены или диакинеза мейотической профазы; это часто контролируется генетически, но также может быть вызвано условиями среды.

Дицентрик — хромосома с двумя центромерами.

Доминантная мутация — любая мутация, эффект которой проявляется в гетерозиготном состоянии.

Дрейф генов — ненаправленное изменение частот генов в ряду поколений, обусловленное случайным характером оплодотворения и размножения.

Дупликация — хромосомная аберрация, в которой более чем одна копия определенного хромосомного сегмента присутствует несколько раз в хромосомном наборе.

Загрязняющее вещество — природный или антропогенный физический агент, химическое вещество или биологический вид, попадающий в среду или возникающий в ней в количествах, выходящих за рамки обычного наличия предельных естественных колебаний или среднего фона в рассматриваемый период.

Изохроматидная аберрация — хромосомная аберрация, затрагивающая обе хроматиды.

Изохромосома — хромосома с двумя идентичными плечами, которая произошла от телоцентрической хромосомы.

Инверсия — хромосомная перестройка, при которой область между двумя разрывами переворачивается на 180°; при парацентрической инверсии инвертированный участок находится внутри одного плеча хроматиды; при перицентрической инверсии инвертируемый участок включает центромеру.

Канцероген — вещество или физический агент, способные вызвать развитие злокачественных новообразований или способствующие их возникновению. Большинство канцерогенов имеет антропогенное происхождение.

Кластоген — физический или химический фактор, индуцирующий разрывы хромосом.

Кольцо — хромосомная перестройка, при которой концы хромосомы соединяются с образованием кольцевидной структуры, в которой центромера либо присутствует (центрическое кольцо), либо отсутствует (ацентрическое кольцо).

Леталь — мутация, вызывающая гибель клетки или особи до достижения репродуктивного возраста.

Межхромосомный обмен — обмен материалом между двумя хроматидами разных хромосом.

Метафазы арест — остановка клеточного деления в метафазе митоза или мейоза обычно при использовании специальных агентов.

Метацентрик — хромосома, в которой центромера расположена приблизительно посередине; *субметацентрик* — хромосома, в которой центромера расположена между серединой и концом хромосомы.

Микроядро — маленькое ядро, отдаленное от большого ядра, образующееся в течение телофазы.

Мини-фрагменты, или *мини-хромосомы* — фрагменты хромосом, образовавшиеся в результате хромосомной аберрации.

Мини-хромосома — маленькая хромосома, обычно результат хромосомной аберрации.

Митоген — фактор, стимулирующий покоящиеся (интерфазные) клетки к делению и пролиферации.

Митотический индекс — доля (обычно выражаемая в процентах) делящихся клеток в клеточной популяции.

Митотический яд — любое вещество (например, колхицин, колцемид), препятствующее полимеризации тубулина и, следовательно, расхождению хромосом, что приводит к накоплению метафазных клеток; применяется для остановки клеточного деления на стадии метафазы с целью анализа хромосом.

Митотическое ингибирование — индуцированное или спонтанное подавление митотического деления.

Морфогенетические варианты врожденные — отклонения в развитии, выходящие за пределы нормальных вариаций, но не нарушающие функции органа.

Мутаген — любой агент или фактор, вызывающий мутацию. Различают физические, физико-химические, химические и биологические мутагены. Часто мутагены одновременно являются канцерогенами.

Мутация — изменение в наследственных структурах (ДНК, ген, хромосома, геном).

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

Нуллисомик — организм, в геноме которого отсутствует одна пара гомологичных хромосом.

Однонитевые разрывы — разрыв одной из двух нитей в двойной спирали ДНК.

Поликариотик — клетки, имеющие много ядер.

Полиплоидия — присутствие в клетке хромосом в количестве, превышающем число хромосом диплоидного набора ($2n$) и при этом кратном числу хромосом гаплоидного набора (n), например: триплоидия — $3n$, тетраплоидия — $4n$ и т. д.

Полицентрик — хромосома, которая имеет две и более центромеры.

Проканцерогены — вещества, приобретающие свойства канцерогенов после ряда метаболических превращений в организме.

Пыльцы стерильность — пыльца, которая не способна к опылению, такая пыльца может появляться в результате нарушений мейоза или в результате воздействия физических или химических факторов.

Радионуклид — нестабильный нуклид, ядро которого способно к радиоактивному распаду. Образующееся в результате радиоактивного распада α-, β- и γ-излучение способно индуцировать мутагенные, канцерогенные и тератогенные изменения в живых организмах.

Рецессивная мутация — любая мутация, эффект которой проявляется в гомозиготном или гемизиготном состоянии.

Сестринский хроматидный обмен (*СХО*) — обмен генетическим материалом между двумя сестринскими хроматидами.

Синэкологические отношения — отношения организмов с другими организмами (пример — микробно-растительные взаимоотношения).

СПРЛ — сцепленные с полом рецессивные летали; рецессивные летальные мутации, возникающие в половых клетках (например, в Х-хромосомах дрозофилы).

Супрессорная мутация — полное или частичное восстановление признака, измененного в результате первичной мутации. Может возникнуть в исходном мутантном гене (внутригенная супрессия) или в генах, не затронутых прямой мутацией (межгенная супрессия).

Телоцентрик — хромосома, в которой центромера соединяет концы двух хроматид.

Тератогенный эффект — возникновение пороков развития и уродств. Может происходить спонтанно. Ионизирующее излучение и многие химические агенты увеличивают частоту проявления тератогенных эффектов.

Тератоморфы — организмы, имеющие отклонения в развитии.

Трансгенез — процедура (или процесс) переноса генетической информации от одного организма к другому.

Трансгенные организмы — животные, растения, микроорганизмы, вирусы, генетическая программа которых изменена с помощью методов генной инженерии.

Транслокация — изохроматидная перестройка, возникающая в результате обмена материалом между двумя хромосомами.

Транспозиция — перенос генетической информации из одного участка хромосомы в другой.

Хроматида — нереплецированная хромосома или половина целой хромосомы, идентичной копией которой является вторая хроматида, называемая сестринской.

Хроматидная аберрация — аберрация, затрагивающая лишь одну из хроматид какой-либо хромосомы.

Хроматидный мост — структура, напоминающая мост, образуемый посредством дицентрического хроматида с двумя центромерами, расположенными между противоположными полюсами в течение анафазы: частота хроматидных мостов в AII мейоза используется иногда как мера уровня цитологического дисбаланса).

Хромосом слипание — соединение всех хромосом, часто обусловлено мутацией или вызвано физическими или химическими агентами.

Хромосом удвоение — индуцированное или спонтанное удвоение хромосомного набора, приводящее к редупликации или полиплоидизации.

Хромосом элиминация — потеря хромосомы из ядра в течение определенной стадии митоза или мейоза; часто встречается у некоторых спонтанных аутополиплоидов и аллополиплоидов.

Хромосомная аберрация — аберрация, затрагивающая обе хроматиды одной хромосомы.

Хромосомная мутация — любое структурное изменение, спонтанное либо индуцированное. Основные типы хромосомных мутаций: делеции, дупликации, инверсии и транслокации.

Хромосомное сжатие — спирализация и укорачивание хромосом в течение митоза или мейоза естественным путем либо при химической и температурной обработке.

Хромосомный мост — дицентрическая хромосома, которая формирует мост между группами анафазных хромосом, так как это две центромеры, разошедшиеся к разным полюсам.

Шарообразная метафаза — форма митоза, которая характеризуется расположением хромосом по кругу.

Ядерно-цитоплазматические отношения — отношения объемов ядра и цитоплазмы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие ... 3

Глава 1. **Цели, задачи и место генетического мониторинга в системе наук** ... 5

1.1. Цели и задачи генетического мониторинга ... 5
1.2. Подходы к генетическому мониторингу ... 7
1.3. История зарождения генетического мониторинга как научного направления ... 10

Глава 2. **Факторы, влияющие на генетические структуры организмов** ... 13

2.1. Характеристика факторов, вызывающих наследственные изменения ... 13
2.2. Действие физических и химических факторов на наследственный аппарат клетки ... 14
2.2.1. Действие физических факторов ... 15
2.2.2. Действие химических факторов ... 20
2.3. Действие металлов на наследственный аппарат клетки ... 23

Глава 3. **Характеристика тест-систем, применяющихся в генетическом мониторинге** ... 29

3.1. Базовые принципы генотоксических тестов на растениях ... 29
3.2. Базовые принципы генотоксических тестов на животных ... 33
3.3. Критерии подбора тест-систем для генетического мониторинга ... 42
3.4. Характеристика тест-систем для генетического мониторинга ... 46
3.4.1. Микроорганизмы в качестве тест-систем ... 46
3.4.2. Растения в качестве тест-систем ... 53
3.4.3. Животные в качестве тест-систем ... 59
3.5. Генетический мониторинг природных популяций ... 61
3.6. Критерии оценки генетического риска ... 66

Глава 4. **Генетический мониторинг человека** ... 69

4.1. Основные направления генетического мониторинга человека ... 69
4.1.1. Изучение генетической структуры популяций ... 70
4.1.2. Мутационный процесс в популяциях ... 72
4.1.3. Действие отбора в современных условиях ... 75
4.1.4. Миграционные процессы ... 77
4.2. Методы генетического мониторинга человека ... 79
4.2.1. Методы изучения генетической структуры популяций ... 79
4.2.2. Исследование мутационного процесса в половых клетках человека и снижение генетического груза популяции ... 80
4.2.3. Оценка миграционных потоков аллелей ... 85
4.2.4. Оценка мутагенеза в соматических клетках человека ... 86
4.3. Генетическое тестирование и медицина ... 92
4.4. Генетический мониторинг будущего ... 95
4.5. Генетический мониторинг и этика ... 97

Глава 5. **Генетический мониторинг трансгенов** ... 98

5.1. Общий статус трансгенных культур в мире ... 99
5.2. Риски, связанные с интродукцией трансгенных растений в окружающую среду ... 102
5.3. Контроль внедрения генетически модифицированных организмов в агроэкосистемы ... 104
5.4. Основные методы генетического мониторинга трансгенов ... 106
5.5. Технология изготовления и применения ДНК-биочипов в целях генетического мониторинга трансгенов ... 109
5.6. Законодательство в области трансгенных организмов ... 118
Список литературы к главам 1—5 ... 122

Глава 6. **Методы генетического мониторинга** ... 124

6.1. Тест Эймса ... 124
6.2. SOS-хромотест (тест на индукцию SOS-ответа в клетках *Escherichia coli*) ... 132
6.3. Альфа-тест на дрожжах ... 137
6.4. Аллиум-тест ... 140
6.5. Пыльцевой тест ... 143
6.6. Тест на соматические мутации в волосках тычиночных нитей традесканции (клон 02) ... 148
6.7. Тест на сцепленные с полом рецессивные летальные мутации у дрозофилы ... 153
6.8. Метод «ДНК-комет», или щелочного гель-электрофореза изолированных клеток ... 157
6.9. Метод учета аберраций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* ... 169
6.10. Исследование лекарственных препаратов на мутагенность ... 170
6.11. Метод ПЦР для обнаружения ДНК ... 177
6.12. Метод ПЦР-диагностики трансгенных сортов сои, кукурузы и картофеля ... 184
6.13. Краткое изложение методов генетического мониторинга окружающей среды ... 191

Словарь терминов ... 200

Учебное издание

Гераськин Станислав Алексеевич,
Сарапульцева Елена Игоревна,
Цаценко Людмила Владимировна и др.

Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг

Учебное пособие

Редактор *М.А. Есакова*
Технический редактор *О.Н. Крайнова*
Компьютерная верстка: *В.А. Крыжко*
Корректоры *Е.В. Кудряшова, А.Б. Глазкова*

Изд. № 101115272. Подписано в печать 30.04.2010. Формат 60×90/16.
Гарнитура «Ньютон». Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,0.
Тираж 1 500 экз. Заказ № 30233.

Издательский центр «Академия». www.academia-moscow.ru
125252, Москва, ул. Зорге, д. 15, корп. 1, пом. 26б.
Адрес для корреспонденции: 129085, Москва, пр-т Мира, 101В, стр. 1, а/я 48.
Тел./факс: (495) 648-0507, 616-0029.
Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.60.953.Д.007831.07.09 от 06.07.2009.

Отпечатано в соответствии с качеством предоставленных издательством электронных носителей в ОАО «Саратовский полиграфкомбинат».
410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 59. www.sarpk.ru