XXII Российская научная конференция школьников «Открытие»

СЕКЦИЯ БИОЛОГИЯ

**Изучение генотоксической активности пестицида «Протон» с использованием Allium cepa в качестве тест-объекта**

**Исследовательская работа**

Автор – **Макаренко Ирина Андреевна**,

обучающая 11 класса Средней школы

«Провинциальный колледж» г. Ярославля

Научный руководитель **- Фомичева Анна Николаевна**, кандидат биологических наук, учитель биологии Средней школы «Провинциальный колледж»

Ярославль, 2018**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[Введение 3](#_Toc292939)

[1. Материалы и методы исследования 4](#_Toc292940)

[2. Результаты исследования и их обсуждение 6](#_Toc292941)

[2.1. Спонтанный уровень митотической активности меристемы *Allium cepa* 6](#_Toc292942)

[1.2.2. Митотический индекс в меристеме *Allium cepa* при воздействии пестицида «Протон» 6](#_Toc292943)

[1.2.3. Индексы фаз митоза в меристеме *Allium cepa* при воздействии пестицида «Протон» 7](#_Toc292944)

[Выводы 8](#_Toc292945)

[Список использованной литературы. 9](#_Toc292946)

[Приложение 10](#_Toc292947)

[Обзор литературы 10](#_Toc292948)

[1.1. Мутации 10](#_Toc292949)

[1.1.1. Классификация мутаций 10](#_Toc292950)

[1.1.2. Генные мутации 11](#_Toc292951)

[1.1.3. Хромосомные мутации 12](#_Toc292952)

[1.1.4. Геномные мутации 15](#_Toc292953)

[1.2. Понятие и классификация мутагенов 16](#_Toc292954)

[1.3. Мутагенное загрязнение окружающей среды и его негативные последствия 17](#_Toc292955)

[1.4. Методы оценки мутагенов 18](#_Toc292956)

# Введение

Генотоксиканты – факторы, способные нарушать генетические структуры и процессы живых организмов, являются наиболее опасными загрязнителями окружающей среды. В отличие от токсикантов, они оказывают двоякое действие: изменяют наследственность как в поколении, подвергшемся воздействию, так и в последующих поколениях. Поэтому накопление мутаций не только приводит к гибели отдельных индивидов, но и к вырождению и вымиранию популяций и видов. Во множестве исследований показано, что у человека происходит опасный рост генетического груза за счет накопления малых мутаций, возникающих под действием химических и физических факторов окружающей среды.[[1]](#footnote-1)

В связи с этим необходима оценка генотоксической активности факторов окружающей среды, воздействующих на человека. Одними из таких факторов являются пестициды - химические средства, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений, а также с различными паразитами, сорняками, вредителями зерна и зернопродуктов, древесины, изделий из хлопка, шерсти, кожи, с эктопаразитами домашних животных, а также с переносчиками опасных заболеваний человека и животных.[[2]](#footnote-2)

Они широко применяются в сельском хозяйстве и могут оказывать негативное воздействие на живые организмы, в том числе на человека, попадая в его организм вместе с пищей и водой. Наличие генотоксической активности установлено для многих пестицидов, имеется достаточное количество фактов, подтверждающих реальность генетической опасности их накопления в почве, воде и атмосфере[[3]](#footnote-3)

В связи с этим необходима оценка мутагенности пестицидов, которые наиболее широко применяются как на индивидуальных дачных участках, так и в сельхозпредприятиях.

**Цель исследования** - изучить генотоксическую активность пестицида «Протон» (производитель ЗАО «ТПК Техноэкспорт») с использованием Allium cepa в качестве тест-объекта.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние различных концентраций пестицида «Протон» на митотическую активность в меристеме Allium cepa.
2. Выявить влияние пестицида «Протон» на прохождение фаз митоза клетками меристемы Allium cepa.
3. Сравнить данные, полученные при воздействии на меристему различных концентраций пестицида «Протон».

Обзор литературы по теме исследования представлен в приложении

# Материалы и методы исследования

Материалом исследования являлся пестицид «Протон». Для проведения опыта готовили раствор пестицида (Табл. 1).

В качестве тест-объекта *Allium cepa* сорта Штутгартен, который впервые предложен Шведской Королевской Академией Наук как стандартный тест-объект, хорошо зарекомендовавший себя в течение длительного применения и известный как *Allium test* (Прохорова И. М., 2005). Для оценки генотоксической активности веществ был выбран *Allium test,* который основан на оценки изменения митотической активности клеток меристемы при воздействии фактора.

*Allium test* рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды, т.к. результаты, полученные на данном тесте, показывают корреляцию с тестами на других организмах: водорослях, растениях, насекомых, в том числе и млекопитающих (Прохорова И. М., 2005).

Были поставлены опыты в соответствии с таблицей 1.

**Таблица 1**

**Варианты опыта**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Вариант опыта, концентрация** | **Объем воды, мл** | **Масса пестицида, г** |
| Контроль | 50 | 0 |
| П1 (1 мг/мл) | 50 | 0,05 |
| П2 (0,5мг/мл) | 50 | 0,025 |
| П3 (0,24мг/мл) | 50 | 0,012 |

Чувствительность данного тест-объекта высока и сходна с чувствительностью клеток китайского хомяка и клеток лимфоцитов человека. (Песня Д.С., 2010)

Выбранный тест позволяет регистрировать митозстимулирующий и митозугнетающий эффект действия экологического фактора, нарушения прохождения клетками фаз митоза. Также выявляются мутагены, непосредственно повреждающие ДНК, так и промутагены, т.е. факторы генетически безопасные, но приобретающие мутагенную активность в процессе метаболизма в растительном организме.

Генотоксическая активность фактора определялась по нарушению процесса митоза в меристеме (митотоксичность).

В контрольном варианте луковицы проращивались негазированной питьевой воде марки «Некрасовская» из артезианской скважины № 104, жесткостью не более 7 мг-экв/л, с минеральными солями не более (мг/л): Кальций 130; Магний 65; Калий 20; Гидрокарбонаты 400; Сульфаты 250; Хлориды 250 (соответствует ГОСТ Р 52181-2003, производитель ООО «Большие Соли»). Та же вода использовалась для разведения пестицида «Протон». Луковицы проращивали в течение 4 дней.

Срезанные корешки фиксировали в фиксаторе Кларка, состоящем из этилового спирта(96%) и ледяной уксусной кислоте в соотношении 3:1, и окрашивали 2% ацетоорсеином в фарфоровых тиглях.

Для анализа готовили временные давленые препараты корневых меристем. Лезвием отрезали кончик корешка длинной 2-3 мм, помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты, накрывали покровным стеклом и с помощью спички раздавливали до получения монослоя клеток. (Прохорова И.М., 2014).

Препараты анализировали под цифровым микроскопом «Альтами» при увеличении около 1206,5 раз. На препаратах рассматривали мелкие, округло-квадратной формы клетки с хорошо прокрашенными ядрами и неповрежденными клеточными стенками.

Учет митотической активности проводили следующим образом. Просматривали около 300 клеток для каждого препарата. Подсчитывали общее количество делящихся клеток и отдельно клетки на разных стадиях митоза.

Показателем уровня митотической активности является митотический индекс (MI, %) - доля клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате.

Индекс может говорить о нормальном протекании митоза, об угнетении процесса деления клеток или, напротив, усилении митотической активности тканей. На основании этого делается заключение о митозмодифицирующим действии изучаемого фактора. Увеличение MI может быть обусловлено как усилением деления клеток, так и изменением продолжительности различных фаз, то есть задержкой клеток на определенных фазах митоза.

Чтобы вскрыть причины изменений MI подсчитывали фазные индексы (ПИ,% - профазный индекс; МИ, % - метафазный индекс; А-ТИ, % - ана-телофазный индекс) - доля клеток в различных стадиях митоза от общего количества делящихся клеток.

Математическая обработка результатов проводилась с помощью программы MS Excel. Для всех значений рассчитывалось среднее значение и ошибка среднего (m). Достоверность разницы между контролем и опытом проводилась с помощью t-критерия Стьюдента для малых выборок.

# 2. Результаты исследования и их обсуждение

## 2.1. Спонтанный уровень митотической активности меристемы *Allium cepa*

Результаты изучения спонтанной митотической активности меристемы *Allium cepa* представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

**Спонтанная митотическая активность меристемы *Allium cepa***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **номер повторности** | **MI, %** | **ПИ,%** | **МИ, %** | **А-ТИ, %** |
| **1** | 23,00 | 46,48 | 29,58 | 21,13 |
| **2** | 24,00 | 38,03 | 29,58 | 33,80 |
| **3** | 24,00 | 46,48 | 25,35 | 29,58 |
| **Среднее значение** | 23,67 | 43,66 | 28,17 | 28,17 |
| **M** | 0,33 | 2,82 | 1,41 | 3,73 |

По данной таблице мы наблюдаем, что клетки в контроле делятся достаточно активно. Полученные данные соответствуют литературным данным, по уровням спонтанной митотической активности, в среднем MI% составляет 23,67±0,33%. Митотическая активность меристемы значительно зависит от времени фиксации корешков. Превышение показателей митотического индекса по сравнению с литературными данными может быть связано с тем, что для фиксации материала был выбран утренний период, во время которого митозы идут наиболее активно. По фазным индексам мы видим, ПИ% составил 43,66±2,82, МИ% составляет 28,17±1,41, А-ТИ% составил 28,17±3,73%. Из полученных данных, мы можем сделать вывод, что в контрольном варианте преобладают клетки на стадии профазы.

## 1.2.2. Митотический индекс в меристеме *Allium cepa* при воздействии пестицида «Протон»

Результаты изучения митотического индекса в меристеме *Allium cepa* при воздействии пестицида «Протон» представлены в таблице 3 и на рис. 1.

**Таблица 3**

**Митотический индекс и t-критерий Стьюдента в меристеме *Allium cepa***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Концентрация пестицида** | **MI,%** | **t-критерий Стьюдента** | **Кратность различий с контрольным вариантом, балл** |
| **контроль** | 23,67±0,33 | 10,84 |  |
| **П1** | 10,00±1,00 | 23,67 | 2,4 |
| **П2** | 7,67±1,20 | 23,42 | 3,1 |
| **П3** | 9,33±1,33 | 19,04 | 2,5 |

**Рис.1. Митотический индекс в меристеме *Allium cepa***

При воздействии трёх изученных концентраций пестицида «Протон» митотический индекс значительно снижается по сравнению с контрольным уровнем. Различия между контролем и опытом достоверны при воздействии пестицида во всех изученных концентрациях. Из этого мы можем сделать вывод о том, что пестицид «Протон» обладает генотоксичностью (индуцирует митотоксический эффект) и вызывает нарушение деления клеток меристемы. Наибольшее снижение митотической активности меристемы зарегистрировано при концентрации пестицида 0,5 мг/мл, доля митозов снизилась в три раза (MI составил 10,00±1,00%). Различия между контролем и опытом достоверны при p<0,05. При концентрации пестицида до 1 мг/мл и 0,24 мг/мл количество делящихся клеток также достоверно снижается, но менее значительно до 7,67±1,20% и 9,33±1,33% соответственно.

## 1.2.3. Индексы фаз митоза в меристеме *Allium cepa* при воздействии пестицида «Протон»

Результаты изучения индексов фаз митоза в меристеме Allium cepa при воздействии пестицида «Протон» представлены в таблице 4 и на рис. 2.

**Таблица 4**

**Индексы фаз митоза в меристеме *Allium сepa* воздействии различных концентраций пестицида «Протон»**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Вариант опыта** | **ПИ,%** | **МИ,%** | **А-ТИ,%** |
| **Контроль** | 43,66±2,82 | 28,17±1,41 | 28,17±3,73 |
| **П1** | 43,33±8,82 | 16,67±3,33 | 40,00±5,77 |
| **П2** | 34,78±8,70 | 17,39±4,35 | 47,83±8,70 |
| **П3** | 35,71±9,45 | 17,86±7,14 | 46,43±9,45 |

**Рис. 2. Индексы фаз митоза при воздействии пестицида «Протон».**

Индексы фаз митоза позволяют судить нам о нарушении митотического индекса. Мы наблюдаем, что во всех изученных нами концентрациях происходит снижение индекса анателофаз. Из этого мы может сделать вывод о том, что происходит нарушение прохождения клетками данной стадии митоза, например, могут быть нарушено движение хромосом на ахроматиновом веретене, которое может быть обусловлено негативным влиянием на процессы сборки веретена деления, недостаточным количеством энергии для прохождения данного процесса, повреждением кинетохоров хромосом и др. Данные нарушения приводят к значительному снижению доли ана-телофаз.

# Выводы

1. Спонтанный митотический индекс составил 23,67±0,33%, что значительно выше показателей по литературным данным и может быть связано с различиями во времени фиксации материала. Индексы фаз митоза в контрольном варианте показывают, что доля клеток на различных стадиях деления составила: профаза - 43,66±2,82%; метафаза - 28,17±1,41%; ана-телофаза - 28,17%±3,73%.
2. Воздействие пестицида «Протон» во всех изученных концентрациях достоверно снижает митотический индекс в меристеме *Allium сepa*, следовательно, пестицид обладает генотоксической активностью.
3. Наибольший уровень снижения пролиферативной активности меристемы (в 3,1 раза) зарегистрирован при концентрации пестицида 0,5 мг/мл. При концентрации до 1 мг/мл и 0,24 мг/мл доля делящихся клеток также снижается, но менее значительно до 7,67±1,20% и 9,33±1,33% соответственно.
4. Индексы фаз митоза изменяются при воздействии пестицида на меристему во всех изученных концентрациях, происходит задержка прохождения клетками ана-телофазы, что может быть связано с негативным влиянием на процессы сборки веретена деления, недостаточным количеством энергии для прохождения данного процесса, повреждением кинетохоров хромосом и др.

# Список использованной литературы.

1. Иванов В.И. Генетика. Учебник для вузов. – М.:ИКЦ «Академкнига», 2006. С. 226-234.
2. Изменчивость. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://studfiles.net/](https://studfiles.net/%20)(дата обращения: 21.03.2018)
3. Кукушкина Е.В., Кукушкин И.А. Мутагены и их влияние на генетическую безопасность человека и окружающей среды. - Комсомольск-на-Амуре: Изд-во АмГПГУ, 2012. С. 122-124.
4. Пестициды. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/>(дата обращения: 17.11.2017).
5. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.: ЯрГУ, 2005. С. 8-53.
6. Саратовских Е. А., Глазер В. М. Костромина Н. Ю., Котелевцев С.В. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к образованию комплексов с ДНК. – Т.5. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Черноголовка: ИПХФ РАН, 2007. 9 с.
7. Яблоков А.В. О концепции популяционного груза. – М.: ФБГУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 2015.С. 11- 15.
8. Исследование токсического и генотоксических эффектов синтетических пищевых красителей методом Allium test // Ярославский педагогический вестник. 2012. №3. 8 с.
9. Комплексная балловая система оценки воздействия микроорганизмов на пролиферацию клеток корневой меристемы Allium cepa L. // Фундаментальные исследования 2015. №7. 4 с.
10. Экологическая генетика. Что это такое? // Соросовский образовательный журнал. 1998. №2. 7 с.

# Приложение

# Обзор литературы

## 1.1. Мутации

### 1.1.1. Классификация мутаций

Мутации - это наследуемые изменения генетического материала. Существует несколько типов классификации понятия «мутация».

1. **По характеру изменения генома:**
   1. Геномные мутации-изменения числа хромосом.
   2. Хромосомные мутации/хромосомные перестройки-изменения структуры хромосом.
   3. Генные мутации-изменения генов.
2. **По проявлению в гетерозиготе:**
   1. Доминантные мутации.
   2. Рецессивные мутации.
3. **По уклонению от нормы или так называемого дикого типа:**
   1. Прямые мутации
   2. Реверсии. Иногда говорят об обратных мутациях, однако очевидно, что они представляют собой только часть реверсий, поскольку в действительности широко распространены так называемые супрессорные мутации.
4. **В зависимости от причин, вызывающих мутации:**
   1. Спонтанные, возникающие без видимой причины, т.е. без каких-либо индуцирующих воздействий со стороны экспериментатора.
   2. Индуцированные мутации.

Данные способы классификации изменений генетического материала имеют универсальное значение. Подходы в этих способах классификации отражают существенную сторону возникновения или проявления мутаций у любых организмов: эукариот, прокариот и их вирусов.

Рассмотрим более частные подходы к классификации мутаций:

1. **До локализации в клетке:**
   1. Ядерные
   2. Цитоплазматические. В этом случае обычно подразумевают мутации неядерных генов.
2. **По отношению к возможности наследования:**
   1. Генеративные, происходящие в половых клетках.
   2. Соматические, происходящие в соматических клетках.

Два последних способа классификации мутаций применимы только к эукариотам, а рассмотрение мутаций с точки зрения их возникновения в соматических или половых клетках имеет отношение только к многоклеточным эукариотам.

Хромосомные и геномные мутации выражаются также в изменении характера наследования признаков.[[4]](#footnote-4)

### 1.1.2. Генные мутации

Генные мутации представляют собой изменение числа и/или последовательности нуклеотидов в структуре ДНК (вставки, выпадения, перемещения, замещения нуклеотидов) в пределах отдельных генов, приводящие к изменению количества или качества соответствующих белковых продуктов.[[5]](#footnote-5)

Генные мутации включают в себя делеции и инсерции нуклеотидов.

Существует три типа мутантных кодонов, к которым приводит замена оснований:

1. С изменённым смыслом (миссенс-мутации).
2. С неизменённым смыслом (нейтральные мутации).
3. Бессмысленные или терминирующие кодонов (нонсенс-мутации).

Вставки, перемещения или выпадения отдельных оснований или их коротких последователей в пределах гена вызывают сдвиг рамки считывания. Воздействия данных мутаций были изучены при анализе аминокислотной последовательности белков фага Т4, кодируемых геном дикого типа *е+* и тремя разными мутантными генами *е*, содержащими взаимно супрессирующиефреймшифт (сдвигающие рамку считывания)- мутации. В ходе исследования выяснилось, что некоторые единичные мутации являются следствием одновременных изменений нескольких соседних нуклеотидов. И, скорее всего, единичная мутация со сдвигом рамки возникает в результате вставки двух соседних нуклеотидов, а не одного. При возникновении мутаций со сдвигом рамки считывания меняются все триплеты ниже сайта дупликации или делекции по ходу считывания, при этом повышается вероятность возникновения стоп-кодонов и, соответственно, терминации трансляции.

С точки зрения структурно-функциональной организации генов, происходящие внутри них замены, вставки, выпадения, перемещения нуклеотидов можно объединить в следующие группы:

1. **Мутации в регуляторных областях генов**
   1. Мутации в промоторной части (например, регуляторном элементе с последовательностью PuCPuCCC и внутри TATA-бокса у гена β-глобина) снижают уровень синтеза белкового продукта.
   2. Мутации в сайте полиаденилирования снижают уровень транскрипции (характерно для афроамериканцев, страдающих β-талассемией)

В итоге, мутации в регуляторных 5’ и 3’-нетранслируемых областях генов оказывают огромные изменения полученных продуктов и проявляются фенотипически (клинически), но это зависит от порогового уровня белков, при котором их функция ещё сохраняется.

1. **Мутации в кодирующих областях генов**
   1. Мутации в экзонах могут приводить к преждевременному окончанию белкового синтеза. Именно это происходит, к примеру, в случае β-талассемии: в результате мутаций внутри экзона гена гемоглобина белковая цепь оказывается укороченной и не обладает активностью.
   2. Мутации в интронах способны генерировать новые сайты сплайсинга. Которые, конкурируя с нормальными (исходными), в итоге, заменяют их. Возникновение замен в гене гемоглобина, замедляющих сплайсинг, известно и для β0-,и для β+-талассемии.
   3. Мутации в сайтах сплайсинга (на стыках экзонов и интронов), нарушают процессинг первичного РНК-транскрипта и приводят к трансляции бессмысленных белков: удлинённого при неправильном вырезании интронов либо укороченного при вырезании экзонов. Так, в результате одиночных замен в донорском участке сплайсинга гена гемоглобина процессинг нарушается, это приводит к развитию β0-или β+ - талассемии. Мутация сдвига рамки считывания в акцепторном участке сплайсинга гена *ХРА* приводит к полной инактивации белка и ,как следствие, к развитию тяжёлой формы пигментной ксеродермы.

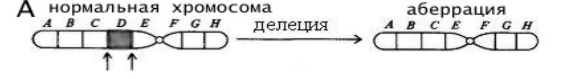
Замены нуклеотидов, в кодирующих областях генов, не сопровождающиеся заменами аминокислот в силу вырожденности генетического кода, приводят к нейтральным мутациям, не оказывающим заметного влияния ни на функцию соответствующего белка, ни на его структуру.

### 1.1.3. Хромосомные мутации

Хромосомные мутации (или их ещё называют хромосомные аберрации/хромосомные перестройки) -изменение структуры хромосом: уменьшение или увеличение их размеров или изменения положения их частей.[[6]](#footnote-6)

Хромосомные аберрации подразделяются на несколько типов:

1. Делеции - потеря участка хромосомы размером более одного гена.

[[7]](#footnote-7)

Делеции бывают концевыми или интерстициальными.

Концевая хромосомная делеция возникает из-за одного разрыва в стадию G1. В результате данного типа делеции наблюдается укороченность исходной формы хромосомы и два ацентрических фрагмента, расположенные рядом с хромосомой или вдали от неё. Хроматидная делеция возникает в результате разрыва в период G2. В результате данного типа делеции возникает хромосома с разными длинами хроматид, а делетированный участок расположен рядом с комплементарным сегментом целой хроматиды. Интерстициальная хромосомная делеция возникает в результате выпадения серединного участка хромосомы в результате двух разрывов на стадии G1. В результате данного типа делеции образуется укороченная хромосома, и за счёт «липких концов» и парные ацентрические кольца. Эти кольца, объединяясь, образовывают одно большое кольцо. Если делеция захватит район центромеры, то образуются парные центрические кольца и два ацентрических фрагмента. Во время данного типа делеции, возникает хромосома с разными по длине хроматидами. Делетированный участок даст ацентрическое кольцо.[[8]](#footnote-8)

Делеция-наиболее частая аберрация, регистрируемая при воздействии мутагенных факторов.

Делеции могут быть зарегистрированы:

1. Методом метафазного анализа делеции обнаруживаются по укорочению хромосомы и образованию фрагментов.
2. Методом ана-телофазного анализа делеции регистрируются по образованию фрагментов.
3. Во время профазы мейоза I: при конъюгации комплементарный делетированному участку сегмент образует петлю.
4. В интерфазу делеция обнаруживается по наличию микроядер.
5. На гигантских хромосомах делеция выявляется по наличию петли в участке хромосомы, соответствующем делетированному участку.

Примером этого типа хромосомных мутаций может послужить делеция , получившая название мутации Notch, фенотипически проявляющаяся в зазубренности края крыла у дрозофилы.

1. Дупликации - это удвоение участка хромосомы.

[[9]](#footnote-9)

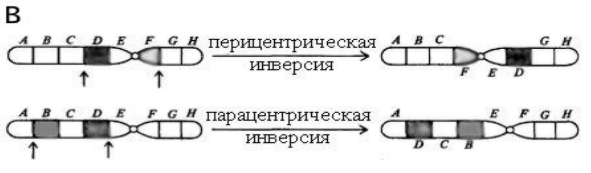
Главной причиной дупликаций является неравный кроссинговер. Он имеет место только в том случае, если на некотором участке хромосомы гомологичные локусы при коньюгации в профазе 1 мейоза сдвигаются друг относительно друга на некоторое расстояние.

Дупликации регистрируются:

1. Метафазным анализом выявляются только крупные дупликации по изменению морфологии хромосом.
2. Ана-телофазным анализом не выявляются.
3. В мейозе во время конъюгации дуплицированный участок образует петлю.
4. В интерфазу дупликации не обнаруживаются

Примером дупликации служит мутация Bar, обнаруженная у дрозофилы.

1. Инверсии-перестройки, суть которых - поворот на 180ͦ участка, образовавшегося в результате двух разрывов, с соответствующим изменением расположения генов.

[[10]](#footnote-10)

Хромосомная инверсия возникает в результате двух разрывов в одной хромосоме и поворота участка хромосомы на 180ͦ .

Инверсии выявляются:

1. Метафазный анализ выявляет перецентрические инверсии по изменению морфологии хромосом.
2. При ана-телофазном анализе инверсия выявляется в случае кроссинговера в инвертированном участке.
3. В мейозе инверсия обнаруживается по наличию инверсионной петли.
4. На политенных хромосомах инверсия выявляется по изменению рисунка дисков и по наличию инверсионной петли.
5. Транслокации-это перенос генетического материала одной хромосомы на другую негомологичную хромосому.

[[11]](#footnote-11)

Транслокации относятся к межхромосомными перестройками и являются результатом двух разрывов –по одному в паре негомологичных хромосом.

Транслокации могут возникать за счёт соединения центрика одной хромосомы с ацентрическим фрагментом другой хромосомы. Данный тип обмена носит название –симметричный.

Транслокации так же может возникнуть за счёт соединения центрического участка одной хромосомы с центрическим участком другой негомологичной хромосомы (ацентрические участки этих хромосом также соединяются). Данный тип обмена носит название –асимметричный.

Транслокации выявляются:

1. Метафазным анализом по изменению морфологии хромосом.
2. Ана-телофазным анализом по наличию фрагментов и мостов.
3. Во время мейоза транслокации выявляются по наличию транлокационного креста, который образуется при конъюгации исходных хромосом и хромосом с транлокацией.
4. В интерфазу транлокация выявляется по наличию микроядер.
5. На политенных хромосомах транслокация выявляется по изменению расположения дисков.

Примером транслокации может послужить один из вариантов болезни Дауна, обусловленный наличием такой сбалансированной трансолокации у одного из родителей. В этом случае хромосома 21-й пары транслоцирована на 15-ю пару. Таким образом, у этого человека будет 45 хромосом, так как 15-я и 21-я хромосомы составляют одну хромосому.

**1.1.4. Геномные мутации**

К этому классу мутаций относятся изменения кариотипа, выражающиеся в уменьшении/увеличении числа хромосомных наборов либо числа отдельных хромосом. Существует несколько типов геномных мутаций.[[12]](#footnote-12)

1. Гаплодия-уменьшение числа хромосом в кариотипе вдвое. Гаплодия возникает при воздействии генетически активных факторов среды.

Выявляется при мейозе: происходит случайное расхождение гамет к полюсам клетки, так как не образуются биваленты. Поэтому часто отмечается стерильность или снижение фертильности за счёт несбалансированности гамет.

Примером гаплодии могут послужить трутни у пчёл.

1. Полиплодия-изменение числа хромосом кратно гаплоидному набору (n).

Причины полиплодии–неравное расхождение хромосом к полюсам в анафазе, деление ядра без деления клетки (цитокинеза), удвоение хромосом без деления ядра.

Выявление полиплодии:

Во время мейоза образуются гаметы с нередуцированным числом хромосом.

Во время митоза нарушается расхождение хромосом.

Примером гаплодии-мягкая пшеница-Triticumaestivum.

1. Анеуплодия-зменение числа хромосом не кратно n.

Причиной анеуплодии служит потеря в процессе мейоза хромосомы, не имеющей партнёра.

Выявляется анеуплодия в процессе мейоза: происходит потеря хромосомы, не имеющей партнёра.

Пример анеуплодии: гетероплодия, которую обнаружил Бриджес у дрозофилы. У мух было вместо двух три половые хромосомы.

## 1.2. Понятие и классификация мутагенов

Мутагены – это факторы среды, повышающие спонтанную частоту мутаций во много раз.[[13]](#footnote-13)

Классификация мутагенов:

1. Эндогенные-мутагены, образующиеся в процессе жизнедеятельности организма (например, мутации могут возникать под влиянием свободных радикалов). Свободные радикалы - это атомы или группа атомов, которые содержат по крайней мере, один непарный электрон. А если электрон непарный, другой атом или молекула с лёгкостью присоединяются к нему. Возникает химическая реакция, способная принести большой вред организму. Свободные радикалы обычно присутствуют в организме в небольших количествах, и здоровый организм контролирует их. Некоторые свободные радикалы производятся иммунной системой. Они разрушают вирусы и бактерии. Другие свободные радикалы участвуют в производстве важных гормонов и активизации необходимых для жизни ферментов. Свободные радикалы нужны организму для производства энергии и разнообразных субстанций, в которых он нуждается.

Обычно количество свободных радикалов контролируется действием поглотителей свободных радикалов, образующихся в организме естественным путём. Эти поглотители или антиоксиданты нейтрализуют свободные радикалы, связывая их свободные электроны. В качестве антиоксидантов выступают: ферменты, которые постоянно синтезируются организмом; некоторые витамины и микроэлементы (А, С, Е, бета-каротин, селен);гормон мелатонин; некоторые травы (черника, гинкго билоба, экстракт виноградных косточек, зелёный чай). Многие антиоксиданты можно получать с пищей, например, употребляя пророщенное зерно, свежие фрукты и овощи. Однако на сегодняшний день, когда окружающая среда очень сильно загрязнена, этого недостаточно. Поэтому необходим дополнительный приём антиоксидантов, сводящих к минимуму воздействие свободных радикалов.

1. Экзогенные –различные и многочисленные факторы внешней среды.

Например: радиационное излучение, алкилирующие агенты, окислители, многие вирусы.[[14]](#footnote-14)

## 1.3. Мутагенное загрязнение окружающей среды и его негативные последствия

Загрязнение окружающей среды оказывает негативное воздействие на живые организмы, в том числе и на человека.

Среди загрязнителей окружающей среды особую опасность представляют генотоксиканты.

Это факторы, вызывающие как повреждения структуры ДНК, так и нарушения генетических процессов, косвенно влияющих на выход мутаций.

Наиболее опасные генотоксиканты-диоксины, фураны, полихлорированныебифенилы, пестициды и инсектициды, тяжёлые металлы. Это суперэкотоксиканты –стойкие органические соединения, распространённые в окружающей среде, высокоустойчивые к разложению и способные мигрировать по пищевым цепям.

Особая опасность генотоксикантов заключается в том, что их эффект не прекращается с гибелью организма, подвергшегося воздействию, поскольку наследственные структуры передаются потомству, то отдалённые негативные последствия проявятся и в следующих поколениях. Образующиеся в результате действия генотоксикантов вредные мутации составляют генетический груз популяции.

Распространение мутагенов в окружающей среде чревато повышением частоты мутаций, а следовательно, увеличением генетического груза человечества, что в свою очередь влечёт за собой физические страдания больных, ставит сложные моральные проблемы перед обществом и, наконец, ложится на его плечи тяжёлым экономическим бременем.[[15]](#footnote-15)

## 1.4. Методы оценки мутагенов

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

Существует несколько классификация методов для оценки мутагенов:

1. **Бактериальные тест-системы для выявления мутагенов.**

Преимущества:

1. Бактерии одноклеточные организмы с высокой скоростью размножения, поэтому даже редкие мутации, встречающиеся с частотой 1x10-6 , могут быть зарегистрированы.
2. Генетика бактерий хорошо изучена, методы культивирования дешёвые, не требуют больших затрат и площадей.
3. Получены штаммы, обладающие высокой чувствительностью ко многим мутагенам.
4. Методы с использованием бактерий краткосрочны.

Наиболее широко в генетической токсикологии используется

*метод учета обратных мутаций у Salmonellatyphimurium.*

Штаммы дикого типа (прототрофы) способны к синтезу всех необходимых аминокислот из неорганического азота, если в среде есть источник углерода, например глюкоза. Б. Эймсом с соавторами получены штаммы *Salmonellatyphimurium*, имеющие генную мутацию в гистидиновом опероне, препятствующую синтезу аминокислоты гистидина. Такие штаммы (их обозначают his–)являются ауксотрофами по гистидину.

Недостатком метода является то, что он выявляет только прямые мутагены и не выявляет промутагены.[[16]](#footnote-16)

1. **Эукариотические микроорганизмы как тест-объекты для выявления мутагенов**

Тесты с использованием одноклеточных эукариот обладают всеми преимуществами, свойственными бактериальным тестам:

1. Бактерии одноклеточные организмы с высокой скоростью размножения, поэтому даже редкие мутации, встречающиеся с частотой 1x10-6 , могут быть зарегистрированы.
2. Генетика бактерий хорошо изучена, методы культивирования дешёвые, не требуют больших затрат и площадей.
3. Получены штаммы, обладающие высокой чувствительностью ко многим мутагенам.
4. Методы с использованием бактерий краткосрочны.

Вместе с тем эукариотические организмы ближе на эволюционной лестнице к высшим млекопитающим, и, следовательно, экстраполяция данных более обоснована.[[17]](#footnote-17)

1. **Метафазный анализ**

Преимущества данного метода оценки мутагенов:

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

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

Метафазный анализ является обязательным компонентом систем, предназначенных для проверки факторов внешней среды на мутагенную активность.[[18]](#footnote-18)

1. **Микроядерный тест**

Метафазный анализ хромосом требует высокой квалификации исследователя, что значительно удорожает исследование. Микроядерный тест в силу простоты и возможности быстрого анализа стал одним из распространенных скриниговых тестов в генетической токсикологии.

Особенность данного метода в том, что его можно применять для оценки не только индивидуальных факторов, но и для оценки генотоксической ситуации территорий, изучая микроядра в костном мозге или крови животных, обитающих на данных участках. Микроядерный тест на рыбах используется для оценки загрязнения водной среды.[[19]](#footnote-19)

1. **Сестринские хроматидные обмены**

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

Поскольку сестринские хроматиды абсолютно идентичны друг другу, выявить сестринский хроматидный обмен цитогенетическими методами невозможно. Вместе с тем известно, что мутагены и канцерогены вызывают разрывы в хромосомах. Первым этапом возникновения как кроссинговера, так и генных и хромосомных мутаций является именно разрыв. Следовательно, если фактор повышает частоту кроссинговера, значит, он способен вызывать и мутации.

СХО происходят в десятки раз чаще, чем хромосомные аберрации, следовательно, метод регистрации СХО, был бы значительно чувствительнее, чем метод учета хромосомных аберраций. Но чтобы зарегистрировать СХО, нужно, чтобы две сестринские хроматиды отличались друг от друга. Это было достигнуто введением к культуру клеток аналога тимина – бромдезоксиуридина (БДУ). Клетки в присутствие БДУ проходят два деления, и в синтезированной ДНК вместо тимина будет включаться БДУ. Хроматиды, включившие БДУ, выглядят на окрашенных препаратах более светлыми, поэтому СХО будут видны как переместившиеся светлые и темные участки.[[20]](#footnote-20)

1. **Политенные хромосомы**

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

Благодаря этим свойствам политенные хромосомы являются прекрасным материалом для обнаружения и локализации всех типов хромосомных перестроек: инверсий, делеций, дупликаций, транслокаций.[[21]](#footnote-21)

1. Яблоков А.В. О концепции популяционного груза. – М.: ФБГУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 2015. – С. 11- 15. [↑](#footnote-ref-1)
2. Пестициды. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/>(дата обращения: 17.11.2017). [↑](#footnote-ref-2)
3. Саратовских Е. А., Глазер В. М. , Костромина Н. Ю., Котелевцев. С. В. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к образованию комплексов с ДНК. – Т.5. – М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Черноголовка.: ИПХФ РАН, 2007. [↑](#footnote-ref-3)
4. Изменчивость. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://studfiles.net/](https://studfiles.net/%20)(дата обращения: 21.03.2018) [↑](#footnote-ref-4)
5. Иванов В.И. Генетика. Учебник для вузов.-М.:ИКЦ «Академкнига», 2006. 234 с. [↑](#footnote-ref-5)
6. Иванов В.И. Генетика. Учебник для вузов.-М.:ИКЦ «Академкнига», 2006. 226 с. [↑](#footnote-ref-6)
7. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 22 с. [↑](#footnote-ref-7)
8. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 24 с. [↑](#footnote-ref-8)
9. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 22 с. [↑](#footnote-ref-9)
10. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 22 с. [↑](#footnote-ref-10)
11. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 22 с. [↑](#footnote-ref-11)
12. Иванов В.И. Генетика. Учебник для вузов.-М.:ИКЦ «Академкнига», 2006. 222 с. [↑](#footnote-ref-12)
13. Кукушкина Е.В., Кукушкин И.А. Мутагены и их влияние на генетическую безопасность человека и окружающей среды - Комсомольск-на-Амуре: Изд-во АмГПГУ, 2012. 122 с. [↑](#footnote-ref-13)
14. Кукушкина Е.В., Кукушкин И.А. Мутагены и их влияние на генетическую безопасность человека и окружающей среды - Комсомольск-на-Амуре: Изд-во АмГПГУ, 2012. 124 с. [↑](#footnote-ref-14)
15. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 53 с. [↑](#footnote-ref-15)
16. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 43 с. [↑](#footnote-ref-16)
17. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 46 с. [↑](#footnote-ref-17)
18. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 47 с. [↑](#footnote-ref-18)
19. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 49 с. [↑](#footnote-ref-19)
20. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 50-51 с. [↑](#footnote-ref-20)
21. Прохорова И.М., Ковалёва М.И., Фомичёва А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. – Яросл.:ЯрГУ, 2005. 52 с. [↑](#footnote-ref-21)