

### ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Гогуа М.Л., Абхазский государственный университет, Сухум, Абхазия

В настоящее время существует ясное понимание опасностей, грозящих биосфере в результате побочных отрицательных последствий научно-технического прогресса. Проблема генетической безопасности приобрела актуальность после представления Меллером в 1927 году данных, неопровержимо доказывающих способность рентгеновских лучей вызывать мутации у дрозофилы (Muller, 1927). После этого открытия мутагенез, индуцированный рентгеновскими лучами господствовал почти во всех областях генетики. Были разработаны методы регистрации эффектов, позволивших установить мутагенный эффект всех типов ионизирующего излучения.

Вскоре после открытия радиационного мутагенеза был установлен мутагенный эффект этиленмина (Рапопорт, 1946), пирита и его аналогов (Auerbach, Robson, 1944; 1947). Это привело к широкому фронту исследований по химическому мутагенезу, широта которого определялась возрастающей химической нагрузкой на биосферу. По данным Chemical Abstract Servis в настоящее время зарегистрировано 19 миллионов органических и неорганических соединений. Более 3,5 миллиона химических соединений включены в различные каталоги в качестве коммерчески доступных и список этот постоянно возрастает.

Помимо соединений с общетоксическим, тератогенным, эмбрио- и гистотоксическим действием среди них могут быть генотоксиканты, вызывающие целый спектр различных повреждений наследственных структур всех видов живых организмов. Мутации в половых клетках являются причиной возникновения болезней в последующих поколениях (Фогель, Мотульски, 1990). Мутации в соматических клетках приводят к возникновению злокачественных опухолей. Существует класс химических соединений так называемых соматических мутагенов, которые вызывают мутации в соматических клетках, но не в половых (Adler, Ashby, 1989; Adler et al., 1989). Существуют также негенотоксические канцерогены, к числу которых относят, например, гормоны, иммунодепрессанты, т.е. те вещества, которые не участвуют в инициации злокачественных опухолей, а стимулируют процесс новообразований на более поздних стадиях промоции и прогрессии опухолей (Тарасов, 1994; Weisburger, Williams, 1981; Butterworth, 1990). Среди всех обозначенных классов наибольшую долю канцерогенов составляют генотоксиканты.

Особая опасность генотоксикантов и основная сложность в их выявлении заключается в значительной отдаленности во времени биологических последствий их воздействия. Рецессивные мутации в половых клетках могут проявиться в течение десятков поколений (Фогель, Мотульски, 1990). Злокачественные опухоли, результат мутаций в соматических клетках, возникают спустя более 10 лет после действия мутагена (Voice, Monson, 1977). В связи с этим остро встает проблема генетической безопасности окружающей среды и увеличение генетического груза человека в частности.

Несмотря на множество работ по химическому мутагенезу в настоящее время нет ни одного химического соединения, которое можно было бы считать мутагеном со 100 %-ной вероятностью и, соответственно, наоборот ни одно соединение стопроцентно нельзя считать немутагенным для человека. Это обусловлено невозможностью проведения прямых экспериментов на человеке. Таким образом, все химические

Следует отметить, что можно считать потенциально опасными. Однако степень этой опасности определяется при определении степени генотоксичности результат во многом зависит от чувствительности методов, т. е. от чувствительности выбранной тест-системы. Было проведено более 200 краткосрочных тестов, где в качестве объектов используются клетки бактерий, эукариот, растения, клетки животных и человека. Химические мутагены обладают также специфичностью действия. Генотоксичность агента может значительно зависеть от вида, ткани и пола объекта (Bridges, 1988; Zeiger, Tennant, 1986). Так в 85 использованных тест-системах в 5-2 случаях химические вещества дают либо позитивные, либо негативные ответы в тест-системах, и напротив, примерно 85% их показывают позитивные ответы в других системах, негативные – в других (Mendelson, et al., 1992). В связи с этим целесообразным считается построение батареи тестов. На первом этапе тестирования используются оперативные и относительно «дешевые» тест-системы. В случае, когда на этом этапе результаты свидетельствуют о наличии мутагенной активности у испытуемых соединений, процедура тестирования продолжается на следующем этапе, который включает в себя более эффективные, но и более дорогостоящие тест-системы (Bridges, 1974; Flam, 1974; Бочков и др., 1975; Тарасов, 1984).

Среди химических веществ загрязнителей окружающей среды особое внимание следует уделить ионам тяжелых металлов, которые все больше вводятся в биосферу, накапливаются в ней и не разрушаются. Если ранее отрицательное действие тяжелых металлов испытывали лишь рабочие в промышленных условиях, то сейчас, за последние десятилетия тяжелых металлов в окружающей среде, круг лиц, на которых распространяется их действие, значительно расширился. Ионы тяжелых металлов вступают во взаимодействие с факторами окружающей среды, с органическими и неорганическими соединениями, меняют степени окисления, превращаясь из относительно безопасных в очень вредные и наоборот.

В данной работе проведен сравнительный анализ данных по изучению мутагенной активности тяжелых металлов с использованием трех растительных тест-систем, рекомендованных на первом этапе мониторинга: традесканции клона 02, скерды зеленой (*Crepis capillaris* L.) и сои (*Glycine max* (L.) Merrill).

Традесканция отличается высокой чувствительностью и восприимчивостью к действию облучения и химических мутагенов (Sparrow et al., 1974; Nauman et al., 1976, 1977; Yamaguchi, Tano, 1984; Шевченко, Померанцева, 1985, Tano, 1989), пригодна для обнаружения как водорастворимых, так и газообразных мутагенов (Cebulcka-Wasilewska, 1988).

*Crepis capillaris* L. – один из классических объектов современной генетики, исключительно удобный, поскольку отличается от других, до сих пор исследованных, низким числом хромосом ( $n=3$ ) с отчетливыми морфологическими особенностями индивидуальных хромосом. В литературе есть данные по обработке воздушно-сухих семян *Crepis capillaris* в течение 1 часа нитратами свинца и меди в концентрациях от  $10^{-2}$  до  $10^{-1}$  М их мутагенность проявилась только при концентрации  $10^{-1}$  М (Рупошев, 1976). Нитрат и хлорид кадмия в течение такого же периода времени обработки в концентрациях от  $10^{-1}$  М до  $10^{-3}$  М вызывали увеличение числа хромосомных aberrаций у *Crepis capillaris* в 2-3 раза по сравнению с контролем (Рупошев, Гарина, 1976; 1977). Сульфат цинка также вызывает повышение числа хромосомных aberrаций у *Crepis capillaris* в концентрации  $3 \cdot 10^{-2}$  М (Колумпаева, Ярещенко, 1989), а хлорид цинка – в концентрации  $10^{-2}$  М (Нысабаева, 1982). Токсичность соединений при таком времени обработки не была выявлена.

Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) дает возможность определять специфичность действия мутагенов, поскольку с ее помощью можно дифференцировать типы хромосомных нарушений, вызываемых мутагенами, а именно – соматический кроссинговер, хромосомные делеции, точковые мутации и нерасхождения хромосом (Nilan, Vig, 1973; Vig, 1975, 1978, 1982). Это единственная тест-система среди высших эукариотов, дающая возможность определить сразу несколько типов мутаций после однократной обработки и определить таким путем специфичность действия мутагенов. В литературе имеется много свидетельств о высокой чувствительности данной тест-системы к воздействию различных мутагенов (Vig, 1968, 1975, 1982). Наряду с этим есть данные о нечувствительности этой тест-системы в частности к бензо(а)пирену (Fuji, Inoue, 1985) и некоторым металлам (Vig, Mandeville, 1972). Так соединения трёх металлов –  $\text{AlK}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$  в высших испытанных концентрациях  $2,6 \cdot 10^{-4}$ ,  $3,1 \cdot 10^{-1}$  и  $3,3 \cdot 10^{-4}$  М соответственно, при времени обработки от 4 до 28 ч не проявили мутагенной активности в исследованиях с использованием сои (Vig, Mandeville, 1972). Однако металлы, входящие в состав этих соединений, не относят к числу тяжёлых, а вопрос об их мутагенности остаётся открытым.

В таблице приведены обобщенные литературные данные работ, в которых обработку тест-объектов растворами исследуемых солей металлов производили по общим методикам. Указаны самые низкие концентрации, при которых наблюдали токсический и мутагенный эффекты соединений металлов. В исследованиях на традесканции клона 02 учитывали соматические мутации в волосках тычиночных нитей в результате обработки соцветий растворами солей в течение 24 ч. За мутационное событие отмечали изменение пигментации от голубого к розовому в клетках тычиночных нитей. Токсический эффект проявлялся в виде почернения и высыхания листьев черенков, гибели практически всех бутонов. Меристематические клетки корешков *Crepis capillaris* L., обрабатывали в течение 42 часов растворами солей тяжелых металлов различной концентрации. Цитогенетический анализ проводили на метафазах давленных ацетокарминовых препаратов методом учета структурных аберраций хромосом (Дубинина, 1987). Цитотоксичность вызывала подавление митотической активности, что приводило к ограниченному росту корешков и их потемнению. Определение мутагенного действия испытываемых веществ на сое (*Glycine max* (L.) Merrill), вели путем учета и анализа пятен, появляющихся на листьях проростков в результате предварительной обработки семян растворами в течение 24 часов. При токсичности соединения наблюдалось снижение процента всхожести семян.

Иодид серебра является более сильным мутагеном для всех трех использованных тест-систем, чем нитрат серебра. Свинец, в виде иодида проявил значительную мутагенность во всех трех тест-системах, тогда как в виде нитрата не вызывал повышения уровня мутагенности ни на одной тест-системе. Среди элементов VI Б группы наибольшую активность проявил хром, меньшую молибден. Генотоксичность вольфрамата натрия была установлена лишь на *Crepis capillaris*, одной из трех использованных тест-систем. Это указывает на большую чувствительность данной тест-системы.

Для выявления степени генетической активности тяжелых металлов проведем сравнение их влияния с действием супермутагенов на эти тест-объекты. Необходимо отметить, что сравнения подобного рода могут быть только лишь количественными, так как существуют различия в механизмах действия супермутагенов и тяжелых металлов, зависящие от их структуры и реакционной способности. Сравнимые супермутагены являются алкилирующими соединениями S-зависимыми мутагенами.

Влияние солей тяжелых металлов на транссканцию клона 02, скерду зеленую (*Streps carillaris* L.) и сою (*Glycine max* (L.) Merrill)

№	Вещество	Транссканция клона 02			<i>Streps carillaris</i> L.			<i>Glycine max</i> (L.) Merrill		
		Токсич. конц. (M)	Мутаг. конц. (M)	Авторы	Токсич. конц. (M)	Мутаг. конц. (M)	Авторы	Токсич. конц. (M)	Мутаг. конц. (M)	Авторы
1	AgJ	—	$1,5 \times 10^{-8}$	Реутова, Шевченко, 1992	—	$1,5 \times 10^{-8}$	Реутова, Шевченко, 1991a	—	$1,5 \times 10^{-8}$	Реутова, Шевченко, 1993
2	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	$10^{-3}$	$10^{-5}$	Гоуга, 2001	$10^{-4}$	$10^{-8}$	Гоуга, 2001b	$10^{-2}$	$10^{-6}$	Гоуга, 2001b
3	AgNO <sub>3</sub>	—	$3 \times 10^{-5}$	Реутова, Шевченко, 1992	$10^{-5}$	$10^{-5}$	Реутова, Шевченко, 1991a	$3 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	Реутова, Шевченко, 1993
4	PbJ <sub>2</sub>	—	$1,5 \times 10^{-3}$	Реутова, Шевченко, 1992	$3,8 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-5}$	Гоуга, 2001b	—	$1,5 \times 10^{-3}$	Реутова, Шевченко, 1993
5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	$10^{-2}$	$10^{-2}$	Гоуга, 2000	$10^{-2}$	$10^{-5}$	Реутова, Шевченко, 1991b	—	$10^{-2}$	Реутова, Шевченко, 1993
6	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	—	—	Реутова, Шевченко, 1992	$10^{-1}$	$10^{-2}$	Гоуга, 2001a	—	—	Гоуга, 2001b
7	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—	—	Реутова, 2001	$4 \times 10^{-4}$	—	Реутова, Шевченко, 1991b	—	—	Реутова, 2001
8	CuJ	—	—	Реутова, 2000	$10^{-5}$	—	Реутова, 2001	—	—	Реутова, 2001
9	CuSO <sub>4</sub>	—	—	—	$10^{-4}$	—	Реутова, 2001	—	—	Гоуга, 2001b

Супермутагены оказали сильный мутагенный эффект в концентрациях, на несколько порядков превышавших концентрации растворов солей тяжёлых металлов. N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ) в концентрации от  $19,4 \cdot 10^{-3}$  до  $4,8 \cdot 10^{-3}$  М в 10-15 раз повышает спонтанный уровень мутаций на традесканции клона 02. Более низкие концентрации не вызывали значительный мутагенный эффект. Этиленимин (ЭИ) в концентрации  $46,5 \cdot 10^{-3}$  и  $11,6 \cdot 10^{-3}$  М вызывал повышение числа мутаций в 2-3,5 раз по сравнению с контролем (Реутова, Шевченко, 1992). Показано также, что зависимость частоты розовых клеток от дозы мутагена в клетках тычиночных волосков традесканции отличается для действия метилирующих агентов от действия этилирующих соединений. Метилирующие агенты имеют порог действия. Используемые этилирующие агенты не показали порога (Yamaguchi, Tano, 1984).

Сравнение действия тяжёлых металлов с алкилирующими соединениями, указывает на индивидуальность мутагенности последних и на общее генотоксическое действие тяжёлых металлов. Диэтилсульфат (ДЭС) в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М при длительности обработки 42 ч не вызывал повышения числа хромосомных aberrаций у *Crepis capillaris* L. по сравнению с контролем (Реутова, Шевченко, 1991). Это согласуется с другими литературными данными, в которых говорится, что ДЭС, вызывая большое количество генных мутаций, практически не влияет на число aberrаций хромосом у растений (Heiner et al., 1960; Hoffman, 1980).

Соли тяжёлых металлов вызывали пропорциональный рост всех типов пятен, что говорит об отсутствии специфического действия этих соединений. В отличие от них супермутагены обладают специфическим действием при обработке семян сои. ДЭС и ЭИ вызывают в основном точковые мутации, НММ – делеции хромосом. Супермутагены оказывали сильное мутагенное действие, повышая число пятен на лист в 4-20 раз по сравнению с контролем (Реутова, Шевченко, 1991). Однако такой высокий уровень мутаций при действии супермутагенов обнаруживался в высоких концентрациях, при которых металлы проявляли токсичность.

Так ДЭС вызывает мутагенный эффект при концентрации  $10^{-3}$  М. Более низкие концентрации этого соединения мутагенного влияния на сою не оказывали (Реутова, Шевченко, 1991).

#### ЛИТЕРАТУРА

Бочков Н.П., Шрам Р.Я., Кулешов Н. П., Журков В.С. Система оценки химических веществ на мутагенность: общие принципы, практические рекомендации и дальнейшие разработки // Генетика, 1975. №10. С. 156-169.

Гоуга М.Л. Исследование генотоксического потенциала соединений вольфрама и молибдена на традесканции клона 02 // Вестник Кабардино-Балкарского гос. университета. Нальчик, 2000. Вып.4. С. 28.

Гоуга М.Л. Исследование генотоксического потенциала соединений вольфрама и молибдена на растительных тест-системах // Тез. докл. III Международной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа». Нальчик, 2001а. С. 135-136.

Гоуга М.Л. Мутагенное влияние хрома на растительные тест-системы // Материалы XXIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. Новосибирск, 2001б. С. 50.

Гоуга М.Л. Мутагенное влияние молибдата и вольфрамата натрия на сою // Тез. докл. 2-ой Международной конференции молодых ученых и студентов. Самара, 2001в. С. 51-52.

Дубинина Л.Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaris*. М.: Наука, 1987. 187 с.

- Колупаева Т.В., Ярещенко И.А. К изучению мутагенного действия свинца и цинка на модельных объектах // Вестн. Харьк. ун-та, 1980. 195. С. 98-101.
- Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций // Докл. АН СССР, 1946. Т. 54. №1. С. 65-67.
- Реутова Н.В. Изучение мутагенного и токсического влияния соединений серебра и свинца на растительных тест-системах / Автореферат. ... дисс. канд. биол. наук. Москва, 1991. 23 с.
- Реутова Н.В. Мутагенное влияние иодидов и нитратов серебра и свинца // Генетика, 1993. Т. 29, № 6. С. 928-934.
- Реутова Н.В. Изучение мутагенного потенциала соединений меди и модификация эффектов йодистым серебром // Генетика, 2001. Т. 37. № 5. С. 617-623.
- Реутова Н.В., Шевченко В.А. Мутагенное действие неорганических соединений серебра и свинца на традесканцию // Генетика, 1992. Т. 28. № 9. С. 89-96.
- Реутова Н.В., Шевченко В.А. О мутагенном влиянии двух различных соединений свинца // Генетика, 1991. Т. 27. № 7. С. 1275-1278.
- Реутова Н.В., Шевченко В.А. Серебро как возможный мутаген // Генетика, 1991. Т. 27. № 7. С. 1280-1283.
- Рупошев А.Р. Цитологический эффект ионов тяжёлых металлов на семена *Crepis scollaris* L. // Генетика, 1976. Т. 12. № 3. С. 37-43.
- Рупошев А.Р., Гарина К.П. Мутагенное действие солей кадмия // Цитология и Генетика, 1976. Т. 10. № 5. С. 437.
- Рупошев А.Р., Гарина К.П. Модификация мутагенного эффекта этилнимина нитратом кадмия // Генетика, 1977. Т. 13. № 1. С. 32.
- Тарасов В.А. Принципы качественной и количественной оценки генетической опасности химических веществ // Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека: Межд. симп. М., 1994. С. 3-66.
- Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. М.: Мир, 1990. 378 с.
- Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985. 143-151 с.
- Adler I.D., Ashby J. // *Mutat. Res.* // 1989. V 212. P. 55.
- Adler I.D., Ashby J., Wurgler F.E. // *Mutat. Res.* // 1989. V 213. P. 23.
- Auerbach C., Robson J.M. Production of mutations by alkyl isothiocyanate // *Nature*, 1944. V. 154.
- Auerbach C., Robson J.M. The production of mutations by chemical substances // *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 1947. V 62. P. 271-283.
- Boice J.D., Monson R.R. Breast cancer in women after repeated fluoroscopic examinations of the chest // *J Natl. Cancer Inst.*, 1977. V. 59. № 3. P 823-832.
- Bridges B.A. The three-tier approach to mutagenicity screening and the concept of radiation – equivalent dose // *Mutat. Res.*, 1974. V. 26 P. 335-340.
- Bridges B.A. // *Mutat. Res.*, 1988. V. 205 P. 25.
- Butterworth B.E. // *Mutat. Res.*, 1990. V 229. P. 117.
- Fiam W.G. A tier sistem approach to mutagen testing // *Mutat. Res.*, 1974. V. 26. P. 321.
- Heiner R.E., Konzak C.F., Nilan R.A., Legault R.R. Diverse rations of mutations to chromosome aberrations in barley treated with diethyl sulphate and gamma rays // *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 1960. 46. №9. P. 1215-1221.
- Hoffman G.R. Genetic effects of dimethyl sulphate and related compounds // *Mutat. Res.*, 1980. 75. P. 63-129.

Mendelsohn M.L., Moore II D.H., Lohman P.H.M. A method for comparing and comparing short-term genotoxicity test data: Results and interpretation // *Mutat. Res.*, 1992. V. 266. P. 43-60.

Muller H.J. The problem of genetic modification // *Z. Ind. Abstammungs u. Vererbungslehre. Supp. 1: Verh. V. Intern. Congr. Vererbungswiss.*, 1927. S. 234-260.

Nauman C.H., Sparrow A.H., Schairer L.A. Competitive effects of ionizing radiation and two gaseous chemical mutagens on somatic mutation in one mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia* // *Mutat. Res.*, 1976. 38. P. 53-70.

Nauman C.H., Sparrow A.H., Underbrink A.G., Schairer L.A. Radiobiological protection: First Europ. Symp. On Radeguivalence. Publ. Of the Comiss. Of the Europ. Communistics: NEUR 5725E. 1977. P. 13.

Nilan R.A., Vig B.K. Plant test systems for detection of chemical mutagens // *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* Plenum Press., 1973. 4, №4. P. 143-170.

Sparrow A.H., Schairer L.A., Villalobos – Pietrini R. Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens // *Mutat. Res.*, 1974. 26. P. 265-276.

Vig B.K. Somatic mosaicism in plants with special reference to somatic crossing over // *Environ. health Persp.*, 1978. 27. P. 27-36.

Vig B.K. Somatic crossing over in higher plants // *Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology V. II.* Praeger Press., 1982. P. 26-54.

Vig B.K. Soybean (*Glycine max*): a new test system for study of genetic parametres of affected by environmental mutagens // *Mutat. Res.*, 1975. 31. P. 49-50.

Vig B.K., Mandeville W.E. Ineffectivity of metallic solts in induction of somatic crossing-over and mutations in *Glycine max L. (Merill.)* // *Mutat. Res.*, 1972. 10. №1. P. 151-155.

Vig B.K., Paddock E.F. Alteration by mytomicin C of spot friquencies in soybean leaves // *J. Heredity*, 1968. 59. №4. P. 225-230.

Weisburger J.H., Williams G.M. // *Food Cosmet. Toxicol.*, 1981. V. 19. P. 561.

Yamaguchi H., Tano S. Dose-responses in the induction of somatic mutations by genotoxic chemicals in the Tradeacantia: Stamen hair system – Problem of threshold in chemical mutagenesis. Tokyo, 1984. P. 41-47.

Yamaguchi H., Tano S. Dose-responses in the induction of somatic mutations by genotoxic chemicals in the Tradeacantia: Stamen hair system – Problem of threshold in chemical mutagenesis. Tokyo, 1984. P. 41-47.

Zeiger E., Tennant R. Genetic toxicology environmental chemicals. Part B. Genetic Effects and Applied Mutagenesis. Liss., 1986. V. 5. P. 75.