

© Л. В. Бондаренко,  
А. В. Дукельская

Санкт-Петербургский  
государственный университет,  
Санкт-Петербург

✿ Дана развернутая аннотация  
практикума «Методы тестиро-  
вания генетической активности  
факторов окружающей среды».  
Приведен список рекомендуемой  
литературы.

✿ **Ключевые слова:** экологическая  
генетика, генетическая токсиколо-  
гия, тест-системы, цитогенетиче-  
ские методы, практикум

## МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

### РАЗВЕРНУТАЯ АННОТАЦИЯ КУРСА

Одной из главных задач генетической токсикологии является разработка адекватных тест-систем для оценки генетической опасности действия химических соединений.

Между воздействием агента на организм и проявлением биологических последствий проходит большой промежуток времени, поэтому необходимы методики определения потенциальной мутагенной и канцерогенной активности как отдельных компонентов окружающей среды, так и их комплекса.

Тест-системы различаются по длительности времени дополучения первых результатов, информативности, стоимости, и в каждом конкретном случае надо выбирать, какие тесты использовать с учетом того, где проверяемые соединения используются, и как часто с ними контактирует человек. На первом этапе проверки применяются сравнительно недорогие краткосрочные тесты, которые позволяют учитывать частоту возникновения различных типов генетических повреждений у растений, животных, микроорганизмов. Подробно все тесты обсуждаются в курсах «Генетическая токсикология», «Экологическая генетика», «Механизмы модификационной изменчивости».

Постоянно идет разработка и внедрение новых методов тестирования, создаются компьютерные программы для определения потенциальной опасности соединений.

Для того, чтобы учесть все возможные эффекты физического или химического агента при его проверке используют батареи (набор) тестов, которые должны удовлетворять определенным требованиям. Тесты, включаемые в одну батарею, должны быть:

- *взаимодополняющими*, т.е. отличаться или по типу учитываемых нарушений, или по уровню биологической организации объекта исследований;
- *верифицированными* на соединениях с известной мутагенной активностью;
- *высокочувствительными, специфичными*;
- *обладать высокой пропускной способностью*.

Существуют методические рекомендации, разработанные фармакологическим комитетом, по использованию батарей тестов для проверки канцерогенной активности соединений, где приведены подробные протоколы проведения экспериментов на различных объектах.

Батареи тестов не являются жестко фиксированными, и для выявления одних и тех же эффектов существует ряд равноценных взаимозаменяемых тестов. Так, при выявлении генных мутаций можно применять либо тест Эймса на сальмонелле, либо равнозначные тесты на дрозофиле: рецессивные сцепленные с полом летальные мутации (РСПЛМ) или соматическую комбинацию.

Дрозофила как модельный объект генетической токсикологии широко используется при тестировании различных по механизмам действия агентов по следующим причинам:

- простота разведения в лабораторных условиях и относительная дешевизна компонентов питательных сред;
- короткий жизненный цикл, позволяющий оценивать последствия воздействий в ряду поколений;
- наличие разработанных тест-систем для учета различных типов генетических повреждений;
- возможность тестировать агенты, находящиеся в твердом, жидком и газообразном состоянии;

— наличие линий, различающихся по чувствительности к мутагенам, что позволяет оценивать роль генотипа в мутационном процессе.

В ходе проведения практикума студенты знакомятся с биологией дрозофилы, методами ее культивирования, выбирают способ воздействия агентом в зависимости от его физических и химических свойств. Для оценки генотоксического действия осваивают методы учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ), рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ), соматического мозаицизма, морфозов, аномалии структуры гонад, и после анализа полученных результатов делают вывод о генетической активности испытанных соединений.

В батарею тестов, кроме тестов на выявление генных мутаций включены цитогенетические методы анализа. Цитогенетические тесты студенты осваивают во второй части практикума. Данный практикум является составной частью специализированной лаборатории «Методы тестирования генетически активных факторов окружающей среды» и идеологически тесно связан с другими ее разделами. К этому практикуму студенты приступают в двенадцатом семестре шестого курса, уже имея опыт тестирования генетической активности ксенобиотиков с помощью генетических методов. Поэтому, целью данного раздела специализированной лаборатории является сравнение возможностей цитогенетических и генетических методов в мониторинге экологической напряженности окружающей среды. Особое внимание уделяется обсуждению со студентами необходимости правильного выбора методов исследования в зависимости от поставленной задачи, возможностей используемого тест-объекта и объема финансирования данного проекта.

Принимая во внимание разный уровень подготовки студентов к экспериментальной работе, существует набор цитогенетических методов, из которых можно выбрать наиболее соответствующие уровню навыков экспериментальной работы у конкретной группы студентов:

#### **Подсчет частоты аномалий головок спермиев.**

Это — один из наиболее простых (в освоении) методов, позволяющих делать выводы о генотоксичности исследуемого фактора. В качестве тест-объекта используются половозрелые самцы лабораторных мышей. В ходе освоения этого метода студентам предлагается приготовить цитологические препараты спермиев. При выполнении этой работы обсуждаются причины, обуславливающие существование спонтанного уровня аномалий спермиевых головок, проводятся параллели с процессами, протекающими в организме человека. Детально анализируется спектр аномалий и обсуждаются возможные последствия, к которым приводят отдельные типы аномалий. При сравнении данных, полученных в опытной и контрольной группе мышей, делается вывод о влиянии исследуемого фактора на сперматогенез тест-объекта.

#### **Учет частоты хромосомных аберраций**

а) На препаратах политеменных хромосом *D. melanogaster*

Это достаточно легкая в освоении методика требует приготовления давленных препаратов из слюнных желез личинок третьего возраста. В ходе экспериментальной работы, со студентами обсуждаются следующие вопросы: особенности структуры политеменных хромосом, их интерфазная природа, преимущества и недостатки использования данного типа хромосом для оценки генотоксичности факторов окружающей среды.

#### **б) Ана-телофазный метод**

Для использования этого метода при оценке генотоксических факторов окружающей среды студентам необходимо освоить методику приготовления давленных препаратов митотически делящихся клеток. В качестве тест-объектов используют самцов лабораторных мышей, водных и наземных представителей отряда *Isopoda*. В этих экспериментах обсуждаются следующие вопросы:

- понятие спонтанного уровня хромосомных нарушений. Факторы окружающей среды, от которых может зависеть этот уровень;
- частота индуцированных хромосомных нарушений;
- спектр анализируемых перестроек;
- возможности метода.

#### **в) Метафазный метод**

Самый трудоемкий для изучения из всех рассмотренных методов. Освоение данного метода можно предложить студентам, уже имеющим навыки цитогенетической работы. В качестве тест-объекта используют половозрелых самцов лабораторных мышей. Студенты готовят сухо-воздушные препараты митотических хромосом клеток костного мозга. Для подсчета частоты хромосомных перестроек используют хорошо расправленные пластинки митотических хромосом. При выполнении работы с использованием этого метода особенного внимания заслуживают следующие вопросы:

- изученность кариотипа тест-объекта как необходимое условие возможности применения этого метода;
- связь различных типов хромосомных перестроек со стадиями клеточного цикла. Хромосомные и хроматидные аберрации;
- преимущества и недостатки метода, по сравнению с ана-телофазным способом учета хромосомных аберраций;
- обсуждение универсальности метода, демонстрация различных типов хромосомных аберраций на препаратах митотических хромосом из периферической крови человека.

### **ПРОГРАММА КУРСА**

Специализированная лаборатория «Методы тестирования генетически активных факторов среды».

(11 и 12 семестры, 46 часов)

**Введение.**

Знакомство с тест-системами и методами обнаружения генотоксической активности ксенобиотиков с использованием микроорганизмов, растений, животных, культур тканей. Методы выявления генных мутаций, хромосомных aberrаций, повреждений ДНК.

**Тест-системы на *Drosophila melanogaster***

**Преимущества дрозофилы** как объекта для тестирования различных по механизмам действия агентов: простота разведения, дешевизна компонентов питательных сред, короткий жизненный цикл, наличие разработанных тест-систем для учета различных типов генетических повреждений.

**Этапы тестирования химических агентов:**

1. Выбор способа воздействия в зависимости от физических и химических свойств агента, обоснование необходимости постановки позитивного контроля (известный мутаген или облучение) и контроля без воздействия.
2. Оценка токсического действия соединения по выживаемости имаго, личиночной и куколочной смертности: построение кривой «доза-эффект» для 4–5 доз, определение ЛД<sub>50</sub>.
3. Оценка генотоксического действия агента: по частоте доминантных леталей, рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций, соматического мозаицизма.
4. Оценка тератогенного действия агента по частоте появления различных морфозов.
5. Изучение структуры гонад у самок и самцов после воздействия агента.
6. Статистическая обработка результатов.
7. Вывод о наличии или отсутствии генотоксических эффектов проверенных соединений.

**Цитогенетические методы в тестировании факторов окружающей среды.**

**Целью** данного раздела спецлаборатории является демонстрация студентам возможностей цитогенетического анализа в мониторинге экологической напряженности окружающей среды.

**Объекты:** дрозофила, равноногие раки, мышь.

**Цитологические показатели:**

- частота хромосомных aberrаций и методы их учета (метафазный, анафазный). Обсуждение достоинств каждого из методов и специфики их применения;
- частота аномалий головок спермиев.

В ходе проведения практикума студентам предоставляется возможность сравнить различные методы тестирования генетической активности по критериям простоты и удобства используемой системы, финансовым затратам, быстроты получения ответа и его адекватности применительно к разным объектам, в том числе и к человеку.

Работа поддержана грантом «Ведущие научные школы» НШ-7623.2006.4

**Литература**

1. *Ананьев Е. В.* Электронно-микроскопическая карта политенных хромосом слюнных желез дрозофилы (*D.melanogaster*) / Ананьев Е. В., Барский В. Е. — М.: Наука, 1985. — 85 с.
2. *Жимулев И. Ф.* Общая и молекулярная генетика / Жимулев И. Ф. — Из-во Новосибирского университета, Новосибирск, 2002. — 458 с.
3. *Медведев Н. Н.* Практическая генетика / Медведев Н. Н. — М., 1966.
4. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность. Методические указания. — Вильнюс, 1989. — С. 14.
5. *Шварцман П. Я.* Индуцированный соматический мозаицизм у дрозофилы как тест-система для оценки генетической активности факторов окружающей среды / Шварцман П. Я., Сондоре З. А. // Генетика. — 1975. — Т. 11, № 8. — С. 171.
6. A pilot study on a new *Drosophila* spot test / Graf U., Juon H., Katz A. J., Frei H. J. [et al.] // *Mut.Res.* — 1983. — Vol. 120. — P. 23311.
7. *Mollet P.* Induction and detection of mosaicism by MMS in the eye disc and female germ line of *Drosophila melanogaster* / Mollet P., Szabad J. // *Mut.Res.* — 1978. — Vol. 51. — P. 293.
8. *Sobels F. H.* The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage / Sobels F. H., Vogel E. // *Mut.Res.* — 1976. — Vol. 41, N 1. — P. 95.
9. *Vogel E. W.* Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages / Vogel E. W., Zijlstra J. A. // *Mut.Res.* — 1987. — Vol. 180. — P. 1897.
10. *Vogel E. W.* Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster* / Vogel E. W., Zijlstra J. F. // *Mut.Res.* — Vol. 182. — P. 243.
11. *Zimmering S.* Utility of *Drosophila* for detection of potential chemical mutagens / Zimmering S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1975. — Vol. 269. — P. 26.

**The genetic activity of environmental factors test-method**

*L. V. Bondarenko, A. V. Dukelskaya*

☼ **SUMMARY:** The detailed program of the special practice tutorial “The genetic activity of environmental factors test-method” is presented with the list of recommended literature.

☼ **KEY WORDS:** genetic toxicology, test-systems, ecological genetics, cytogenetic methods, practice