



УДК 575.116.12 : 504.5

А.Н. Тарасюк

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (РТУТИ, СВИНЦА). I. ИЗМЕНЕНИЕ ЧАСТОТЫ КРОССИНГОВЕРА У ДРОЗОФИЛЫ

Изучено влияние нитратов ртути и свинца на частоту кроссинговера в зоне у-*v* хромосомы I дрозофилы. Установлено, что данные соединения обладают генетической активностью и приводят к достоверному снижению частоты кроссинговера у дрозофилы, причём эффект зависит от концентрации действующих веществ и исследуемого сегмента хромосомы.

В настоящее время антропогенное загрязнение окружающей среды приобрело глобальный характер и поставило человечество на грань экологической катастрофы. В списке наиболее опасных и распространённых загрязнителей окружающей среды, включающем более 20 наименований, тяжёлые металлы занимают второе после пестицидов место [1]. Традиционно к тяжёлым относят металлы, имеющие атомную массу 40 и более [2]. Одни из них крайне необходимы для обеспечения жизнедеятельности человека и других живых организмов и называются биогенными. Другие вызывают противоположный эффект и приводят к отравлению или гибели (металлы-токсиканты). Наиболее опасными для живых организмов среди металлов-токсикантов считаются кадмий, медь, мышьяк, никель, ртуть и свинец [2]. На сегодняшний день производство ряда тяжёлых металлов-токсикантов (ртуть, свинец и др.) намного превысило величину их масс, участвующих в естественных процессах миграции металлов. Основным источником поступления соединений ртути в биосферу являются отходы промышленного производства, а свинца – выбросы автомобильных двигателей [1]. В биологических системах ртуть и свинец присутствуют в виде ионов, которые могут связываться с различными органическими веществами, образуя металлоорганические соединения, преобладающими формами которых являются метилртуть и метилсвинец [2]. Токсическое действие соединений свинца и ртути описано в ряде источников [1, 3, 4]. Однако вопросы генетической активности тяжёлых металлов и их соединений изучены недостаточно. Имеются лишь отдельные сообщения об их мутагенном действии, обнаруженном при изучении частоты хромосомных перестроек у лиц, проживающих на загрязнённых тяжёлыми металлами территориях [5, 6]. В то же время показателем генетической активности исследуемого фактора является не только его мутагенное, но и рекомбинационное действие [7]. Более того, в последнее время склоняются к точке зрения, что решающая роль в формировании генотипической изменчивости высших организмов принадлежит не мутациям, а мейотическим рекомбинациям [8]. Поскольку уровень рекомбинационной изменчивости, сложившийся в ходе эволюционного процесса, по-видимому, оптимален, всякое существенное его отклонение (как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения), можно признать нежелательным [9]. Изучение влияния антропогенных загрязнителей окружающей среды на рекомбинационную изменчивость необходимо для прогноза отдалённых последствий ухудшения экологического состояния биосферы.



МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований использовались две лабораторные линии *Drosophila melanogaster* из генетической коллекции кафедры зоологии и генетики Брестского государственного университета им. А.С. Пушкина:

1) 28 – мутантная линия, несущая три рецессивных сцепленных гена в хромосоме 1 (X): *y* (*yellow*) – жёлтое тело, локус 0; *cut* – обрезанные крылья, локус 20,0; *v* (*vermillion*) – ярко-красные глаза, локус 33,0;

2) Д18 – линия дикого типа, несущая доминантные аллели приведенных выше генов: y^+ – серое тело; cut^+ – нормальные крылья; v^+ – красные глаза.

Для расчета частоты кроссинговера между сцепленными генами *y*, *cut*, *v* проводилось скрещивание данных линий в направлении 28 × Д18. Полученные гибриды F₁ выращивались на стандартной питательной среде следующего состава: вода – 350 мл, дрожжи – 40 г, манная крупа – 13 г, сахар – 13 г, агар-агар – 4,5 г [10], в пенициллиновых флаконах с объёмом среды 5 мл. Опыт проводился в 5 повторностях.

В ходе эксперимента соли тяжёлых металлов (ртути, свинца) добавлялись непосредственно в питательную среду для выращивания дрозофилы в количествах, обеспечивающих их определённую концентрацию. Для проведения экспериментальных воздействий использовались нитраты свинца и ртути как соли, хорошо растворимые в воде. В качестве отправной точки для выбора концентраций действующих веществ брались предельно допустимые концентрации (ПДК) нитратов ртути и свинца, составляющие 0,005 и 0,1 мг/л соответственно [11]. Исследовалась также генетическая активность нитратов ртути и свинца в концентрациях, превышающих ПДК в 10, 100, 1000 и 10000 раз, а именно, для Hg(NO₃)₂ – 0,05; 0,5; 5 и 50 мг/л, для Pb(NO₃)₂ – 1, 10, 100 и 1000 мг/л. Действующие вещества добавлялись непосредственно в питательную среду, на которую помещались гибриды F₁. При этом вначале готовился раствор нитрата ртути (или свинца) с концентрацией, превышающей расчётную в 5 раз. Затем 1 мл этого раствора тщательно смешивался с 4 мл питательной среды. В контроле смешивался 1 мл дистиллированной воды с 4 мл питательной среды.

После того как питательная среда с заданными концентрациями нитратов ртути и свинца застывала, её поверхность смазывалась раствором дрожжей и в каждый пенициллиновый флакон сажались по 3 пары родительских особей в соответствии со схемой скрещиваний. При этом из линии 28, используемой в качестве материнского компонента скрещивания, отбирались девственные самки. После гибридизации самки откладывали яйца на питательную среду с повышенным содержанием нитрата ртути (свинца), на этой среде проходил полный цикл развития гибридов F₁, и действующие вещества беспрепятственно поступали в их организм. Поэтому мейоз у гибридных особей, процесс кроссинговера, предшествующие им события, а также постмейотический период проходили на фоне повышенных концентраций нитратов ртути и свинца, с действием которых мы и связываем все наблюдаемые эффекты.

Для самок F₁, выращенных на питательной среде с добавлением Hg(NO₃)₂ и Pb(NO₃)₂, проводилось анализирующее скрещивание. После выведения потомства (F_A), которое развивалось на чистой питательной среде, без добавления нитратов ртути и свинца, проводился полный количественный учёт всех 8 фенотипических классов (некроссоверных особей; особей, кроссоверных по генам *y* и *cut*; особей, кроссоверных по генам *cut* и *v*; двойных кроссоверов – всех по 2 класса). Частоты кроссинговера (*rf*) и их стандартные ошибки (*s_{rf}*) рассчитывались по общепринятым формулам [12].



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зона *y-v*, для которой оценивалась частота кроссинговера, располагается в теломерном участке хромосомы I дрозофилы и включает 2 сегмента: *y-cut* и *cut-v*. Частоты кроссинговера для опытных и контрольных вариантов рассчитывались как для отдельных сегментов, так и для зоны в целом.

Результаты изучения влияния нитрата ртути на частоту кроссинговера представлены в таблице 1. Как следует из полученных данных, при действии $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ в целом происходит снижение частоты кроссинговера, однако эффект зависит от концентрации действующего вещества и участка хромосомы. Наиболее существенное снижение **rf** – фактически 2-х кратное – отмечается для сегмента *cut-v* при концентрации нитрата ртути, в 100 раз превышающей ПДК (0,5 мг/л), причём эффект высоко достоверен ($P < 0,001$). Несколько меньшее снижение частоты кроссинговера наблюдается при концентрациях $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 и 5 мг/л (уровень значимости различий составляет 0,05). Для сегмента *y-cut* эффект снижения **rf** выражен в меньшей степени. Достоверные данные получены только при действии нитрата ртути в концентрации 0,05 мг/л ($P < 0,05$). Любопытно, что самая высокая концентрация $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (50 мг/л) не приводит к снижению частоты кроссинговера ни в одном из сегментов исследуемой зоны, хотя в целом для зоны, благодаря суммированию эффекта, отличия **rf** от контроля достоверны.

В целом, как видно из таблицы 1, все исследуемые концентрации $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, за исключением ПДК, приводят к достоверному снижению частоты кроссинговера в зоне *y-v* хромосомы I дрозофилы.

Таблица 1

Влияние различных концентраций нитрата ртути ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) на частоту кроссинговера в зоне *y-v* хромосомы I дрозофилы

Концентрация $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (мг/л)	Число проанализированных особей F_A	Частота кроссинговера ($rf \pm s_{rf}$), (%), между генами:		
		<i>y, cut</i>	<i>cut, v</i>	<i>y, v</i>
Контроль	322	$14,2 \pm 1,0$	$11,4 \pm 1,0$	$24,7 \pm 2,0$
ПДК (0,005)	650	$13,1 \pm 1,4$	$9,8 \pm 1,1$	$22,9 \pm 1,6$
0,05	594	$10,2 \pm 1,3^*$	$8,3 \pm 1,2^*$	$16,9 \pm 1,7^{**}$
0,5	677	$12,6 \pm 1,3$	$5,6 \pm 0,9^{***}$	$16,9 \pm 1,5^{**}$
5	525	$13,3 \pm 1,4$	$7,8 \pm 1,1^*$	$17,5 \pm 1,6^{**}$
50	471	$14,2 \pm 1,6$	$9,5 \pm 1,1$	$18,4 \pm 1,8^*$

Примечание: *, **, *** – отличия от контроля достоверны при $P < 0,05, 0,01, 0,001$ соответственно.



В таблице 2 представлены данные по влиянию нитрата свинца на частоту кроссинговера. Здесь только наиболее высокая концентрация $Pb(NO_3)_2$, 100 мг/л, превышающая ПДК в 1000 раз, приводит к достоверному снижению rf в сегменте $y - cut$ и зоне $y-v$ в целом ($P < 0,05$). Большинство других концентраций нитрата свинца, включая ПДК, также снижают частоту кроссинговера, однако результат их действия статистически не значим. При этом прослеживается тенденция к усилению эффекта с увеличением концентрации исследуемого вещества. Самая высокая концентрация $Pb(NO_3)_2$ (1000 мг/л) привела к гибели мух, что не позволило исследовать частоту кроссинговера.

Таблица 2

Влияние различных концентраций нитрата свинца ($Pb(NO_3)_2$) на частоту кроссинговера в зоне $y - v$ хромосомы I дрозофилы

Концентрация $Pb(NO_3)_2$ (мг/л)	Число проанализированных особей F_A	Частота кроссинговера ($rf \pm s_{rf}$), (%), между генами:		
		y, cut	cut, v	y, v
Контроль	431	$13,8 \pm 1,5$	$10,6 \pm 1,0$	$23,4 \pm 2,0$
ПДК (0,1)	648	$11,9 \pm 1,3$	$9,3 \pm 1,1$	$20,6 \pm 1,6$
1	688	$11,4 \pm 1,2$	$9,2 \pm 1,1$	$19,8 \pm 1,5$
10	718	$10,2 \pm 1,1$	$11,2 \pm 0,9$	$20,3 \pm 1,5$
100	621	$9,1 \pm 1,2^*$	$11,7 \pm 1,3$	$17,2 \pm 1,6^*$
1000	-	-	-	-

Примечание: * – отличия от контроля достоверны при $P < 0,05$.

Анализ представленных результатов исследований позволяет выявить некоторые закономерности влияния нитратов ртути и свинца на частоту кроссинговера у дрозофилы.

Во-первых, из сравнения приведенных данных следует, что действие $Hg(NO_3)_2$ характеризуется значительно более существенным эффектом, чем $Pb(NO_3)_2$, что свидетельствует о его более высокой генетической активности, а следовательно, и опасности для окружающей среды и обитающих в ней живых организмов.

Во-вторых, наблюдаются определённые различия в действии нитратов ртути и свинца на различные сегменты хромосом, что свидетельствует о явлении сегментоспецифичности. Это явление обнаружено нами не впервые: оно описано в ряде работ по



изучению влияния различных факторов на частоту кроссинговера [13]. По мнению исследователей, различия в реакции разных участков хромосом на действие внешних факторов могут быть связаны с особенностями ультраструктурной организации этих участков, то есть степенью компактизации хроматина, соотношением ДНК-белок, нуклеотидным составом ДНК и др. Эти различия могут также зависеть от положения сегмента на хромосоме.

Для объяснения особенностей реакции различных хромосомных сегментов на действие $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ представляется целесообразным привлечь основные положения гипотезы А.Д. Bateman, А.С. Chandley (1965) [14]. Согласно данной гипотезе, большинство внешних факторов оказывают влияние одновременно на два процесса, являющихся необходимой предпосылкой кроссинговера: на конъюгацию гомологичных хромосом и на формирование первичных одностранных разрывов в ДНК. Итоговая частота кроссинговера, которую мы наблюдаем в эксперименте, определяется взаимодействием этих двух событий. Любые изменения, происходящие в одном из них или в обоих, будут приводить к изменению **rf**.

Мы полагаем, что в нашем эксперименте действие нитратов ртути и свинца приводило в первую очередь к снижению эффективности конъюгации: таким эффектом обладает большинство внешних факторов, нарушающих физиологические процессы в клетке [13]. С другой стороны, соли тяжёлых металлов, обладая мутагенным действием [5, 6], могли индуцировать дополнительные первичные одностранные разрывы, как это делает, например, высокая температура [15]. Причём, судя по полученным нами данным, взаимодействие этих двух процессов происходит таким образом, что при низких концентрациях нитратов ртути и свинца влияние снижения эффективности конъюгации сильнее, чем индукции дополнительных разрывов. Это, на наш взгляд, приводит к наблюдаемому снижению частоты кроссинговера. С повышением концентрации вклад второго процесса в конечный результат начинает превалировать над вкладом первого и **rf** несколько увеличивается. Этим объясняется тот факт, что самая высокая концентрация $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (50 мг/л) приводит к меньшему снижению частоты кроссинговера, чем более низкие.

Z.U. Ahmed, G.W.R. Walker [16] также считают, что химические вещества (в частности, исследуемая ими мочеви́на) с ростом концентрации увеличивают число первичных одностранных разрывов – необходимых предшественников кроссоверных обменов. Однако, как полагают авторы, при росте числа таких разрывов усиливается конкуренция за их репарацию, что приводит к перегибу кривой зависимости частоты кроссинговера от дозы. Поскольку в наших исследованиях такого перегиба не наблюдалось, то для объяснения полученных нами результатов более предпочтительной является гипотеза А.Д. Bateman, А.С. Chandley.

Дополнительным подтверждением применимости данной гипотезы для интерпретации представленных в работе экспериментальных данных являются различия в изменении частоты кроссинговера в зависимости от положения сегмента на хромосоме. Известно, что конъюгация начинается в теломерных (дистальных) участках хромосом и далее распространяется по всей длине хромосомы по типу застёжки «молния». Не исключено, что в нашем эксперименте действующие факторы не оказывали влияния на начало конъюгации, но препятствовали её распространению вдоль хромосомы. Тогда более существенную реакцию (снижение **rf**) проксимального сегмента *cut* – *v* при действии нитратов ртути и свинца, по сравнению с дистальным сегментом *y* – *cut*, можно объяснить более сильным нарушением конъюгации в этом сегменте при прочих равных



условиях. Различия во влиянии $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ при этом могут быть связаны с тем, что свинец, в силу его меньшей токсичности для клеток, в меньшей степени нарушает процесс конъюгации, чем ртуть. Следовательно, при действии нитрата свинца более вероятно увеличение числа кроссоверных обменов, что мы и наблюдаем в виде тенденции в сегменте *cut – v*, который к тому же расположен проксимально и в меньшей мере подвергнут нарушениям конъюгации.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что нитраты ртути и свинца обладают генетической активностью и приводят к достоверному снижению частоты кроссинговера у дрозофилы. При этом действие нитрата ртути сопровождается более сильным эффектом по сравнению с нитратом свинца. Показана прямо пропорциональная зависимость степени снижения частоты кроссинговера от концентрации действующего вещества, а также сегментоспецифичность действия $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ на определённые участки хромосом. Генетические последствия снижения частоты кроссинговера значительны и состоят в увеличении числа вредных мутаций (мутационного груза) в популяциях организмов, что снижает их общую приспособленность и жизнеспособность [8, 13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Ревелль П., Ревелль Ч. Среда нашего обитания. Кн.2. Загрязнение воды и воздуха. – М.: Мир, 1994. – 340 с.
- 2 Будников Г.К. Тяжёлые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 23 – 29.
- 3 Эйхлер В. Яды в нашей пище. – М.: Мир, 1993. – 188 с.
- 4 Орлова А.О., Линг Д. Свинец в окружающей среде. – М.: Изд-во Центра экологической политики России, 1995. – 24 с.
- 5 Ворсанова С.Г., Ахмедова З.А., Демидова И.А., Игнатова М.С., Юров И.Ю., Берешева А.К., Харина Е.А., Юров Ю.Б. Цитогенетическая характеристика детей с нефропатиями из региона, загрязнённого тяжёлыми металлами // Нефрология и диализ. – 2000. – Т.2. – № 3. – С. 24 – 31.
- 6 Hutner E., Gotze A., Nikolova T. Chromosomal aberrations in humans as genetic endpoints to assess the impact of pollution // Mutation Research. – 1999. – V. 30. – № 445(2). – P. 251 – 257.
- 7 Инге-Вечтомов С.Г. Экологическая генетика. Что это такое? // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 2. – С. 59 – 65.
- 8 Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). – Кишинёв: Штиинца, 1988. – 767 с.
- 9 Филатова Л.П., Лаптева Н.Ш., Шевченко В.А. Многолетний мониторинг за экологическим состоянием промзоны г.Москвы с применением тест-линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 3. – С. 343 – 346.
- 10 Абрамова З.В. Практикум по генетике. – М.: Агропромиздат, 1992. – 224 с.
- 11 Филов В.А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I–IV групп. – Л.: Химия, 1988. – 512 с.
- 12 Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. – Мн.: Вышэйшая школа, 1978. – 448 с.
- 13 Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – 400 с.



- 14 Bateman A.J., Chandley A.C. Effects of X-rays on female germ cells of *Drosophila melanogaster*. II. Crossing-over in the X-chromosome // Mutation Research. – 1965. – V. 2. – № 6. – P. 506 – 522.
- 15 Lu B.C., Chiu S.M. Genetic recombination in *Coprinus*. V. Repair synthesis of deoxyribonucleic acid and its relation to meiotic recombination // Molecular and General Genetics. – 1976. – V. 147. – № 2. – P. 121 – 127.
- 16 Ahmed Z.U., Walker G.W.R. The effects of urethane, sodium monohydrogen and selenocystine on crossing-over in *Drosophila melanogaster* // Canadian Journal of Genetics and Cytology. – 1975. – V. 17. – № 1. – P. 55 – 66.

A.N. Tarasyuk. Investigation of Genetical Activity of Heavy Metals Solts (Mercury, Plumbum). I. Change of Crossing-Over Frequency in *Drosophila*

The influence of mercury and plumbum nitrate on crossing-over frequency in zone y-v of drosophila I chromosome was investigated. It has been discovered, that these substances possess genetic activity and lead to reliable reduction of crossing-over frequency in drosophila. The effect of influence depends on concentration of active substances and investigated chromosome segments.