

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА БИОТУ И ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ

УДК 575.224.46

*А.С. Амиргалиева, Э.М. Хусаинова, Б.К. Курманов, К.М. Бекетов,
Е.Ж. Жумабеков, Н.В. Мить, Л.Б. Джансугурова*

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА ОСНОВНЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ВОДЫ ИЛЕ-БАЛХАШСКОГО БАСЕЙНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЛОДОВОЙ МУШКИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Иле-Балхашский бассейн (ИББ) – крупнейшая озерная экосистема планеты, расположенная на территории четырех областей Республики Казахстан (Алматинской, восточной части Джамбульской, юго-восточной части Карагандинской и юго-западной части Восточно-Казахстанской). Активная хозяйственная деятельность человека, наличие крупных промышленных предприятий в данном регионе способствуют загрязнению окружающей среды тяжелыми металлами, радионуклидами, полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ), стойкими органическими загрязнителями (СОЗ), имеющими генотоксичный эффект.

Генотоксичность обусловлена прямыми и косвенными воздействиями на ДНК, к числу которых относят индукцию мутаций (генных, хромосомных, геномных, нарушения рекомбинации), косвенные эффекты, связанные с мутагенозом («внеплановый» синтез ДНК, образование микроядер, нарушения апоптоза), и повреждения ДНК (например, образование ДНК-аддуктов), которые могут приводить к возникновению мутаций.

В качестве тест-объектов для изучения мутагенных свойств вещества часто используются плодовые мушки *Drosophila melanogaster*.

Процедура тестирования химических веществ на дрозофиле включает методы учета рецессивных, сцепленных с полом и аутосомных мутаций /1-3/. С помощью данных методов проводят оценку способности испытуемого вещества и продуктов его метаболизма индуцировать генные мутации в зародышевых клетках дрозофилы. Часто параллельно проводят оценку тератогенного и канцерогенного потенциала, принимая во внимание индуцируемые морфологические нарушения и новообразования.

Целью данной работы было выявление основных загрязнителей в пробах воды в экологически неблагополучных местах Иле-Балхашского бассейна и исследование генотоксического эффекта приоритетных загрязнителей окружающей среды с применением модельной системы *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований явились пробы воды из 5-ти точек ИББ:

а) точка №1 – побережье реки Или (Алматинская область, Панфиловский район, между г. Жаркент и г. Чунджа);

б) точка №2 – побережье Капчагайского водохранилища (Алматинская область, Карасай-

ский район, между устьями рек Каскелен и Большая Алматинка, окрестности г. Капчагай и п. Николаевка);

в) точка №3 – побережье реки Или (Алматинская область, мост им. Д. Кунаева, между г. Акжар и г. Баканас);

г) точка №4 - побережье озера Балхаш (Карагандинская область, Балхашский район, между г. Приозерск и г. Сары-Шаган);

д) точка №5 - побережье озера Балхаш в районах медиплавильного и цинкового завода (г. Балхаш, Карагандинская область).

Материал отбирали в 3-х повторностях (для химического анализа) и по 3 дополнительные пробы для анализа: цитотоксичности, мутагенности и канцерогенности с использованием различных тест-систем.

Химический анализ проб воды проводился физико-химическими методами в соответствии с принятыми стандартами (ГОСТ 29269; СТ РК ИСО 8288-2005 Качество воды; СТ РК ГОСТ Р 51309-2003 Вода питьевая; МУК 4.1.1274-03; МУК 4.1.667-97; ГОСТ 277537-88; РД 52.34.581-95; РД 52.34.580-95). В отобранных пробах определяли наличие только приоритетных загрязнителей, а именно тяжелых металлов, фенолов, ПАУ (бенз[а]пирена) и нитритов/нитратов.

Линии *Drosophila melanogaster*, использованные в работе:

а) *Oregon R* – линия дикого типа;

б) *double yellow* – лабораторная линия, позволяющая учитывать летали X-хромосомы.

в) *Cy/Pm; D/Sb* – лабораторная линия, позволяющая учитывать летальные мутации одно-временно по второй и третьей аутосомам.

Для определения мутагенного действия проб воды из различных точек ИББ автоклавированные пробы воды добавляли в корм для дрозофил в концентрациях 3%, 5% и 10% от объема корма. В контрольных экспериментах в корм дрозофил вместо проб воды из ИББ добавляли физиологический раствор 1xPBS в том же интервале концентраций. В каждом варианте опыта и контроля исследовали по 10 самцов F_0 , которых индивидуально скрещивали с самками лабораторных линий и анализировали потомство: рецессивные летальные мутации в X-хромосоме определяли в F_1 /1-2/, а мутации аутосом – по расщеплению в F_3 /3/. С выделенными летальными проводили тест на аллелизм. Это позволило исключить повторную регистрацию выделенных ранее мутаций и определить истинную частоту индукции рецессивных леталей. Для выяснения вопроса о канцерогенности проб воды из ИББ проводили гистологический анализ личинок третьего возраста в

выделенных летальных мутациях по стандартной методике /4/.

Результаты исследований и обсуждение

По результатам химического анализа во всех пробах воды не выявлено превышения ПДК по фенолам, бенз [а] пирену, однако выявлено превышение ПДК по и нитритам/нитратам (от 1,35 до 2,4 ПДК), а также по концентрациям тяжелых металлов. По содержанию тяжелых металлов обнаружено превышение ПДК в пробах воды в точке № 1 кобальту (24 ПДК), в точке №2 по свинцу (4 ПДК), кобальту (20 ПДК), в точке №3 по кобальту (20 ПДК), в точке №4 по кадмию (2 ПДК), свинцу (3 ПДК), кобальту (30 ПДК), в точке №5 по кобальту (24 ПДК). Таким образом, во всех пробах выявлено превышение ПДК по кобальту в 20-30 раз.

Мух F_0 , выращенных на корме с добавлением водных проб из ИББ, после вылупления просматривали под бинокляром для выявления видимых морфологических изменений. Наиболее часто наблюдали такие отклонения, как нарушения развития крыльев (нерасправленные или смятые крылья, вырезки и укорочения крыльев), изменения размеров (уменьшение числа фасеток) и формы глаз (выемки на глазах), нарушение строения тергитов, дефекты ног, уменьшения размеров тела. Эти изменения были обнаружены нами в разных вариантах опыта и в контроле. Все особи с морфологическими изменениями подвергались индивидуальным скрещиваниям с линией *Oregon R*. Вывод о наследуемости данных изменений делали на основании анализа расщепления в F_2 и F_3 от этих скрещиваний. В результате выявлено, что все наблюдаемые изменения являются ненаследуемыми, то есть морфозами. В таблице 1 представлены результаты морфологического анализа имаго, выращенных на корме с добавлением проб воды из разных точек ИББ.

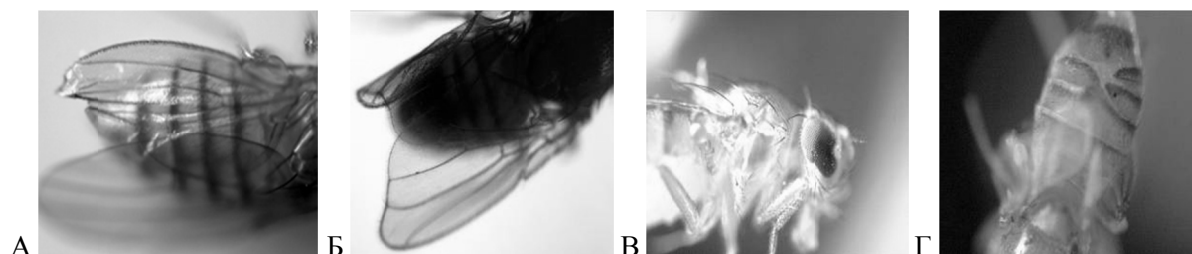
Представленные результаты свидетельствуют о том, что онтогенетические нарушения – морфозы происходят также без обработки корма с частотой 4,8%. В контроле с применением физиологического буфера уровень морфозов был выше – 5,3-9,6%. Согласно литературным данным, частота морфозов в диких и лабораторных популяциях дрозофилы без индуцированного воздействия колеблется в пределах 2-5% /5-6/. В случае обработки корма пробами воды из ИББ частота онтогенетических нарушений возрастала в таком порядке: точка №3, №5, №2, №1 и №4.

Для выявления мутагенных свойств проб воды из ИББ проводили учет рецессивных летальных мутаций в X-хромосомах и аутосомах дрозофилы.

Морфологические изменения имаго у дрозофилы после обработки культуральной среды для выращивания дрозофилы пробами воды из 5-ти точек ИББ

№ пробы, разведение, %	Тип онтогенетических нарушений	Процент измененных особей
Контроль без обработки	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов	4,8%
Точка №1, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, вырезки крыла, нарушение строения тергитов, выемки глаза, дефекты ног	7,6-15,0%
Точка №2, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов	5,2-12,4%
Точка №3, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов, выемки глаза, дефекты ног	6,2-8,1 %
Точка №4, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов, выемки на глазу, лопастные глаза, уменьшение размера, грубые глаза, дефекты ног уменьшение размеров тела	8,3-19,2%
Точка №5, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов	6,8-11,7%
Контроль, 1xPBS, 3-10%	Нерасправленные или смятые крылья, нарушение строения тергитов	5,3-9,6,%

На рисунке 1 представлены некоторые из наблюдавшихся морфозов.



А – смятое крыло, контроль без обработки, 1x20; Б – укороченные крылья, точка №2, разведение пробы 5%; В – лопастные глаза, точка №4, разведение пробы 5%, 1x20; Г – изменения тергитов, точка №5, разведение пробы 10%, 1x20

Рис. 1. Морфозы имаго

Для выявления рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме было проанализировано 190 индивидуальных X-хромосом и просмотрено 8842 мухи потомства F₁. Среди других нарушений обращали внимание на стерильность самцов F₀ и гибель куколок F₁. При учете рецессивных летальных мутаций в аутосомах дрозофилы было проанализировано 760 индивидуальных хромосом. Всего в этой части исследования просмотрено 1329 мух потомства F₁, 12429 мух потомства F₂ и 34047 мух потомства F₃. Все рецессивные летальные мутации выведены в линии и поддерживаются в гетерозиготе на балансерных хромосомах, маркированных соответствующими мутациями 2-й (Cy, Pm) и 3-й хромосомы (D, Sb). Результаты экспериментов суммированы в таблице 2.

Уровень рецессивных летальных мутаций в контроле без всякой обработки составил 4%, с применением физиологического буфера – 6,6%.

Наибольший мутагенный эффект в этих тестах проявили пробы воды из точек № 1 и №5 – общий уровень индукции мутаций в обеих точках составил 11,3%. Для проб из точки № 4

данный показатель составил 9,3%, для точки №2 – 7,3% и для точки №3 – 6%. В ряде случаев также были отмечены довольно высокие уровни стерильности самцов (точки №1, 2 и 3) и гибели куколок (точки №5, 1 и 3), вероятно, в результате индукции доминантных летальных мутаций. Отмечено, что уровень мутагенеза не сильно увеличивался от повышения концентрации пробы воды в корме.

В целом, проведенный скрининг рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме и 2-й и 3-й аутосом *Drosophila melanogaster* показал, что все изученные пробы, за исключением точки №3, проявляют повышенный уровень мутагенеза.

Для анализа канцерогенных свойств проб воды из 5-ти загрязненных точек ИББ проводили гистологический анализ личинок 3-го возраста, в гетерозиготе содержащих скринированные нами рецессивные летальные мутации по аутосомам. Гистологическому анализу подвергали личинок линий с летальными мутациями, скринированными как в контрольных экспериментах, так и во всех вариантах воздействия проб воды из ИББ.

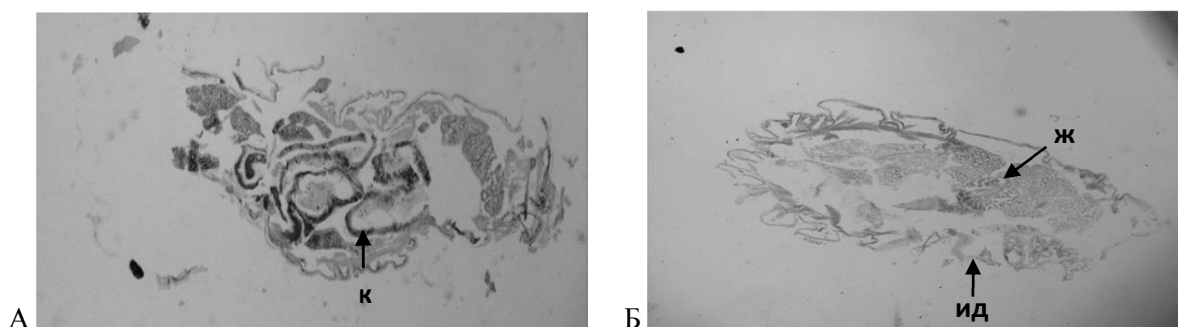
Результаты учета рецессивных, сцепленных с полом и аутосомных летальных мутаций у дрозофилы под действием проб воды из ИББ

№ пробы, разведение, %	Выявлено рецессивных летальных мутаций			Другие нарушения
	X-хромосомы	2-й аутосомы	3-й аутосомы	
Точка №1, 3%	0	1	1	Гибель куколок (2%)
Точка №1, 5%	0	4	3	Гибель куколок (1,1%)
Точка №1, 10%	2	3	3	Гибель куколок (13,3%), стерильность самцов (20%)
Точка №2, 3%	0	4	2	Гибель куколок (0,7%),
Точка №2, 5%	0	2	1	Гибель куколок (7,6%), стерильность самцов (20%)
Точка №2, 10%	0	1	1	стерильность самцов (10%)
Точка №3, 3%	0	2	2	Гибель куколок (3,6%), стерильность самцов (20%)
Точка №3, 5%	0	2	1	Гибель куколок (5,3%)
Точка №3, 10%	0	0	2	Гибель куколок (9,4%), стерильность самцов (10%)
Точка №4, 3%	0	3	0	Гибель куколок (1%), стерильность самцов (10%)
Точка №4, 5%	0	2	3	Гибель куколок (5,3%)
Точка №4, 10%	0	3	3	Гибель куколок (6,7%)
Точка №5, 3%	0	2	7	Гибель куколок (1,5%)
Точка №5, 5%	0	2	0	Гибель куколок (2,7%)
Точка №5, 10%	0	3	3	Гибель куколок (13,5%), стерильность самцов (10%)
Контроль без обработки	0	1	1	нет
Контроль, 3% 1xPBS	0	2	1	нет
Контроль, 5% 1xPBS	0	1	2	нет
Контроль, 10% 1xPBS	0	1	3	Гибель куколок (1,2%)

Как известно, пролиферирующими тканями у личинок дрозофилы являются имагинальные диски /7-8/. Помимо имагинальных дисков, других активно пролиферирующих тканей на изученных гистологических препаратах не было обнаружено. Однако в некоторых случаях были отмечены очаги лизиса личиночных тканей,

вероятно, являющихся причиной гибели особей - носителей летальных мутаций на стадии куколки.

На рисунке 2 представлены гистологические препараты, демонстрирующие отсутствие канцерогенного эффекта во всех вариантах эксперимента.



К - кишечник, ид – имагинальные диски, ж – жировая ткань. А – нормальное гистологическое строение, контроль без обработки, 10x20; Б – отсутствие патологии, точка № 5, 10% разведение пробы воды в корме, 10x20.

Рис. 2. Результаты гистологического анализа личинок – носителей рецессивных летальных мутаций в аутосомах

Таким образом, гистологический анализ тканей личинок 3-го возраста линий дрозофилы с рецессивными летальными мутациями по аутосомам показал, что пробы воды из ИББ не вызывают канцерогенного эффекта у дрозофилы.

Обращаясь к литературным данным по экологическому мониторингу Балхаш-Алаколь-

ского бассейна /9-10/, можно отметить, что в 2010 году (при сравнении с данными 2009 года) качество воды во всех створах рек и озер ухудшилось. Наиболее выражено повышенное содержание таких элементов, как медь, сульфаты, натрий и магний. Содержание тяжелых металлов в реках и озерах Балхаш-Алакольского бассейна

колеблется в широких пределах: кадмий от 0,03 до 0,2 мг/кг, свинец от 0,36 до 19,4 мг/кг, медь от 0,7 до 4,2 мг/кг, хром от 0,08 до 1,7 мг/кг, никель от 0,2 до 12,3 мг/кг, мышьяк от 0,27 до 10,2 мг/кг, марганец от 460,2 до 990,8 мг/кг.

Сравнивая полученные данные по исследованию генотоксичности с данными химического анализа, можно предположить, что основным генотоксическим фактором является высокое содержание тяжелых металлов в пробах воды. Проявляемый пробами воды из ИББ уровень мутагенности коррелирует с содержанием кобальта. Так, наименьшее количество летальных мутаций было зарегистрировано для проб №2 и №3, в которых наблюдалось меньшее превышение ПДК по кобальту, чем в остальных пробах. Что касается свинца и кадмия, эти металлы обнаружены не во всех пробах, и их содержание значительно меньше, чем кобальта. Возможно, планируемые нами исследования почвы и донных отложений из этих же точек ИББ помогут получить более полные данные о влиянии тяжелых металлов на развитие дрозофилы.

1. Общая генетика // под ред. С.Г. Инге-Вечтомова – СПб.: Изд-во Н-Л., -2007. – 124 с.

2. *Drosophila* in a practical approach. Ed. by Roberts D.B. 2d edition // Oxford, New-York, Tokyo: Oxford University Press. – 1998. – 389 p.

3. Жансугурова Л.Б., Тажин О.Т., Берсимбаев Р.И. Большой практикум по генетике дрозофилы – Алматы: Казак университеті. - 1998. – 43 с.

4. Lilly B.D. Histopathologic technic and practical histochemistry // New York. - 1954. - P. 118-119.

5. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика // Н.: Изд-во Новосибирского университета, 2002. – 459 с.

6. Генетика // под ред. В.И. Иванова – М.: ИКЦ «Академкнига». – 2007. – 638 с.

7. Дрозофила в экспериментальной генетике // Сб. под ред. Хвостова В.В. Сиб. отд. – Новосибирск: Наука, - 1978. – 288 с.

8. Бакай А.В., Кочиш И.И., Скрипниченко Г.Г. Генетика. – М.: КолосС, – 2006. – 448с.

9. Информационный бюллетень о состоянии окружающей среды Республики Казахстан за 2009 г. // Министерство охраны окружающей среды РК. РГП «Казгидромет»: Департамент экологического мониторинга. – Выпуск 1 (16). (2 квартал 2010 г.). – Астана, 2010. - 14 с. - <http://www.eco.gov.kz/ekolog/ekolog.php>

10. Информационный бюллетень о состоянии окружающей среды Республики Казахстан за 2009 г. // Министерство охраны окружающей среды РК. РГП «Казгидромет»: Департамент экологического мониторинга. – Выпуск 2 (17) (3 квартал 2010 г.). – Астана, 2010. - 16 с. - <http://www.eco.gov.kz/ekolog/ekolog.php>

*Ile-Balkash су қоймасының 5 нүктесінен алынған су үлгілеріне химиялық талдау жүргізілді. Негізгі ластаушылар ауыр металдар (кобальт, қорғасын және кадмий) болып табылатындығы анықталды. *Drosophila melanogaster* жеміс шыбынын тесет-жүйе ретінде қолданып, Ile-Balkash су қоймасының 5 нүктесінен алынған су үлгілерінің генотоксикалық әсерін анықтауға зерттеулер жүргізілді. Осы зерттелінген су үлгілері аутосомда және дрозофиланың жыныс хромосомасында рецессивті летальді мутацияны тудыруы мүмкін екендігі, сонымен қатар F_0 ересек шыбында морфозды индукциялайтындығы анықталды. Дернәсілдердің үшінші даму сатысына жүргізілген гистологиялық талдау бөлініп алынған летальді мутацияларда канцерогендік әсер байқалмайды. Дрозофила шыбынында мутация индукциясының жиілігі ИБСҚ алынған нүктелердегі үлгілерде кобальт концентрациясымен реттелетіні анықталды.*

*The chemical analysis of water samples from Ile-Balkhash basin 5 polluted zones was done. It was revealed that main water pollutant was heavy metals (cobalt, plumbum and cadmium). The genotoxic effect of water samples was determined using *Drosophila melanogaster* test-systems. It was shown that water samples can induce morphosis of imago F_0 , also autosomal and X-chromosomal recessive lethal mutations. Histological analysis of 3rd instar *drosophila* larvae carrying lethal mutations did not reveal the cancerogenic effect. Mutation frequency correlates with cobalt concentration in water samples from different Ile-Balkhash basin zones.*

УДК 504+597.8+591.8

**Ж.М. Базарбаева, Д. Әмірбек, Р.Б. Каупенбаева,
А. Меней, З.Б. Есимсиитова**

КЕЙБІР ЭКОЛОГИЯЛЫҚ ФАКТОРЛАРДЫҢ КӨЛ БАҚАСЫНЫҢ АЩЫ ШЕК МОРФОЛОГИЯСЫНА ӘСЕРІ

Қоршаған ортаның ластану мәселелерінің көбеюіне байланысты (шаруашылық-тұрмыстық және өндірістік қалдық суларының құйылуы; атмосфераға азот қышқылының шығуы; мұнай, газ, химиялық және энергетикалық кешендердің қолдану нәтижесінде топырақ-өсімдік жамылғысының деградациясы және ластануы) көптеген авторлардың мәліметтері бойынша қоршаған ортаның индикаторы болып табылатын амфи-

биялар мен рептилияларға зерттеу жұмыстарын жүргізу қызығушылық тудыруда. Бұл жануарлардың мүшелерінде патологиялық өзгерістерді гистологиялық тұрғыда зерттеу, жануарлар экологиясы мен биологиясы бойынша мәліметтерді толықтыруға және түзетулер енгізуге мүмкіндік береді.

Тірі организм ашық жүйе болғандықтан, ол қоршаған ортамен үнемі қарым-қатынаста болады.