

# БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ

Под редакцией С. А. Гераськина и Е. И. Сарапульцевой

*Допущено  
Учебно-методическим объединением  
по классическому университетскому образованию  
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,  
обучающихся по направлению «Биология» и биологическим специальностям*



Москва  
Издательский центр «Академия»  
2010

УДК 57(075.8)  
ББК 28.088я73  
Б633

Авторы:

*С. А. Гераськин, Е. И. Сарапульцева, Л. В. Цаценко, В. М. Глазер, С. К. Абилев,  
С. Г. Смирнова, И. А. Замулаева, Л. Н. Комарова, Е. И. Степченкова,  
С. Г. Инге-Вечтомов, А. И. Ким, Д. В. Крутенко, Т. И. Евсеева, Г. Ф. Михайлова,  
Н. В. Амосова*

Рецензенты:

зав. кафедрой ботаники Кубанского государственного аграрного  
университета, д-р биол. наук, проф. *С. Б. Криворотов*;  
зав. лабораторией экологической генетики Института общей генетики  
им. Н. И. Вавилова РАН, д-р биол. наук, проф. *А. В. Рубанович*

**Биологический контроль окружающей среды : генетиче-**  
Б633 **ский мониторинг : учеб. пособие для студ. высш. проф. об-**  
**разования / [С. А. Гераськин, Е. И. Сарапульцева, Л. В. Цацен-**  
**ко и др.]; под ред. С. А. Гераськина и Е. И. Сарапульцевой. —**  
**М. : Издательский центр «Академия», 2010. — 208 с.**  
**ISBN 978-5-7695-6536-6**

В учебном пособии освещены теоретические основы и методология генетического мониторинга окружающей среды, описаны наиболее часто используемые практические методики. По структуре и содержанию книга представляет собой основу практикума к таким дисциплинам, как «Биологический и экологический мониторинг», «Генетика и селекция», «Генетический мониторинг трансгенов», входящим в учебные планы многих специальностей биолого-экологической и агрономической направленности.

Для студентов учреждений высшего профессионального образования.

УДК 57(075.8)  
ББК 28.088я73

*Оригинал-макет данного издания является собственностью Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом без согласия правообладателя запрещается*

© Коллектив авторов, 2010

© Образовательно-издательский центр «Академия», 2010

© Оформление. Издательский центр «Академия», 2010

**ISBN 978-5-7695-6536-6**

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие подготовлено коллективом специалистов в области генетического мониторинга и биотестирования окружающей среды, имеющих большой опыт преподавания соответствующих дисциплин.

Задача пособия — пополнение генетических знаний и интеграция их в практической работе по выявлению в окружающей среде генотоксикантов, представляющих опасность для живых систем.

По структуре и содержанию книга представляет собой основу практикума к таким дисциплинам, как «Биологический и экологический мониторинг», «Генетический мониторинг трансгенов», «Генетика и селекция», входящим в учебные планы многих специальностей биолого-экологической и агрономической направленности. В ней изложены предмет, цели, задачи и методы генетического мониторинга окружающей среды. Приведены современные данные о генотоксикантах, способных индуцировать мутации в клетках микроорганизмов, растений, животных и человека. Дана система оценки генетической опасности на разных уровнях организации живой материи: молекулярном, клеточном, организменном и популяционном. Имеется словарь ключевых терминов и понятий.

При разработке учебного пособия авторы использовали опыт преподавания курсов «Генетика и селекция», «Биологический и экологический мониторинг», «Биобезопасность и экологический риск» для студентов, обучающихся по направлению «Биология», а также курсов «Генетический мониторинг» и «Генетически модифицированные организмы в сельском хозяйстве» для студентов биологических специальностей аграрных вузов, обучающихся по специальности «Генетика и селекция сельскохозяйственных культур». Эти курсы становятся особенно востребованными в связи с быстро меняющейся ситуацией на сельскохозяйственном рынке.

Большое внимание уделяется генетическому мониторингу трансгенов, которые являются неотъемлемой частью современных продовольственных рынков. Для мониторинга генетически модифицированных организмов (ГМО) необходим универсальный подход. В качестве одного из вариантов предлагается ПЦР-анализ по конкретной специфической вставке, внедренной в геном транс-

генных растений. Детально представлено положение дел в этой области исследований, впервые описаны методы генетического мониторинга агропопуляций высших растений.

Пособие включает теоретические основы и методологию генетического подхода к биотестированию качества окружающей среды, в том числе мониторинг человека и генетически модифицированных организмов (гл. 1—5). Теоретические главы завершаются списком литературы, куда вошли монографии, учебники, учебные пособия известных ученых в области генетики, биоинженерии, биоэкологии и охраны окружающей среды.

Практическая часть пособия содержит подробное описание 12 методов генетического контроля окружающей среды, включая методы мониторинга человека (гл. 6). Работы приведены в форме, доступной для воспроизведения их студентами на практических занятиях продолжительностью 2—4 академических часа. Большинство практических работ сопровождается рисунками, справочным материалом и рабочими таблицами, к каждой работе дается список литературы.

Глава 1 учебного пособия написана Л. В. Цаценко и Е. И. Сарапульцевой; глава 2 — С. А. Гераськиным, Л. В. Цаценко и Т. И. Евсеевой; глава 3 — С. К. Абилевым, В. М. Глазером, И. Ким, С. А. Гераськиным, С. Г. Инге-Вечтомовым, Е. И. Степченковой, Е. И. Сарапульцевой и Л. В. Цаценко. Авторами главы 4 являются С. Г. Смирнова и И. А. Замулаева; главы 5 — Л. В. Цаценко, Е. И. Сарапульцева, Л. Н. Комарова и Д. В. Крутенко. В подготовке и подробном описании практических заданий по освоению методов генетического контроля приняли участие все авторы книги, в том числе Г. Ф. Михайлова (подразделы 6.9; 6.10) и Н. В. Амосова (подраздел 6.6).

## ЦЕЛИ, ЗАДАЧИ И МЕСТО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В СИСТЕМЕ НАУК

### 1.1. Цели и задачи генетического мониторинга

Генетический мониторинг — это научное направление, в рамках которого разрабатываются методология и практические методы оценки появления и накопления в окружающей среде генотоксических веществ, изучения спектра их мутационного воздействия и способности индуцировать тот или иной вид генетических нарушений. К генотоксикантам относят вещества и агенты, способные индуцировать мутации в половых и соматических клетках, что является причиной наследуемых изменений в первом случае и бластомагенеза — во втором. Как отдельное научное направление генетический мониторинг возник на рубеже 70—80-х гг. XX в. в связи с необходимостью разработки методов анализа изменений наследственных структур организма под влиянием техногенных факторов.

Основной целью генетического мониторинга является выявление объема и содержания генетического груза<sup>1</sup> в популяциях живых организмов, а также количественных критериев оценки последствий мутагенеза.

Термин «мониторинг» (от лат. *monitor* — тот, кто напоминает, предупреждает, надзирает) вошел в обиход специалистов по охране окружающей среды в 1972 г., когда на Стокгольмской конференции ООН по окружающей среде было предложено создать глобальную систему мониторинга (*Global Environment Monitoring Systems — GEMS*). Термин «генетический мониторинг» в отношении популяции человека применили Н. П. Дубинин и Ю. П. Алтухов (1975 г.), определив его как наблюдение за уровнем мутационного груза в популяциях человека.

Наличие и степень проявления генетических изменений характеризуют мутагенную активность среды, а возможность сохранения генетических изменений в популяциях отражает эффективность

---

<sup>1</sup> Генетическим грузом называют накопление летальных и сублетальных отрицательных мутаций, вызывающих при переходе в гомозиготное состояние выраженное снижение жизнеспособности особей или их гибель.

функционирования защитных систем организмов. В норме большинство генетических нарушений распознается и элиминируется клеткой, например: с помощью внутриклеточных систем репарации, путем апоптоза или посредством иммунной системы. Достоверное превышение спонтанного уровня таких нарушений является индикатором стрессового воздействия. Генетические изменения могут выявляться на генном, хромосомном и геномном уровнях.

Нестабильная экологическая обстановка и ухудшение общего состояния биосферы делают необходимым широкое использование генетического мониторинга. Генетический мониторинг включает методы, позволяющие количественно оценить и прогнозировать направленность и интенсивность мутационного процесса в популяциях, а в случае необходимости подобрать систему мероприятий, направленных на предотвращение отрицательных последствий для живых организмов. Отсюда вытекает основная цель генетического мониторинга — получение информации о наследственных изменениях, которая необходима и достаточна для принятия решений о мерах по защите генофонда от мутагенных факторов окружающей среды, ослаблению их действия и предупреждению вредных отдаленных последствий.

Проблема генетического мониторинга состоит в том, чтобы подобрать информационные показатели, способные с возможно большей полнотой отражать состояние генетических систем, дать оценку количественных параметров этих систем, а также их корректную интерпретацию.

Основные задачи генетического мониторинга включают: генетико-токсикологическую оценку; выявление зон повышенного риска; оценку динамики и временных трендов генетических процессов; апробацию разных тест-систем; построение универсальных математических моделей для разных типов популяций.

Различают следующие виды генетического мониторинга:

- 1) мониторинг природных генетических систем;
- 2) территориальный генетический мониторинг в связи с загрязнением природной среды;
- 3) мониторинг искусственных и экспериментальных генетических систем.

Новым направлением в адаптивной селекции растений является создание сортов-популяций, копирующих природные популяции. По мнению ряда исследователей, успех в создании новых типов агрофитоценозов будет зависеть от полноты моделирования в их структуре и функции принципов организации естественных растительных сообществ, характеризующихся высокой степенью гетерогенности. Ввиду этого необходимо разрабатывать принципы двух типов генетического мониторинга: мониторинг природных и искусственных генетических систем.

## 1.2. Подходы к генетическому мониторингу

Последствия воздействия факторов внешней среды на природные и аграрные экологические системы в значительной степени определяются иерархичностью организации биоты. На каждом уровне биологической организации существуют свои специфические способы защиты от экзогенных стрессоров (репарация, репопуляция, регенерация, изменение видового состава и структуры биоценоза и др.). Поэтому до высших уровней биологической организации стрессовые воздействия чаще всего доходят с запаздыванием и в значительно смягченной, косвенной форме, хотя есть и обратные примеры, когда малое воздействие за счет системных и биологических механизмов усиления способно приводить к значительным эффектам. Таким образом, наиболее ранние изменения можно зафиксировать на молекулярно-клеточном уровне организации живой материи. При этом генетические тесты имеют уникальное значение для оценки изменений, наступающих, как правило, до появления морфологических, физиологических, популяционных и других отклонений от нормы. Генетические тесты фиксируют наиболее серьезные последствия загрязнения окружающей среды — усиливающееся мутагенное давление на биосферу, проявляющееся в увеличении частоты канцерогенеза и наследственных заболеваний, возрастании генетического груза в популяциях человека, животных и растений, изменении их генетической структуры. Накопление генетических нарушений в долгосрочной перспективе ведет к ухудшению здоровья и репродуктивной способности слагающих популяцию организмов. Следовательно, именно генетические тест-системы должны использоваться для ранней диагностики изменений, возникающих в результате хозяйственной деятельности человека.

Для оперативного выявления большинства мутагенов и канцерогенов в окружающей среде применяют краткосрочные генетические тесты. Давно известно, что некоторые химические вещества способны вызывать рак у человека и животных. Химические вещества также вызывают мутации в половых клетках, которые повышают частоту наследственных заболеваний. Многие тысячи таких химических веществ, включая фармакологические препараты, бытовые химические вещества и пищевые добавки, пестициды и нефтепродукты, уже присутствуют в окружающей среде и каждый год синтезируют все новые и новые химические соединения. Помимо этого, существуют и природные химические вещества, относительно которых известно, что они обладают мутагенной и/или канцерогенной активностью (например, микотоксины, содержащиеся в пищевых продуктах). Поэтому важно, чтобы химические вещества, воздействию которых люди подвергаются

преднамеренно (например, во время терапевтических процедур), в повседневной жизни (это, в частности, относится к бытовым химическим веществам, косметическим средствам и т. п.), по недосмотру или небрежности (как в случае с пестицидами), испытывались на способность индуцировать генетические нарушения (мутации).

Мутагенные химические вещества взаимодействуют с ДНК, вызывая изменения в ее структуре. Эти процессы могут приводить к потере, увеличению или замене оснований, изменяя тем самым содержащуюся в ДНК генетическую информацию.

Выявление канцерогенных свойств химических веществ в экспериментах на животных — сложное и дорогое научное исследование. В нем, как правило, используется несколько сотен грызунов, которым предполагаемый канцероген вводится на протяжении большей части их жизни. Поэтому в последнее тридцатилетие наблюдается внедрение в практику исследований относительно быстрых тестов. Эти тесты экономичны и позволяют получить результаты в течение нескольких недель. Почти все краткосрочные методы основаны на выявлении хромосомных повреждений, генных мутаций или повреждений ДНК, при этом многие из них являются тестами *in vitro* (т. е. проводятся на экспериментальных биологических системах без использования целостных живых организмов). В этих тестах используется широкий спектр организмов — от бактерий и дрожжей до насекомых, растений и культивируемых клеток млекопитающих. Существуют также краткосрочные тесты, в которых лабораторные животные подвергаются воздействию изучаемого химического вещества на протяжении небольшого периода времени — от нескольких часов до недель. Хотя в литературе описано более сотни тест-систем для исследования генотоксичности на разных уровнях биологической организации — от бактериофагов до млекопитающих, регулярно применяются менее 20 из них, а некоторые могут быть выполнены лишь в специализированных лабораториях.

Иерархическая структурно-функциональная организация живого предполагает оценку генетических изменений на разных уровнях биологической организации. Например, применительно к агропопуляциям используют следующие подходы.

- **Клеточный уровень** — цитогенетический скрининг. Преимущество цитогенетического анализа заключается в том, что он дает характеристику состояния всего генома. Это один из наиболее чувствительных генетических тестов, который может быть использован в качестве «биологического дозиметра» техногенного загрязнения территории.

Основные растительные тест-системы для скрининга мутагенов и мониторинга *in situ* условно делят на две группы: в первой ис-

пользуют спорофиты, во второй — гаметофиты. Цитологические методы на спорофитах включают изучение митоза в меристемах побегов и корешков растений и мейоза в цветковых почках. К цитогенетическим тестам на гаметофитах относят тесты на микроядра в тетрадах микроспор, а также прохождение митоза в пыльцевых зернах и пыльцевых трубках. Для моногенных признаков спорофитов разработаны спот-тесты на сое, табаке, кукурузе и других объектах, для гаметофитов — тесты специфического локуса (методы с анализом активности отдельных ферментов, система локуса *шаху*). В цитоэмбриологических исследованиях широко используются полигенные признаки: проращиваемость пыльцы, мужская стерильность и др. При использовании пыльцы растений в качестве тест-системы при мониторинге, скрининге и для выявления токсического действия мутагенов необходимо учитывать такие ее генетические характеристики, как орнаментация, вид, форма, стерильность и жизнеспособность, содержание белков и крахмала.

- На *организменном уровне* ведется наблюдение за частотой «сторожевых» фенотипов. В качестве «сторожевых» могут быть выбраны мутантные фенотипы по форме колоса или метелки, а также различные отклонения в развитии растения — тератоморфы.



Рис. 1.1. Схема проведения генетического мониторинга фитопопуляции (на примере озимой пшеницы)

Следует различать отклонения в развитии, вызванные действием генетических и экологических факторов.

- На *популяционном уровне* проводят учет элементов, характеризующих продуктивность популяции растений, а именно количество развитых и неразвитых цветков в колосе или метелке, массу 1 000 зерен. Оценку гетерогенности семенного потомства исследуемых форм проводят по критериям: энергия прорастания семян; всхожесть; выживаемость проростков; количество проростков; индекс устойчивости (толерантности), определяемый как отношение длины корней у проростков на растворе с исследуемым загрязнителем к приросту корней на растворе того же состава без загрязнителя; выявление генотипов, характерных для той или иной среды в зависимости от уровня техногенной нагрузки.

Успех генетического мониторинга зависит от системы тестов, к которым предъявляются специфические требования. Так, для зерновых колосовых культур набор тестов для генетического мониторинга будет охватывать все уровни биологической организации (рис. 1.1) — пример приведен для озимой мягкой пшеницы и ячменя. Набор тестов может меняться для каждой культуры, так как зависит от индивидуальных особенностей фаз органогенеза.

### **1.3. История зарождения генетического мониторинга как научного направления**

Генетический мониторинг основан на фундаментальных знаниях, накопленных генетикой. В процессе становления генетики как науки можно выделить несколько этапов. До конца XIX в. в биологии существовали разные гипотезы о природе наследственности и изменчивости. Основными предпосылками для формирования научных представлений об этих явлениях служили наблюдения за половым размножением у животных и растений, результаты опытов по гибридизации растений и развитие учения о клетке. Основы современных представлений о наследственности и изменчивости организмов были впервые сформулированы чешским исследователем Г. Менделем (G. J. Mendel) в 1865 г. Он установил закономерности наследования родительских признаков в гибридном потомстве и сделал вывод, что формирование каждого наследственного признака определяется парой материальных наследственных задатков, один из которых организм получает от матери, другой — от отца. Конкретная реализация признака определяется взаимоотношениями доминантности — рецессивности между материнским и отцовским задатками. При созревании половых клеток в каждую отдельную клетку попадает только

по одному гену от каждой пары. Проведенные независимо друг от друга в начале XX в. опыты Г. де Фриза в Голландии, К. Корренса в Германии и Э. Чермака в Австрии показали универсальное значение сформулированных Г. Менделем принципов для живой природы и человека.

Важнейшим шагом в развитии генетики стало построение Т. Морганом (Th. H. Morgan) и его сотрудниками в 1910—1915 гг. хромосомной теории наследственности, согласно которой гены располагаются на хромосомах в линейной последовательности и воспроизводятся при клеточных делениях, а хромосомы могут обмениваться своими участками (кроссинговер), что приводит к рекомбинации генетического материала. Следующим шагом было установление химической природы генов. Советский генетик Н. К. Кольцов одним из первых развил представление о форме существования наследственного материала (1927 г.), а Н. В. Тимофеев-Ресовский с соавторами в середине 30-х гг. XX в. вычислили примерный объем гена. В 1944 г. О. Эйвери (O. T. Avery) с соавторами показали, что носителем наследственного материала является молекула ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсон (J. D. Watson) и Ф. Крик (F. H. C. Crick) предложили модель строения ДНК, механизмы ее репродукции и изменчивости, а несколько позже создали теорию универсального генетического кода, с помощью которого генетическая информация, зашифрованная в ДНК, реализуется в структуре белка. Эти открытия означали переход генетики на молекулярный уровень исследования фундаментальных биологических процессов.

В начале XX в. Г. де Фризом (H. de Vries) была сформулирована мутационная теория, хотя экспериментально индуцировать мутации долгое время не удавалось. В 1925 г. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов открыли на низших грибах мутагенное действие рентгеновских лучей, показав, что после облучения возникают разнообразные новые расы, свойства которых воспроизводятся в потомстве. В 1927 г. Г. Меллер (H. J. Muller) в опытах на дрозофиле убедительно доказал, что ионизирующее излучение способно индуцировать мутации. Позже И. А. Рапопорт и Ш. Ауэрбах (Ch. Auerbach) открыли явление мутагенеза под влиянием химических веществ. Теперь известно, что в окружающей нас природной среде содержится много разнообразных химических, физических и биологических факторов (мутагенов), способных вызывать мутации у всех живых организмов, включая человека. К концу 80-х гг. XX в. у человека было выявлено свыше 4 тысяч мутантных фенотипов. Особое значение для слежения за частотой мутагенеза приобрел анализ мутаций белков крови. Мутационный анализ позволил изучить структуру гена гемоглобина и другие важные особенности строения, функции и организации генетического материала у человека.

В начале XX в. датский генетик В. Иоганнсен (W. Johannsen) сформулировал понятия «генотип» (совокупность наследственных задатков) и «фенотип» (совокупность их проявлений). Российский биолог И. И. Шмальгаузен ввел понятие «норма реакции генотипа» (рамки, в пределах которых может варьировать проявление фенотипа в ответ на изменения условий среды). Советскими генетиками Б. Л. Астауровым и Н. В. Тимофеевым-Ресовским в 20—30-е гг. XX в. были разработаны представления о комплексной обусловленности признаков организма взаимодействием генотипических, внутриорганизменных и внешнесредовых факторов. В 1944 г. американские генетики Г. Бидл (G. W. Beadle) и Е. Тейтем (E. L. Tatum), обобщив опыт изучения биохимических мутантов у микроскопических грибов, предложили гипотезу о регуляции генами синтеза ферментов, выражаемую принципом «один ген — один фермент», что перевело феногенетику на биохимический, а затем и на молекулярный уровень.

В 20-е гг. XX в. параллельно и независимо друг от друга генетиком из СССР С. С. Четвериковым, англичанами Р. Фишером (R. Fisher) и Дж. Холдейном (J. B. S. Haldane), американским ученым С. Райтом (S. Wright) были заложены основы популяционной генетики. Ими сформулировано представление о генетической гетерогенности популяций, а также о роли системы скрещивания, колебаний численности, миграций организмов, мутаций, репродуктивной изоляции и естественного отбора в изменениях генотипического состава популяций и их эволюции. Позже популяционная генетика составила основу синтетической теории эволюции.

Первостепенной задачей генетики стали оценка и последующее длительное динамическое слежение (мониторинг) за возможными отрицательными генетическими последствиями применения химикатов, а также воздействия факторов, присутствующих в окружающей среде, как для самого человека, так и для животных, растений и микроорганизмов. Значение генетического мониторинга факторов окружающей среды тем более велико, что мутагенез наряду с тератогенезом и канцерогенезом составляет основной комплекс отдаленных опасных последствий повышения концентрации биологически активных факторов в биосфере.

# ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ОРГАНИЗМОВ

### 2.1. Характеристика факторов, вызывающих наследственные изменения

По современным оценкам количество загрязняющих среду обитания отходов ежегодно увеличивается в среднем на 4 %. Опасность техногенных стрессоров состоит прежде всего в том, что биологические системы — организмы, популяции и биоценозы — недостаточно адаптированы к ним. Многие техногенные факторы отличаются по величине, интенсивности, продолжительности и моменту воздействия от существующей в природе нормы, что обуславливает их повышенную эффективность. До 90 % всех случаев рака у человека в настоящее время обусловлено воздействием факторов окружающей среды, из них 70 — 80 % — воздействием химических канцерогенов и около 10 % — радиационных. Количество произведенных и находящихся в окружающей среде токсичных хлорорганических веществ достаточно для уничтожения всех аэробных организмов. Кроме 22 радионуклидов имеется 12 металлов (Be, Al, Cr, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb), токсичных во всех своих водо-, щелоче- и кислотнo-растворимых соединениях.

Возрастающее распространение техногенных химических соединений в окружающей среде сделало первостепенной задачей выявления генетически активных химических соединений. Для ее решения было необходимо разработать простые высокочувствительные методы, позволяющие оценить мутагенность широкого набора химических соединений и их сложных смесей. Были предложены многочисленные тесты с использованием микроорганизмов (часть таких тестов подробно описана в гл. 6). Однако микроорганизмы в качестве тест-объектов имеют существенный недостаток: система метаболизма у млекопитающих и бактерий значительно отличается. В организме млекопитающих и человека подавляющее большинство химических соединений претерпевают биотрансформацию, поэтому мутагенные и канцерогенные эффекты определяются непрямым действием исходного соединения, а продуктов их метаболизма. В результате большинство известных химических соединений является не прямыми мутагенами и кан-

церогенами, а промутагенами и проканцерогенами. Это не позволяет регистрировать с помощью микроорганизмов мутагенную активность метаболитов химических соединений, образующихся в процессе биотрансформации. Выход из этой ситуации был найден.

Увеличение во всех компонентах биосферы количества доступных для живых организмов форм тяжелых металлов делает актуальным анализ последствий этих, обусловленных развитием человеческой цивилизации, процессов на биоценозы. Особенно важны такие исследования в отношении растений, поскольку сохранение оптимальных условий жизнедеятельности на нашей планете во многом зависит от состояния фитоценозов, их способности выполнять свои функции в биосфере.

В последнее время тревогу вызывает воздействие остатков пестицидов, ионов тяжелых металлов и других ксенобиотиков на структуру, функции и генетическую основу агропопуляций, что может привести к ухудшению генетических свойств ценных видов культурных растений. В первую очередь отрицательное воздействие перечисленных факторов сказывается на генетической чистоте сорта, т. е. способности из поколения в поколение передавать сгруппированные в селекционном процессе блоки генов с хозяйственно важными характеристиками сортов.

Для сохранения генофонда культурных растений необходимы раннее тестирование и предсказание возможных изменений на уровне организма и популяции, связанных с использованием в сельском хозяйстве пестицидов и удобрений в реально применяемых концентрациях. Решить эту задачу можно с помощью генетического мониторинга, уделив внимание изучению причин, механизмов и последствий мутационной изменчивости, т. е. наследуемых изменений генетического материала.

## **2.2. Действие физических и химических факторов на наследственный аппарат клетки**

Существуют серьезные отличия в механизмах действия физических и химических факторов, связанные в первую очередь с различиями в формах передачи энергии и путей поступления в клетки-мишени. В частности, начиная с определенной дозы ионизирующего излучения, дальнейшее ее снижение влияет только на долю пораженных ядер, оставляя неизменной величину средней энергии, абсорбированной ядром, в отличие от химических мутагенов, концентрацию которых можно уменьшать вплоть до молекулы на клетку. Специфика химических факторов обнаруживает

ся также при анализе путей их поступления в клетки. Хотя излучения частично поглощаются покрывающей клетки-мишени тканью, но качество их при этом не меняется. Химические же агенты, проходя через метаболическую систему организма, могут существенно изменяться. При этом они могут как потерять свои токсические или мутагенные свойства, так и усилить их. Яркий пример такого превращения — циклофосфамид, широко используемый в качестве цитостатика. Это немутагенное само по себе соединение в организме млекопитающих превращается в сильный мутаген. Таким образом, различия в генетическом действии этих двух групп мутагенов носят кардинальный характер. Именно поэтому калибровочная кривая, построенная на основе облучения культуры клеток *in vitro*, может быть использована в целях биологической дозиметрии для оценки дозы облучения *in vivo*. Трудно представить что-либо подобное в отношении химических субстанций.

## 2.2.1. Действие физических факторов

Относительный вклад в техногенную нагрузку факторов физической природы стремительно возрастает. За последние 50—60 лет суммарная напряженность электромагнитных полей и интенсивность неионизирующих излучений увеличилась по сравнению с естественным фоном в 1 000—1 000 000 раз. С точки зрения экологии и эволюции такое увеличение можно рассматривать как мгновенный скачок со сложно предсказуемыми медицинскими, биологическими и экологическими последствиями.

Ионизирующее излучение (ИИ) в отношении индукции биологических эффектов является наиболее изученным из факторов физической природы. Первые экспериментальные доказательства способности ионизирующего излучения индуцировать мутации были практически одновременно получены в середине 20-х гг. XX в. Г. А. Надсоном и Г. С. Филипповым на плесневых грибах *Mucor genevensis*, Г. Меллером на дрозофиле и Р. Стадлером на овсе. В результате этих исследований биологи впервые получили возможность экспериментально воздействовать на наследственную изменчивость. Ионизирующее излучение индуцирует все типы повреждений, возникающих в ДНК и спонтанно — от модификации отдельных оснований до крупных перестроек, захватывающих обширные области хромосом, включающие большое количество генов. Однако спектры спонтанных и индуцированных ионизирующим излучением повреждений ДНК существенно различаются. Если при спонтанном мутагенезе большая часть (65 %) поврежденных ДНК относится к генным мутациям, а именно к заменам пар

оснований, то при радиационном мутагенезе в основном возникают делеции. Двунитевой разрыв ДНК (ДР ДНК) — самый опасный и сложно реparableмый тип повреждений генетического материала, индуцируемый ионизирующим излучением и некоторыми химическими мутагенами. В то же время ДР ДНК постоянно возникают в клетках, хотя и с гораздо меньшей частотой, в ходе нормального функционирования генетического аппарата.

При анализе биологических эффектов действия ИИ важно ясно представлять, какие элементарные события происходят в облученной клетке и как соотносится уровень индуцированных генетических повреждений со спонтанным. Согласно исследованиям Б. Эймса, только за счет окисления активными формами кислорода в ДНК одной нормальной клетки человека в течение суток возникает 1 млн повреждений оснований. Такое же количество повреждений формируется при  $\gamma$ -облучении клеток в дозе 0,5 Гр. В свете этих данных гораздо более понятными становятся оценки генетической эффективности естественного радиационного фона, на 6 порядков уступающие скорости образования спонтанных повреждений ДНК. Эта оценка остается справедливой даже с учетом того, что спектр индуцируемых ИИ повреждений смещен в сторону более тяжелых нарушений относительно спонтанных. Тем не менее естественный радиационный фон индуцирует в клетке ДР ДНК в 1 000 раз реже, чем они возникают спонтанно.

В начальный период развития радиобиологии принято было считать, что выход мутаций на единицу дозы одинаков как для малых, так и для больших доз (линейность), и предполагалось, что квант энергии излучения, воздействуя непосредственно на хромосому, вызывает в молекулах ДНК необратимые изменения (беспороговость). Эти постулаты легли в основу получившей в настоящее время наибольшее распространение линейной беспороговой концепции, подразумевающей безусловную опасность любых уровней облучения, в том числе и не превышающих естественный радиационный фон. На молекулярном уровне действие ионизирующего излучения действительно является беспороговым, поскольку энергия любого кванта излучения превышает энергию связи в биологических макромолекулах.

Накопление экспериментальных фактов показало возможность модификации результатов мутационного процесса разными факторами, а также то, что первичные повреждения ДНК восстанавливаются в ходе репарационных процессов. Это в корне изменило концептуальную основу понимания мутационного процесса. Уже к середине прошлого века стало ясно, что при изучении биологического действия низких доз ИИ необходимо отойти от механически перенесенных из области больших доз представлений.

В чем же заключается причина существенных различий в ответной реакции клетки на облучение в больших и малых дозах? Исчерпывающего ответа на этот вопрос пока не существует, поэтому до настоящего времени нет и общепризнанной концепции биологического действия малых доз ИИ. Однако многое уже известно, и это позволяет сделать вывод, что закономерности формирования биологических эффектов больших и малых доз принципиально различаются. В этом различии существенную роль играют так называемые «немишенные» феномены, выраженность которых не увеличивается с дозой облучения. Поэтому при облучении в больших дозах они играют незначительную роль. Понятно, что такой характер проявления немишенных реакций самым существенным образом сказывается на форме дозовой зависимости и определяет ее нелинейность в диапазоне малых доз.

Перечислим наиболее существенные из них:

- различие систем репарации, активируемых в клетке в ответ на облучение в больших и малых дозах;
- адаптивный ответ, заключающийся в увеличении устойчивости к большим дозам после воздействия в малых;
- эффект свидетеля, состоящий в том, что часть не подвергшихся воздействию клеток реагируют так же, как облученные;
- генетическая нестабильность, проявляющаяся в повышенной частоте возникновения самых разных генетических нарушений (генных мутаций, aberrаций хромосом, гибели) в поколениях подвергшихся воздействию (не обязательно радиационному) клеток. Это явление может проявляться на протяжении многих поколений, характерно как для соматических, так и для половых клеток и поэтому может проявляться у потомков облученных организмов.

Учет немишенных эффектов, играющих определяющую роль в формировании ответной реакции клетки на низкодозовое радиационное воздействие, позволяет объяснить имеющиеся в нашем распоряжении факты закономерностей индукции генетических эффектов малыми дозами ионизирующих излучений, а именно:

- принципиальное различие биологических эффектов, индуцируемых облучением в больших и малых дозах;
- малую величину дозы, вызывающей вскоре после облучения увеличение метаболической активности в клетках разного типа;
- нелинейность формы дозовой зависимости;
- существование нижнего порога эффектов по дозе;
- зависимость эффекта от мощности дозы;
- неспецифичность в отношении природы иницирующих агентов.