**ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ 8**

**ТЕСТ-системи для оцінки генетичної активності хімічних сполук**

В даний час в навколишнє середовище введено велику кількість факторів, вплив яких на організми може призвести до серйозних негативних наслідків, аж до виродження та вимирання видів. Серед таких факторів особливе значення мають генотоксиканти, тобто фактори, здатні порушувати генетичні структури та процеси. Особлива їх небезпека полягає в тому, що, на відміну від токсикантів, їх ефект не припиняється з загибеллю організму, що зазнав впливу, оскільки спадкові структури передаються потомству. Віддалені негативні наслідки з'являться у наступних поколіннях. У зв'язку з цим необхідна оцінка генотоксичності всіх факторів навколишнього середовища та моніторинг за вмістом генотоксикантів у біосфері.

Генотоксиканти – широке поняття. Сюди відносяться: по-перше, фактори, здатні порушувати структуру ДНК, тобто викликати мутації (генні, хромомсомні, геномні). По-друге, генотоксичними подіями вважаються процеси, що побічно впливають перебіг мутацій (генетична репарація, кросинговер, протікання мітозу, порушення центромір і мітотичного апарату та інших.).

Разом з тим, в даний час в екотоксикогенетиці широко використовуються тести, що реєструють тільки мутагенний потенціал фактора. Це призводить до заниження загрози реального забруднення біосфери генетично активними чинниками з таких причин.

По-перше, реєструються лише порушення структури спадкового матеріалу.

По-друге, тести на мутагенність є видоспецифічними, оскільки є мутагени, що ушкоджують геном лише в певних видів. Таким чином, мутаген, небезпечний, наприклад, для людини, може бути не виявлений на тест-об'єкті, що використовується дослідником.

По-третє, методи є тест-специфічними, тому що кожен метод виявляє, як правило, небагато, частіше за один вид пошкоджень і не реєструє інші. З цих причин для зменшення кількості можливих помилково-негативних і помилково-позитивних відповідей необхідно використовувати широкий набір методів із застосуванням широкого кола об'єктів.

Це сильно ускладнює та подорожчає дослідження. У зв'язку з цим перспективним є використання інтегральних показників, що дозволяють в одному тесті реєструвати широкий спектр порушень як генетичних структур, так і генетичних процесів.

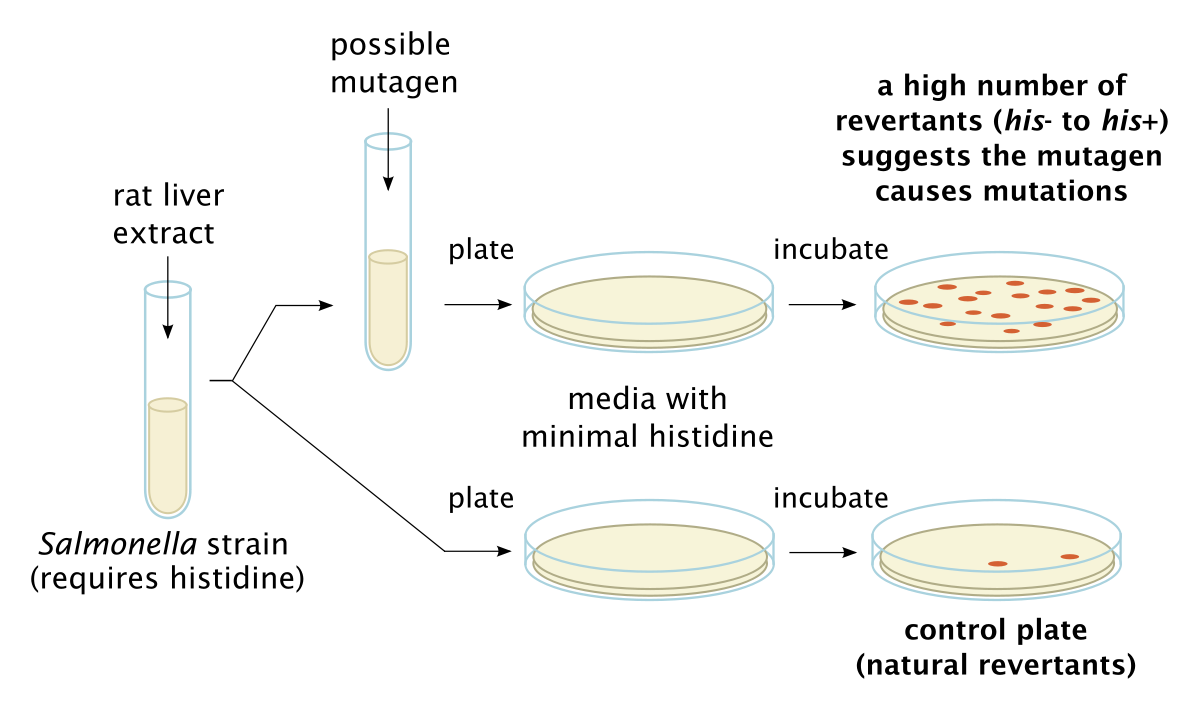
Відомо понад 100 різних методів оцінки генотоксичності. Однак реально практичне використання мають не більше ніж 20 тест-систем. Найбільш поширений метод реєстрації впливу ксенобіотиків (мутагенів та канцерогенів) на частоту генних мутацій запропонований Брюсом Еймсом у 1975 році.

Які використовуються як тест-об'єкт His-мутанты Salmonella typhimurium не синтезують гістидин і виживають на безгістидинових середовищах лише при виникненні зворотної мутації до дикого типу

His+. Ревертанти дикого типу утворюють колонії на середовищі без гістидину, що служить показником виникнення генних мутацій. Конструювання тестерних штамів, найбільш чутливих до дії мутагенів, досягається інактивуванням у клітинах системи ексцизійної репарації.

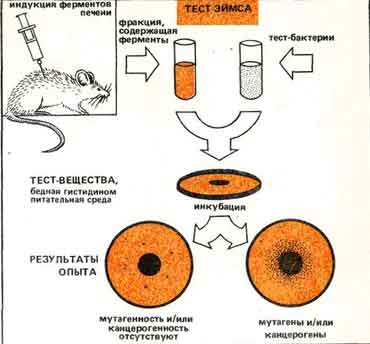
Крім того, клітини штамів, що застосовуються в тесті Еймса, мають й інші особливості, що підвищують чутливість їх до мутагенних впливів. Багато сполук проявляють мутагенну та канцерогенну активність тільки при метаболічній активації ферментами ссавців,

(її проводять щодо досліджуваних сполук in vitro за допомогою мікросомної фракції печінки ссавців). Останніми роками тесг Еймса було значно вдосконалено: автоматизовано процедуру тестування, підвищено чутливість до окремих типів мутагенів.



Принципово новий підхід для оцінки генотоксичності - використання трансгенних мишей з інтегрованими в геном тестерними генами. За їхньою зміною, що виявляється, наприклад, за допомогою рестрикційного аналізу, можна оцінювати індукцію генних мутацій. Використовуючи трансгенні тест-об'єкти, можна вивчати тканинну та органну специфічність мутагенної дії

.



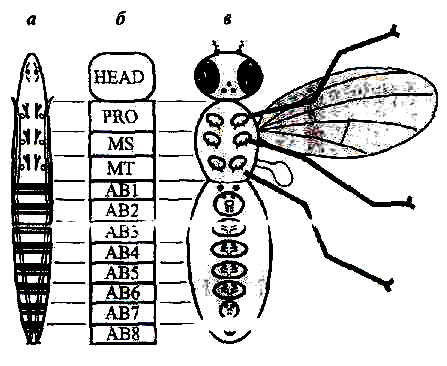
Найчастіше у вищих організмів мутації окремих генів не розглядаються, оскільки дуже рідкісні. Натомість оцінюють частоту виникнення мутацій у хромосомі в цілому.

Перший такий метод виявлення та визначення частоти мутацій у дрозофіли -СlВ-застосував у 1927 р. Герман Меллер. Він розробив систему, що дозволяє відрізняти мутацію, що знову виникла від вже наявних в генотипі.

Так як найбільш об'єктивно можна врахувати частоту рецесивних летальних мутацій, Г. Меллер ввів у Х-хромосому тестерної лінії дрозофіли інверсію Сl, яка відіграє роль «замикача» кросинговера (C) і має рецесивний летальний ефект (l).

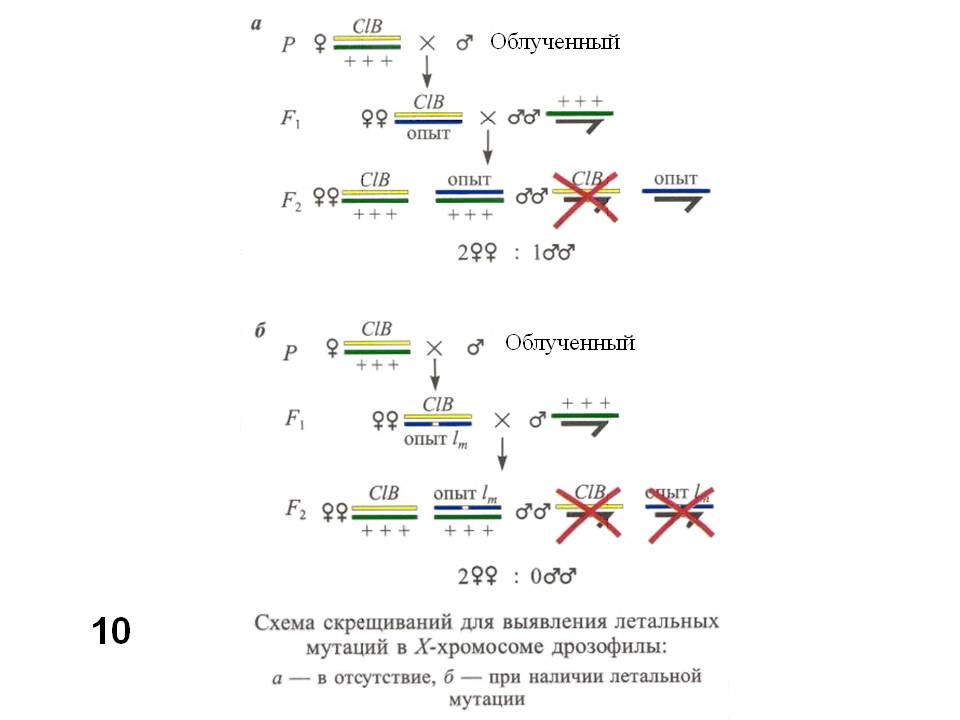
Крім того, він маркував Х-хромосому домінантним геном В (Bar), що редукує число фасеток ока; в результаті сферичні в нормі ока у самок-гетерозигот набувають бобоподібної форми, а у самців стають щілинними.

Самок тестерної лінії СlВ схрещували з опроміненими самцями (як мутаген могло виступати і хімічна сполука). З першого покоління вибирали самок СlВ/+ для встановлення індивідуальних схрещувань.



Оскільки самці з генотипом ClB/Y гинуть незалежно від появи нової летальної мутації, у разі її відсутності розщеплення за статтю у другому поколінні буде 2:1. Відсутність у другому поколінні самців XY свідчить про виникнення у Х-хромосомі летальної мутації. Її частота виражається ставленням числа Х-хромосом, точніше пробірок з індивідуальними схрещуваннями, де була виявлена нова летальна мутація, до загального числа пробірок даної вибірки.

Слід пам'ятати, що у самок першого покоління між статевими хромосомами іноді може відбуватися подвійний кросинговер, що призводить до зниження істинної частоти летальних мутацій. В даний час метод С1В втратив своє практичне значення.



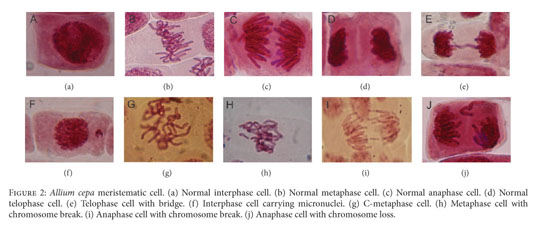
Замість нього використовується запропонований надалі тим самим автором метод Меллер-5. У самок лінії-аналізатора: обидві Х-хромосоми містять дві інверсії, не пов'язані з летальною дією: sc8 (редуковані щетинки) захоплює більшу частину Х-хромосоми, 49 - інверсія в середній частині Х-хромосоми. Наслідком цих інверсій є майже повне виключення перехреста між хромосомами. Додатково обидві Х-хромосоми самки марковані геном жовтого забарвлення тіла та щетинок yellow (у). Самці у такій лінії життєздатні.

Якщо взятий для дослідження самця дикого типу немає мутації в Х-хромосомі, то, після схрещування його з самкою з лінії-аналізатора, у другому поколінні ми отримаємо по 2 фенотипічні класи самок і самців. Якщо ж у аналізованій Х-хромосомі досліджуваного самця виникла летальна мутація, то у другому поколінні всі самці належать до одного фенотипного класу (scsy d49) – жовті з редукованими щетинками.

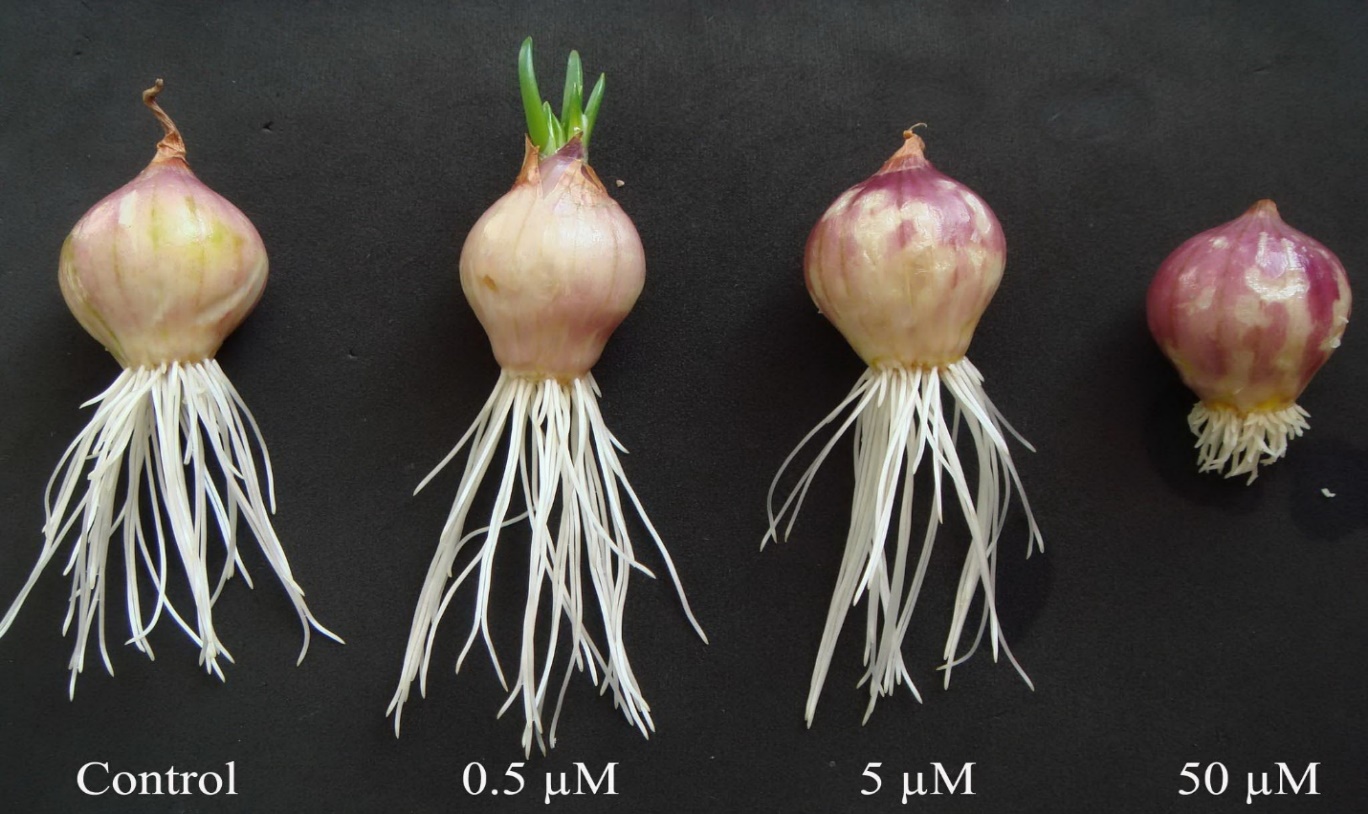
При цьому кожна індивідуальна культура другого покоління, яка є потомством однієї самки F1, відповідає одній дослідженій Х-хромосомі самця.

Для оцінки здатності агентів індукувати хромосомні мутації широко використовуються цитогенетичні методи обліку хромосомних аберацій у метафазних клітинах проліферуючих тканин in vitro або in vivo.

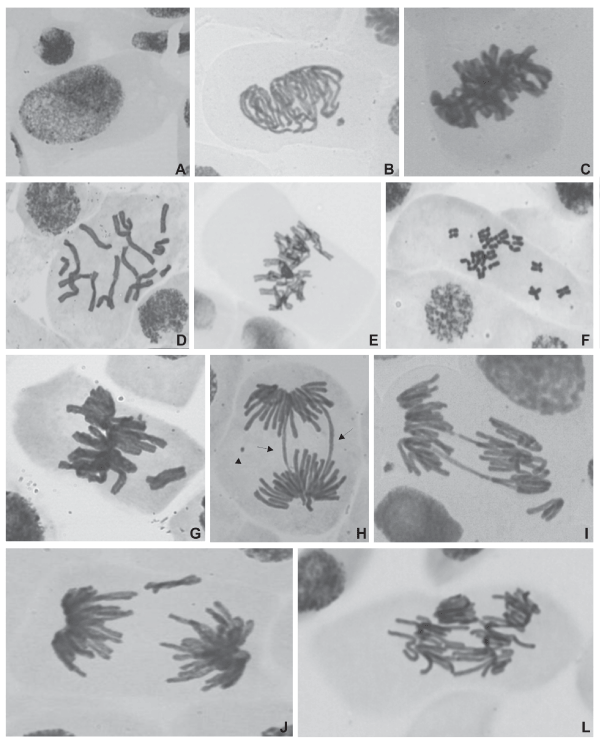
Одним із таких методів є розроблений А. Леваном у 1938 році для вивчення ефекту впливу колхіцину на мітоз у клітинах Allium cepa, що показав високу ефективність. Спостереження за особливостями кореневої системи цибулі звичайної (Allium cepa) підтвердили, що ця рослина є найбільш чутливою до небезпечних впливів токсикантів, адже коренева система – це частина будь-якої рослини, що першою вступає в контакт з хімічними забруднюючими агентами, що перебувають у складі грунтів та вод. Загальний ефект кількісно може бути визначений виміром стримування приросту кореневої системи, що розвивається, а огляд хромосом окремих клітин кореневої системи може вказати ймовірні мутагенні ефекти.



Біотест Allium cepa не вимагає знання каріотипу та ідентифікації типів пошкоджень хромосом, є простим, економічним та досить чутливим для визначення «мутаген» або «не мутаген». Він забезпечує подібні результати з низкою інших тестових систем. Як макроскопічний, так і мікроскопічний ефекти, мають хорошу кореляцію між собою Макроскопічний ефект (стримування кореневого приросту) є найчутливішим параметром і наслідком прямих або непрямих шкідливих ефектів.



Мікроскопічне дослідження дозволяє оцінити пошкодження хромосом та порушення розподілу клітин, і тому надає додаткову інформацію щодо гостроти, механізму токсичного ефекту чи потенційної мутагенності. Кореневі клітини мають певні ферменти, що виконують функції оксидаз, які сприяють перетворенню багатьох немутагенних речовин на мутагенні. Ця система активації дозволяє виявити ті хімічні речовини, які посилюють свій токсичний ефект у процесі метаболізму.



Система має широкий ряд застосувань, наприклад, для перевірки хімічної чистоти питної та природної води, для визначення ступеня впливу промислових збитків тощо. Біотест використовують для вимірювання відносної токсичності нерозчинних у воді сполук, за умови, що вони будуть розчинені у відповідному розчиннику, а потім розведені у воді таким чином, що залишкова концентрація не перевищить певних меж.

У таких випадках для контролю розчинників повинен бути організований тестовий режим. Біотест працює за широких значень pH (3.5–11.0) без жодних очевидних ефектів на прирості кореневих систем. Тому помірно кислі або лужні зразки води, хімічні розчини аналізуються без коригування pH.