

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕФТИ В ОРГАНИЗМЕ ГРЫЗУНОВ

В условиях экспериментальной модели установлены эффективные концентрации нативной нефти как загрязнителя окружающей среды, обладающие мутагенным эффектом, путем индукции хромосомных мутаций в клетках костного мозга млекопитающих. Установлена эффективная концентрация мутагенной активности нефти (1 мг/кг массы тела) и специфичность ее действия по изменению частоты индуцированных хромосомных мутаций в клетках костного мозга млекопитающих при остром воздействии в течение 12, также генетическая опасность эффективных концентраций нефти при 10 мг/л (0,1 мг/кг) и 100 мг/л (1,00 кг/кг).

In experimental models established effective concentration of native oil as a pollutant to the environment, which has a mutagenic effect by induction of chromosomal mutations in bone marrow cells of mammals. The effective concentration of the mutagenic activity of oil (1 mg/kg body weight)

and the specificity of its actions to change the frequency of induced chromosomal mutations in bone marrow cells of mammals following acute exposures for 12, also genetic risk effective oil concentrations under 10 mg/l (0.1 mg/kg) and 100 mg/l (1.00 kg/mg).

Экотоксиканты, накапливаясь в объектах окружающей среды, оказывают негативное воздействие на природные экосистемы. Поражая наследственный материал, они приводят к увеличению генетического груза в природных популяциях. Снижение способности клетки к репарации, вызванное различными ксенобиотиками, может сопровождаться возникновением мутаций, развитием патологических процессов и впоследствии гибелью клетки и целого организма. Накопление в окружающей среде тяжелых металлов, пестицидов, загрязнение компонентами ракетного топлива, нефтью и нефтепродуктами приводит к росту заболеваемости населения, снижению численности и редких и эндемичных видов растений и животных, к дестабилизации природных экосистем [1, 2].

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования были взяты беспородные белые крысы весом 200-250 г в возрасте 6 месяцев (самцы и самки).

Животные, подвергавшиеся острому воздействию растворами сырой нефти (однократная инъекция внутривентриально) были разделены на 2 группы:

- первая группа подвергалась воздействию нефти в концентрациях 0.01 мг/кг; 0.10 мг/кг и 1.00 мг/кг массы тела в течение 12 часов (9 особей);

- вторая группа – интактные животные, не подвергавшиеся воздействию нефти (3 особи).

Всего в эксперименте было использовано 12 особей. Хроническое воздействие нефти производили введем внутривентриально животных. Материалом исследования явились клетки костного мозга подопытных животных. Приготовление цитологических препаратов хромосом осуществлялось по общепринятой методике с помощью метафазного метода [3].

Перед опытом определяли вес каждой крысы. Внутривентриально крысам вводили 0.04 % раствор колхицина из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Колхицин является ингибитором митоза, подавляет функцию веретена деления, что задерживает делящиеся клетки на стадии метафазы. Это позволяет накопить достаточное количество метафаз. Под влиянием колхицина хромосомы укорачиваются (спирализуются) и становятся удобными для анализа. Через 1,5-2 часа после ввода колхицина крыс забивали и извлекали бедренные кости, очищали от мышц, отрезали эпифизы и костный мозг вымывали с помощью шприца гипотоническим раствором хлорида калия 0.56% (5 мл, лучше подогретым до 37 °С) в градуированную центрифужную пробирку емкостью 10 мл. Вымытый костный мозг тщательно суспендировали с помощью пастеровской пипетки для гомогенизации клеточной суспензии. Пробирки с клеточной суспензией помещали в термостат при 37 °С на 30 минут. Перед изготовлением препаратов суспензию зафиксированных клеток центрифугировали, удаляли фиксатор, а осадок клеток тщательно ресуспендировали в 0.5-0.8 мл свежего фиксатора. Клеточную суспензию по 5-6 капель наносили с помощью пастеровской пипетки на охлажденное влажное предметное стекло с высоты 5-6 см. Затем стекло быстро проносили через пламя спиртовки для выжигания фиксатора. Выжигание должно быть полным, но долгое пребывание стекла в пламени плохо отражается на качестве препарата и способности хромосом к окрашиванию. После сгорания фиксатора стекло высушивали в струе теплого воздуха. Препараты маркировали и оставляли до окончательного просушивания на 2-3 дня, затем окрашивали. Для окраски хромосомных препаратов использовали краситель по Романовскому - Гимзе. Метафазные пластинки анализировали и фотографировали в световом микроскопе Axioskop-40 (Zeiss). Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты исследования и обсуждение. Диплоидный набор хромосом клеток крысы содержит по результатам измерения абсолютных размеров и положения центромеры четыре группы хромосом с умеренной степенью спирализации (рис. 1).



Рис. 1. Кариотип самца костного мозга крысы ($2n=42$).

Формулу кариотипа крысы можно представить следующим образом:

$24A + 16M + XY (XX) = 42$ ($NF = 58$), где А – акроцентрические хромосомы; М – метацентрические хромосомы; XY – половые хромосомы самца; XX – половые хромосомы самки; NF – основное число плеч хромосом в наборе самок.

Экогенетический анализ хромосомных аномалий был проведен в клетках костного мозга беспородных крыс, которых подвергали острому воздействию растворами нативной нефти. Для сравнения анализ был проведен и в контрольной группе животных, не подвергавшихся воздействию нативной нефти.

Результаты динамики экогенетических количественных нарушений в клетках костного мозга подопытных животных при остром воздействии различными концентрациями нефти в течение 12 часов. Так, при концентрациях нефти 0.01 мг/кг и 0.10 мг/кг массы тела частота анеуплоидных клеток составила $(3.07 \pm 0.96)\%$ и $(3.58 \pm 1.02)\%$, что превышает контрольный уровень в 1.67 и 1.95 раза, соответственно. Частота клеток с гиподиплоидным набором составила $(1.53 \pm 0.68)\%$ и $(1.49 \pm 0.66)\%$, что превышает контроль в 1.54 и 1.5 раза, а частота клеток с гипердиплоидным набором хромосом составила $(1.53 \pm 0.68)\%$ и $(2.09 \pm 0.78)\%$, соответственно, то есть в первом и втором вариантах опыта частота гипердиплоидных клеток превышала контроль в 1.8 и 2.46 раза. При увеличении концентрации нефти до 1.00 мг/кг массы тела наблюдалось увеличение частоты анеуплоидных клеток в 2.24 раза достоверно превышающей уровень контроля, что составило $(4.12 \pm 1.08)\%$ ($p < 0.05$). В данном случае также выявлено увеличение частоты гипердиплоидных клеток в 2.76 раза по сравнению с контролем, что составило $(2.35 \pm 0.82)\%$. В этом варианте эксперимента выявлено недостоверное по сравнению с контролем увеличение частоты гиподиплоидных клеток в 1.78 раза, что составило $(1.76 \pm 0.71)\%$ (рисунки 2, 3).



Рис. 2. Метафазная пластинка с полиплоидным (А) и гиподиплоидным набором хромосом, ацентрическим кольцом (Б).

Все изученные концентрации нефти приводят к увеличению частоты полиплоидных клеток по сравнению с контролем, так при концентрации 0.01 мг/кг массы тела обнаружено увеличение частоты полиплоидных клеток в 2.17 раза, что составило $(2.45 \pm 0.86)\%$. При воздействии нефти в концентрации 0.10 мг/кг массы тела обнаружено увеличение частоты полиплоидных клеток в 2.65 раза по сравнению с контролем, что составило $(2.99 \pm 0.93)\%$. При увеличении концентрации нефти до 1.00 мг/кг массы тела обнаружено достоверное увеличение частоты полиплоидных клеток в 3.12 раза по сравнению с контролем, что составило $(3.53 \pm 1.00)\%$ ($p < 0.05$).

В контрольном варианте частота анеуплоидных клеток составила $(1.84 \pm 0.51)\%$, среди которых частота гиподиплоидных наборов составила $(0.99 \pm 0.37)\%$, частота гипердиплоидных наборов - $(0.85 \pm 0.35)\%$, частота полиплоидных клеток составила $(1.13 \pm 0.40)\%$.

Помимо частоты геномных изменений, также анализировали общую частоту клеток с хромосомными aberrациями, а также спектр структурных нарушений хромосом. В таблице 1 представлены результаты анализа общей частоты экогенетических нарушений хромосомного аппарата в клетках костного мозга подопытных животных при остром воздействии нативной нефти в течение 12 часов.

ЭКОЛОГИЯ

Таблица 1. Анализ частоты качественных экогенетических нарушений хромосомного аппарата в клетках костного мозга подопытных животных при остром воздействии нефти (экспозиция 12 часов)

Группа животных	Концентрация нефти, мг/кг массы тела	Изучено метафаз	Всего клеток с абберациями		Типы аббераций хромосом							
			число	(M±m), %	хромосомные				хроматидные			
					парные фрагменты	центромерные разрывы	всего		концевые делеции	acentрические кольца	всего	
						число	(M±m), %					число
контроль	-	705	11	1.56±0.47	3	2	5	0.71±0.32	6	0	6	0.85±0.35
1 опыт	0.01	326	9	2.76±0.91	2	2	4	1.23±0.61	4	1	5	1.53±0.68
2 опыт	0.10	335	11	3.28±0.97	1	3	4	1.19±0.59	5	2	7	2.09±0.78
3 опыт	1.00	340	13	3.82±1.04*	2	3	5	1.47±0.65	8	0	8	2.35±0.82
Примечание – * p<0.05, при t>1.96												

ЭКОЛОГИЯ

Из данных представленных в таблице видно, что структурные нарушения хромосом представлены в преобладающем количественном отношении нарушениями хроматидного типа. При этом аберрации хромосомного типа были представлены в основном парными фрагментами и центромерными разрывами. Структурные нарушения хромосом хроматидного типа были представлены в виде ацентрических колец и концевых (одиночных) делеций. Концентрации нефти 0.01 мг/кг и 0.10 мг/кг массы тела вызвали повышение частоты хромосомных нарушений в 1.77 и 2.1 раза по сравнению с контролем, что составило $(2.76 \pm 0.91)\%$ и $(3.28 \pm 0.97)\%$, соответственно. При увеличении концентрации нефти до 1.00 мг/кг массы тела обнаружено достоверное увеличение частоты хромосомных нарушений в 2.45 раза по сравнению с контролем, что составило $(3.82 \pm 1.04)\%$, ($p < 0.05$). При воздействии нефти в концентрации 0.01 мг/кг массы тела аберрации хромосомного типа составили $(1.23 \pm 0.61)\%$, а хроматидного типа составили $(1.53 \pm 0.68)\%$. При увеличении концентрации нефти до 0.10 мг/кг и 1.00 мг/кг массы тела аберрации хромосомного типа составили $(1.19 \pm 0.59)\%$ и $(1.47 \pm 0.65)\%$, тогда как аберрации хроматидного типа составили $(2.09 \pm 0.78)\%$ и $(2.35 \pm 0.82)\%$, соответственно.

Таким образом, в дополнение к известным результатам по генетической опасности, то есть отдаленных экологических последствий, нами установлено, что загрязнение природной среды нефтью в концентрациях 1 мг/кг массы тела при остром (однократном) воздействии и в концентрациях 10 мг/л и 100 мг/л при хроническом длительном воздействии представляет реальную экологическую опасность. Увеличение частоты гипердиплоидных и полиплоидных клеток указывает на возможность перерождения клеток, то есть развития злокачественных новообразований, что представляет канцерогенный риск для населения данного региона.

Литература:

1. Абилев С.К. Химические мутагены и генетическая токсикология. //Природа. 2012, № 10. – С. 39-46.
2. Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Калимагамбетов А.М., Ловинская А.В., Ерубаяева Г.К. Влияние пестицидов класса фенилпиразолов на организм млекопитающих. //Материалы 3-й Международной междисциплинарной конференции Гумбольдт-Коллег в Кыргызстане «Наука и культура в глобализованном мире». – Бишкек, 2010. – С. 83-86.
3. Ford C.E., Hamerton J.L. The chromosomes of man // Nature. – 1956. – Vol. 178. No. 4541. – PP. 1020-1023.