УДК 546.8 : 615.099

ПОЛИТЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ GLYPTOTENDIPES GLAUCUS MG. (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ СВИНЦА

Н.А. Дурнова[1], Ю.В. Климова[1], М.Ю. Воронин[2]

[1]ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 410012, г. Саратов, Российская Федерация
[2]ФГБОУ ВПО Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012, г. Саратов, Российская Федерация

Представлены результаты анализа цитогенетического воздействия ионов свинца на политенные хромосомы (ПХ) *Glyptotendipes glaucus* Mg. Функциональное состояние политенных хромосом определяли посредством вычислений: индекса компактности хромосом (CR); коэффициента генетической активности ядрышкового организатора (NOR) и коэффициента генетической активности кольца Бальбиани (BRR). При увеличении концентрации раствора нитрата свинца индекс компактности возрастает, т. е. компактность хромосом уменьшается: медианы значений CR (при измерении плеча E) в контроле составляют 6.05, для максимальной исследованной концентрации – 7.3. В результате воздействия ионов свинца происходит снижение активности генов ядрышкового организатора: медианы значений NOR снижаются от 2.3 в контроле до 2.0 для самых высоких использованных в эксперименте концентраций. Активность генов кольца Бальбиани с увеличением концентрации раствора нитрата свинца возрастает: медианы значений BRR в контроле составляют 1.45, для максимальной исследованной концентрации – 1.95. Геном *G. glaucus* реагирует на изменение концентрации ионов свинца в среде неоднозначно: происходит снижение коэффициента генетической активности ядрышкого организатора, тогда как генетическая активность кольца Бальбиани, наоборот, возрастает.

Ключевые слова: *тяжелые металлы, политенные хромосомы, хирономиды, генетическая активность.*

Ведение. В настоящее время, наряду с токсикантами органического происхождения, увеличивается ежегодное поступление в естественные биогеохимические циклы соединений тяжелых металлов (ТМ), в результате чего нарушается постоянство элементарного состава окружающей среды, что является дестабилизирующим фактором функционирования биологических систем. К широко распространенным и потенциально опасным токсикантам относятся соединения свинца [1].

Токсическое действие ТМ на организм гидробионтов в естественных условиях во многом зависит от формы их существования в среде, поэтому актуально проведение экспериментальных исследований, моделирующих влияние различных концентраций ионов свинца на организм гидробионтов. Экспериментальные исследования токсикологических и генотоксических эффектов воздействия ТМ на организм гидробионтов делает их актуальными и перспективными в общей проблеме биологических аспектов охраны окружающей среды [2-5]. При этом важным аспектом является регистрация морфо-функциональных нарушений, происходящих на уровне организма и клетки, и выявление зависимости подобных процессов от

Дурнова Наталья Анатольевна (Durnova Natalya Anatolievna), доцент, доктор биологических наук, заведующая кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники «ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 410012, г. Саратов, ndurnova@mail.ru
Климова Юлия Валерьевна (Klimova Julia Valerievna), аспирант кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники «ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 410012, г. Саратов, ulia.climowa2015@yandex.ru
Воронин Максим Юрьевич (Voronin Maksim Yurievich), кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и экологии животных «ФГБОУ ВПО Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства образования и науки Российской Федерации, 410012, г. Саратов, voroninmj@yandex.ru

концентрации токсиканта в среде, уровня биоаккумуляции и экспозиции [6-8].

В основе ответной реакции любого организма на влияние извне лежит реакция клетки, прежде всего, её хромосомного аппарата – носителя наследственной, структурной, регуляторной информации. Уникальным объектом для исследования функциональной активности интерфазной хромосомы являются гигантские или политенные хромосомы слюнных желез личинок хирономид, выполняющие тканеспецифические функции, заключающиеся в продукции секреторного материала [9, 10]. Ранее в качестве тест-объекта по влиянию тяжелых металлов использовался *Chironomus plumosus* L., обитающий на дне водоема, поэтому при проведении хронического эксперимента возникала необходимость добавления грунта к анализируемому раствору ксенобиотика, что в целом существенно искажало эффект его действия. Личинки *Chironomus* доступны для массового сбора только в определенный, кратковременный период времени (с января по март) [11,12].

Выбор в качестве модельного объекта для оценки степени токсичности ионов свинца фитофильного вида хирономид – *Glyptotendipes glaucus* Mg. (триба *Chironomini*, подсемейство *Chironominae*, семейство *Chironomidae*), личинки которого большую часть года заселяет прибрежно-водную растительность и любые погруженные субстраты [13]. Личинки *G. glaucus* доступны для массового сбора практически круглогодично, к тому же при проведении даже хронического эксперимента нет необходимости добавления грунта в тестируемый раствор ксенобиотика, что делает результаты эксперимента более достоверными.

Цель настоящей работы – изучить влияние ионов свинца различной концентрации на морфофункциональные характеристики политенных хромосом *Glyptotendipes glaucus.*

Материалы и методы исследования. Собранных в природе личинок хирономид *G. glaucus* с целью акклимации выдерживали в течение суток в дехлорированной воде при комнатной температуре. Далее по 10 особей помещали в растворы нитрата свинца соответствующих концентраций 0.01, 0.02, 0.1, 0.5 мг/л и в контроль (дехлорированная вода). Эксперимент проводили без смены среды. Рабочие растворы готовили непосредственно перед началом исследований разведением стандартного 1М раствора нитрата свинца. Экспозиция – 12 часов. У каждой особи исследовалось по 10 клеток слюнных желез. По окончании времени эксперимента личинок высушивали в течение одной минуты на фильтровальной бумаге и фиксировали в смеси Карнуа (этанол, уксусная кислота, в соотношении 3:1). Емкости с личинками и фиксирующим раствором хранили при пониженной температуре (+4^{0}C). В качестве метода кариологического анализа применяли этил-орсеиновую методику [14], которая позволяет одновременно фиксировать и окрашивать хромосомы. Из клеток слюнных желёз личинок хирономид готовили давленые препараты. Анализ и фотографирование хромосом проводилось с помощью микроскопа Primo Star Carl Zeiss с использованием фотокамеры Axio CamER c5s при увеличениях 16×40 и 16×100.

Функциональное состояние политенных хромосом определяли посредством вычислений: индекса компактности хромосом (CR) – отношения абсолютной длины плеча Е хромосомы III к ширине её центромеры [15,16]; коэффициента генетической активности ядрышкового организатора (NOR) – отношения максимального диаметра ядрышка к ширине интактного района 6 хромосомы IV; коэффициента генетической активности кольца Бальбиани (BRR) – отношение максимального диаметра кольца Бальбиани к ширине интактного района 6 хромосомы IV [17]. В соответствии с результатами описательной статистики множественное сравнении выборок проводили с использованием непараметрического аналога дисперсионного анализа – критерию Краскела-Уоллиса и Медианному тесту.

Результаты и обсуждение. Непосредственная связь работы ядрышкового организатора – локуса, ответственного за синтез рРНК, с процессами биосинтеза белка, делает ядрышко основной мишенью стрессовых воздействий [18]. Воздействия ионов свинца в эксперименте вызвало снижение активности генов ядрышкового организатора у *G. glaucus.* Анализ распределения значений NOR (по критериям Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка и Лиллиефорса) показал статистически достоверное отклонение от нормального для исследованных выборок в растворах нитрата свинца. Для этих же выборок отмечены достоверные асимметрия и эксцесс. Медианы значений NOR с увеличением концентрации раствора нитрата свинца в целом снизились от 2.3 в контроле и концентрации 0.01 мг/л (рис.) до 2.0 – для самых высоких использованных в эксперименте концентраций (0.1 и 0.5 мг/л). Это определило статистически достоверные отличия между выборками из высоких концентраций нитрата свинца и самых низких концентраций в растворе, что предполагает снижение интенсивности общего метаболизма в клетках [7]. Активность биохимических механизмов снижается и клетке требуется меньше рРНК.

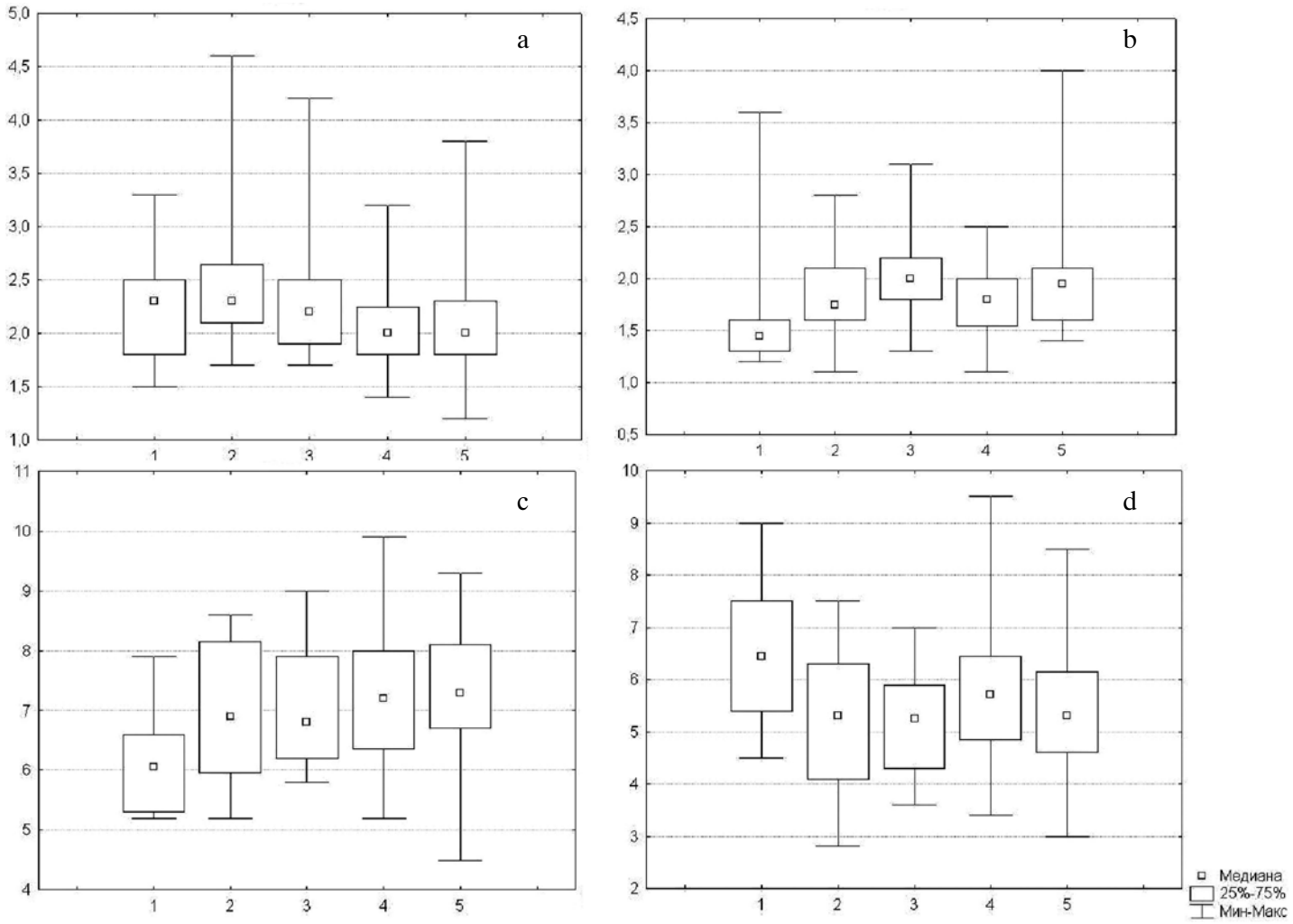

Рис. Распределение значений: «a» – отношений максимального диаметра ядрышка к ширине интактного района 6 хромосомы IV; «b» – отношений максимального диаметра кольца Бальбиани к ширине интактного района 6 хромосомы IV; «c» – абсолютной длины плеча E хромосомы III к ширине её центромеры; «d»– абсолютной длины плеча F хромосомы III к ширине её центромеры в контрольной выборке – «1», в растворе нитрата свинца 0.01 мг/л – «2», 0.02 мг/л – «3», 0.1 мг/л – «4», 0.5 мг/л – «5»

Кольца Бальбиани, в генах которых кодируется синтез тканеспецифических секреторных белков, также могут являться мишенью стрессовых воздействий [19]. Результаты проведенного эксперимента показали, что значения BRR распределены ненормально для всех исследованных выборок, кроме раствора в концентрации 0.1 мг/л. Для данных значений отмечены достоверные асимметрия и эксцесс. Медианы значений BRR с увеличением концентрации раствора нитрата свинца возрастают (см. рис.). В контроле значения составляют 1.45, для максимальной исследованной концентрации – 1.95. Для всех исследованных концентраций отмечены статистически значимые отличия от контроля. Это позволяет говорить о высокой чувствительности данного показателя к воздействию раствора нитрата свинца.

Значения индекса компактности хромосом (CR) распределены ненормально в выборке раствора с концентрацией 0.02 мг/л. Достоверная асимметрия распределения по данному показателю отмечена в контрольной выборке и в выборках из концентраций раствора нитрата свинца 0.02, 0.1, 0.5 мг/л. Отмечен эксцесс для выборок из растворов с концентрациями: 0.01, 0.02 мг/л. Медианы значений CR с увеличением концентрации раствора нитрата свинца возрастают (см. рис.). Значения CR в контроле составляют 6.05, для максимальной исследованной концентрации – 7.3. Для всех исследованных концентраций отмечены статистически значимые отличия от контроля. Это также позволят

говорить о высокой чувствительности данного показателя к воздействию раствора нитрата свинца. При увеличении концентрации раствора нитрата свинца индекс компактности возрастает, т. е. компактность хромосом уменьшается, а функциональная активность увеличивается.

Ранее установлено, что у *Ch. plumosus* под действием тяжелых металлов (Cd, Pb, Hg) компактность ПХ, также как и в нашем эксперименте, уменьшается согласно динамике биоаккумуляции личинками хирономид каждого из металлов. Наименьшая компактность наблюдается при максимальном уровне содержания ионов металлов в тканях. В экспериментах установлено, что изменение индекса компактности связано с концентрацией ионов свинца в среде и хорошо согласуется с динамикой накопления этого токсиканта тканями личинок хирономид [7].

В отличии от личинок *Ch. plumosus*, у личинок *G. glaucus* в плече E имеются активные районы, которые не позволяют в полной мере оценить как изменяется индекс компактности хромосом. Поэтому мы дополнительно измеряли плечо F для достоверности результатов. Достоверных отличий между выборами при сравнении отношений абсолютной длины плеча F хромосомы III к ширине её центромеры не обнаружено.

Таким образом, геном *G. glaucus* реагирует на изменение концентрации ионов свинца в среде неоднозначно: происходит снижение коэффициента генетической активности ядрышкового организатора, а коэффициент генетической активности кольца Бальбиани возрастает, т.е. тканеспецифическая активность клеток слюнных желез увеличивается. Вероятно, у *G. glaucus* механизм адаптации, протекающий на клеточном уровне, требует своего пластического обеспечения – наработки под контролем генетического аппарата клетки тканеспецифических белков.

Заключение. При воздействии ионов свинца в концентрациях, близких к фоновым, наблюдается неоднозначное изменение функциональной активности ПХ *G. glaucus*: происходит снижение коэффициента генетической активности ядрышкового организатора, генетическая активность кольца Бальбиани, наоборот, возрастает.

При увеличении концентрации раствора нитрата свинца индекс компактности возрастает, т. е. компактность хромосом уменьшается, что может свидетельствовать об увеличении функциональной активности хромосом в целом.

Полученные результаты свидетельствуют о специфической реакции ядерного генома *G. glaucus* на присутствие в среде ионов свинца, что может быть связано с особыми адаптационными механизмами у этого вида на хромосомном и клеточном уровнях. Повышение экспозии в эксперименте позволит более детально рассматривать динамику ответной реакции генома на токсическое воздействие ионов свинца и, следовательно, возможные биологические последствия загрязнения водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К.* Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. - М.: 1996; 319.

2. *Petrova N., Michailova P., Bovero S.* Cytogenetic characteristics of Chironomus nuditarsis Str. (Chironomidae, Diptera) and its relationship with species from the plumosus group. Late 20th century research on Chironomidae: an anthology from the 13th Intern. symposium on Chironomidae. Freiburg. 5–9 Sept. 1997; 201 – 208.

3. *Michailova P., Belcheva R.* Mutat. Res. Environ. Mutagenes and Related Subj. 1989; V. 2- № - P.: 308 – 3

4. *Белоногова Ю. В.* Экологические последствия влияния тяжелых металлов на гидробионтов Автореф. дис. …канд. биолог. наук. Экология, 1999; 126.

5. *Michailova P., Petrova N., Sella G.* Polyetene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of tracemetal- induced genome instability 2012; Fauna norvegica (31) 227 – 234.

6. *Левина Э.Н.* Общая токсикология металлов. - Л.: 1972; 1

7. *Ершов Е.А., Плетнева Т.В.* Механизмы токсического действия неорганических соединений. М.: 1989; 2

8. *Эмсли Дж.* Элементы: Пер. с англ. - М.:1993; 2

9. *Кикнадзе И.И.* Функциональная организация хромосом. - Л.: 1972; 211.

10. *Кикнадзе И.И.* Молекулярно-цитологическая организация колец Бальбиани и генов, локализованных в них. Организация и экспрессия генов тканеспецифической функции у Diptera. – Новосибирск: Наука. 1985; 23–

11. *Белянина С. И., Кузьмина К. А., Сигарева Л. Е.* Гигантские хромосомы хирономид как тест - объекта для оценки токсических эффектов пестицидов на гидробионтов. Харьков. 1979; 103.

12. *Федорова И.А., Полуконова Н.В.* Оптимизация методов анализа токсикологических и цитогенетических эффектов лекарственных препаратов на Chironomus (Diptera) in vivo в остром эксперименте. Материалы II Международной научно - практической конференции «экология биосистем: проблемы изучения, идентификации и прогнозирования». 25-30 августа 20Астрахань. 2009; 67-74.

13. *Калугина Н.С.* Систематика и биология фитофильных хирономид Учинского водохранилища (Díptera, Chironomidae). Автореф. канд. биол. наук. М.: 1960;

14. *Демин С. Ю., Шобанов Н. А.* Кариотип комара Chironomus entis из группы plumosus в европейской части СССР. Цитология: 1990; 1046- 1054.

15. *Ильинская Н.Б.* Характеристика политенных хромосом различной степени компактности у личинок природной популяции хирономуса. Цитология. 1984; Т. № 543-551.

16. *Ильинская Н. Б.* Согласованность изменений компактности политенных хромосом и их плеч в клетках слюнных желез при акклимации личинок мотыля к различным температурам. Цитология. 1990; Т. № 993- 1001.

17. *Фёдорова И. А., Полуконова Н. В.* Цитогенетические эффекты холинотропных препаратов при комбинированном действии на личинок Chironomus plumosus (Diptera) in vivo. Цитология, 2009; Том 51, № 849 – 855.

18. *Зацепина О. В.* Современные представления о свойствах и функциях ядрышка: ядрышко как мишень стрессовых воздействий на клетки. Цитология. 2007; № 53 (9): 748-749.

19. *Кикнадзе И. И., Истомина А. Г., Гундерина Л. И.* и др. Кариофонды хирономид криолитозоны Якутии: Триба Chironomini. Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 1996; 166.

REFERENCES:

1. Maystrenko VN, Khamitov R. Z., Budnikov G. K., / Ecological and analytical monitoring of super. – M.: 1996; 319.

2. *Petrova N., Michailova P., Bovero S.* Cytogenetic characteristics of Chironomus nuditarsis Str. (Chironomidae, Diptera) and its relationship with species from the plumosus group. Late 20th century research on Chironomidae: an anthology from the 13th Intern. symposium on Chironomidae. Freiburg. 5–9 Sept. 199; 201–208.

3. *Michailova P., Belcheva R.* Mutat. Res. Environ. Mutagenes and Related Subj. 1989; V. 2№ 308-312.

4. Belonogova YV. Environmental consequences of influence of heavy metals on aquatic Abstract. Ecology, 1999; 126.

5. *Michailova P., Petrova N., Sella G.* Polyetene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of tracemetal-induced genome instability 2012; Fauna norvegica (31) 227 – 234.
6. Levina EN. General toxicology of metals. – L.:1972; 140.
7. Ershov, EA, Pletneva T. V., Mechanisms of toxic effect of inorganic compounds. M.: 1989; – 272.
8. *Emslie J.* Elements: Trans. from English. – M.: 1993; 256.
9. Kiknadze II, The functional organization of chromosomes. – A.: 1972; – 211.
10. Kiknadze II, Molecular and cytological organization and rings Balbiani genes localized in them // Organization of tissue-specific gene expression and function in Diptera. – Novosibirsk: Nauka. 1985; 23-97.
11. Belyanina SI, Kuzmin KA, Sigareva LE. Giant chromosomes chironomids as a test – object to evaluate the toxic effects of pesticides on aquatic organisms. Kharkiv, 1979; 103.
12. Fedorova IA, Polukonova NV. Optimization of methods of analysis of cytogenetic and toxicological effects of drugs on Chironomus (Diptera) in vivo in acute experiment // Proceedings of the II International Scientific and Practical Conference " Ecology of biological systems : problems of studying , identifying and forecasting ." Astrakhan, 25-30 August 2009; 67-74.
13. Kalugina, NS. Systematics and biology phytophilic chironomid Uchinskaya reservoir (Díptera, Chironomidae). Author. cand. biol. Sciences. – M.: 1960; 14.
14. Demin, S. Yu., Lobanov N. A. Karyotype of Chironomus entis mosquito from the group plumosus in the European part of the USSR. Cytology: 1990; 1046 – 1054.
15. Ilinskaya NB. Characteristics of polytene chromosomes of varying degrees of compactness in the larvae of the natural population chironomusa. Cytology. 1984; V. № 543-551.
16. Ilinskaya NB. Consistency changes compactness polytene chromosomes and their shoulders in the cells of the salivary glands in acclimation moth larvae to different temperatures . Cytology. 1990; T. № 993- 1001
17. Fedorova IA, Polukonova NV. Cytogenetic effects cholinotropic drugs when combined action on the larvae of Chironomus plumosus (Diptera) in vivo. Cytology, 2009; Volume 51, № 849 – 855.
18. Zatsepina OV. Modern ideas about the properties and functions nucleolus: the nucleolus as a target of stress on cells. Cytology. 2007; № 53 (9): 748-749.
19. Kiknadze II , Istomin AG , Gunderina LI et al karyofonds chironomid Cryolithozone Yakutia : . Chironomini Tribe . Novosibirsk: Nauka . RAS Siberian Publishing House, 1996; 166.

N.A. Durnova[1], Y.V. Klimova[1], M.Y. Voronin[2]

POLYTENE CHROMOSOMES OF *GLYPTOTENDIPES GLAUCUS* MG. (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) AS TEST – OBJEKT TO STUDY TOXIC EFFECTS OF LEAD IONS

[1] V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, 410012 Saratov, Russian Federation
[2] N. G. Chernyshevsky National Research Saratov State University, 410012, Saratov, Russian Federation

Results of the analysis of cytogenetic effects of lead ions on polytene chromosomes of Glyptotendipes glaucus Mg are reported. The functional state of polytene chromosomes was determined via computation: chromosome compactness index (CR); coefficient of genetic activity of the nucleolar organizer (NOR) and coefficient of genetic activity of the Balbiani ring (BR). With increase of the lead nitrate solution concentration, the compactness index increases, that is, the chromosomes compactness decreases: medians of CR values (when measuring shoulder E) in the control are 6.05, for the maximum concentration studied they are 7.3. As a result of the of lead ions action, the activity of the nucleolar organizer genes decreases: medians of the NOR values decrease from 2.3 in the control to 2.0 for the highest concentrations used in the experiment. The activity of the Balbiani ring genes increases with the growing concentration of the lead nitrate solution: medians of the BR values in the control are 1.45, for the maximum studied concentration they are 1.95. The G. glaucus genome responds ambiguously to the change in the lead ions concentration in the medium: the coefficient of the nucleolar organizer's genetic activity decreases, while the genetic activity of the Balbiani ring, on the contrary, increases.

Keywords: *heavy metals, polytene chromosomes, chironomidae, genetic activity.*

Материал поступил в редакцию 30.06.2016 г.