

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ КАДМИЯ

*Приведены результаты лабораторных исследований показывающих, что ионы кадмия в концентрациях 0,001М, 0,01М, 0,1М обладают генотоксичным действием, вызывая снижение всхожести, митотического индекса, индуцируя перестройки и отставания хромосом в семенах пшеницы сорта Казахстан-210.*

Охране окружающей среды от химического загрязнения в последнее время придаётся большое значение. Наибольшую опасность для биосферы представляют стойкие загрязнители, к которым относятся ионы тяжёлых металлов. Тяжёлые металлы являются биологическими активными соединениями, микроэлементами, жизненно необходимыми для функционирования живых организмов. Поэтому для некоторых из них не существуют биологических барьеров при поступлении в организм, и они способны в значительных количествах концентрироваться в отдельных органах, тканях и даже субклеточных структурах [1,2]. По данным многих авторов, повышенные концентрации металлов в среде отрицательно сказываются на продуктивности растений, тормозят их рост. Так, Э.Н. Ваулиной с соавторами было показано влияние ионов кадмия на деление клеток корневой меристемы *Strepis capillaris*. Применявшиеся растворы хлористого кадмия в концентрации ниже  $5 \times 10^{-3}$  М не влияли на скорость

прорастания семян, а более высокие концентрации вызывали задержку в сроках прорастания на 6-4 часов и снижали всхожесть семян на 13-14%. Проращивание семян *Strepis capillaris* в растворе хлористого кадмия приводило к нарушению деления ядра и полному прекращению цитокинеза в клетках корневых меристем. При концентрации хлорида и нитрата кадмия от 0,01М до 0,1М число структурных перестроек возрастало в 2-3 раз по сравнению с контролем [3,4]. Результаты зарубежных исследований также неоднозначны, установлена генотоксичность кадмия на ячмене, креписе, бобовых, эвглеме, но показано отсутствие хромосомных aberrаций после обработки семян лука солями кадмия, сопровождаемое нарушением веретена деления. В экспериментах А.Р. Рупошева наряду с повышением выхода aberrаций хромосом обнаружен эффект изменения спектра aberrаций в зависимости от дозы мутагена. С увеличением дозы нитрата кадмия возрастает доля перестроек хромосомного типа и парных фрагментов, а количество хроматидных aberrаций соответственно снижалось [4].

В основе токсического и мутагенного действия кадмия лежит его способность денатурировать метаболически важные белки и изменять процессы белкового синтеза. Поскольку катализирующая и регуляторная роль белков является всеобъемлющей для метаболической системы организма, нарушения, вызванные ионами кадмия, могут затрагивать самые разнообразные звенья обмена. Вызывая суперспирализацию хромосом, изменяя плоидность, нарушая процессы расхождения хромосом в анафазе и патологию цитокинеза, хлористый кадмий почти не увеличивал частоту aberrантных клеток. Наблюдавшиеся эффекты авторы объясняют подавлением сократительной способности волокон ахроматического веретена, основу которой составляют белки, что затрудняет расхождение хромосом к полюсам. Блокирование цитокинеза, возможно вызвано связыванием SH-групп, обладающих сродством к ионам кадмия и потерей активности белков содержащих сульфидгидрильные группы. Соли кадмия могут действовать как «псевдомутагены», при взаимодействии с молекулой ДНК уменьшается стабильность её спирализации, что, в свою очередь, способствует образованию aberrаций хромосом. При уменьшении стабильности молекул ДНК, нарушения хромосом могут также вызываться другими соединениями, которые присутствуют в клетке, но в обычных условиях не приводящие к структурным мутациям хромосом. Как «псевдомутаген», кадмий снижает эффективность работы репарационной системы. Мутагенность кадмия частично может быть обусловлена наличием в его природной смеси стабильного изотопа  $^{113}\text{Cd}$  с  $\beta$ -излучением. Содержание изотопа в естественном элементе доходит до 12,3%, а его период полураспада составляет  $2 \times 10^{17}$  лет [5]. Находясь в клетке на протяжении клеточного цикла, изотопы способны вызывать образование перестроек хромосом на всех стадиях. Являясь источником излучения, кадмий одновременно может обладать свойствами химических мутагенов. Двойственный характер прямой мутагенной активности иона кадмия создаёт повышенную генетическую опасность для окружающей среды [4,5].

#### **Материал и методы исследований**

Материалом для исследований послужили воздушно-сухие семена озимой мягкой пшеницы сорта Казахстан-210, после 6 часового замачивания и проращивания в термостате при температуре 25-26°C. Для выявления генотоксического действия применялись водные растворы нитрата кадмия  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  в концентрациях 0,001М, 0,01М, 0,1М. В каждом варианте определялся индекс прорастания и

митотическая активность клеток. Анализ структурных нарушений хромосом проводился ана-телофазным методом. При проведении анализа использовались временные давленные препараты, приготовленные из меристематических зон корешков. Фиксацию проводили в смеси абсолютного спирта с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1. В качестве красителя использовали водный раствор фуксин сернистой кислоты. Для получения монослоя клеток использовали цитазу-смесь ферментов вилочковой железы виноградных улиток. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики, разницу средних значений оценивали по критерию Стьюдента. Ана-телофазные клетки анализировались с помощью светооптического микроскопа фирмы Carl Zeiss.

### **Результаты и их обсуждение**

Полученные результаты.

Результаты и изучения генотоксического действия ионов кадмия на воздушно-сухие семена озимой мягкой пшеницы сорта Казахстан-210 после 6 часового замачивания в молярных растворах  $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$  в концентрации 0,001М, 0,01М, 0,1М представлены в таблице 1. Как видно из данных, спонтанный уровень перестроек хромосом в контроле составил  $(3,2 \pm 0,78)\%$ . На 500 просмотренных ана-телофаз было обнаружено 16 нарушений, из которых 4 хроматидных моста, 8 одиночных фрагментов, 4 микрофрагмента (таблица 2). Всхожесть семян контроля была 100%, митотический индекс составил 56,2%.

Анализ воздушно-сухих семян, обработанных 0,001М раствором нитрата кадмия показал, что при всхожести 93,3% и митотическом индексе 48,7% уровень выхода аберрантных клеток по сравнению с контролем был выше в 2 раз и составил  $(6,4 \pm 1,09)\%$ , ( $t=2,4$ ,  $p<0,05$ ), (таблица 1). На 500 просмотренных клеток было обнаружено 37 перестроек хромосом, причём в 5 клетках было зарегистрировано по две аберрации. Частота перестроек на 100 метафаз составила  $(7,4 \pm 1,17)$ . Из 37 нарушений статистически значимое увеличение аберрантных клеток происходило главным образом за счёт перестроек хроматидного типа; одиночных фрагментов 25 и хроматидных мостов 4. Из перестроек хромосомного типа были обнаружены 5 парных фрагментов, которые не были выявлены в контроле. Небольшую долю от общего числа перестроек составили микрофрагменты 2 (таблица 2).

При анализе воздушно-сухих семян, обработанных 0,01М раствором нитрата кадмия, общая частота ана-телофаз с перестройками составила  $(8,8 \pm 1,26)\%$ , а количество перестроек на 100 клеток  $(9,8 \pm 1,30)$ , так как в трёх клетках было зарегистрировано по две перестройки. Частота структурных нарушений хромосом статистически значимо превышала контрольный уровень мутабельности в 2,75 раз ( $t=3,7$ ,  $p<0,01$ ). Из 47 перестроек увеличение выхода аберрантных клеток происходило главным образом за счёт нарушений хроматидного типа; одиночных фрагментов 20, хроматидных мостов 9 и ацентрических колец 2. Перестройки хромосомного типа были представлены 8 парными фрагментами (таблица 2). Было обнаружено 6 микрофрагментов и 2 отставания хромосом. Всхожесть семян составила 74,9%, митотический индекс 36,8%.

При обработке воздушно-сухих семян 0,1М раствором нитрата кадмия резко снизилась всхожесть семян, индекс прорастания составил 40%. Семена наклюнулись, но дальнейший их рост в течении 30 часов в условиях термостата был заторможен. В связи с этим анализ по выявлению структурных нарушений и отставаний хромосом ана-телофазным методом не проводился.

ромосом  
ювались  
их зон  
кислотной  
раствор  
питаву-  
работку  
разницу  
клетки

здушно-  
асового  
, 0,01M,  
естроек  
аз было  
ментов,  
ический

кадмия  
выхода  
оставил  
ж было  
о по две  
рушений  
главным  
в 25 и

парных  
го числа

нитрата  
26%, а  
их было  
ромосом  
2,75 раз  
сходило  
нтов 20,  
па были  
жено 6  
74,9%.

ия резко  
оннулись,  
можен. В  
ромосом

Таблица 1

Общая частота ана-телофаз с перестройками индуцированными растворами нитрата кадмия

№	Количество просмотренных ана-телофаз	Число ана-телофаз с перестройками		Всего Перестроек	Количество перестроек на 100 ана-телофаз
		Число	%±m		
1. Контроль	500	16	3,2±0,78	16	3,2±0,78
2. Доза 0,001M	500	32	6,4±1,09*	37	7,4±1,17*
3. Доза 0,01M	500	44	8,8±1,26**	47	9,8±1,30**

Примечание: \* -p<0,05; \*\* -p<0,01

Таблица 2

Снектр структурных нарушений хромосом индуцированными растворами нитрата кадмия

№	Все-го пере-стро-ек	В том числе													
		Хромосомные				Хроматидные						Микро-фрагменты		Отставание хромосом	
		Хромосомные мосты		Парные фрагменты		Хроматидные мосты		Одиночные фрагменты		Ацентрические кольца		число	%	чис-ло	%
Чис-ло	%	Чис-ло	%	число	%	число	%	число	%	число	%	чис-ло	%		
1. Контроль	16	-	-	-	-	4	25%	8	50%	-	-	4	25%	-	-
2. Доза 0,001M	37	-	-	5	13,5%	4	10,8%	25	67,5%	-	-	2	5,4%	1	2,7%
3. Доза 0,01M	47	-	-	8	17,0%	9	19,0%	20	42,5%	2	4,2%	6	12,7%	2	4,2%

### Обсуждение результатов

Результаты проведённых анализов показывают, что воздействие растворов нитрата кадмия в течение 6 часов до прорастивания (стадия  $G_0+G_1$ ) первого клеточного цикла, вызывало задержку прорастания семян и снижению всхожести. Так, если в контроле всхожесть семян была 100%, то при воздействии 0,001М раствора всхожесть семян снижалась до 93,3%, при воздействии 0,01М до 74,9%, при воздействии 0,1М до 40,0%. С увеличением концентрации растворов одновременно наблюдалось снижение митотической активности клеток.

Воздействие растворов нитрата кадмия в концентрациях 0,001 и 0,01М на воздушно-сухие семена в стадии  $G_0+G_1$  увеличивали частоту перестроек и отставаний хромосом в 2-2,75 раз соответственно. С увеличением концентрации растворов наблюдалось постепенное возрастание частоты ана-телофаз с перестройками и отставаниями хромосом. Анализ спектра перестроек хромосом, индуцированных растворами нитрата кадмия в семенах пшеницы показал, что большая часть перестроек была представлена абберациями хроматидного типа (одиночные фрагменты, хроматидные мосты, ацентрические кольца). Так как кадмий химический мутаген, он действует в поздней стадии синтеза ДНК и в стадии  $G_2$  приводящие к образованию перестроек хроматидного типа.

Полученные нами данные показывают, что при действии более высоких концентраций ионов кадмия, абберации хромосом возникают и в стадии  $G_1$ , приводящие к образованию и увеличению числа парных фрагментов. Было обнаружено также, что с увеличением дозы увеличивалось количество микрофрагментов в просмотренных клетках. Полученные результаты можно объяснить тем, что активность ионов кадмия как химических мутагенов проявляется на всех стадиях клеточного цикла ( $G_1, S, G_2$ ).

Известно, что ионы кадмия вызывают нарушения числа хромосом, гипо- и гиперплоидность. В наших исследованиях было обнаружено, что с увеличением дозы возрастало количество отставаний хромосом. Вероятно, это связано с нарушением функций веретена деления клетки и центромер хромосом.

Таким образом, полученные нами результаты лабораторных исследований показывают, что ионы кадмия в концентрациях 0,001М, 0,01М, 0,1М обладают генотоксичным действием, вызывая снижение всхожести, митотической активности, индуцируя перестройки и отставания хромосом. В связи с этим следует отметить, что накопление и повышенные концентрации кадмия в объектах окружающей среды могут привести к отрицательным эффектам для живых организмов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бигалиев А.Б. Генетический эффект солей тяжёлых металлов как