

Учреждение образования  
«Белорусский государственный педагогический  
университет имени Максима Така»

Факультет естествознания  
Кафедра морфологии и физиологии человека и животных

МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ ЭРИТРОЦИТОВ НА ПРИМЕРЕ  
R.RIDIBUNDA (ЛЯГУШКА ОЗЕРНАЯ) И R.TEMPORARIA  
(ЛЯГУШКА ТРАВЯНАЯ)

Допущен к защите

Заведующий кафедрой

(подпись) (фамилия, инициалы)

Протокол № 4 от 08.11 2017 г.

Защищена 18 декабря 2017 г.

С отметкой «удовлетв.»

Курсовая работа  
студентки 34 группы  
3 курса специальности  
«Биология и Химия»  
очной формы  
получения образования  
Ус Дарьи  
Андреевны

Научный руководитель –  
преподаватель  
С.А.Подберезко

Минск, 2017

25-2-08-2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ПОНЯТИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ЭРИТРОЦИТОВ .....	5
1.1 Биологические методы контроля.....	5
1.2 Микроядерный анализ.....	7
1.2 Использование микроядерного анализа.....	9
ГЛАВА 2. ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТ .....	11
2.1 Объекты микроядерного анализа.....	11
2.2 Маршрутный учет.....	13
2.3 Площадочный учет.....	13
2.4 Методика приготовления стёкол для мазков .....	13
2.5 Методика приготовления мазков. Фиксация мазков на предметном стекле.....	14
2.6 Методика окрашивания мазков.....	15
2.7 Интерпретация результатов.....	18
ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННОЙ КУРСОВОЙ РАБОТЫ В ШКОЛЬНОЙ ПРАКТИКЕ. ....	19
3.1 Проблема экологического воспитания в школе.....	19
3.2 Цикл факультативных занятий «Микроядерный анализ как метод биотестирования».....	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	26

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день можно считать общепринятым, что основным показателем устойчивого развития человека и животных является условия среды обитания. Любые современные технологии направлены на продуктивное использование природных ресурсов и, тем самым, на перестройку окружающей среды. Антропогенные воздействия представляют собой, с одной стороны, новые параметры внешней среды, с другой – изменения свойств биологических систем. В результате чего происходит деформация окружающей среды, возникают локальные, региональные и глобальные экологические проблемы.

Одним из важнейших эффектов воздействия загрязнителей разной природы является нарушение целостности генетических структур клеток, поскольку это непосредственно ведет к наследственным изменениям, передающимся следующим поколениям. Имеется достаточно фактов свидетельствующих о росте генетических уродств и аномалий развития лягушек в условиях химического и радиационного заражения территории, что определяет повышенное внимание исследователей к выявлению загрязнений среды обитания мутагенными факторами различной природы [2].

Озерные и травяные лягушки имеют 26 мелких хромосом, что значительно затрудняет анализ генетических изменений в клетках стандартным метафазным методом. Наиболее явным показателем данного воздействия является увеличение количества микроядер в клетке.

Микроядра в клетках образуются при нарушении процессов митоза или образовании ацентрических хромосомных фрагментов вследствие мутаций. В зависимости от количества обнаруженных образований можно говорить о степени загрязнения среды обитания организма. Таким образом, наличие микроядер в клетках можно считать универсальным показателем загрязненности, с помощью которого можно быстро и точно определить способность новых синтезируемых соединений вызывать хромосомные изменения. Одним из новых методов оценки действия агентов разной природы на образование в организме микроядер является микроядерный тест. Этот метод позволяет повысить качество экологического мониторинга и эффективность борьбы с различными заболеваниями, связанными с изменениями структуры генов.

Актуальность работы обусловлена необходимостью выявления цитологических особенностей живых организмов в условиях промышленного загрязнения окружающей среды различными химическими веществами.

**Цель работы:** оценить состояние природных популяций *R. Ridibunda* (лягушка озерная) и *R. Temporaria* (лягушка травяная), обитающих в водных экосистемах по микроядерному тесту.

**Задачи:**

- Познакомиться с основными методами биологического контроля;
- Выявить преимущества и недостатки различных методов биологического контроля;
- Изучить особенности микроядерного анализа и выявить области его применения;
- Познакомиться с методикой проведения микроядерного теста;
- Освоить методику микроядерного теста.

Данная курсовая работа состоит из 3 глав, 2 рисунков, 1 таблицы, 12 использованных литературных источников.

## ГЛАВА I ПОНЯТИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ЭРИТРОЦИТОВ

### 1.1 Биологические методы контроля

Реакция организма, его угнетение или процветание зависит от степени воздействия фактора, т.е. каждый вид приспособлен к определенной интенсивности каждого экологического фактора и к определенному диапазону его изменчивости. Согласно «закону минимума» Ю.Либиха и «закону толерантности» Шелфорда (рис.1.1) [7], существование вида определяется лимитирующими факторами в области пессимума в максимальных и минимальных значениях. Вблизи точек максимума и минимума лежат сублетальные величины экологического фактора, а за пределами зоны толерантности – летальные.

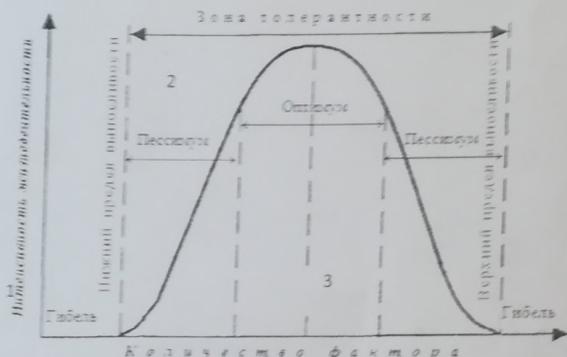


Рисунок 1.1 Схема влияния экологического фактора. Диапазон действия (или зона толерантности) ограничен крайними пороговыми значениями (точки минимума (1) и максимума (3)). Точка (2), соответствующая наилучшим показателям жизнедеятельности- это точка оптимума.

Животные, физиологически близки человеку, по их реакциям можно предвидеть санитарные последствия загрязнений не только для природы, но и для людей. Загрязняющее вещество может непосредственно влиять на генетический материал или вызывать различного рода мутации. Подобные нарушения выявляются при проведении специальных исследований [1].

В настоящее время при оценке состояния окружающей среды ведущая роль отводится физическим и химическим методам экологического контроля. Их сущность сводится к сравнению загрязнения отдельных компонентов природных комплексов с ПДК (предельно допустимая концентрация) или ПДУ (предельно допустимый уровень). Преимущество физико-химического контроля – прочная нормативная и организационная (сети химико-аналитических лабораторий) базы. Их недостаток – высокая трудоемкость, низкая оперативность. Используются в производственных лабораториях

методами физико-химическому и биохимическому контролю. Результаты исследований среды не всегда могут дать адекватную картину состояния окружающей среды на существующей территории [1].

При всей важности проведения оценки качества среды на всех уровнях с применением различных методов (включая физические, химические и другие методы) приоритетной представляется биологическая оценка. Наиболее простым объяснением этому может быть то, и ряде ситуаций, она позволяет быстрее и качественно оценить состояние окружающей среды и наличие некоторых загрязнений, не обнаруживаемых физико-химическими методами. Поэтому в развитых областях промышленности возникает все большая потребность в проведении разнообразных биологических тестов.

К биологическим методам контроля относятся биоиндикация и биотестирование. Методами биоиндикации определяется присутствие в окружающей среде того или иного загрязителя по наличию или состоянию определенных организмов, наиболее чувствительных к изменению экологической обстановки, т.е. обнаружение и определение биологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакции на них живых организмов и их сообществ.

Биоиндикация – это определение биологически значимых нагрузок на основе реакции на них живых организмов и их сообществ. В полной мере это относится ко всем видам антропогенных загрязнений. Биоиндикация на молекулярном и клеточном уровне в целях ранней диагностики необходима в обществах с загрязненностью от низкой до средней, где видимые повреждения организмов не проявляются [7].

Основной задачей биоиндикации является разработка методов и критериев, которые могли бы адекватно отражать уровень антропогенных воздействий с учетом комплексного характера. Существует два основных вида биоиндикации: пассивная и активная.

Пассивная биоиндикация – исследование у свободноживущих организмов видимых или незаметных повреждений и отклонений от нормы, являющихся признаками неблагоприятного воздействия.

Активная индикация или биотестирование – исследование тех же воздействий в стандартных условиях на наиболее чувствительные к данному фактору тест-организмы. Тест-объекты (тест-объекты) – специально отобраные и выращиваемые живые организмы, сигнализирующие об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения их жизненно важных функций. Биотестирование основано на регистрации изменений биологически значимых показателей (тест-функций) исследуемых тест-объектов с последующей оценкой их состояния в соответствии с выбранным критерием токсичности. Как тест-функцию можно рассматривать любой показатель реакции гидробионтов на соответствующие изменения внутренних и внешних условий среды [7].

Преимуществом методов биоиндикации и биотестирования перед физико-химическими методами является интегральный характер ответных реакций организмов, которые:

- суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде и отражают ее состояние в целом;
- выявляют наличие в окружающей природной среде комплекса загрязнителей;
- позволяют судить о степени вредности тех или иных веществ для живой природы и человека;
- дают возможность контролировать действие многих синтезируемых человеком соединений.

## 1.2 Микроядерный анализ

Микроядерный анализ является направлением биотестирования. Это относительно новый, но уже общепринятый цитогенетический метод оценки мутагенного действия агентов различной природы. С помощью этого анализа проведено тестирование на мутагенную активность большого числа химических, физических и биологических агентов, тест применяется уже на первом этапе проверки потенциальных мутагенов и канцерогенов [7].

Микроядра — это небольшие ДНК-содержащие тельца, существующие в клетке отдельно от основного ядра (ядер) или связанные с ними хроматиновым мостом. Их возникновение связывают, как правило, с такими типами повреждения генома как ацентрические фрагменты хромосом или целые хромосомы, отставшие в анафазе, телофазе митоза от веретена деления и не вошедшие в дочерние ядра [11]. Так же в различных исследованиях Ильинских показано, что такие нарушения могут быть связаны с широким спектром факторов, начиная от воздействия тяжёлых металлов, действия ионизирующего излучения и заканчивая вирусными инфекциями [3].

Размеры микроядер зависят от причин, лежащих в основе их образования. Как правило, крупные микроядра будут образовываться при действии на организм различных мутагенов, а мелкие указывать на снижение потенциальной возможности клеток к регенерации и репарации.

Выделяют следующие виды нарушения, нормального процесса формирования ядра (рис.1.2) [6]:

1. Стандартные – небольшого размера, имеют четкий контур, не связаны с ядром, а располагаются вблизи него.
2. Поверхностные – небольшие ядерные образования, находятся на поверхности ядра эритроцита.
3. Микроядра с нуклеосомным мостиком – ядерные образования, соединённые с ядром хроматиновой нитью и лежащие вблизи него.
4. Палочковидные – удлинённые ядерные образования, по форме напоминающие палочки, располагаются вблизи ядра.

3. Клубочковидные — неоформленный ядерный материал, результат слияния нескольких «палочек»;
6. Крупные микроядра — разрыхлённый ядерный материал больших размеров.



Рисунок 1.2 Виды микроядер. 1 — Стандартные микроядра. 2 — Поверхностные микроядра. 3 — Микроядра с нуклеосомным мостиком. 4 — Палочковидные микроядра. 5 — Клубочковидные микроядра. 6 — Крупные микроядра.

В то же время в исследованиях Shimizu было показано, что образование микроядра — это не всегда только постмитотическое событие. Например, микроядра могут образовываться в фазе синтеза ДНК из ядерных почек, а также, видимо, во всех тех случаях, когда клетка избавляется от избытка ДНК (избыточная амплификация, реверсия культур клеток опухоли путем экскреции онкогенов). Таким образом, микроядро — это свидетельство количественных изменений ДНК в живой клетке, свидетельство наличия нарушений в процессах репарации ДНК и других нарушений нормального функционирования организма на клеточном уровне [4].

В 1973 г. J.A.Heddle и W.Schmid независимо друг от друга предложили микроядерный тест, основанный на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга. Позже тест стал применяться для учета микроядер в ранних мужских половых клетках (сперматидах) на 4-й стадии развития, которые, в результате цикла структурных изменений, превращаются в сперматозоиды; клетках печени плода при изучении трансплацентарной активности химических соединений; в клетках слизистой рта; в лимфоцитах человека; в клетках печени и толстой кишки животных [12].

В конце XIX — начале XX века Howell и Jolly были описаны Фельгенположительные ядерные тела в ретикулоцитах человека, которые являлись хромосомами, не связанными с веретеном деления. В начале 70-х гг. В работах Schmidt (1973), проведенных на эритроцитах костного мозга, появился термин «микроядерный тест». Через несколько лет Countryman и

Heddle (1976) было показано, что лимфоциты периферической крови могут быть использованы в качестве тест-объекта в микроядерном тесте [12].

Микроядерный тест привлекает повышенное внимание лабораторий, действующих в области охраны окружающей среды и мутагенеза, и количество опубликованных исследований по этой методике быстро растет.

К преимуществам микроядерного теста можно отнести [10]:

- возможность проводить прижизненный неинвазивный скрининг для определения динамики изменения данного показателя во времени;
- применимость данного теста для значительного числа биологических объектов и типов клеток, что особенно важно для видов с большим количеством хромосом или с хромосомами небольшого размера, то есть независимость от кариотипа;
- возможность проведения в тканях с низкой митотической активностью;
- возможность применения различного рода автоматических анализирующих систем для подсчета клеток с микроядрами, что дает возможность анализировать большие выборки;
- стандартная процедура приготовления препаратов хромосом позволяет проводить просмотр с целью обнаружения микроядер на тех же препаратах, на которых проводится определение уровня патологических митозов;
- по сравнению с другими тестами микроядерный тест более краткосрочный, доступный и более дешевый, то есть экономически более выгодный.

К недостаткам микроядерного теста можно отнести:

- результаты микроядерного теста могут существенно различаться в зависимости от применяемых методов фиксации, окраски и методических приемов микроскопического анализа стандартного мазка крови;
- спонтанный уровень клеток с микроядрами не одинаков у животных одного вида, но различных линий, а также у разных видов животных и в различных тканях и органах одного и того же организма;
- у одного и того же организма число клеток с микроядрами различно в полихроматофильных и нормохромных эритроцитах крови и в ядросодержащих клетках организма;
- в различных популяциях животных и человека уровень клеток с микроядрами может существенно различаться, что связано с наличием в окружающей среде генотоксикантов различной природы.

Вместе с тем, в ряде случаев целесообразно использовать данный тест совместно с другими, так как микроядерный тест не позволяет точно установить тип хромосомных aberrаций и идентифицировать хромосомы, в которых они произошли.

### 1.3 Использование микроядерного анализа

Микроядерный тест может быть с успехом использован для [5]:

- Контроля эффективности радиопротекторов, так как радиоактивное излучение индуцирует появление клеток, содержащих микроядра, особенно в экспериментальной практике.
- Контроля влияния факторов окружающей среды на организм человека, т.к. использование микроядерного теста весьма информативно. Исследователями был установлен факт увеличения числа клеток с микроядрами в мокроте и буккальном эпителии лиц, проживающих в крупных городах. Не случайный характер таких результатов связан, в том числе, с непосредственным воздействием загрязненного воздуха на клетки респираторного тракта и ротовой полости.
- Оценки воздействия газообразных веществ, попадающих в организм ингаляционным путем. Так как регистрация микроядер в альвеолярных макрофагах довольно проста и в то же время весьма эффективна. Экспериментально доказано, что токсические вещества, содержащиеся в табачном дыме, индуцируют формирование микроядер в клетках красного костного мозга, лейкоцитах крови и клетках бронхоальвеолярного лаважа.
- Цитологических исследований, в которых соотношение жизнеспособных клеток и клеток, содержащих микроядра, является важным показателем хромосомных aberrаций. Большие размеры альвеолярных макрофагов позволяют точно и безошибочно проводить идентификацию содержащихся в них микроядер. Данный метод имеет и некоторые ограничения, связанные с трудностью определения размеров микроядер при плохом распластывании цитоплазмы. Целесообразно использовать метод предварительной инкубации, позволяющий клеткам хорошо распластаться по подложке, и тем самым облегчить задачу идентификации микроядер, для повышения информативности некоторых цитологических исследований.
- Определения степени риска развития заболеваний у контингента, работающего во вредных условиях. Поскольку микроядерный тест достаточно информативен в плане определения влияния мутагенов на эпителиальные клетки, непосредственно контактирующие с факторами окружающей среды, то его целесообразно использовать. При этом, изменение количества клеток с микроядрами полезно учитывать при исследованиях эффективности воздействия протекторов, защищающих организм от влияния токсических веществ.
- Тестирования различных химических соединений, так как исследование ряда веществ включает в себя идентификацию микроядер в клетках красного костного мозга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антропогенное загрязнение окружающей среды способствует росту мутационного груза и, как следствие, приводит к изменению некоторых генетических параметров в популяциях человека (например, врожденных пороков развития). В настоящее время, в связи с организацией эколого-генетического мониторинга человека, наряду с отслеживанием мутагенных факторов среды параллельно осуществляется мониторинг за популяциями организмов, территориально сосуществующих рядом с людьми.

Микроядерный тест представляет собой высокоинформативный и вместе с тем простой в техническом отношении метод оценки влияния на организм различного рода факторов, таких как ионизирующее излучение, действие лекарственных препаратов, выбросов в атмосферу диоксида серы и других отравляющих веществ.

В данной курсовой работе мне удалось изучить методику и специфику микроядерного анализа как метода биотестирования.

В ходе работы я выяснила, что формирование микроядер является следствием патологии митотического деления клеток, в процессе которого происходит отставание некоторых хромосом в метафазе и в анафазе. При апоптозе могут встречаться микроядра различного размера, в связи с фрагментацией ядра клетки, подверженной этому процессу. Все эти изменения успешно фиксируются при помощи микроядерного теста, что позволяет достаточно легко диагностировать различные генетические изменения в организме.

Решение фундаментальных вопросов, касающихся образования микроядер, позволит более точно определить место индуцирующих их процессов в возникновении целого ряда заболеваний, улучшить контроль за качеством медицинских препаратов, при контроле эффективности радиопротекторов, повысить качество экологического мониторинга.

Использование микроядерного теста в школьной практике перспективно, позволяет развить у старшеклассников учебно-познавательные, ценностно-смысловые компетенции.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вершинин, В. Л. Предварительная оценка влияния антропогенных факторов на амфибий Свердловска / В. Л. Вершинин // Сб. науч. тр. / Ин-т экологии растений и животных. – Свердловск, 1980. – Вып. 2. – С. 117-118;
2. Вершинин, В. Л. Физиологические показатели амфибий в экосистемах урбанизированных территорий / В. Л. Вершинин, С. Ю. Терещин // Экология: сб. науч. тр. / Ин-т экологии растений и животных. – Екатеринбург, 1999. – Вып. 4. – С. 283-287;
3. Глазко, Т. Т. Микроядерный анализ у крупных и мелких млекопитающих / Т. Т. Глазко, О. А. Ковалева, Л. П. Якименко // Цитология и генетика: сб. науч. тр. / Ин-т агроэкологии. – Киев, 2003. – Вып. 2. – С. 77-85;
4. Ильинских, Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, В.В. Новицкий, Н.Н. Ванчугова. – Томск: Изд. Томского ун-та, 1992. – 272 с.
5. Ингель, Ф. И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока / Ф. И. Ингель // Экологическая генетика: сб. науч. тр. – Москва, 2003. – Вып. 3. – С.7-9;
6. Колмакова, Т. С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации/ Т. С. Колмакова, С. Н. Белик., Е. В. Моргуль, А. В. Севрюков – Ростов н/Д: Изд-во: РостГМУ, 2013. – С. 4-28;
7. Ляшенко, О. А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учеб. пособие / О. А. Ляшенко. – Санкт Петербург: ГТУРП, 2012. – С. 1-19;
8. Макгрегор, Г. Методы работы с хромосомами животных / Г. Макгрегор, Дж. Варли; пер. с англ. В. М. Гиндилиса, Ю. Б. Юрова; под ред. Н. Н. Воронцова. – Москва, 1986. – Гл. 3. – С. 46-69;
9. Максимов, В. Н. Об одном способе оценки качества природных вод / Самоочищение и биоиндикация загрязненных вод: учеб. пособие / В. Н. Максимов. – Москва: Наука, 1980. – С. 189-201;
10. Радченко, Н. М. Методы биоиндикации в оценке состояния окружающей среды: учеб. пособие / Н. М. Радченко, А. А. Шабунов. – Вологда: Издательский центр ВИРО, 2006. – С. 68-69;
11. Bonassi, S. et al. Human MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes // Environmental and Molecular Mutagenesis, 45. – Wiley-Liss, Inc., 2001. – P. 3;
12. Mateuca, R. M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring// Biochimie 88, 2006. – P. 1515-1531.