

УДК 634.37(043.2)

Сидорович М.М., Кундельчук О.П., Польченко Ю.В., Кот С.Ю.

**ФИТОТЕСТИТОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И
МУТАГЕННОСТИ ПРОИЗВОДНОЙ СПИРОКАРБОНА - НОВОГО
СИНТЕТИЧЕСКОГО СТИМУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ**

Херсонський державний університет, м.Херсон, Україна

Ключевые слова: спирокарбон, биотест, хромосомные aberrации.

В Херсонском государственном университете синтезирован стимулятор роста растений - комплекс спирокарбона с янтарной кислотой. Спирокарбон и его производные относятся к новому классу синтетических регуляторов роста растений [6]. Он является спиросоединением, которое состоит из двух гетероциклов, каждый имеет два атома Нитрогена и четыре атома Карбона, один из них является общим. Каждое кольцо имеет карбонильную группу. Циклы находятся в транс-конфигурации относительно общего атома карбона. Синтез спирокарбона химиками Херсонского государственного университета был осуществлен двумя путями. Каждый из них базировался на взаимодействии мочевины с кетонами или их производными в присутствии сильно концентрированной кислоты [17].

Для широкого внедрения комплекса спирокарбона с янтарной кислотой в практику сельского хозяйства необходимым этапом является оценка токсичности и мутагенности данного вещества для организмов. В современных экспериментальных исследованиях, посвящённых оценке экологической безопасности окружающей среды, как правило, такая токсичность и мутагенность устанавливается на основании результатов, полученных одновременно в нескольких тестовых системах: на бактериях, грибах, животных, растениях, *in vitro* и на внеклеточных тестовых системах.

Однако, достаточно много работ по оценке экобезопасности факторов окружающей среды выполнено всего на одной модельной системе – *Allium test*. В большинстве публикаций данные, полученные на *Allium test*, как правило, хорошо коррелируют с данными других живых систем различного уровня организации [26; 32; 34; 37]. Более того, анализ результатов, полученных в ряде работ, позволил Kristen U. (1997) сделать вывод о потенциальной возможности использования *Allium test* и теста на рост пыльцевой трубки как альтернативы биотестам на животных для выявления цитотоксичности факторов окружающей среды [29].

Во многих случаях при анализе экобезопасности внешних факторов *Allium test* показывает по сравнению с другими биотестами более высокую

чувствительность [8; 24; 25; 28; 30; 38; 41]. Однако, существуют другие модельные системы, которые являются более эффективными, чем *Allium test* [33; 36; 39]. В частности, исследования, проведенные Rank J. и Nielsen M.N. [39] показали, что эффективность *Allium test* составляет 82% по сравнению с аналогичным показателем тест-системы на канцерогенез у грызунов. Но на сегодняшний день 82% - это максимальная эффективность биотеста по сравнению с другими тестами, проводимыми на немлекопитающих [39].

Учитывая преимущества и недостатки разработанных биотестов, для оценки уровня экологической безопасности нового синтетического стимулятора роста растений в исследовании выбрали *Allium test*. Обусловлено это тем, что сегодня он является наиболее универсальной и максимально чувствительной биологической модельной системой для скрининга факторов окружающей среды на токсичность и мутагенность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование провели на проростках *Allium cepa L.*. В нем использовали семена сорта Латук, которые вырастили на приусадебном участке. Их замочили на 1 сутки в дистиллированной воде (К1), сточной промышленной воде (К2) и трех концентрациях (10^{-7} , 10^{-4} и 10^{-2} моль/л) комплекса спирокарбона с янтарной кислотой (СЯ). После этого семена проростили в термостате по общепринятой методике в чашках Петри при $t=26^{\circ}\text{C}$. Материал для цитологических исследований отобрали у 4-суточных проростков. На давленных препаратах их кончиков корней, окрашенных ацетоорсеином, подчитали митотический индекс (МИ) и фазные индексы (ПИ, МетИ, АИ и ТИ) [13]. Для каждого варианта эти параметры определили на 9 кончиках корней для 9 тыс. клеток. Окуляр-микроскопом для каждого варианта измерили размеры 30 неделящихся клеток (S) на 3-х препаратах. Их площадь обсчитали по формуле эллипса. Динамика названных параметров отразила влияние комплекса на пролиферативную активность клеток проростка и их рост. Одновременно при подсчете МИ и фазных индексов (ФИ) ана-телофазным способом учли количество клеток с хромосомными нарушениями (микроядрами, мостами и фрагментами) [12]. Для оценки мутагенного воздействия препарата на фитотесте определили уровни хромосомных aberrаций (ХА) [13] и мутагенного эффекта (УМЭ) [15]. В исследовании под митозомодифицирующим действием препарата понимали нарушения прохождения клеткой фаз митоза, а под цитотоксическим – ингибирование пролиферации и роста клеток. Мутагенный (генотоксический) эффект препарата охватывал достоверное увеличение количества хромосомных аномалий фитотеста по сравнению с фоновым уровнем. Количественные данные получили на репрезентативных объемах выборок (120-36000 клеток) и обработали статистически с использованием ресурса Excel, параметрического и непараметрического критериев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Собственные предыдущие исследования [23], содержащие описание биологические свойства комплекса СЯ, констатировали необходимость изучения его митозомодифицирующего и мутагенного воздействия на организм. Поэтому результаты, которые презентуются в данной публикации, состоят из двух частей. Первая - это мониторинг цитологических показателей, который отражает влияние СЯ на пролиферативную активность и рост клеток *Allium test*, вторая - отслеживание значений этих же параметров, связанных с определением уровня мутагенности препарата.

Влияние СЯ на пролиферацию и рост клеток *Allium test*. Собственные предыдущие исследования по мониторингу биостимулирующих свойств комплекса [23] показали, что только три концентрации СЯ (10^{-7} , 10^{-4} та 10^{-2} моль/л) способны изменить ростовые характеристики проростков *A. сера*. Концентрации 10^{-4} и 10^{-2} моль/л ускорили рост проростка лука, а концентрация 10^{-7} моль/л - его замедлила. При этом увеличение роста корня наблюдали только при замачивании семян в первых двух концентрациях. Поэтому определение митозомодифицирующего воздействия СЯ в исследовании проводили для названных концентраций. Таблица 1. содержит средние значения МИ клеток корневой меристеме проростков *A. сера*. Как свидетельствует эта таблица, МИ варианта 2 подобный контрольному. Вместе с тем, две другие концентрации СЯ способствуют его изменению: концентрация 10^{-4} моль/л увеличила МИ в 1,5 раза, 10^{-2} моль/л – в 2 раза по сравнению с контролем.

Таблица 1

Значение митотического индекса клеток проростков *Allium cepa L.*, сформированных из семян, которые обработали растворами комплекса спирокарбона с янтарной кислотой
The value of the mitotic index of germ cells *Allium cepa L.*, formed from the seeds that were treated with solutions of complex spirokarbon with succinic acid

№ варианта	Вариант	МИ
1	K1	5,5±1,2
2	10^{-7} моль/л	6,9±0,9
3	10^{-4} моль/л	7,4±1,0*
4	10^{-2} моль/л	11,02±2,0*

*- достоверно отличается от контроля с $p=0,05$.

* - significantly different from the control with $p = 0.05$.

Примечание: при тенденции к стимулированию митотического деления значение МИ составляет 120% от контроля, при явном стимулирующем эффекте МИ в 2 раза превышает контроль [3].

Таким образом, концентрация 10^{-4} моль/л обеспечивает тенденцию к стимуляции пролиферации клеток корня, а 10^{-2} моль/л – оказывает явный стимулирующий эффект на этот процесс [3]. Для выяснения причин такого феномена далее подсчитали ФИ (табл. 2) и S неделящихся клеток корня (табл. 3). Статистическая обработка данных таблицы 2 показала отсутствие изменений значений ФИ в экспериментальных вариантах по сравнению с контролем. Таким образом, комплекс не оказывал митозомодифицирующего действия. Вместе с тем, препарат мог влиять на S неделящейся клетки (табл.3). Так, концентрации СЯ 10^{-4} и 10^{-2} моль/л существенно увеличили S клеток, в то время, как наименьшая концентрация ее не изменила. Таким образом, этот показатель продемонстрировал тенденцию подобно той, которая была зафиксирована для МИ. Ранее указывалось, что при концентрациях 10^{-4} и 10^{-2} моль/л СЯ наблюдали усиление роста корня. Приведенные данные свидетельствуют о том, что этот феномен обеспечивался за счет стимуляции двух клеточных процессов: митотического деления и роста площади неделящихся клеток. Сформулированное предположение свидетельствует об отсутствии у препарата СЯ цитотоксического действия на организм.

Таблица 2.

Мониторинг фазных индексов клеток проростков *Allium cepa L.*, сформированных из семян, обработанных растворами комплекса спирокарбона с янтарной кислотой

Monitoring phase indices of germ cells *Allium cepa L.*, formed from seeds treated with solutions of complex spirokarbon with succinic acid

Вариант	Фазные индексы			
	ПИ	Мет	АИ	ТИ
К1	62,4±11,8	16,2±1,5	19,1±5,4	2,3±1
10^{-7} моль/л	56,2±15,2	22,4±5,2	19,6±6,4	1,9±1,2
10^{-4} моль/л	65,1±5,3	16,4±1,2	16,3±3,3	2,2±1
10^{-2} моль/л	67,5±5,2	11,9±3,1	15,6±4,5	5,1±2

*- достоверно отличается от контроля с $p=0,05$.

* - significantly different from the control with $p = 0.05$.

Влияние СЯ на уровень мутагенности (генотоксичности) клеток *Allium test.* Наиболее распространенными видами хромосомных aberrаций в клетках корня проростков *Allium test* сорта Латук, которые находятся в ана- и телофазе, явились микроядра, разнообразные мосты и фрагменты. На рис.1 изображены клетки корня, которые не имеют хромосомных аномалий, на рис.2 – содержащие указанные выше хромосомные aberrации.

Таблица 3

Мониторинг размеров клеток проростков *Allium cepa* L., сформированных из семян, обработанных растворами комплекса спирокарбона с янтарной кислотой
Monitoring the size of germ cells *Allium cepa* L., formed from seeds treated with solutions of complex spirokarbon with succinic acid

Вариант	Площадь неделящейся клетки
К1	0,47±0,05
10 ⁻⁷ моль/л	0,41±0,04
10 ⁻⁴ моль/л	0,58±0,06*
10 ⁻² моль/л	0,63±0,03*

*- достоверно отличается от контроля с $p=0,05$.
 * - significantly different from the control with $p = 0.05$.

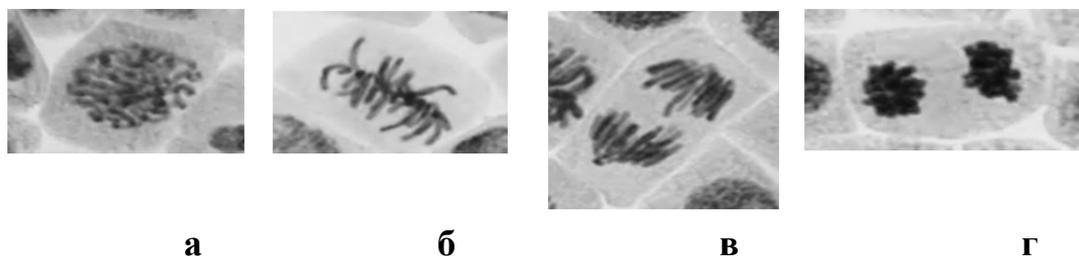


Рис. 1. Клетки корневой меристемы *Allium cepa* L. в профазе (а), метафазе (б), анафазе (в) и телофазе (г).
Fig. 1. Root meristem cells of *Allium cepa* L. in prophase (a), metaphase (b), anaphase (c), and telophase (d).

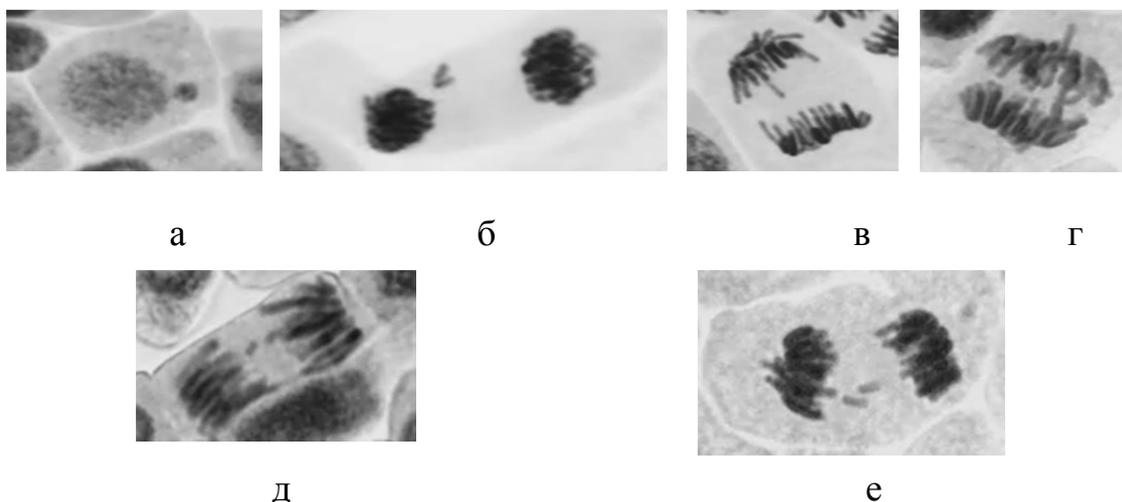


Рис. 2. Разновидности хромосомных aberrаций в клетках корня *Allium cepa* L.: а – микроядро в профазе; б – потерянный участок хромосомы в телофазе; в – отставание хромосомы в анафазе; г – мосты в анафазе; д – фрагменты в анафазе; е – двойные фрагменты в анафазе.
Figure 2: Types of chromosomal aberrations in root cells *Allium cepa* L. : a - micronuclei in prophase; b - lost part of the chromosome in telophase; c - lag chromosomes at anaphase; d - bridges in anaphase; e - fragments in anaphase; f - double fragments in anaphase.

Руководствуясь динамикой биометрических показателей [23] и проведенными цитологическими исследованиями, определение уровня мутагенного воздействия СЯ в *Allium test* также проводили на трех концентрациях препарата: 10^{-7} , 10^{-4} , 10^{-2} моль/л. Средние значения ХА содержит таблица 4, которая имеет два контроля: дистиллированную воду и сточную промышленную воду. Как показала статистическая обработка приведенных в ней данных, уровень aberrаций в клетках корней экспериментальных проростков *A. sepa* аналогичный ХА контроля 1 (дист. воде), т.е. не превышает фоновый уровень. Их УМЭ=0. Вместе с тем, эти же значения ХА более чем в 2 раза ниже, чем у контроля 2 (сточной воды предприятия, имеющей слабый мутагенный эффект, УМЭ=1). [15].

Таблица 4

Уровень aberrаций клеток проростков *Allium sepa* L., сформированных из семян, обработанных растворами комплекса спирокарбона с янтарной кислотой
Aberration level of germ cells *Allium sepa* L., formed from seeds treated with solutions of complex spirokarbon with succinic acid

Вариант	Количество клеток в ана- и телофазах	Количество aberrаций в ана- и телофазах	УМЭ	ХА, %
К 1 (дист. вода)	103	30	-	33,1±13,5
10^{-7} моль/л	136	32	0	25,2±8,1**
10^{-4} моль/л	123	23	0	20,8±9,3**
10^{-2} моль/л	202	40	0	20,9±6,3**
К 2 (сточная пром. вода)	112	66	1	59,35±29,2

*- достоверно отличается от контроля 1 с $p=0,05$; **- достоверно отличается от контроля 2 с $p=0,05$.

Примечание: нет достоверного отличия с контролем 1 – мутагенный эффект отсутствует (УМЭ=0); превышение уровня мутаций по сравнению с контролем < чем в 5 раз - мутагенный эффект слабый (УМЭ =1)[15].

* - Significantly different from the control 1, $p = 0.05$;

** - Significantly different from the control 2 with $p = 0.05$.

Note: no significant differences with the control 1 - mutagenic effect is absent (VME = 0); excess of the level of mutations compared to the control < than 5 times - weak mutagenic effect (VME = 1) [15].

Таким образом предварительная обработка семян *Al. sepa* комплексом СЯ не приводит к стимуляции в его проростках индуцированного мутагенеза (препарат не оказывает генотоксическое воздействие), т.е. не является мутагеном.

Результаты проведенного фитотестирования свидетельствуют о том, что комплекс спирокарбона с янтарной кислотой не оказывает цитотоксического, митозомодифицирующего и мутагенного (генотоксического) воздействия на организм.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химики Херсонского госуниверситета в течение последних 20 лет создают новые синтетические стимуляторы роста растений из класса бициклических бисмочевин [6; 7; 17]. Вместе с тем широкомасштабно их биологические свойства не изучали. Поэтому в серии наших предыдущих публикаций была дана характеристика таким свойствам одного из представителей этих препаратов – комплексу спирокарбона с янтарной кислотой. В них на батарее фитотестов показали, что СЯ обладает видоспецифичными и сортоспецифическими биостимулирующими способностями относительно формирования проростка у некоторых высших растений. У *A. sera* он способен повысить всхожесть семян, ускорить рост проростка и изменить координацию роста его органов [23]. У *Lemna minor* L. препарат увеличивал количество листочков [19]. Для комплекса характерны температурпротекторные свойства. Так, СЯ мог улучшать адаптационные возможности пшеницы озимой при ее проращивании при низких положительных температурах [2], а семенам *A. sera* обеспечил устойчивое проращивание при колебании значений этого фактора в течение суток в пределах от +25⁰С до +35⁰С [22]. Вместе с тем, другой представитель класса исследуемых препаратов – спирокарбон – продемонстрировал негативное воздействие на кровь белых мышей: он вызвал у них развитие анемических процессов [21]. В эритроцитах человека *in vitro* спирокарбон явился причиной мембранотропического действия [16], а у белых мышей - изменение активности миелопероксидазы лейкоцитов [4]. Отмечено определенное токсическое воздействие спирокарбона на ГГНС у крыс [9]. Наличие, с одной стороны, важных для сельского хозяйства свойств, а, с другой – определенного токсического воздействия на животный организм у класса исследуемых препаратов, обусловили необходимость всестороннего исследования комплекса СЯ с позиций степени его экологической безопасности. Именно этому и были посвящены наши работы по его фитотестированию на разных уровнях организации организма, результаты которой содержит предыдущая [23] и настоящая публикации.

Обобщая полученную информацию в контексте выше сказанного, следует заметить, что:

- в качестве основного тест-объекта были выбраны прорастающие семена *A. sera* (*Allium test*) не только, как наиболее чувствительная модель к действию разнообразных факторов среды, но и наличие возможности надежной экстраполяции полученных результатов на млекопитающих и человека [10; 11; 26];
- экологическую безопасность препарата констатировали на 4-х уровнях организации *Allium test*: организменном, клеточном, субклеточном и молекулярном. Это позволило в зависимости от уровня тест-системы определить *токсичность* (для организменного), *цитотоксичность* (для

клеточного), *генотоксичность* или мутагенность (для субклеточного – хромосомного аппарата) и *состояние молекулярного стресса* (для молекулярного) [3];

- на каждом уровне регистрировали несколько параметров, описывающих жизнедеятельность проростка Allium test:

1. на организменном: биометрические показатели (БП), а именно энергию прорастания, длину проростка (стебля) и корня, отношение длины корня к длине стебля, по которым определяли уровень повреждающего воздействия –ПВ [11] и наличие фитотоксического эффекта - Δ_t [10]; динамика БП отражала уровень токсичности СЯ на фитотест [18];

2. на клеточном уровне: МИ и ФИ давали возможность оценить общий цитотоксический и митозомодифицирующий эффекты СЯ [5];

3. на субклеточном уровне: о степени мутагенного воздействия препарата (генотоксичности) судили по значениям ХА [13] и УМЭ [15];

4. на молекулярном уровне: значения ядрышкового маркера и S неделящейся клетки давали представления о влиянии препарата на общую функциональную активность генома (уровень метаболизма) [1]; определение активности каталазы, конкретизировала эту информацию относительно антиоксидантной системы клетки [27; 31; 35; 40].

- полученные первичные значения показателей Allium test получили на репрезентативных объемах выборок и обрабатывали статистически с использованием ресурса Excel, параметрических и непараметрических критериев.

Руководствуясь перечисленными условиями фитотестирования степени экологической безопасности комплекса СЯ, было показано, что:

1. на организменном уровне препарат не продемонстрировал существенного токсического эффекта; только наименьшая его концентрация (10^{-7} моль/л) имела слабое ПВ при отсутствии Δ_t ;

2. на клеточном уровне препарат:

- не оказал цитотоксического воздействия (напротив, мог стимулировать пролиферацию и рост клеток);

- не продемонстрировал митозомодифицирующий эффект;

3. на субклеточном уровне комплекс:

- не обладал генотоксичностью, т.е. не являлся мутагеном (УМЭ=0);

3. на молекулярном уровне препарат:

- мог вызвать состояние метаболического стресса, которое скорее отражало развитие комплекса реакций неспецифического адаптационного клеточного синдрома [14], чем негативное воздействие препарата на тест-систему;

- не повышал уровень каталазы в клетках, что свидетельствовало об отсутствии оксидантного стресса и подтверждало предположение о

развитии неспецифических адаптивных процессов в *Allium test* на минимальное действие фактора среды (СЯ).

Проведенное исследование засвидетельствовало отсутствие у комплекса спирокарбона с янтарной кислотой свойств, которые обеспечивают токсические, цитотоксические, генотоксические и существенные стрессовые воздействия на организм.

Таким образом, фитотестирование этого комплекса на четырех уровнях *Allium test* доказало высокую степень его экологической безопасности. Такой вывод подтверждают собственные исследования, проведенные на менее чувствительных фитотестах: прорастающих семенах пшеницы [20] и культуре ряски малой [19]. Полученные результаты дают возможность разработать особую разноуровневую шкалу для определения статуса экологической безопасности антропогенного фактора посредством *Allium test*. Открытым остается вопрос экологической безопасности базового химического вещества исследуемого класса новых препаратов – спирокарбона, о повреждающих свойствах которого на животный организм упоминалось выше. Комплексное исследование его биологических свойств при помощи фитотестирования – предмет нашей дальнейшей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипчук В.В. Комплексная оценка токсичности, цито- и генотоксичности полигесаметилenguанидина с использованием растительных и животных тест-организмов и их клеток / В.В. Архипчук, В.В. Гончарук // Химия и технология воды. – 2007. – Т. 29. - № 4. – С. 357-369.
2. Баканча М.В. Протекторні властивості синтетичного стимулятора росту рослин з класу біциклічних бісечовин – похідних спірокарбону / М.В. Баканча, К.А. Воронова // Екологічна безпека держави: тези доповідей Всеукр. конф. молодих учених та студентів. – К.: НАУ, 2013. – С. 126-127.
3. Гарипова Р.Ф. Способ комплексного биотестирования воды, почвы, биологически активных веществ в фитотестах / Р.Ф. Гарипова – Режим доступа: <http://www.sibpatent.ru/patent.asp?nPubl=2322669&mpkcls=G01N033&ptncls=G01N033/24&page=2&sort=2>.
4. Гасюк О.М. Активність мієлопероксидази лейкоцитів білих мишей за умови впливу спірокарбону / О.М. Гасюк, О.Н. Речицький, С.П. Бесчасний // Теорія і практика сучасного природознавства: V Всеукр. наук.-практ. конф Збірник наукових праць. – Херсон: ПП Вишимирський В.С., 2011. – С.28-32.
5. Гончарук В. Знесолена вода і життєдіяльність організмів / В. Гончарук, В. Архипчук // Вісник НАН України. – 2002. - № 9. – С.56-60.
6. Ерьсько В.А. Регулятор роста растений / В.А. Ерьсько, Г.А. Голик, В.П. Евтушенко // Автор. свидет. 1628255, опуб.15.10.1990.
7. Ерьсько В.А. Синтез и фармакологические свойства 1,6-замещенных-4-арил-2,3,4,5,6,7-гексагидро(1H)пирроло-[3,4-d]-пиримидин дионов-2,5 / В.А. Ерьсько, А.Н. Речицький, Р.Т. Бойко // Физиологически активные вещества. – 1995. - № 26. - С. 27–30.
8. Ефремова О.О. Біотестування питної води у моніторингу стану екологічної безпеки : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : Спец. 21.06.01 - екологічна безпека / О.О. Ефремова. – Київ, 2009. – 18 с.

9. Кошелева В.Д. Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГГНС) растущих животных / В.Д. Кошелева, Р.Т. Бойко, В.А. Ересько // Матер. всеукр. науч.-практ. конф. - Херсон, 1994. - С. 103.
10. МР 2.1.7.2297-07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. – Режим доступа: <http://www.gosthelp.ru/text/MR217229707Obosnovaniekla.html>.
11. МУ 1.2.2968-11. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам. Методические указания" (утв. Роспотребнадзором 17.10.2011). - М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.
12. Оценка митотического и мутагенного действия факторов окружающей среды: Метод. указания / сост. И.М. Прохорова и др. – Ярославль: Яросл. гос. ун-т., 2003. – 32 с.
13. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. / З.П. Паушева - М.: Колос, 1980. - 304 с.
14. Пахонова В.М. Неспецифический адаптационный синдром биосистем и общин закономерности реактивности клеток./ В.М. Пахонова. – Казань: КГУ, 2000. – 177 с.
15. Прохорова И.М. Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз. Неро / И.М. Прохорова, М.И. Ковалева, А.Н. Фомичева и др. - М.: Наука, 2008. - 59 с.
16. Речицький О.Н. Дослідження впливу „спірокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм / О.Н. Речицький, В.А. Єресько, К.П. Дудок, Н.О. Сибірна // Теорія і практика сучасного природознавства: III Всеукр. наук.-прикт. конф Збірник наукових праць. – Херсон: ПП Вишимирський В.С., 2007 - С.47–52.
17. Речицький О.Н. Дослідження рiстрегулюючої активностi спiрокарбон та його похiдних на рослинних об'єктах / О.Н. Речицький, Л.Л. Пилипчук, В.І. Езиков, Т.А. Косяк // Теорія і практика сучасного природознавства: Всеукр. наук.-прикт. конф. Збірник наукових праць. – Херсон: ПП Вишимирський В.С., 2009. – С. 66-70.
18. Сидорович М.М. Використання біометричних показників *Allium test* для визначення якості питної води міста / М.М. Сидорович // Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова. Серія 20. Біологія: Зб наукових праць. К.: НПУ імені М.П. Драгоманова, 2013. - № 5. – С. 182-192.
19. Сидорович М.М. Моніторинг біологічних властивостей комплексу спiрокарбон з бурштиновою кислотою засобами фiтотесту «культура ряски малої *Lemna minor* L.» // М.М. Сидорович, М.В. Баканча / Екологічна безпека держави: тези доповідей Всеукр. конф. молодих учених та студентів. – К.: НАУ, 2014. – С. 180-182.
20. Сидорович М.М. Моніторинг властивостей комплексу спiрокарбон з янтарною кислотою засобами тест-системи «пророщене насіння пшениці» / М.М. Сидорович, М.П. Баканча, С.Ю. Кот // Збірник наукових праць. Культура здоров'я. – Херсон: П.П. Вишемирський В.С., 2012. – С. 52-54.
21. Сидорович М.М. Біотестування синтетичних стимуляторів росту в модельній системі «кров білих мишей» / М.М. Сидорович, Л.В. Вишневська, Ю.О. Кістин // Тези доповідей Всеукраїнської конференції «Актуальні питання природничих наук та методики їх викладання». – Ніжин: Видавництво НДУ імені Миколи Гоголя, 2012. – С.30-32.

22. Сидорович М.М. Активна біоіндикація біотичних чинників довкілля за допомогою Allium test / М.М. Сидорович, О.П. Кундельчук, М.П. Баканча // Тези доповідей Всеукра. Конференції «Актуальні питання природничих наук та методика їх викладання», Ніжин, 22-23 лютого 2012р. – Ніжин: Видавництво НДУ імені Миколи Гоголя, 2012. – С.113-114.
23. Сидорович М.М. Определение уровня экологической безопасности комплекса спирокарбон с янтарной кислотой при помощи фитотестов / М.М. Сидорович, О.П. Кундельчук, Е.А. Воронова // Сборник научных трудов SWord. – Выпуск 3. Том 43. – Иваново:Маркова А.Д., 2013. – Цит: 313-0563. – С. 46-54.
24. Bandyopadhyay A. Sensitivity of Allium and Nicotiana in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens / A. Bandyopadhyay, A. Mukherjee // Ecotoxicology & Environmental Safety. – 2011. – Vol. 74. – P. 860 – 865.
25. Barbosa J.S. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals / J.S. Barbosa, T.M. Cabral, D.N. Ferreira et al. // Ecotoxicology & Environmental Safety. – 2010. – Vol. 73. – P. 320 – 325.
26. Fiskesjo G. The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions / G. Fiskesjo // Mutation Research. – 1988. – Vol. 197. – P. 243 - 260.
27. Foyer C.H. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants / C.H. Foyer, P. Descourvieres, K.J. Kunert // Plant Cell Environ. – 1994. – Vol. 17. – P. 507-523.
28. Klauck C.R. Toxicological evaluation of landfill leachate using plant (Allium cepa) and fish (Leporinus obtusidens) bioassays / C.R. Klauck, M.A.S. Rodrigues, L.B. da Silva // Waste Management & Research. – 2013. – Vol. 31(11). – P. 1148 – 1153.
29. Kristen U. Use of higher plants as screens for toxicity assessment // Toxicology in vitro. – 1997. – Vol. 11. – P. 181 – 191.
30. Kwasniewska J. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests / J. Kwasniewska, G. Natecz-Jawecki, A. Skrzypczak et al. // Ecotoxicology & Environmental Safety. – 2012. – Vol. 75. – P. 55 – 62.
31. Li Q. Cinnamic acid pretreatment mitigates chilling stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity / Q. Li, B. Yu, Y. Gao et al. // J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 168. – P. 927-934.
32. Malini M. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems / M. Malini, M.A. Marin-Morales, M.S. Mantovani et al. // Genetics & Molecular Biology. – 2010. – Vol. 33 (1). – P. 176 - 181.
33. Monarca S. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays / S. Monarca, D. Feretti, C. Zani et al. // Environmental & Molecular Mutagenesis. – 2005. - Vol. 46. – P. 96 - 103.
34. Nunes E.A. Genotoxic assessment on river water using different biological systems / E.A. Nunes, C.T. de Lemos, L. Gavronski et al. // Chemosphere. – 2011. – Vol. 84. – P. 47 – 53.
35. Nunez M. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl / M. Nunez, P. Mazzafera, L.M. Mazorra et al. // Biol. Plant. - 2003. – Vol. 47. – P. 67-70.
36. Pedrazzani R. Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations / R. Pedrazzani, E. Ceretti, I. Zerbini et al. // Ecotoxicology & Environmental Safety. – 2012. – Vol. 84. – P. 274 – 281.
37. Pierantozzi P. Physico-chemical and toxicological assessment of liquid wastes from olive processing-related industries / P. Pierantozzi, C. Zampini, M. Torres et al. // J. Sci. Food Agric. – 2012. – Vol. 92. – P. 216 – 223.

38. Rank J. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test / J. Rank, A.-G. Jensen, B. Skov et al. // Mutation Research. – 1993. – Vol. 300. – P. 29 - 36.
39. Rank J., Nielsen M.H. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater / J. Rank, M.H. Nielsen // Mutation Research. – 1994. – Vol. 312. – P. 17 - 24.
40. Severine B. Nucleolus under stress / B. Severine, D.J. Westman, H. Saskia et al. // Molecular Cell. – 2010. – Vol. 40. – P. 216-227.
41. Viana L.A. Mutagenicity and cytotoxicity of liquid waste, press water and pond water, produced in the cassava flour industry, and of antitoxic sodium thiosulfate / L.A. Viana, E. Dьsman, V.E.P. Vicentini // J. Sci. Food Agric. – 2014. – Vol. 94. – P. 453 – 458.

Сидорович М.М., Кундельчук О.П., Польченко Ю.В., Кот С.Ю.

ФИТОТЕСТИРОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И МУТАГЕННОСТИ ПРОИЗВОДНОЙ СПИРОКАРБОНА – НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СТИМУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ

В Херсонском государственном университете синтезирован новый регулятор роста растений. Это комплекс спирокарбона с янтарной кислотой (СЯ). Собственные предыдущие исследования констатировали необходимость изучения его цитотоксического и мутагенного воздействия на организм. В данной публикации представлены результаты такой работы получены на модельной системе *Allium test*. Его проростки перед проращиванием обрабатывали комплексом СЯ. В исследовании митозомодифицирующее действие препарата выражалось в нарушении прохождения клеткой фаз митоза. Цитотоксический эффект приводил к ингибированию пролиферации и роста клеток. Мутагенное (генотоксическое) воздействие комплекса охватывало достоверное увеличение количества хромосомных аномалий (мостов и микроядер) фитотеста по сравнению с фоновым уровнем.

Ранее, мониторинг биостимулирующих свойств комплекса показал, что только три его концентрации (10^{-7} , 10^{-4} та 10^{-2} моль/л) способны изменить ростовые характеристики проростков *Allium cepa* L. Проведенное исследование продемонстрировало, что концентрация 10^{-4} моль/л стимулировала пролиферацию клеток корня проростка, а 10^{-2} моль/л – оказала явный стимулирующий эффект на этот процесс. Фазные индексы клеток меристемы достоверно не изменились. Комплекс СЯ не приводил к росту фонового уровня мутаций в корне *A. cepa*. Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат усиливает клеточную пролиферацию и увеличивает размеры неделящихся клеток. Эти клеточные процессы и обеспечивают ускорение роста проростка *Allium test* после обработки семян СЯ. Таким образом, комплекс не оказывал митозомодифицирующего, цитотоксического и мутагенного действия на растительный организм.

Представленная публикация завершает серию работ по фитотестированию СЯ. Полученные в ней результаты позволяют сделать вывод о степени экологической безопасности комплекса на четырех уровнях организации тест-системы:

на организменном уровне препарат не оказал существенного токсического воздействия; только наименьшая его концентрация (10^{-7} моль/л) в отсутствие фитотоксического эффекта имела слабое повреждающее воздействие;

на клеточном уровне препарат не имел цитотоксического эффекта (напротив, мог стимулировать пролиферацию и рост клеток); не продемонстрировал митозомодифицирующий эффект;

на субклеточном уровне комплекс не обладал генотоксичностью, т.е. не являлся мутагеном;

на молекулярном уровне препарат мог вызвать состояние метаболического стресса, которое отражало развитие неспецифического адаптационного клеточного синдрома; при этом не повышал уровень каталазы в клетках.

Таким образом, проведенное исследование показало отсутствие у комплекса спирокарбона с янтарной кислотой токсического, цитотоксического, генотоксического и существенного стрессового воздействия на организм. Его результаты свидетельствуют о высокой степени экологической безопасности комплекса. Такой вывод подтверждают собственные исследования на прорастающих семенах пшеницы и культуре ряски малой. Представленные данные мониторинга свойств СЯ позволяют разработать особую уровневую шкалу для определения статуса экологической безопасности антропогенного фактора посредством *Allium test*. Открытым остается вопрос экологической безопасности базового химического вещества исследуемого класса новых препаратов – спирокарбона. Его повреждающее воздействие описано на зоотестах. Комплексное исследование биологических свойств спирокарбона при помощи фитотестирования – предмет нашей дальнейшей работы.

Sidorovich M.M., Kundelchuk O.P., Polchenko Y.V., Cot S.Y.
CYTOTOXICITY AND MUTAGENICITY FITOTESTING
DERIVATIVE SPIROKARBONA - NEW SYNTHETIC PLANT
GROWTH PROMOTER

It was synthesized a new plant growth regulator in the Kherson State University. It is a complex of spirokarbon with succinic acid (SS). Own previous studies have noted the need to study its cytotoxic and mutagenic effects on the body. In this publication presented the results of this work, which were obtained using a model system - *Allium test*. Its seedlings treated before germination complex SS. In a study of mitosis modifying effect of the drug was expressed in

violation of the passage of cell mitosis phases. Cytotoxic effects leads to inhibition of proliferation and cell growth. Mutagenic (genotoxic) effects complexes include reliable increase of the number of chromosomal aberrations (bridges and micronuclei) of phytotest compared to background levels.

Previously, monitoring biostimulating properties of the complex showed that only three concentrations (10^{-7} , 10^{-4} and 10^{-2} mol / l) are able to change growth characteristics of seedlings *Allium cepa* L. This study had demonstrated that the concentration of 10^{-4} mol / l stimulated cells proliferation of the root of the seedling, and 10^{-2} mol / l – had an obvious stimulatory effect on this process. Phase indices meristem cells did not change significantly. SS complex did not lead to an increase in the background level of mutations at the root of *Al. cepa*. These data suggest that the drug enhances cell proliferation and increases the size of the cells in interphase. These cellular processes provides a faster growth of the seedling *Allium* test. Thus, the complex had no mitosis modifying, cytotoxic and mutagenic action on the plant.

This publication completes a series of works on SS biotesting. The obtained results do allow us to conclude about the extent of environmental security complex on the four levels of the organization of the body:

1. at the organismal level, the drug had no significant toxic effects; only its lowest concentration (10^{-7} mol / l) in the absence of the phytotoxic effect had had the weak damaging effect;

2. at the cellular level, the drug had no cytotoxic effect (on the contrary, could stimulate the proliferation and growth of cells); had not demonstrated mitosis modifying effect;

3. at the subcellular level complex it is not genotoxic, so it is not mutagenic;

4. at the molecular level, the drug could provoke a state metabolic stress, which reflected the development of non-specific cellular adaptation syndrome; at the same time did not increased the catalase levels in the cells.

So, this study showed the absence of the toxicity, cytotoxic, genotoxic and significant stress effects on the body of a spirokarbon succinic acid complex. Its results indicate a high degree of environmental security complex. Own research confirms such a conclusion using a germinating seeds of wheat and culture duckweed. The presented data monitoring features allow SS to develop a special split-level scale for determining the status of the environmental safety of the anthropogenic factor by *Allium* test. It remains an open question of ecological safety of the base of the test chemical class of new drugs - spirokarbon. Its damaging effects described in zootests. A complex study of the spirokarbon's biological properties using a phytotests - the subject of our future work.