

© Л.С. Швець, 2011

УДК 576.385+504.054+614.777

Л.С. ШВЕЦЬ

*Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра медичної біології з курсом медичної генетики, Івано-Франківськ***ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТО- І ГЕНОТОКСИЧНОСТІ ПИТНОЇ ВОДИ З РІЗНИХ РАЙОНІВ ПРИКАРПАТТЯ**

Досліджено цито- і генотоксичність зразків питної води з різних районів Прикарпаття (хімічно забруднених міст Калуша, Надвірної та Бурштина; зони посиленого радіологічного контролю с. Стецева Снятинського району; умовно екологічно чистих м. Косова та Яремчі) за допомогою *Allium cepa* – тесту. Доведено пригнічення мітотичної активності клітин *Allium cepa*, пророщених на зразках води з хімічно забруднених міст Калуша і Бурштина та стимуляцію поділу – в зразках води с. Стецева. Найістотніший кластогенний ефект виявляли зразки води з міста Калуша, а найменший – з міста Косова. Встановлено достовірні генотоксичні ефекти зразків води з міста Бурштина: частота хромосомних аберацій достовірно перевищувала (4,05±0,03 і 3,70±0,02% у 2007 та 2009 роки) контрольні значення (відповідно 0,85±0,04 та 0,74±0,05%).

**Ключові слова:** *Allium cepa*-тест, мітотична активність, хромосомні аберації, техногенне забруднення

**Вступ.** В умовах постійного забруднення довкілля мутагенами різної природи зростає небезпека негативних змін генофонду населення України [1]. Несприятлива екологічна ситуація склалася також в Івано-Франківській області, що впливає на трудові ресурси, здоров'я людини та демографічні показники [7]. Тому актуальним питанням екогенетики є пошук тест-систем для визначення інтенсивності сумарних забруднень довкілля [1, 5]. Порівняльний аналіз ефективності застосування різних тест-об'єктів засвідчив перевагу рослин, які поєднують швидку зміну поколінь з великою кількістю нащадків та універсальністю генетичного коду [2]. Це дає змогу встановлювати генетичні аспекти мутагенного забруднення та прогнозувати віддалені наслідки впливу різних мутагенів на стан живої природи та здоров'я людей [5].

Групою експертів Міжнародної комісії із захисту від мутагенів при проведенні еколого-генетичних досліджень рекомендується *Allium cepa*-тест [6]. Перевагою цього методу моніторингування є відносна швидкість, інформативність та кореляція його результатів з такими, отриманими на інших тест-системах [8]. *Allium cepa*-тест дає змогу вивчати два аспекти токсичності: 1) загальну (або фітотоксичність) за пригніченням росту корінців цибулі; 2) цитотоксичність, визначену мікроскопічним дослідженням хромосомних аберацій (ХА) в клітинах апікальної меристеми. Вивчено мутагенез в клітинах апікальної меристеми *Allium cepa*, зумовлений дією солей токсичних металів, діоксиду, радіонуклідів (зокрема <sup>232</sup>Th) [4, 5, 8]. Проте довкілля забруднюють ксенобіотики різної природи, тому актуальним є визначення їх

комплексного впливу на спадковий апарат з використанням *Allium cepa*-тесту [5].

**Мета дослідження.** Встановити цито- і генотоксичні ефекти факторів довкілля різних районів Івано-Франківської області за допомогою *Allium cepa*-тесту.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були зразки води з умовно-екологічно чистих міст Косова та Яремчі; хімічно-забруднених (за даними СЕС) міст – Калуша, Надвірної, Бурштина; зони посиленого радіологічного контролю – с. Стецева Снятинського району. Контролем слугувала дистильована вода. Для здійснення про-мета-аналізу цибулини *Allium cepa* пророщували в ємкостях із вищевказаними зразками води. Підрахунок активності росту корінців проводили через 42-72 год, що відповідало першому та другому мітотичним циклам. Корінці, які досягнули довжини 1-1,5 см, були фіксовані в розчині етанолу та оцтової кислоти (у співвідношенні 3:1) протягом 24 год. Підготовка давлених препаратів та їх фарбування 2% орсеїном проводилися за стандартними методиками [10].

Загальний мітотичний індекс (МІ) визначали за відношенням клітин у мітозі до загальної кількості клітин. Про-, мета-, ана-, телофазний індекси розраховували залежно від фази мітозу. Проаналізовано по 5-7 препаратів на кожний зразок води. ХА визначали шляхом аналізу 100 мета-, ана- і телофаз на препарат, по 5 препаратів на зразок. Дослідження проводилося в 2007 і 2009 роках. Мутагенний фон оцінювали на основі послідовного визначення показника пошкодженості (ПП) з використанням наступної формули:

$$ПП = \frac{P_e - P_q}{P_k - P_q}$$

де:  $P_q$  – значення частоти ХА в умовно екологічно чистих районах,  $P_e$  – значення частоти ХА в досліджуваних умовах,  $P_k$  – значення частоти ХА максимально можливе. Результати співставляли з відповідною шкалою [1] (табл.1).

## Шкала оцінки мутагенного фону

Діапазон числових значень показника пошкодження, в балах	Оцінка стану території (зразка) за мутагенним фоном
0,00-0,15	Сприятливий
0,16-0,30	Насторожуючий
0,31-0,45	Конфліктний
0,46-0,60	Загрозливий
0,61-0,75	Критичний
0,76-1,00	Небезпечний

Статистичну обробку здійснено за загальноприйнятими методами математичної статистики за програмою Microsoft Excel.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Першочергово визначали інтенсивність росту корінців *Allium cepa* у зразках води з різних екологічних районів Прикарпаття (табл. 2). Виявлено найнижчий показник у рослин, пророщених у зразках води з м. Калуша, близькими до них були результати з м. Бурштина. Найкраще проростали рослини у зразках води із с. Стецева: довжина корінців перевищувала таку в контролі на 31 у 2007 та на 40 % у 2009 роках. Це може бути зумовлено стимулюючою дією малих доз іонізуючого випромінювання на процеси поділу клітин [1, 5]. Показники інтенсивності росту *Allium cepa* були подібними у рослин з міст Косова та Яремчі. Враховуючи те, що ріст рослин визначається активністю клітин меристеми,

важливо було встановити вплив забруднення довкілля на меристематичну активність. Останню оцінювали за інтенсивністю клітинного поділу і кількістю клітин в меристемах, здатних вступати в мітотичний цикл (див. табл. 2). Виявлено знижений, порівняно з контролем, МІ у рослин, пророщених у зразках води з Калуша та Бурштина. Подібні дані були отримані при дослідженні діоксину на активність мітотичного процесу [8]. Це може свідчити про наявність хімічних чинників забруднення води у даних районах Прикарпаття. Проби води із села Стецева стимулювали поділ клітин первинної меристеми *Allium cepa* – МІ досліджуваних рослин перевищив контрольні показники в 1,6 разу у 2007 та 1,52 разу у 2009 роках. Активність мітотичного процесу в первинних корінцях рослин, пророщених у зразках води із екологічно чистих міст Косова та Яремчі за досліджуваній період також була високою.

Таблиця 2

Інтенсивність росту та загальна мітотична активність клітин апікальної меристеми корінців *Allium cepa*, пророщених у зразках води з досліджуваних районів у 2007 і 2009 роках

Досліджувані райони	Довжина корінців (см)		Мітотичний індекс (%)	
	2007 р.	2009 р.	2007р.	2009р.
Контроль	2,01 ±0,16	2,06±0,12	6,91±0,28	7,32±0,59
Косів	2,41±0,11*	2,30±0,04*	9,50±0,81*	9,03±0,63
Яремча	2,23±0,05*	2,35±0,07*	9,08±0,47*	8,89±0,73*
Надвірна	1,95±0,07*	2,01±0,09*	7,17±0,20*	7,42±0,49*
Стецева	2,64±0,21*	2,88±0,25*	11,06±0,42*	11,23±0,56*
Калуш	1,66±0,15*	1,74±0,20*	6,48±0,61*	6,19±0,70*
Бурштин	1,89±0,09*	1,92±0,23	6,57±0,35*	6,08±0,31*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Оскільки цитотоксичність визначається на різних етапах клітинного циклу, було вивчено розподіл клітин первинної меристеми *Allium cepa* залежно від фази мітозу (табл. 3). Найбільший відсоток склали показники МІ у профазі. Варто зазначити те, що профазний індекс у рослин пророщених у пробах води із с. Стецева, перевищував контрольний у 1,36 разу в 2007 та в 1,42 разу у 2009 роках (табл. 4). У клітинах

апикальної меристеми рослин із міст Калуша та Бурштина виявлено незначні відхилення профазного індексу від контролю. Однак цей показник був зниженим порівняно з таким в умовно екологічно чистих містах Яремча та Косові. В останніх індекс поділу в профазі достовірно переважав контроль відповідно в 1,31 і в 1,37 разу у 2007 та в 1,21 і в 1,23 разу у 2009 роках.

Таблиця 3

Мітотична активність (%) клітин апікальної меристеми корінців *Allium cepa*, пророщених у зразках води досліджуваних районів, по фазах мітозу за 2007 рік, M±m

Досліджувані райони	Індекси мітотичної активності (%) у різних фазах мітозу			
	Профазний індекс	Метафазний індекс	Анафазний індекс	Телофазний індекс
Контроль	33,16±0,48	24,54±0,66	21,08±0,58	23,22±0,31
Косів	38,93±0,71*	20,78±0,53*	20,52±0,39	20,77±0,28*
Яремча	37,88±0,39*	20,43±0,72*	20,71±0,58	20,98±0,56*
Надвірна	38,65±0,61*	21,90±0,62*	21,42±0,41	19,03±0,82*
Стецева	42,43±0,29*	19,02±0,40*	16,59±0,65*	21,96±0,63*
Калуш	34,25±0,73	23,97±0,53*	19,43±0,64*	22,35±0,42*
Бурштин	33,19±0,54	24,23±0,64	19,02±0,49*	23,56±0,39

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Таблиця 4

Мітотична активність (%) клітин апікальної меристеми корінців *Allium cepa*, пророщених у зразках води досліджуваних районів, по фазах мітозу за 2009 рік, M±m

Досліджувані райони	Індекси мітотичної активності (%) у різних фазах мітозу			
	Профазний індекс	Метафазний індекс	Анафазний індекс	Телофазний індекс
Контроль	30,29±0,37	22,07±0,42	22,13±0,61	24,51±0,69
Косів	36,16±0,50*	21,31±0,74	22,36±0,72	19,17±0,41*
Яремча	34,91±0,90*	21,75±0,60	23,30±0,43*	20,04±0,63*
Надвірна	34,53±0,52*	20,38±0,37*	24,61±0,38*	21,48±0,57*
Стецева	43,26±0,43*	19,19±0,51*	18,10±0,29*	19,45±0,48*
Калуш	32,08±0,51*	23,20±0,39*	21,60±0,81	20,12±0,36*
Бурштин	30,31±0,48	24,90±0,47*	21,58±0,50	23,21±0,72*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Закономірними були показники МІ у клітинах апікальної меристеми рослин у метафазі, тобто збільшилася активність поділу у рослин, які мали низький профазний індекс. Підтвердженням цього є дані МІ в первинній меристемі рослин із міст Калуша та Бурштина. В первинній меристемі корінців *Allium cepa*, пророщених у зразках води із с. Стецева, відсоток клітин у метафазі за обидва роки досліджень був найнижчим і майже ідентичним. Це свідчить про гальмівний вплив води із зони посиленого радіологічного контролю саме на цю фазу мітозу, що узгоджується із літературними даними [5]. Дослідження анафазного індексу встановило його зниження у рослин із с. Стецева за два роки в середньому на 25 % порівняно з контролем. Кількість клітин в анафазі була також невисокою в апікальній меристемі корінців *Allium cepa*, пророщених у пробах води з міст Калуша та Бурштина,

особливо у 2007 р. В літературі відзначається зменшення числа реєстрованих анафаз як наслідок токсичного впливу невеликих концентрацій важких металів на клітину [3]. Зміни мітотичного поділу рослин з міст Косова та Яремчі були не суттєвими, що свідчить про стабільність даного процесу та сприятливу екологічну ситуацію в даних районах. Аналіз мітотичної активності клітин *Allium cepa*, пророщених на воді з м. Надвірної засвідчив найбільшу кількість анафазних клітин порівняно із такими із інших населених пунктів у 2007 і 2009 роках. На завершальному етапі мітотичного циклу найменший телофазний індекс виявили у 2007 р. у рослин саме з цього міста, а у 2009 р. – у рослин з м. Косова та с. Стецева. Активність формування дочірніх клітин в телофазі в рослин з м. Бурштина була найвищою і не виявила значущих відхилень від контролю.

Частота хромосомних аберацій (%) у клітинах апікальної меристеми *Allium cepa*, пророщеної на зразках води з досліджуваних районів ( $M \pm m$ )

Досліджувані райони	Частота хромосомних аберацій, %	
	2007 рік	2009 рік
Контроль	0,85±0,041	0,74±0,050
Косів	0,76±0,029	0,71±0,058
Яремча	0,98±0,065	0,89±0,035
Надвірна	1,25±0,038	1,48±0,027*
Стецева	3,45±0,041*	3,34±0,021*
Калуш	2,58±0,021*	3,02±0,015*
Бурштин	4,05±0,039*	3,70±0,028*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Для оцінки гено- і цитотоксичності води на тих самих препаратах визначали частоту ХА (табл. 5). Показники порушень мітозу рослин з хімічно забруднених міст Калуша і Бурштина переважали контрольні відповідно в 3,04 і в 4,06 рази в 2007 та в 4,08 і в 4,51 разу в 2009 роках. В спектрі патологій мітозу переважали хроматидні мости та одиночні фрагменти, злипання та відставання хромосом, що узгоджується з даними літератури щодо мутагенного впливу факторів довкілля [5, 9]. Окрім ХА ідентифіковано пошкодження на клітинному рівні: мікроядра, вакуолізовані ядра. Закономірним виявився той факт, що малі дози іонізуючої радіації, які виявлені в с. Стецева Снятинського району (Постанова КМУ від 23 липня 1991 р.) стимулювали виникнення хромосомних аберацій, їх частота коливалася від 3,45±0,41% у 2007 р. до 3,34±0,21% у 2009 р. Суттєва генотоксичність даних проб води підтверджувалась К-мітозами, відставанням, розсіюванням хромосом. Ці пошкодження є наслідком порушення формування ниток веретена поділу на стадії полімеризації тубуліну, тобто у фазі  $G_2$  клітинного циклу [3].

За попередніми дослідженнями у с. В. Кліщі (зона обов'язкового відселення після аварії на ЧАЕС) частота ХА становила 5,24% і слугувала

максимально можливою величиною при встановленні показника пошкоженості для оцінки мутагенного фону довкілля [9]. Отримані дані дозволили визначити мутагенний фон на основі послідовного визначення показника пошкоженості з урахуванням частоти ХА: Яремча – ПП=0,049, сприятливий; Надвірна – ПП=0,11, сприятливий; Стецева – ПП=0,60, загрозовий; Калуш – ПП=0,41, конфліктний; Бурштин – ПП=0,73, критичний.

**Висновки.** 1. Доведено пригнічення мітотичної активності клітин *Allium cepa*, пророщених на зразках води хімічно забруднених міст Калуша і Бурштина та стимуляцію поділу – в зразках води с. Стецева. 2. Найістотніший кластогенний ефект виявляли зразки води з міста Калуша, а найменший – з міста Косова. 3. Встановлено достовірні генотоксичні ефекти зразків води з міста Бурштина: частота ХА достовірно перевищувала (4,05±0,03 і 3,70±0,02 % у 2007 та 2009 роки) контрольні значення (відповідно 0,85±0,04 та 0,74±0,05 %).

**Перспективи подальших досліджень.** У даному напрямку перспективи полягають у кореляційному аналізі показників гено- і цитотоксичності води з результатами дослідження патологій спадкового апарату на тваринах, які проживали на забруднених територіях.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Методологические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов / А.И. Горовая, Л.Ф. Бобырь, Т.В. Скворцова, В.М. Дигурко // Цитология и генетика. — 1996. — Т.30, №6. — С. 78—86.
2. Довгалюк А.И. Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L / А.И. Довгалюк, Т.Б. Калиняк, Я.Б. Блюм // Цитология и генетика. — 2001. — №2. — С. 3—10.
3. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *Allium cepa* низкими концентрациями Cd и  $^{232}\text{Th}$  / Т.И. Евсеева, Т.А. Майстренко, С.А. Гераськин, Е.С. Белых [и др.] // Цитология и генетика. — 2005. — №5. — С. 73—80.
4. Влияние Cd и K на уровень цитогенетических эффектов, индуцируемых  $^{232}\text{Th}$  в корневой меристеме *Allium cepa* L / Т.И. Евсеева, Т.А. Майстренко, С.А. Гераськин, Е.С. Белых // Цитология и генетика. — 2006. — №6. — С. 50—58.
5. Козовий Р.В. Цитогенетичне монітування мутагенної активності чинників довкілля / Р.В. Козовий // Галицький лікарський вісник. — 2004. — №1. — С. 58—61.
6. Руководство по изучению генетических эффектов в популяциях человека / Программа ООН по окружающей среде, Международная организация труда и ВООЗ. Гигиенические критерии оценки окружающей среды. — М.: Медицина; Женева: ВООЗ, 1989. — 121 с.

7. Сем'янів О.І. Вплив забруднення довкілля в Івано-Франківській області на здоров'я населення / О.І. Сем'янів // Довкілля та здоров'я. — 2000. — №1(12). — С. 45—48.
8. Шкарупа В.М. Мутагенез, індукований діоксидом в *Allium*-тесті / В.М. Шкарупа, І.Р. Барилляк // Цитологія і генетика. — 2006. — №5. — С. 31—35.
9. Kovalchuk O. Novel Plant bioassays for monitoring of the genotoxicity of drinking water from the inhabited areas of Ukraine affected by the Chernobyl accident / O. Kovalchuk, P. Telyuk, L. Kovalchuk [et al]. // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. — 2003. — Vol.70, №.5. — P. 847—853.
10. Fiskesj G., Levan A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test // ATLA. — 1993. — Vol.21. — P. 139—149.

L.S.SHVETS

*Ivano – Frankivsk National Medical University, chair of medical biology with course of medical genetics, Ivano-Frankivsk*

#### EVALUATION OF CYTO- AND GENOTOXICITY OF DRINKING WATER FROM DIFFERENT REGIONS OF PRECARPATHIA

Cyto- and genotoxicity of drinking water samples from different regions of Precarpathia (chemically polluted towns of Kalush, Nadvirna, and Burshtyn; intense radiological monitoring zone of Stetseva village of Snyatyn district; conditionally ecologically clean towns of Kosiv and Yaremcha) has been investigated by means of *Allium cepa*-test. The inhibition of mitotic activity of *Allium cepa* cells sprouted on water samples from chemically polluted towns of Kalush and Burshtyn and the fission stimulation in water samples from the village of Stetseva has been proved. Samples of water from town of Kalush showed the most significant clastogenic effect and those from the town of Kosiv showed the least effect. Actual genotoxic effects of water samples from the town of Burshtyn have been established: incidence rate of chromosomal aberrations adequately exceeded ( $4,05 \pm 0,03$  and  $3,70 \pm 0,02$  % in 2007 and 2009) the target value (respectively  $0,85 \pm 0,04$  and  $0,74 \pm 0,05$  %)

**Key words:** *Allium cepa*-test, mitotic activity, chromosomal aberrations, technogenic pollution

**Стаття надійшла до редакції: 10.05.2011 р.**