

Н. Куцоконь

РОСЛИННІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ

Науково-технічний прогрес супроводжується посиленням антропогенного тиску на довкілля. Людина бере від природи її найцінніші багатства, повертаючи натомість шкідливі відходи. В умовах екологічної напруженості важливого значення набуває генетичний моніторинг забрудненого довкілля. Автор статті, зважаючи на одвічний брак в Україні грошей на придбання сучасного устаткування для аналітичних лабораторій, пропонує збагатитися світовим досвідом використання рослинних тест-систем і розповідає про практичне застосування цієї методики вітчизняними вченими.

Основними критеріями контролю за забрудненням довкілля є санітарно-гігієнічні норми, за якими визначають його токсикологічну, органолептичну, загально-санітарну і фізіологічну характеристики. Такий аналіз зазвичай не враховує ще одного, дуже важливого, аспекту забруднення — наявності мутагенних властивостей. Адже негативні наслідки забруднення проявляються не лише в загальнотоксичній дії на організми, яка призводить до деградації, ослаблення життєздатності, раннього старіння та елімінації окремих особин, але й у віддалених ефектах, що позначаються на стані потомства і спричиняють зміни генетичного статусу популяції [1]. Саме тому надзвичайно важливо здійснювати моніторинг генотоксичності шкідливих сполук, що накопичуються в зонах екологічної напруженості й мають небезпечні мутагенні властивості.

Про які шкідливі сполуки йдеться? В одній із найповніших баз даних забруднювачів довкілля TOXNET, що розміщена на інтернет-сторінці національної медичної бібліотеки США — MEDLINE (<http://toxnet.nlm.nih.gov>), наведено понад 5000 потенційно небезпечних для здоров'я лю-

дини сполук, 9000 канцерогенів, які мають і мутагенні властивості, 3200 генотоксикантів. Їхню мутагенність визначають за допомогою тест-систем, серед яких мають вагомe значення рослинні біотести. Рослинні тест-системи для визначення генотоксичності поділяють на кілька класів [2]:

а) цитогенетичні тести на індукцію пошкоджень мітотичних хромосом, які включають тести на цибулі *Allium*, ячмені *Hordeum vulgare*, традесканції *Tradescantia*, бобах *Vicia faba*, горосі *Pisum sativum*, скереді *Crepis capillaris*;

б) тести на індукцію мікроядер, зокрема в клітинах кореня *Hordeum vulgare* та *Vicia faba*, у тетрадних клітинах (мейотичні хромосоми) *Tradescantia*;

в) тести на індукцію генних мутацій: мутації локусу «восковидності» пилку різних видів, наприклад, у кукурудзи *Zea mays*, недостатність хлорофілу в *Hordeum vulgare*, соматичний мозаїцизм у сої *Glycine max*, мутації у волосках тичинкових ниток у *Tradescantia*, мутації різних видів у *Arabidopsis thaliana*;

г) тести на індукцію сестринських хроматидних обмінів (СХО) та соматичної

© КУЦОКОНЬ Наталія Костянтинівна. Кандидат біологічних наук. Старший науковий співробітник Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (Київ). 2010.

рекомбінації передбачають цитогенетичний аналіз частоти СХО у *Vicia faba* і *Crepis capillaris*, аналіз рівня гомологічної рекомбінації в трансгенних рослин *Arabidopsis thaliana* та вже згадуваний соматичний мозаїцизм у *Glycine max*;

г) кометний тест із використанням тканин тютюну *Nicotiana*, *Vicia faba* та ряду дикорослих рослин.

Наявність широкого спектра рослинних біотестів дає можливість застосовувати їх для оцінювання величезної кількості мутагенних — фізичних, хімічних, біологічних — чинників та забруднень довкілля (води, повітря, ґрунту) [3, 4].

Висока ефективність застосування тест-систем вищих рослин зумовлена низкою переваг порівняно з тестами на інших організмах [5], серед яких найважливіші такі:

- вищі рослини — евкаріоти, що вможливує екстраполяцію результатів тестування на інших представників евкаріотичних організмів, у тому числі й на людський організм;
- тести відносно недорогі, недовготривалі, прості в застосуванні, мають високу чутливість;
- для них розроблено і стандартизовано відповідні методики;
- вони не потребують складного лабораторного обладнання, тому застосування рослинних тест-систем особливо перспективне в країнах, що розвиваються [5];
- під час тестування можна використовувати як окремі речовини, так і складні комплекси сумішей за різноманітних умов середовища, рН, температури;
- показник кореляції даних, отриманих у рослинних тестах, із результатами тестування на культивованих клітинах ссавців не нижчий від показника кореляції між результатами тестування на інших організмах [6];
- вищі рослини чутливі щодо впливу канцерогенних агентів [7];

— генотоксичність деяких сполук можна (і потрібно!) визначати в кількох тест-системах одночасно (батареї тестів), що дає змогу, порівнюючи результати різних тестів, комплексно оцінювати забруднення [8, 9].

Ксенобіотики можуть потрапляти в рослинний організм дифузійно через корені та надземні органи. Корені поглинають речовини менш вибірково, ніж листки: у корені необхідно пройти тільки клітинну стінку, а для потрапляння через листок — додатково ще через кутикулу епідермісу або продихи [10]. Кінчик кореня — це частина рослини, яка першою контактує із середовищем. У ньому містяться ферменти, що активують промутагени в мутагени [11], тому використання кореневих меристем не потребує систем активації в процесі вивчення тих сполук, які здійснюють свій мутагенний вплив через активований метаболіт. Це зумовлює високу чутливість клітин кореневої меристеми до дії мутагенних факторів.

Метаболічні перетворення ксенобіотиків у рослинних організмах, як і в тваринних, відбуваються за три етапи: конверсія, або трансформація, кон'югація та компартменталізація [12]. Протягом першого етапу внаслідок хімічних перетворень гідрофобні молекули стають менш гідрофобними. У подібних реакціях важлива роль цитохромів Р450, спектр та активність яких у рослин відмінні від інших організмів. На другому етапі ксенобіотики (або їхні метаболіти попереднього етапу) кон'югують із глутатіоном, цукрами, амінокислотами, утворюючи гідрофільні сполуки. На третьому етапі відбувається переміщення та накопичення (екскреція) цих метаболітів у вакуолях чи клітинних стінках.

Важлива роль у перехопленні й детоксикації вільних радикалів у клітинах рослин належить природним системам захисту: супероксиддисмутазі, аскорбатпероксидазі, глутатіонредуктазі, каталазі.

У відповідь на надходження іонів важких металів рослинні клітини синтезують фітохелатини, збагачені цистеїном пептиди, які здатні зв'язувати іони металів і є функціональними аналогами металотіонеїнів, виявлених у клітинах тварин і деяких грибів. Припускають, що фітохелатини беруть участь в акумуляції, детоксикації та метаболізмі іонів металів, зокрема важких. Уважають, що рослинні фітохелатини, на відміну від тваринних металотіонеїнів, не є первинними генними продуктами. Такий неспецифічний механізм інтоксикації іонів, очевидно, виник у рослин через відсутність чіткої селективності для проникнення іонів у клітину [13].

Отже, у рослин метаболізм ксенобіотиків відбувається інакше, ніж у людини і тварин. Така відмінність є основним недоліком застосування тест-систем вищих рослин під час визначення генотоксичності, що частково гальмує їх (тест-систем) загальне визнання, оскільки виникають ускладнення в оцінюванні значущості даних, отриманих у процесі тестування рослин, для інших організмів [5]. Справді, організми рослин і ссавців мають вагомий морфологічні, фізіологічні та біохімічні відмінності. Міцна целюозна оболонка рослинної клітини, очевидно, впливає на проникнення в неї деяких речовин, тому між клітинами рослин і ссавців можливі відмінності щодо типів абсорбованих молекул. Однак проблема екстраполяції даних, отриманих на основі рослинних тестів, на людський організм, як і будь-яка екстраполяція з одного виду на інший, загальнобіологічна. Тому, незважаючи на окреслені обмеження, рослинні тести активно застосовують для визначення мутагенності різних факторів, а також для біотестування забруднень довкілля.

На основі результатів програми «Gene-Tox», ініційованої в 1981 р. Департаментом захисту довкілля США для оцінюван-

ня та систематизації наявних даних за різними тест-системами, рослинні біотести було рекомендовано для первинного скринінгу мутагенів як складника батареї тестів. У межах цієї програми в кількох лабораторіях було проаналізовано 9 тестів на 7 видах рослин для визначення мутагенності. Усі тести показали високу чутливість, вони добре відповідають вимогам для виявлення канцерогенності [5].

Важливу роботу проводить створена в 70-х рр. XX ст. моніторингова мережа Китаю. Вона об'єднує національний і близько 20 провінційних центрів (у їхньому складі директор та кілька польових працівників). Крім здійснення хімічних аналізів для виявлення небезпечних речовин, деякі зі станцій проводять тестування для визначення мутагенності повітря, води і ґрунту на *Tradescantia*, а також на *Allium* чи *Vicia* — для визначення водних і ґрунтових забруднень. У разі виявлення генотоксичного ефекту станція визначає джерело забруднення через хімічний аналіз, проведення інтерв'ю тощо. Винуватців змушують провести ремедіацію. Така схема не вимагає подальших детальних досліджень, проте вона доволі ефективна [14].

В Україні рослинні тест-системи застосовують як для тестування конкретних мутагенів, так і визначення сумарних мутагенних забруднень довкілля. Відомо чимало наукових публікацій, у яких показано мутагенність забруднених ґрунту й води. Проте результати таких робіт, на жаль, не впливають належним чином на розв'язання проблем забруднення довкілля.

Наші багаторічні дослідження з вивчення впливу мутагенів фізичної, хімічної та біологічної природи, а також забруднень довкілля підтверджують високу ефективність рослинних тест-систем для визначення мутагенності [15-18].

За даними спеціальних досліджень, біотести застосовують переважно для встановлення

мутагенності стічних вод або значних забруднень водного середовища. Інколи досліджувані зразки води концентрують (найчастіше в тесті Еймса) [19]. Ми ж застосовували рослинні тест-системи не лише в модельних експериментах із мутагенними чинниками, але й для виявлення мутагенності слабких, або таких, що вважають задовільними за санітарними показниками, забруднень води і ґрунту.

Експерименти, проведені із застосуванням рослинних біотестів *Allium cepa*, *Allium fistulosum* і традесканції (клон 02), показали, що вода з водогінної мережі м. Києва, а також вода і ґрунт із природних водойм у деяких випадках виявляли мутагенні властивості [17].

За результатами наших досліджень можна зробити висновок про доцільність застосування рослинних тест-систем для виявлення не лише значних, але й слабких мутагенних забруднень довкілля без попередньої концентрації проб. Зважаючи на те що мутагенність виявляється при значно нижчих концентраціях, ніж токсичність, а популяційно-генетичні наслідки її дії набагато важливіші, застосування цих біотестів у поєднанні із санітарно-гігієнічними аналізами було б надзвичайно інформативним і корисним для поліпшення стану довкілля.

1. Горвая А.И., Бобыр Л.Ф., Скворцова Т.В. Методологические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов // Цитология и генетика. — 1996. — Т. 30. — №6. — С. 76–85.
2. *Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human being* // Ed. Maluszynska J. and Plewa M. — Katowice, 2003. — 150 p.
3. Fatima R.A., Ahmad M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays // Mutation Research. — 2006. — Vol. 609 (1). — P. 81–91.
4. Ma T.-H., Carberra G.L., Owens E. Genotoxic agents detected by plant bioassays // Reviews on Environ Health. — 2005. — Vol. 20 (5). — P. 1–13.
5. Grant W.F. The present status of higher plant for the detection of environmental mutagens // Mutation Research. — 1994. — Vol. 310. — №2. — P. 175–185.
6. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. — Женева: ВОЗ, 1989. — 212 с.
7. Ma T.H., Harris M.M., Anderson V.A., Mohammad I.A., Bare J., Lin G. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents // Mutation Research. — 1984. — Vol. 138. — P. 157–167.
8. Куринный А.И., Зубко Е.С., Кравчук А.П. Сравнительная эколого-генетическая оценка по мутагенному фону двух сельскохозяйственных районов в Закарпатской области // Цитология и генетика. — 1993. — Т. 27. — №1. — С. 13–18.
9. Biscardi D., Monarca S., De Fusco R., Senatore F., Poli P., Buschini A., Rossi C., Zani C. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by Tradescantia/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS // Sci. Total. Environ. — 2003. — Vol. 302. — №1–3. — P. 101–108.
10. Гетко Н.В. Растения в технологической среде. — М.: Наука и техника, 1989. — 208 с.
11. Fiskesjo G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring // Hereditas. — 1985. — Vol. 102. — P. 99–112.
12. Abhilash P.C., Jamil S., Singh N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics // Biotechnology Advances. — 2009. — Vol. 27. — P. 474–488.
13. Grill E., Winnacker E., Zenk M. Phytochelatins, a class of heavy-metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 84. — P.439–443.
14. Gopalan H.N.B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays // Mutation Research. — 1999. — Vol. 426. — P. 99–102.
15. Куцоконь Н.К., Неумержицька Л.В., Баріляк І.Р. Цитогенетична дія тіофосфаміду в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — Київ–Луганськ. — 2001. — Вип. 5 (37). — С. 36–40.
16. Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності 1. Характеристика дозових залежностей // Цитология и генетика. — 2003. — №4. — С. 20–25.
17. Kutsokon N.K. *Allium*-assay in evaluation of drinking and surface water mutagenicity. In: Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle. Eds. Hlavinek, P.; Bonacci, O.; Marsalek, J.; Mahrikova, I. Springer. — 2008. — P. 81–87.

18. Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М. Ефекти хронічного опромінення рослин, зумовленого радіонуклідами техногенного походження // Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення у рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи / За ред. Д.М. Гродзинського. — К.: Наукова думка, 2008. — С. 70–126.
19. Дуган А.М. Продукты хлорирования воды как индукторы генных мутаций // Цитология и генетика. — 1996. — Т. 30. — №5. — С. 76–81.

Н. Куцоконь

РОСЛИННІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ

Резюме

В умовах екологічної напруженості й за постійного зростання кількості шкідливих сполук, що можуть мати генотоксичні властивості, важливого значення набуває генетичний моніторинг, для потреб якого активно застосовують рослинні тест-системи. З метою визначення величезної кількості мутагенних — фізичних, хімічних, біологічних — чинників та забруднювачів довкілля (води, повітря, ґрунту). Багаторічні

дослідження українських учених підтверджують високу ефективність рослинних тест-систем для визначення мутагенності.

Ключові слова: мутагенні фактори, забруднювачі довкілля, рослинні тест-системи.

N. Kutsokon

VEGETABLE TEST-SYSTEMS FOR GENOTOXICITY DETECTION

Summary

Under ecological stress conditions and constant increase of quantity of harmful compounds that may possess genotoxic properties, genetic monitoring becomes very important. For such monitoring vegetable test-systems are intensively used. They are used for testing of large quantity of mutagenic (physical, chemical, biological) factors and polluters of environment (water, air, soil). Long-term researches of Ukrainian scientists confirm high efficiency of vegetable test-systems for mutagenicity detection.

Keywords: mutagenic factors, environment polluters, vegetable test-systems.