

МУТАГЕНЕЗ, ІНДУКОВАНИЙ ДІОКСИДИНОМ В ALLIUM-ТЕСТІ



Досліджували вплив діоксидину (ДН) в концентраціях 10–100 мг/л на індукцію аберантних ана-телофаз в клітинах кореневої меристеми проростків *Allium cepa* L. Встановлено криву доза—ефект при концентраціях ДН 10, 20, 30, 40, 50, 100 мг/л. Максимальний мутагенний ефект (43,6 % аберантних ана-телофаз) виявлено при концентрації 100 мг/л, при цьому спостерігалось значне зменшення мітотичного індексу. Показано, що мутагенна ефективність ДН статистично достовірно корелює з пригніченням мітотичної активності.

© В.М. ШКАРУПА, І.Р. БАРИЛЯК, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 5

Вступ. Генотоксичність антибіотика діоксидину (2,3-ді(оксиметил)хіноксалін-1,4-діоксид), обумовлену прооксидантною дією, показано на різних тест-об'єктах: мікроорганізмах, дрозофілі, соматичних і статевих клітинах ссавців, лімфоцитах людини *in vitro* [1–3]. Універсальність мутагенної дії на живі об'єкти різних рівнів організації та відомий механізм дії обумовили активне використання діоксидину як модельного мутагена в дослідженнях з модифікації мутагенезу [4–7]. В той же час препарат не застосовується при використанні рослинних тест-систем, які є досить доступними і зручними для роботи, зокрема *Allium*-тест, для якого показана добра кореляція з результатами, отриманими на інших тест-системах [8–10]. Це обумовлено відсутністю даних про ефективні мутагенні концентрації діоксидину щодо рослинних організмів.

Головною узагальненою характеристикою індукованого мутагенезу є його залежність від дози мутагенного впливу. Раніше нами була показана здатність діоксидину в *Allium*-тесті в діапазоні концентрацій 10–100 мг/л індукувати як кластогенні ефекти, так і патології, пов'язані з пошкодженням мітотичного апарату [11]. Логічним продовженням і метою представленої роботи було дослідження залежності рівня хромосомних пошкоджень, індукованих діоксидином, від його концентрації в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.

Матеріали і методи. Вплив діоксидину досліджували за допомогою модифікованого *Allium*-тесту. Як модельну систему використовували не додаткові корені пророслих цибулин, а кореневу меристему 72-годинних проростків *Allium cepa* L. Для цього насіння цибулі (репродукція 2004 р., вік насіння 9 міс) пророщували в чашках Петрі на зволоженому дистиллятом фільтровальному папері в термостаті при температурі +25 °С. Для дослідів використовували, крім контролю, шість варіантів концентрацій діоксидину («Фармакон») — 10, 20, 30, 40, 50, 100 мг/л. Розчини готували на дистильованій воді. Експеримент проводили в трьохкратній повторності.

Для цитогенетичного аналізу відразу після завершення експозиції насіння з діоксидином матеріал (корінці довжиною 5–12 мм) фіксували у фіксаторі Кларка (етиловий спирт та оцтова кислота у співвідношенні 3:1). Матеріал витримували у фіксаторі при температурі

+4 °С не менше 2 год. Для мікроскопічного аналізу готували тимчасові давлені препарати, пофарбовані ацетоорсеїном за загальноприйнятими методиками [12]. Проводили мікроскопічне вивчення меристематичної зони корінців. В проростках на 72-й годині з моменту початку проростання насіння визначали мітотичний індекс (МІ) та частоту аберантних ана-телофаз (ЧАА) за формулами:

$$MI = \frac{П+М+А+Т}{I+П+М+А+Т} \cdot 100\%,$$

де П, М, А, Т, I — кількість клітин в стадії профази, метафази, анафази, телофази та інтерфази відповідно;

$$ЧАА = n_a \cdot 100\% / n,$$

де n_a — кількість аберантних ана-телофаз, n — загальна кількість проаналізованих ана-телофаз.

До аберантних відносили анафази, що містили фрагменти і мости як показники кластогенного ефекту та клітини з так званими «патологіями мітозу»: вагрантні хромосоми, мультиполярні і К-мітози як показники пошкоджень веретена поділу.

Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками [13]. Достовірність відмінностей між дослідними варіантами і контролем за МІ і ЧАА здійснювали за методом χ^2 .

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні дозових залежностей необхідно враховувати два моменти. По-перше, при збільшенні дози за рахунок збільшення часу впливу може відбутися нерівномірне зміщення фаз клітинного циклу, на протязі яких

відбувався мутагенний вплив. Частота мутацій в цьому випадку буде варіювати за рахунок зміни не тільки дози, але і чутливості клітин за фазами циклу. По-друге, при збільшенні дози за рахунок підвищення концентрації хімічних мутагенів може змінюватися тривалість окремих фаз клітинного циклу, що також викличе відхилення від дійсної дозової залежності [14].

Пророщування дослідного насіння в розчині мутагену з самого початку проростання (коли основна кількість клітин перебувала в пресинтетичному періоді) протягом всього часу експозиції дозволило, з одного боку, отримати максимальний мутагенний ефект, а з другого — уникнути вказаних проблем. Крім того, за природних умов відбувається переважно саме пролонгований вплив генотоксикантів навколишнього середовища на організми, і вибрана схема експерименту, на наш погляд, більш адекватно моделює систему мутаген — рослинний організм.

Вибір діючих концентрацій діоксидину базувалася на попередніх результатах, в яких показано, що при концентраціях препарату, вищих за 100 мг/л, майже повністю інгібувалася мітотична активність в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. при фіксації на 72-й годині [11]. Отримані в досліді результати представлені в таблиці, з якої видно, що спостерігається статистично достовірною дозова залежність частоти аберантних ана-телофаз від концентрації діоксидину. Хоча на ділянці діючих концентрацій від 40 до 50 мг/л реєстрували незначне зменшення частоти клітин з абераціями, при 100 мг/л вона збільшується до 43,61 % (рис. 1).

Слід зазначити, що при дії різних мутагенів незалежно від концентрації можна отримати

Вплив діоксидину на показники ЧАА і МІ в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L.

Концентрація діоксидину, мг/л	Проаналізовано анафаз	З них аберантних анафаз	ЧАА ± Sp	P	Проаналізовано клітин	З них мітотичних	M ± m	P
0	2135	38	1,78 ± 0,09		9351	890	9,52±0,10	
10	2922	378	12,94 ± 0,74	<0,0001	12057	1065	8,83 ± 0,30	< 0,60
20	2760	612	22,17 ± 1,21	<0,0001	9120	720	7,89 ± 0,37	< 0,90
30	1790	465	25,97 ± 1,90	<0,0001	9014	656	7,28 ± 0,68	< 0,46
40	1251	414	33,09 ± 6,76	<0,0001	8304	661	7,96 ± 0,84	< 0,92
50	1755	558	31,79 ± 4,87	<0,0001	8165	538	6,32 ± 1,37	< 0,38
100	376	164	43,61 ± 4,19	<0,0001	3974	145	3,65 ± 0,04	< 0,002

різний рівень аберантних клітин. При використанні алкілюючих сполук і при дії радіації в принципі можливо при певних концентраціях досягти майже 100%-ного рівня аберантних клітин. Це дає можливість детально проаналізувати форму кривих концентраційних залежностей і зробити досить обґрунтовані припущення щодо механізму дії мутагена. Однак не для всіх мутагенів можна отримати такий високий рівень аберантних клітин.

Це обумовлено або цитотоксичністю сполук при відносно низькій їх мутагенності, що не дозволяє клітинам досягти стадії анафази після дії таких речовин, або для дії такого роду сполук існує «насичуюча» концентрація, при якій спостерігається максимально можливий рівень аберантних клітин (зазвичай він досить низький — до 20 % і навіть менше). При подальшому збільшенні концентрації не відбувається зростання цитогенетичного ефекту. Як правило, таким чином діють різні антиметаболіти, інгібітори реплікації чи репарації [14]. Виходячи з отриманих результатів, можна зробити висновок, що діоксидин не здатний індукувати такий же високий рівень хромосомних аберацій, який притаманний алкілюючим мутагенам. Можливо, це обумовлено його антимітотичною активністю, коли при концентрації, що індукує 43,61 % аберантних клітин, мітотичний індекс знижувався до 3,65 %. При цьому слід зазначити, що мітотична активність при вказаній концентрації виявлялась лише у частини препаратів — з фракції рано проростаючого насіння.

Була виявлена лінійна кореляція між збільшенням аберантних клітин і зменшенням мітотичного індексу при дії діоксидину в діапазоні концентрацій 10—100 мг/л. На рис. 2 показано взаємозв'язок між впливом діоксидину на частоту аберантних ана-телофаз і мітотичний індекс. Видно, що експериментальні точки добре лягають на одну регресійну пряму, яка проходить через точку, що відповідає спонтанному мітотичному індексу і спонтанній частоті клітин з абераціями. Коефіцієнт кореляції дорівнює $-0,786$ ($P < 0,05$). Таким чином, мутагенний ефект діоксидину корелює з пригніченням мітотичної активності.

При порівнянні з літературними даними щодо мутагенності діоксидину в клітинах

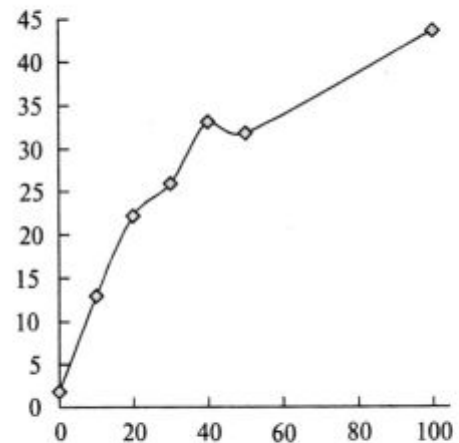


Рис. 1. Залежність частоти аберантних ана-телофаз (по вертикалі, %) від концентрації діоксидину в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L (по горизонталі, мг/л)

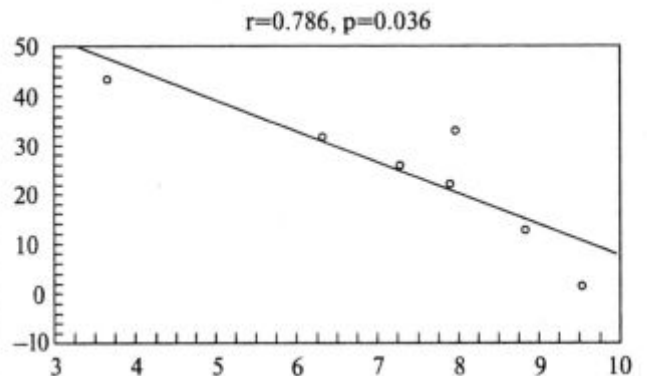


Рис. 2. Залежність між мітотичним індексом (по горизонталі) і частотою клітин з абераціями (по вертикалі, %) при дії діоксидину в різних концентраціях

кісткового мозку мишей *in vivo* та в культурі лімфоцитів людини останній тест виявився більш чутливим до мутагена. Так, в культурі лімфоцитів людини діоксидин в концентрації 0,03 мг/мл індукував 10,0 %, а в концентрації 0,1 мг/мл — 17,1 % аберантних клітин, причому дія мутагена відбувалась в періоді G_2 другого мітозу і нетривалий час (введення діоксидину за 2 год до введення колхіцину) [4]. В той же час у дослідях на мишах при введенні діоксидину в концентрації 200 мг/л (експозиція з діоксидином 24 год) спостерігали від 8,4 до 10,2 % аберантних клітин кісткового мозку. При введенні мутагена (200 мг/л на добу) про-

тягом п'яти днів цей показник збільшувався до 12,8 % [1, 5]. Отримані нами результати свідчать, що при пролонгованій дії діоксидину *in vivo* *Allium cepa* L. є значно чутливішим тестом до дії діоксидину, ніж облік аберантних клітин кісткового мозку мишей (різниця концентрацій мутагена, індукуючих приблизно однаковий рівень аберантних клітин, відрізняється більш ніж на порядок). Навряд чи можна пояснити меншу активність мутагена *in vivo* метаболічною трансформацією — діоксидин не метаболізується в організмі ссавців [1]. Враховуючи прооксидантний механізм його дії, це можливо пояснити значно більшою ефективністю антиоксидантних механізмів на рівні організму, ніж *in vitro*.

Основною вимогою до вибору модельного мутагена в дослідженнях з модифікації мутагенезу є використання добре вивчених речовин з відомим механізмом дії та встановленими залежностями доза—ефект. Відповідно до методичних рекомендацій з експериментального виявлення хімічних модифікаторів мутагенезу пропонується використовувати 3—4 дози мутагена, що індукують приблизно 5, 10, 20 і 30 % клітин з абераціями хромосом. Це дозволяє провести регресійний аналіз залежності доза—ефект при ізольованій дії мутагена і при дії його на фоні модифікатора [15]. При необхідності обмежитись однією-двома дозами пропонується краще використовувати дози, які індукують 20—30 % аберантних клітин (так звані ефективні концентрації мутагена), тому що показана більш виражена модифікація мутагенних ефектів в цьому діапазоні доз. Виходячи з цього, ефективними концентраціями діоксидину як модельного мутагена для *Allium*-тесту можна вважати такі, що лежать в діапазоні 20—40 мг/л. За вищих концентрацій хоча і можна досягти деякого збільшення рівня мутацій, але при цьому спостерігається значне інгібування мітотичної активності.

Висновки. Виявлено залежність доза—ефект при індукції діоксидином хромосомних пошкоджень в клітинах *Allium cepa* L., при цьому мутагенна ефективність діоксидину корелює з пригніченням мітотичної активності. Показано, що *Allium*-тест є більш чутливим тестом *in vivo* до дії діоксидину, ніж тест-система на ссавцях, і визначено ефективні концентрації

мутагена для використання його як модельного в *Allium*-тесті.

SUMMARY. The influence of dioxidin in different concentrations (10—100 mg/l) on the cytogenetic parameters of *Allium cepa* L. has been studied. The mutagenic effect of dioxidin was shown within all the range of the studied concentrations. The curve «dose—effect» has been determined for the concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, and 100 mg/l. The peak of the mutagenic effect and significant reduction of the mitotic index were revealed at the concentration of 100 mg/l. It was shown that the mutagenic efficiency of the dioxidin statistically correlated with reduction of the mitotic activities.

РЕЗЮМЕ. Изучали влияние разных концентраций диоксида (ДН) (10—100 мг/л) на цитогенетические параметры клеток апикальной меристемы *Allium cepa* L. Показан мутагенный эффект ДН в *Allium*-тесте во всем диапазоне исследуемых концентраций. Определена кривая доза—эффект при концентрациях ДН 10, 20, 30, 40, 50, 100 мг/л. Максимальный мутагенный эффект (43,6 % аберантных ана-телофаз) выявлен при концентрации 100 мг/л, при этом наблюдали значительное снижение митотического индекса. Показано, что мутагенная эффективность ДН статистически достоверно коррелирует с угнетением митотической активности.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Серединин С.Б., Дурнев А.Д. Разработка фармакологических средств защиты генетических структур на основе изучения клеточных механизмов индукции мутаций // Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта. — М.: Медицина, 1990. — С. 273—296.
2. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. — М.: Медицина, 1998. — 326 с.
3. Сычева Л.П., Коваленко М.А., Шереметьева С.М., Дурнев А.Д., Журков В.С. Изучение мутагенного действия диоксида полиорганным микроядерным методом // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2004. — № 8. — С. 188—190.
4. Сиднева Е.С., Катосова Л.Д., Платонова В.И., Бекетова Н.А., Коденцова В.М., Чеботарев А.Н., Дурнев А.Д., Бочков Н.П. Оценка спонтанного и химически индуцированного мутагенеза в клетках человека в зависимости от витаминной обеспеченности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2005. — № 2. — С. 199—203.
5. Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Комутагенез — новое направление исследований в генотоксикологии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2003. — 135, № 6. — С. 604—612.

6. Авчиев П.Б., Тюренков В.А., Буторова И.А., Деев С.В., Авчиев М.И., Кулакова А.В., Дурнев А.Д. Исследование антимутагенной активности липидовита // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2004. — 137, № 3. — С. 301—305.
7. Жанатаев А.К., Преснова Г.А., Чистяков А.Н., Дурнев А.Д. Влияние экстракта коры растений рода *Betula* на спонтанный и индуцированный мутагенез у мышей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2004. — 138, № 11. — С. 535—539.
8. Fiskesj G. The Allium test as standart in environmental monitoring // Hereditas. — 1985. — 102. — P. 99—112.
9. Fiskesj G. Allium test // Methods in Molecular Biology. — 43. In vitro Toxicity Testing Protocols / Eds S. O'Hare, C.K. Atterwill — Totowa. — New York : Copyright Humana Press Inc, 1995. — P. 119—127.
10. Довгалюк А.И., Калиняк Т.Б., Блюм Я.Б. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука // Цитология и генетика. — 2001. — 35, № 1. — С. 3—9.
11. Шкарупа В.М., Неумержицька Л.В., Бариляк І.Р. Оцінка фіто- і цитогенетичної активності діоксидину в *Allium*-тесті // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. — Київ—Луганськ—Харків. — 2005. — Вип. 4 (67). — С. 33—40.
12. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
14. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. — М.: Медицина, 1989. — 270 с.
15. Литвинов Н.Н., Журков В.С., Воронин В.М., Казачков В.И., Сычева Л.П. Методические рекомендации по экспериментальному выявлению химических модификаторов мутагенеза и канцерогенеза. — М., 1986. — 10 с.

Надійшла 27.01.06