

Биология

УДК 575

М. Б. МАТЕВОСЯН, В. С. ПОГОСЯН, Э. А. АГАДЖАНЫАН, А. Л. АТОЯНЦ,
Р. М. АРУՏՅՈՆՅԱՆ

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМ ТРАДЕСКАНЦИИ
(КЛОН 02)

Выявлена частота индукции соматических рецессивных мутаций и микроядер под воздействием растворов солей тяжелых металлов $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4$, $NiCl_2$, $CuCl_2$, $CrCl_3$ и окиси хрома CrO_3 с применением тест-систем традесканции (клон 02) – волосков тычиночных нитей и микроядер.

Показано, что ионы изучаемых тяжелых металлов генотоксичны. Они индуцируют соматические точечные мутации и вызывают кластогенный эффект в спорогенных клетках традесканции.

Для оценки мутагенной активности отдельных химических веществ, а именно тяжелых металлов (ТМ), целесообразно применение растительных тест-систем. Среди них наиболее чувствительными являются: подсчет волосков тычиночных нитей традесканции (Трад-ВТН) у гетерозиготных по окраске цветков, позволяющий улавливать точечные мутации при воздействии низких концентраций химических мутагенов, и микроядерный тест (Трад-МЯ), являющийся чувствительной системой для выявления кластогенности тех же мутагенов в спорогенных клетках [1–6]. На территории г. Еревана выявлена техногенная ассоциация четырнадцати тяжелых металлов [7], наблюдается повышенная концентрация свинца, цинка, меди, хрома, никеля и др., что и послужило поводом для моделирования их мутагенной активности.

Для этой цели с применением тестов Трад-ВТН и Трад-МЯ (клон 02) нами проведены модельные опыты для оценки мутагенности растворов солей тяжелых металлов.

Материал и методика. Нами были проведены исследования для выявления частоты индукции соматических рецессивных мутаций и микроядер растворами солей тяжелых металлов $CrCl_3$, $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4$, $NiCl_2$, $CuCl_2$ и окисью хрома CrO_3 .

Обработка растений традесканции (клона 02) проводилась двумя методами: I – обработка соцветий (бутонов) с их погружением в исследуемый раствор солей тяжелых металлов [8]; II – обработка черенков традесканции с

образовавшимися цветочными бутонами [9]. В I случае соцветия (бутоны) обрабатывали в растворах солей разной концентрации в течение 18 часов (12/6 – дневной/ночной цикл в часах), во II – черенки с цветочными бутонами помещали в стеклянные стаканы с теми же растворами на 24 часа (18/6) при температуре 22–26°C.

После обработки в обоих случаях для применения теста Трад-ВТН черенки промывали и помещали в стеклянные емкости с водопроводной водой. Только после семидневного восстановительного периода проводили учет рецессивных (розовых) мутационных событий (РМС) в клетках ВТН и генетически неопределенных (бесцветных) мутационных событий (БМС) по общепринятой методике [2]. Расчеты проводили в среднем на 1000 волосков. Контролем служила бидистиллированная вода. Кроме соматических мутаций отмечались также некоторые морфологические изменения как в волосках тычиночных нитей (карликовые и ветвящиеся волоски), так и в цветках (изменение числа чашелистиков, лепестков и тычинок). Для анализа каждой пробы было проанализировано 10–20 тыс. волосков тычиночных нитей.

Аналогичные эксперименты по всем исследуемым растворам проводили и по тесту Трад-МЯ. Данный тест охватывает изменения, происходящие в процессе микроспорогенеза, особенно в тетрадах микроспор. Цветочные бутоны обрабатывались также, как и при Трад-ВТН, однако после обработки бутоны без прохождения периода восстановления фиксировались в ацеталкоголе (3:1). Готовили временные препараты, окрашенные ацетокармином, и проводили подсчет микроядер на 100 тетрад по стандартной методике [9].

Для каждой пробы проанализировано по 4–5 тыс. тетрад. Полученные данные статистически обрабатывались с использованием t-критерия Стьюдента и компьютерной программы ANOVA.

Исследовалась зависимость частот РМС и БМС, а также числа МЯ в тетрадах спорогенных клеток от концентрации следующих ионов ТМ: Cr^{6+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} в концентрациях 1,25–10,00 мМ.

Результаты и обсуждение. Как показывают данные таблицы 1, с повышением концентрации ионов Cu^{2+} , Cr^{6+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} частота РМС в волосках тычиночной нити традесканции увеличивается в 6–45 раз по сравнению со спонтанным уровнем.

Выявлено, что ионы одних и тех же металлов, имеющие разную валентность, различаются по мутагенной активности. Так, шестивалентный хром по сравнению с трехвалентным повышает частоту рецессивных мутаций в 1,5 раза. С повышением концентрации ионов Ni^{2+} частота РМС уменьшается. При воздействии иона Zn^{2+} с повышением его концентрации в пределах 1,25–3,75 мМ частота РМС повышается, но снижается при концентрации 5,00 мМ.

Обнаружена четкая зависимость частоты РМС от концентрации ионов Cr^{6+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} в пределах 1,25–10,00 мМ.

Выявлено, что при воздействии растворами солей ТМ, наряду с повышением РМС, в целом повышается и частота БМС. При увеличении концентрации Pb^{2+} и Zn^{2+} частота БМС линейно возрастает. Однако для ионов остальных 4-х металлов повышение частоты БМС происходит волнообразно.

Наивысшая концентрация 10,00 мМ при воздействии ТМ, а именно ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} , приводит к гибели цветочных бутонов.

Помимо указанных мутаций, с повышением концентрации солей ТМ прослеживаются и другие типы нарушений: ветвление волосков тычиночных нитей, образование карликовых волосков, срастание тычиночных нитей, образование оголенных тычиночных нитей и пыльников без пыльцы, изменение числа тычинок, лепестков и чашелистиков в цветке.

Таблица 1

Частота соматических мутаций традесканции (клон 02), обработанной окисью хрома и солями тяжелых металлов разной концентрации

Вещество	Концентрация, мМ	Число проанализированных волосков	РМС/1000 волосков ±m	БМС/1000 волосков ±m	Невыжившие волоски, % ±m	Ветвление, % ±m
контроль		9818	0,1±0,10	0,9±0,30		0,2±0,14
CuCl ₂	1,25	9752	0,61±0,25	0,20±0,14	0,50±0,22	0,10±0,10
	2,5	13342	1,60±0,34	1,30±0,31	1,40±0,32	0,90±0,25
	3,75	8417	1,70±0,90	0,80±0,30		0,10±0,10
	5,0	10901	2,10±0,43	5,10±0,68	2,20±0,44	1,80±0,40
	10,0	погибли				
NiCl ₂	2,5	18419	0,80±0,20	3,10±0,40	0,40±0,14	
	3,75	11448	0,60±0,22	8,50±0,85	0,70±0,24	0,30±0,16
	5,0	17399	0,50±0,16	0,60±0,18		0,10±0,07
	10,0	погибли				
ZnSO ₄	1,25	21200	0,99±0,21	2,50±0,34	1,08±0,22	
	2,5	15366	1,43±0,30	3,00±0,44		2,00±0,36
	3,75	22813	2,32±0,31	3,46±0,38		
	5,0	15301	0,30±0,14	4,00±0,51		
	10,0	погибли				
CrCl ₃	2,5	15343	1,10±0,26	1,00±0,25	5,60±0,60	0,30±0,13
	3,75	20281	1,57±0,27	1,30±0,25	2,81±0,37	0,20±0,09
	5,0	18240	2,02±0,33	1,20±0,25	1,40±0,27	0,10±0,07
	10,0	11404	3,00±0,51	1,90±0,40	0,40±0,18	0,40±0,18
CrO ₃	2,5	20861	1,91±0,30	8,80±0,64	0,50±0,15	0,40±0,13
	3,75	9131	2,81±0,55	1,70±0,43		0,10±0,10
	5,0	12647	3,24±0,50	7,80±0,78	0,70±0,23	1,60±0,35
	10,0	6709	4,32±0,80	5,50±0,90	0,40±0,24	1,80±0,51
Pb(NO ₃) ₂	2,5	11362	1,50±0,36	1,00±0,29	0,30±0,16	
	3,75	22696	1,54±0,26	2,81±0,35	1,10±0,22	0,40±0,13
	5,0	12113	1,65±0,36	4,50±0,60	1,30±0,32	1,10±0,30
	10,0	15452	1,74±0,33	5,90±0,61	4,20±0,52	0,30±0,44

По данным теста Трад-МЯ (табл. 2), с повышением концентрации ионов Cr⁶⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ в пределах 1,25–10,00 мМ по сравнению с контролем повышается и количество МЯ в тетрадах традесканции. Однако для всех ионов ТМ не наблюдается линейного повышения частоты МЯ. Аналогичная закономерность отмечена и в работах [4].

Таким образом, нами показано, что ионы изучаемых тяжелых металлов генотоксичны, они индуцируют соматические генные мутации ВТН и вызывают кластогенный эффект в спорогенных клетках микроспор традесканции.

Таблица 2

Частота МЯ в тетрадах микроспор традесканции (клон 02), обработанной окисью хрома и солями тяжелых металлов разной концентрации

Вещество	Концентрация, мМ	Число проанализированных тетрад	Число тетрад с микроядрами/100 тетрад	Процентное содержание тетрад с различным количеством микроядер						Общее число МЯ в тетрадах/100тетрад±m
				1	2	3	4	5	6	
контроль		5000	7,62	74,27	18,37	6,03	0,52	0,78		10,30±0,42
CuCl ₂	1,25	4000	10,45	49,04	34,90	11,96	4,06			17,87±0,60
	2,5	4000	12,12	64,32	23,50	8,24	3,70	0,20		18,42±0,61
	3,75	4000	11,80	67,16	22,67	7,60	2,50			17,17±0,59
	5,0	4000	20,45	51,60	33,50	10,20	3,40	1,22		34,60±0,75
	10,0	4000	10,97	62,64	26,65	9,56	0,90	0,22		16,40±0,58
NiCl ₂	2,5	4000	11,90	56,30	29,60	9,80	3,57	0,63		19,35±0,62
	3,75	4000	8,90	66,01	24,70	7,30	1,90			12,92±0,53
	5,0	4000	8,80	60,22	25,28	10,20	3,90	0,56		14,10±0,55
ZnSO ₄	10,0	4000	11,25	58,40	26,80	9,70	3,50	0,44		17,92±0,60
	1,25	4000	11,05	61,90	30,76	10,85	0,90			17,65±0,60
	2,5	4000	11,46	63,21	26,43	9,20	1,50			16,75±0,59
	3,75	4000	12,10	61,50	26,00	8,26	4,13			21,75±0,65
	5,0	4000	10,65	50,70	34,59	12,50	3,30	1,18		18,65±0,61
CrCl ₃	10,0	4000	10,60	46,46	34,20	12,02	5,18	2,10	0,23	20,20±0,63
	2,5	4000	10,70	67,75	20,79	9,34	1,80	0,20		15,62±0,57
	3,75	4000	12,50	70,80	22,40	6,00		0,80		17,10±0,59
	5,0	4000	13,95	72,20	20,07	3,94	2,30	0,70		19,22±0,62
CrO ₃	10,0	4000	14,65	66,21	20,98	5,10	3,90	1,36		21,40±0,64
	2,5	4500	9,53	67,13	20,74	9,09	2,50	0,46		14,15±0,51
	3,75	4500	17,20	55,81	28,77	9,01	5,08	1,30		28,92±0,67
	5,0	5000	18,26	53,77	28,69	14,23	3,39			30,58±0,65
Pb(NO ₃) ₂	10,0	5000	13,52	58,70	28,84	9,76	4,77	0,70	0,14	21,28±0,57
	2,5	4000	12,90	59,49	26,30	9,30	4,84			20,57±0,63
	3,75	4000	13,90	61,15	26,25	9,71	2,87			21,45±0,64
	5,0	4000	14,87	65,80	20,80	9,74	2,35	1,17		22,25±0,65
	10,0	4000	15,97	63,06	21,28	9,23	2,50	5,69		26,02±0,69

Полученные результаты позволяют моделировать действие повышенных концентраций цветных металлов в окружающей среде.

Лаборатория общей биологии,
подгруппа генетики и цитологии

Поступила 03.10.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Echer S., Ma T.H., Horaka S., Kund M., Knasmuller S. – Environ. Mol. Mutagen, 1998, v. 31, № 2, p. 183–191.
2. Ma T.H., Cabrera G.L. Cebulska-Wasilewska A., Chen R., Loarea F., Vandenberg A.L., Salamone M.F. – Mutat. Res., 1994, v. 310, p. 211–220.
3. Ichikawa S. – Mut. Res., 1992, v. 270, p. 3–22.

4. Knasmüller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Glid R., Kundi M. – Mut. Res., 1998, v. 420, p. 37–48.
5. Fomin A., Paschke A., Arndt U. Assessment of genotoxicity of mine-dump material using the Tradescantia stamen hair assay (Trad SHM) and the Tradescantia micronucleus (Trad MCN) bioassay, in: T.H.Ma (Ed), Workshop on Plant Bioassays for Detection of Environmental Genotoxins, Final Report UNEP, FP/0502-95-08, 1997.
6. Gill B.S., Sandhu R. – Mutat. Res., 1992, v. 270, p. 65–69.
7. Сагателян А.К., Аракелян С.А., Симонян Т.Ш. – Вопросы экологии и охраны окружающей среды, 1996, т. 2, с. 17–22. Деп.№ 82-Ар96.
8. Gichner T., Veleminsky J., Pokorhy V. – Mutat. Res., 1982, v. 103, p. 289–293.
9. Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F. – Mutat. Res., 1994, v. 310, p. 221–230.

Մ. Բ. ՄԱԹԵՎՈՍՅԱՆ, Վ. Ս. ՊՈԴՈՍՅԱՆ, Է. Ա. ԱԳԱԺՅԱՆ, Ա. Լ. ԱՏՈՅԱՆՑ,
Ր. Մ. ՀԱՐՏՅՈՒՆՅԱՆ

ԾԱՆՐ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ԱՂԵՐԻ ԼՈՒԾՈՒՅԹՆԵՐԻ ԳԵՆՈՏՈՔՍԻԿ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ ՏՐԱԴԵՍԿԱՆՑԻԱՅԻ 02 ԿԼՈՆԻ
ՏԵՍՏ-ՀԱՍՏԱԿԱՐԳԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՍԲ

Ամփոփում

Տրադեսկանցիայի առէջաթելերի մազիկների և միկրոկորիզների տեսա-
համակարգերի կիրառմամբ ուսումնասիրվել է տարբեր խտություն ունեցող
ծանր մետաղների աղերի լուծույթների և քրոմի օքսիդի ազդեցությունը
սոմատիկ ռեցեսիվ մուտացիաների և տետրադներում միկրոկորիզների
առաջացման հաճախականության վրա:

Ցույց է տրվել, որ հետազոտվող ծանր մետաղների իոնները գենո-
տոքսիկ են, նրանք մակաձում են տրադեսկանցիայի առէջաթելերի մազիկ-
ներում գենային մուտացիաներ, իսկ սպորոզեն քլիզներում առաջացնում են
կլաստոզեն էֆեկտ:

M. B. MATEVOSYAN, V. S. POGHOSYAN, E. A. AGADJANYAN, A. L. ATOYANTS,
R. M. ARUTYUNYAN

ESTIMATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SALTS OF HEAVY
METALS WITH APLICATION OF TEST-SYSTEMS OF TRADESCANTIA
(CLONE 02)

Summary

Induction of somatic recessive mutations and micronuclei by solutions of
salts of heavy metals CrCl_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 , NiCl_2 , CuCl_2 and chrome oxide
 CrO_3 in test-systems of Tradescantia (clone 02) is investigated.

It is shown, that ions of investigated heavy metals are genotoxic. They
induce somatic point mutations and clastogen effect in sporogenic cells of
Tradescantia.