

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО ТЕСТА ПО УЧЕТУ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ЛИСТЬЯХ СОИ *GLYCINE MAX (L.) MERRILL*.

Биттуева М.М.

ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, e-mail: madbi@mail.ru

Оценка генетической опасности химических соединений – загрязнителей окружающей среды для человека - возникла как новое направление примерно 40 лет тому назад. За это время были созданы и введены в практику исследований более 200 тест-систем для регистрации генотоксичности химических соединений и их смесей. Для целей мониторинга реального загрязнения среды потенциально опасными в генетическом отношении соединениями наиболее подходят растительные тест-системы. При использовании растительных тест-систем, как правило, учитываются хромосомные aberrации в метафазе или анафазе в меристемных клетках *Crepis capillaries*, *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*. Для регистрации генных мутаций созданы и активно используются специальные линии *Tradescantia poludosa*. Однако использование этих тестов позволяет учитывать лишь один тип мутационных событий, либо хромосомные aberrации, либо генные мутации. Исключение в этом плане составляет тест по учету соматических мутаций в листьях сои *Glycine max*. L. Merrill, который позволяет дифференцированно регистрировать сразу несколько генетических нарушений, а именно: прямые и обратные генные мутации, индуцированный соматический кроссинговер и нерасхождение хромосом. Это преимущество, а также оперативность и экономичность при проведении исследований делают ее весьма перспективной при анализе генетической опасности загрязнений территорий и производств.

Ключевые слова: растительные тест-системы, Соя *Glycine max* L. (Merill) линия T219, мутагенная активность химических соединений.

## THE EFFECTIVENESS OF THE TEST PLANT ON ACCOUNT OF SOMATIC MUTATIONS IN LEAVES OF SOYBEAN *GLYCINE MAX (L.) MERRILL*.

Bittueva M.M.

*Kabardino-Balkarian State University n.a. H.M. Berbekov, Nalchik, e-mail: madbi@mail.ru*

Evaluation of genetic hazards of chemical compounds of environmental pollutants to humans - has emerged as a new direction about 40 years ago. During this time, was created and put into practice research more than 200 test systems for registration of genotoxicity of chemical compounds and their mixtures. For the purposes of monitoring of real environmental pollution potentially hazardous genetically compounds are most suitable plant test system. When using plant test systems, as a rule, accounted for chromosomal aberrations in metaphase or anaphase in meristematic cells of *Crepis capillaries*, *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*. For the registration of genetic mutations created and widely used special lines *Tradescantia poludosa*. However, the use of these tests allows to consider only one type of mutational event, or chromosome-wide aberrations, or gene mutations. The exception, in this respect, is the test on account of somatic mutations in leaves of soybean *Glycine max*. L. Merrill, differentiated which allows to register several genetic disorders, namely, direct and reverse gene mutations induced by somatic, crossing-over and chromosome non-separation. This advantage, as well as efficiency and economy when conducting research make it very promising in the analysis of genetic risk of contamination of territories and industries.

Keywords: plant test systems, Soybean *Glycine max* L. (Merill) line T219, mutagenic activity of chemical compounds.

Интенсивная хозяйственная деятельность человека сопровождается загрязнением биосферы огромным количеством разнообразных химических соединений, которые используются в качестве технологических продуктов для промышленности, пестицидов, минеральных удобрений, лекарств, бытовых химических средств, косметических средств и т.д. Значительное количество химических соединений, выбрасываемых в окружающую

среду, является отходами различных отраслей промышленности и других сфер хозяйственной деятельности.

В результате практически вся популяция человека постоянно подвергается воздействию десятков или даже сотен и тысяч химических соединений, которые могут обладать мутагенной и канцерогенной активностью в малых дозах. В связи с необратимостью возникающих при этом мутаций они накапливаются (аккумулируются), и, хотя эффект каждого конкретного мутагена (канцерогена) незначителен, суммарный эффект воздействия может оказаться существенным.

Оценка генетической опасности химических соединений – загрязнителей окружающей среды для человека, возникла как новое направление примерно 35 лет тому назад. За это время были созданы и введены в практику исследований более 200 тест-систем для регистрации генотоксичности химических соединений и их смесей. При этом основное внимание уделялось оценке наличия или отсутствия самого факта такого рода активности у химических соединений для млекопитающих и человека. В этих условиях при создании и отборе тест-систем основными критериями являлись экономичность и филогенетическая близость к человеку. При этом исследования проводились в лабораторных условиях, когда протокол проведения испытаний определялся соображениями простоты, надежности и прогностической эффективности получаемых результатов [3].

Тест-системы принято делить по филогенетической близости к человеку на методы *in vitro* и *in vivo*. Самой многочисленной и постоянно пополняющейся группой являются тесты *in vitro*, в которых в качестве тест-объектов используются клетки бактерий, низшие эукариоты, культуры клеток млекопитающих и человека. Тесты *in vitro* обладают высокой чувствительностью к действию мутагенных соединений и используются, главным образом, на первом этапе тестирования.

Вторую группу представляют тесты *in vivo*, в которых в качестве тест-объектов используются мелкие грызуны, например мыши и крысы. При этом генетические эффекты могут учитываться как в соматических, так и в половых клетках. Тесты *in vivo* используются на втором и третьем этапах оценки потенциальной мутагенной опасности.

Применение тестов *in vivo* на поздних этапах тестирования связано с их высокой стоимостью [3].

Наибольшее распространение в практике оценки генетической опасности химических соединений получили бактериальные тесты (тест Эймса) и клетки млекопитающих в системах *in vivo* и *in vitro*. Однако для целей мониторинга реального загрязнения среды потенциально опасными в генетическом отношении соединениями наиболее подходят растительные тест-системы.

При использовании растительных тест-систем, как правило, учитываются хромосомные aberrации в метафазе или анафазе в меристемных клетках *Crepis capillaries*, *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*. Для регистрации генных мутаций созданы и активно используются специальные линии *Tradescantia poludosa*. Однако использование этих тестов позволяет учитывать лишь один тип мутационных событий, либо хромосомные aberrации, либо генные мутации.

В этом плане исключением составляет тест, созданный еще в 1968 году, который позволяет дифференцированно регистрировать сразу несколько генетических нарушений, а именно: прямые и обратные генные мутации, индуцированный соматический кроссинговер и нерасхождение хромосом [6-8]. В основе этого теста лежит регистрация соматических мутаций, возникающих на листьях сои *Glycine max*. В настоящее время он используется при проведении исследований *in situ* при анализе потенциальной мутагенной опасности соединений в виде растворов, твердых отходов, эмульсий и газообразных веществ [1; 2; 5]. Эти преимущества, а также оперативность и экономичность при проведении исследований делают ее весьма перспективной при анализе генетической опасности загрязнений территорий и производств.

Как уже было отмечено, в настоящее время существуют сотни тест-систем, и тем не менее процесс создания новых продолжается и сегодня. Это связано с отсутствием «идеальной» тест-системы, которая удовлетворяла бы одновременно требованиям эффективности и экономичности. Более того, эффективность подавляющего большинства имеющихся в настоящее время тест-систем либо не определена, либо охарактеризована недостаточно. Определение количественных характеристик эффективности тест-систем проводится в ходе так называемых валидных исследований, которые сами по себе являются достаточно длительными, занимая в среднем десять и более лет, и трудоемкими. Однако без проведения этих исследований тест-системы остаются в значительной мере неполноценными, поскольку при их использовании не ясна количественная связь между результатами тестирования химических соединений и их мутагенной либо канцерогенной активностью у млекопитающих.

Целью нашего исследования является оценка эффективности растительного теста по учету соматических мутаций в листьях сои *Glycine max (l.) Merrill*.

## **Материалы и методы**

### *Принцип метода*

Тест основан на учете и анализе различных типов пятен, появляющихся на листьях сои после обработки семян мутагенами. У линии Т-219 синтез хлорофилла зависит от аллельного состояния гена, доминантный Y11 обуславливает темно-зеленую окраску

листьев, рецессивный  $y11$  обуславливает желтую окраску листьев. В результате расщепления гетерозигот в следующем поколении, растения представлены тремя категориями по признаку окраски листьев, частота которых соответствует менделевскому наследованию при неполном доминировании аллеля дикого типа. Так, гомозиготные доминантные растения  $Y11Y11$  характеризуются темно-зеленой окраской листьев, гетерозиготные растений  $Y11y11$  - светло-зеленой окраской листьев, и, наконец, у листьев гомозиготных растений по рецессивному аллелю  $y11y11$  успевает развиваться только два первых листа, которые имеют желтую окраску.

#### *Проведение эксперимента*

Для изучения мутагенного действия вещества, для каждого варианта опыта, использовали 100 воздушно-сухих семян, которые первоначально замачивали в дистиллированной воде в чашках Петри. После 20 часов замачивания семян в воде проводили их обработку в течение 24 часов в растворе испытуемого соединения при температуре  $25 \pm 2$  °С. Далее семена промывали и проращивали в течение 4-5 недель до появления двух простых и первого сложного тройчатого листа. Поскольку в зародыше представлены только зачатки этих листьев, и появление мозаицизма, индуцированного мутагеном, можно ожидать только на них, анализ следующих листьев не производят. Просматривали только верхнюю поверхность листьев, на которой находится более 80% пятен. Данные приводили в виде числа пятен на лист и анализировали как общее их количество, так и частоту отдельного типа пятен.

#### *Учет результатов*

На всех трех типах листьев могут появиться разного рода мозаичные пятна, являющиеся результатом разных типов мутаций (таблица 1).

Таблица 1

Отношения между возможными генетическими нарушениями и типами соматического мозаицизма, анализируемые на листьях *Glycine max*

Типы листьев	Типы пятен	Тип генетических нарушений
Светло-зеленые	желтые	Прямая мутация $Y11 \rightarrow y11$ Нерасхождение хромосом
	темно-зеленые	Обратная мутация $y11 \rightarrow Y11$ Нерасхождение хромосом
	парные	Соматический кроссинговер
Темно-зеленые	светло-зеленые	Прямая мутация $Y11 \rightarrow y11$
	очень темно-зеленые	Нерасхождение хромосом $Y11Y11Y1$

Желтые	светло-зеленые	Обратная мутация $y11 \rightarrow Y11$
--------	----------------	--

Эти пятна имеют четкие границы, что позволяет довольно легко отличить их от пятен, появляющихся в результате физиологических процессов. Так, на темно-зеленых листьях  $Y11Y11$  растений могут появиться светло-зеленые пятна в результате прямой  $Y11 \rightarrow y11$  мутации. Кроме светло-зеленых пятен, на этих листьях могут появиться еще очень темно-зеленые пятна. Единственным объяснением их появления может быть нерасхождение хромосом, т.е. появление  $Y11Y11Y11$  клеток на  $Y11Y11$ . На листьях желтых  $y11y11$  растений может появиться только один тип пятен – светло-зеленые. Единственной причиной этого может быть только обратная генная мутация  $y11 \rightarrow Y11$ .

На гетерозиготных листьях  $Y11y11$  могут быть участки желтого цвета, причиной их появления может быть как прямая  $Y11 \rightarrow y11$  генная мутация, так и нерасхождение хромосом. Кроме желтых пятен, на этих листьях могут быть темно-зеленые пятна в результате обратных мутаций  $y11 \rightarrow Y11$ , а также нерасхождения хромосом. Одним из наиболее интересных феноменов на  $Y11y11$  листьях является появление парных симметричных пятен, когда рядом с темно-зеленым пятном находится желтое, являющееся его почти зеркальным отражением. Причиной появления таких пятен является индуцированный соматический кроссинговер.

### Результаты и обсуждения

Нами были проведены эксперименты по изучению на сое мутагенных эффектов некоторых химических соединений и препаратов, используемых человеком в быту. Это лекарственные вещества, среди которых противоопухолевый препарат циклофосфан, противотуберкулезный препарат изониазид, антибактериальный препарат нитрофуразон, психотропный препарат диазепам, диуретический препарат фуросемид, витамин С (аскорбиновая кислота), а также пестицид фундазол. Кроме того, на сое были протестированы гидроксилламин и нафтиламин -  $\alpha$ . В таблице 2 представлены итоговые результаты этих исследований.

Таблица 2

Результаты изучения мутагенной активности химических соединений на сое

Химическое соединение	Светло-зеленые листья (гетерозиготы)			Темно-зеленые листья (домин. гомозиготы)		Желтые листья (рецес. гомозиг.)
	прямая мутация $Y11y11 \rightarrow y11y11$ , нерасхожд. хромосом	обратная мутация $Y11y11 \rightarrow Y11Y11$ , нерасхожд. хромосом	соматич. кроссинг.	прямая мутация $Y11Y11 \rightarrow Y11y11$	нерасхожд. хромосом	обратная мутация $y11y11 \rightarrow Y11y11$

КАНЦЕРОГЕНЫ						
НММ	+	+	+	+	+	+
Нитрофуразон	+	-	-	+	-	-
Фуросемид	+	-	-	+	-	+
Циклофосфан	+	+	+	+	-	+
Изониазид	-	-	-	-	-	-
НЕКАНЦЕРОГЕНЫ						
Аскорбиновая кислота	-	-	-	-	-	-
Диазепам	-	+	+	-	+	+
Гидроксиламин	+	+	+	+	+	+
Карбофос	-	-	-	-	-	-
Нафтиламин	+	+	-	-	+	+

Примечание: «+» - позитивный результат; «-» - отрицательный результат.

Видно, что все соединения, за исключением аскорбиновой кислоты, изониазида и карбофоса, индуцировали у сои соматические мутации. Аскорбиновая кислота снижала спонтанный уровень появления пятен на листьях, то есть проявила антимутагенную активность, что согласуется с данными и на других тест-системах [4]. Изониазид, как известно, проявляет мутагенную активность только *in vivo* на клетках млекопитающих [4].

Используя результаты собственных исследований тестирования химических соединений на сое, а также литературные источники была сформирована выборка, состоящая из 55 химических соединений, в том числе 39 канцерогенов и 16 неканцерогенов. При проведении ретроспективного анализа были использованы данные о результатах тестирования соединений, вошедших в выборку с использованием пяти краткосрочных тестов, а именно тест Эймса (ТЭ), тесты по учету хромосомных aberrаций (ХА), генных мутаций (ГМ) и сестринских хроматидных обменов (СХО) в культурах клеток *in vitro* и микроядер или хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *in vivo* (Цит). Критерием использования этих краткосрочных тестов являлось наличие результатов тестирования по крайней мере для 50% соединений, вошедших в эту выборку. В таблице 3 приведены данные тестирования 55 отобранных соединений в шести тест-системах и результаты расчета чувствительности, специфичности этих тест-систем.

Таблица 3

Чувствительность и специфичность тест-систем, рассчитанные по данным тестирования химических соединений

Тест-система	Всего ХС	Канцерогены				Неканцерогены			
		Из них	Рез-ты теста		$\alpha$	Из них	Рез-ты теста		$\beta$
СОЯ	55	39	32	7	0,82	16	6	10	0,63
ТЭ	52	37	28	9	0,76	15	4	11	0,73
ГМ	38	28	27	1	0,96	10	5	5	0,50
ХА	44	29	26	3	0,90	15	7	8	0,53
СХО	42	31	30	1	0,97	11	9	2	0,18
Цит	35	27	22	5	0,82	8	4	4	0,50

Примечание:  $\alpha$  - чувствительность теста;  $\beta$  - специфичность теста.

Чувствительность и специфичность являются важнейшими характеристиками тест-системы. Их определение проводится в процессе валидации тест-системы с использованием ретроспективного анализа. Чувствительность теста представляет собой долю позитивных результатов при испытании заведомых мутагенов или канцерогенов. Специфичность - это доля отрицательных результатов при тестировании заведомо немутагенов и неканцерогенов. Таким образом, чувствительность и специфичность теста представляют собой условные вероятности правильного определения мутагенов или немутагенов, если тестируемая выборка химических соединений состоит из мутагенов или немутагенов соответственно.

Видно, что чувствительность теста на сое составила 0,82 и была выше этого показателя для теста Эймса (0,76), в то же время специфичность ТЭ была самой высокой среди всех рассматриваемых тест-систем (0,75). Тест на СХО имеет очень высокий показатель чувствительности (0,97) и очень низкий показатель специфичности (0,18). Высокие показатели чувствительности имели тесты на ГМ (0,96), ХА (0,90) и Цит (0,82), однако специфичность этих тестов составляла только 0,50-0,53.

### **Заключение**

Таким образом, полученные результаты показывают, что по своей эффективности тест по учету соматических мутаций на листьях сои не уступает (а в некоторых случаях превосходит) лучшие краткосрочные тесты, которые в настоящее время широко используются при оценке потенциальной мутагенной и канцерогенной активности химических соединений. Вместе с тем эффективность такого рода оценки при использовании одиночных тестов оказывается не достаточно высока. В этой связи, как правило, при проведении тестирования в настоящее время используются не одиночные тесты, а их сочетание, батареи тест-систем.

## Список литературы

1. Реутова Н.В., Шевченко В.А. Серебро как возможный мутаген // Генетика. – 1991. – Т. 27, № 7. – С. 1280-1284.
2. Реутова Н.В. Изучение мутагенного потенциала соединений меди и модификация эффектов иодистым серебром // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 5. – С. 617-623.
3. Тарасов В.А. Принципы количественной оценки генетической опасности химических загрязнителей биосферы // Мутагены и канцерогены в окружающей среде: новые подходы к оценке риска для здоровья : сб. – СПб. : НИИ Химии СПбГУ, 1998. – С. 92-117.
4. Шапиро А.А., Мексин В.А., Абилев С.К., Акиншина Л.П., Фонштейн Л.М. Изучение мутагенной активности противотуберкулезных препаратов: гидразида изоникотиновой кислоты и его производных // Цитология и генетика. – 1978. – № 4. – С. 343-349.
5. Anderson D., Basaran N., Blowers S., Edwards A. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxicity assay // Mutation Research. – 1995. – V. 329. – P. 37-47.
6. Vig B., Paddock E. Alteration by mytomyacin C of spot frequencies in soybean leaves // J. Heredity. — 1968. – V. 596. – № 4. – P. 225-230.
7. Vig B. Soybean (Glycine max): A new test system for study of genetic parameters as affected by environmental mutagens // Mutation Research. – 1975. – V. 296. - № 2. – P. 239-240.
8. Vig B. Soybean (Glycine max L. Merill) as a short-term assay for study of environmental mutagens // Mutation Research. – 1982. – V. 99. – P. 339-347.