

UTICAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA OLOVA, ŽELJEZA I BAKRA NA MITOTIČKU AKTIVNOST I HROMOZOMSKO PONAŠANJE MERISTEMA *ALLIUM CEPA*

Adin Mehčić¹, Amela Hercegovac¹, Snježana Hodžić¹, Edina Hajdarević¹, Darja Husejnagić¹, Mirela Habibović¹

Izvod: Cilj istraživanja je ispitivanje učinka različitih koncentracija $Pb(NO_3)_2$, $FeSO_4$ i $CuSO_4$, radi utvrđivanja one koncentracije koja dovodi do inhibicije ćelijske diobe, i abnormalnosti u ponašanju hromosoma, odnosno koja je toksična za biljni organizam. Svi testirani rastvori metala imaju negativan učinak na rast korjenčića *Allium cepa*, mitotsku aktivnost i pojavljivanje hromozomskih aberacija, u odnosu na kontrolni rastvor. Povećanje koncentracije metala obrnuto je proporcionalno mitotskom indeksu meristemskih ćelija, a proporcionalno broju hromozomskih aberacija.

Gljučne reči: $Pb(NO_3)_2$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, mitoza, *Allium cepa*

Uvod

Genotoksični uticaj podrazumijeva negativno djelovanje određenog agensa na nasljedni materijal, na nivou nukleotida (mikrolezije) ili vidljivih promjena koje se mogu detektovati citološkom analizom hromozoma (makrolezije) (Brusnic, 1987.). Pojedini metali su neophodni za održavanje normalnog metabolizma živih organizama, ali ako se njihove koncentracije nalaze iznad gornje ili ispod donje granice dopustivosti, bilo po količini, dužini ili po intenzitetu djelovanja, mogu izazvati neželjene efekte (Babić, 2008). Ispitivanje genotoksičnosti bilo koje hemijske supstance podrazumijeva primjenu brojnih testova kojima se procjenjuje njena sposobnost destruktivnog djelovanja na ćelije, odnosno sposobnost da uzrokuje poremećaje odvijanja ćelijskog ciklusa, kao i sposobnost uzrokovanja oštećenja na hromozomima. Kao pogodan indikatorski organizam za utvrđivanje toksičnog i genotoksičnog efekta određenih agenasa, primjenjuje se sjemenski crni luk, *Allium cepa*, pri čemu se za test citotoksičnosti prati rast korijena u dužinu, a za test genotoksičnosti se registruju vrijednosti mitotičkog indeksa i sve promjene vezane za hromozome i diobeno vreteno tokom mitotičke diobe (Tedesco i Laughinghouse IV, 2012.). *Allium* test je jednostavan za izvođenje, a obezbjeđuje visok kvalitet citoloških preparata, kao i visok stepen podudarnosti rezultata sa rezultatima dobijenim ispitivanjima genotoksičnosti određene supstance na ćelijama drugih bioloških sistema (npr. na bakterijskim ćelijama ili humanim limfocitima). Pored toga, veoma dobro razjašnjene citogenetičke osobine luka, te mali broj hromozoma u diploidnoj hromozomskoj garnituri ($2n = 16$) su još neke osobine koje učvršćuju poziciju ovog testa na vrh ljestvice testova genotoksičnosti (Gorsuch, 1993.). Mitotski indeks koji se mjeri ovim ovim testom, koristi se kao indikator ćelijske proliferacije (Gadano i sar., 2002.).

¹Univerzitet u Tuzli, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitetska 4, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina;

Materijal i metode rada

U istraživanju je korišten sjemenski crveni luk (*Allium cepa* L.) i rastvori tri različita reagensa i to u različitim koncentracijama (tabela 1).

Tabela 1. Prikaz rastvora testiranih metala u različitim koncentracijama

Table 1: The solutions at different concentration of tested metals

Rastvori metala <i>Metal solutions</i>	Koncentracija 1 <i>Concentration 1</i>	Koncentracija 2 <i>Concentration 2</i>	Koncentracija 3 <i>Concentration 3</i>
CuSO ₄	5 mg/m ³	50 mg/m ³	100 mg/m ³
FeSO ₄	100 mg/m ³	500 mg/m ³	1000 mg/m ³
Pb(NO ₃) ₂	0,01 mg/m ³	2 mg/m ³	5 mg/m ³

Pedeset i pet zdravih sjemenskih lukovica *Allium cepa* su postavljene u epruvete do vrha napunjene vodom i ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 24 sata. Nakon toga voda u epruvetama je zamijenjena rastvorima pomenutih koncentracija testiranih supstanci. Za izradu preparata i determinaciju mikroskopskih parametara korišteno je po 5 lukovica iz svake grupe. U ovom istraživanju česmenska voda je korištena kao negativna kontrola, dok je pozitivna kontrola sadržavala 8 mM etilen di aminotetra sirčetnu kiselinu (EDTA). Za svaku grupu uzoraka je pregledano najmanje 2000 ćelija kroz 2 tretmana pripreme mikroskopskih preparata, među kojima je utvrđen mitotički indeks i frekvencija uočenih hromosomskih aberacija. Analizom preparata bilježen je broj i prisustvo promjena u obliku i položaju hromozoma: anafazni i telofazni mostići, hromozomski lomovi i zaostajanje hromozoma. Testiranje statistički značajnih razlika između aritmetičkih sredina mitotičkih indeksa izvršeno je t-testom.

Rezultati istraživanja i diskusija

Lukovice uzgojene u česmenskoj vodi (negativna kontrola) imale su najveći prosječan porast korjenčića, dok za korjenčiće lukovica uzgajanih u rastvoru EDTA (pozitivna kontrola) porast nije evidentiran. Najveći prosječan porast korjenčića zabilježen je kod onih lukovica koje su uzgojene u rastvoru Pb(NO₃)₂ koncentracije 0,01 mg/m³, a najmanji porast kod lukovica uzgojenih u rastvoru FeSO₄ koncentracije 1000 mg/m³. Porast korjenčića obrnuto je proporcionalan koncentraciji metala, tj. sa povećanjem koncentracije metala u rastvoru opada prosječan porast korjenčića lukovica *Allium cepa*. Nakon rasta korjenčića lukovica *Allium cepa*, vrhovi (meristemske ćelije) su odsječeni i fiksirani. Izvršena je mikroskopska analiza preparata pripremljenih iz fiksiranih korjenčića kako bi se ispitalo djelovanje testiranih supstanci na mitotičku aktivnost (mitotički indeks) meristemskih ćelija lukovica *Allium cepa*, kao i prisustvo određenih aberentnih faza mitoze. Frekvencije pojedinih faza mitoze za svaku od koncentracija testiranih rastvora metala, kao i česmenske vode prikazane su u tabelama 2, 3 i 4.

Tabela 2. Učestalost pojedinih faza ćelijskog ciklusa u kontrolnim meristemskim ćelijama lukovica *Allium cepa* i meristemskim ćelijama nakon tretmana serijom rastvora CuSO₄ koncentracija 5, 50 i 100 mg/m³

Table 2. The frequency of individual phases of the cell cycle in the meristem control cells of the bulb *Allium cepa* and meristem cells after treatment with a series of solutions of CuSO₄ concentration 5, 50 i 100 mg/m³

	CuSO ₄ 5 mg/m ³		CuSO ₄ 50 mg/m ³		CuSO ₄ 100 mg/m ³		Kontrola Control	
	Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Interfaza <i>Interphase</i>	964	969	974	969	978	978	915	909
Xav	966,5		971,5		978		912	
St.dev	3,53		3,53		0		4,2	
Broj ćelija u diobi <i>The number of mitotic cells</i>	36	31	26	31	22	22	85	91
Xav	33,5		28,5		22		88	
St.dev	3,53		3,53		0		4,2	
Mitotički indeks <i>Mitotic index</i>	3,6	3,1	2,6	3,1	2,2	2,2	8,5	9,1
Xav	3,35		2,85		2,2		8,8	
St.dev	0,35		0,35		0		0,42	

Tabela 3. Učestalost pojedinih faza ćelijskog ciklusa u kontrolnim ćelijama lukovica *Allium cepa* i meristemskim ćelijama nakon tretmana serijom rastvora FeSO₄ koncentracija 100, 500 i 1000 mg/m³

Table 3. The frequency of individual phases of the cell cycle in the meristem control cells of the bulb *Allium cepa* and meristem cells after treatment with a series of solutions of FeSO₄ concentration 100, 500 i 1000 mg/m³

	FeSO ₄ 100 mg/m ³		FeSO ₄ 500 mg/m ³		FeSO ₄ 1000 mg/m ³		Kontrola Control	
	Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Interfaza <i>Interphase</i>	969	970	972	970	983	986	915	909
Xav	969,5		971		984,5		912	
St.dev	0,7		1,41		2,12		4,2	
Broj ćelija u diobi <i>The number of mitotic cells</i>	31	30	28	30	17	14	85	91
Xav	30,5		29		15,5		88	
St.dev	0,7		1,41		2,12		4,2	
Mitotički indeks <i>Mitotic index</i>	3,1	3,0	2,8	3,0	1,7	1,4	8,5	9,1
Xav	3,05		2,9		1,55		8,8	
St.dev	0,07		0,14		0,21		0,42	

Tabela 4. Učestalost pojedinih faza ćelijskog ciklusa u kontrolnim ćelijama lukovica *Allium cepa* i meristemskim ćelijama nakon tretmana serijom rastvora $Pb(NO_3)_2$ koncentracija 0.01, 2 i 5 mg/m^3

Table 4. The frequency of individual phases of the cell cycle in the meristem control cells of the bulb *Allium cepa* and meristem cells after treatment with a series of solutions of $Pb(NO_3)_2$ concentration 0.01, 2 i 5 mg/m^3

	$Pb(NO_3)_2$ 0.01 mg/m^3		$Pb(NO_3)_2$ 2 mg/m^3		$Pb(NO_3)_2$ 5 mg/m^3		Kontrola Control	
	Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment		Tretman Treatment	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Interfaza Interphase	963	960	972	971	974	976	915	909
\bar{X}_{av}	961,5		971,5		975		912	
St.dev	2,12		0,7		1,41		1,41	
Broj ćelija u diobi The number of mitotic cells	37	40	28	29	26	24	85	91
\bar{X}_{av}	38,5		28,5		25		88	
St.dev	2,12		0,7		1,41		4,2	
Mitotički indeks Mitotic index	3,7	4,0	2,8	2,9	2,6	2,4	8,5	9,1
\bar{X}_{av}	3,85		2,85		2,5		8,8	
St.dev	0,21		0,07		0,14		0,42	

T-testom je utvrđeno da se aritmetička sredina mitotskog indeksa kontrolne skupine statistički značajno razlikuje u odnosu na: rastvor $CuSO_4$ koncentracije 50 mg/m^3 ($P = 0,005 < 0,05$); rastvor $FeSO_4$ koncentracije 500 mg/m^3 ($P = 0,02 < 0,05$); rastvor $FeSO_4$ koncentracije 1000 mg/m^3 ($P = 0,04 < 0,05$); rastvor $Pb(NO_3)_2$ koncentracija 0,01 mg/m^3 ($P = 0,02 < 0,05$); rastvor $Pb(NO_3)_2$ koncentracije 2 mg/m^3 ($P = 0,03 < 0,05$); rastvor $Pb(NO_3)_2$ koncentracije 5 mg/m^3 ($P = 0,04 < 0,05$). Analizom hromozomskih aberacija tretiranih i kontrolnih ćelija, uočeno je postojanje ćelija sa anafaznim mostićima, hromozomskim zaostajanjima i sa lomovima hromozoma. Analizom preparata kontrolne skupine nije uočeno prisustvo hromozomskih aberacija, međutim, povećavanjem koncentracije metala povećava se i učestalost hromozomskih aberacija što je zabilježeno kod svih pet rastvora. Anafazni mostići se najčešće javljaju u tretiranim grupama, zatim slijede hromozomski lomovi, zaostajanja hromozoma, a najmanju učestalost imaju telofazni mostići, od kojih je zabilježen samo jedan.

Najveća učestalost aberantnih hromozomskih stanja uočena je kod rastvora $FeSO_4$ koncentracije 1000 mg/m^3 i to 0,5%, a najmanja kod $CuSO_4$ koncentracije 5 mg/m^3 , 0,15%.

Zaključak

Sumirajući rezultate o razlikama u vrijednostima mitotičkih indeksa tretiranih i ne tretiranih ćelija, te broju hromozomskih aberacija koje se javljaju u svim ćelijama tretiranim rastvorima testiranih metala, možemo uočiti da svi testirani rastvori, u svim koncentracijama, imaju negativan učinak na rast korjenčića, mitotičku aktivnost i pojavljivanje hromozomskih aberacija, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Posmatrajući samo rastvore testiranih metala, najveći prosječan rast korjenčića je zabilježen kod rastvora $Pb(NO_3)_2$ koncentracije $0,01 \text{ mg/m}^3$, a najmanji porast kod lukovica uzgojenih u rastvoru $FeSO_4$ koncentracije 1000 mg/m^3 . Povećanjem koncentracije metala u rastvoru opada prosječan rast korjenčića lukovica *Allium cepa*. Povećanje koncentracije metala obrnuto je proporcionalno mitotičkom indeksu meristemskih ćelija, a proporcionalno broju hromozomskih aberacija.

Literatura

- Babič V. (2008): Uporaba testa mikrojedera pri proučavanju vpliva kovina na rastline. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, Ljubljana.
- Brusnic D. (1987): Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press, New York.
- Gadano A., Gurni A., Lopez P., Ferraro G., Carballo M., (2002): In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. ,J. Ethnopharmacol, 81,11-16.
- Gorsuch J.W. (1993): Environmental toxicology and risk assessment. Second Volume. ASTM, Philadelphia.
- Tedesco S. B. and Laughinghouse H. D. IV (2012): Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, Environmental Contamination, Dr. Jatin Srivastava (Ed.). ISBN: 978953-51-0120-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicitythe-allium-cepa-test>.

EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF LEAD, IRON AND COPPER TO MITOTIC ACTIVITY AND CHROMOSOMES IN MERISTEM CELLS *ALLIUM CEPA*

Adin Mehic¹, Amela Hercegovac¹, Snježana Hodžić¹, Edina Hajdarević¹, Darja Husejnagić¹, Mirela Habibović¹

Abstract

The aim of this study was to examine the effect of $MnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $CdCl_2$, $CuSO_4$ and $FeSO_4$ on cell division *Allium cepa* roots, and to determine whether they have applied chemicals cytotoxic effect and encourage chromosome abnormalities. All tested solutions of metal, in all concentrations, have a significant negative effect on the growth of roots, mitotic activity and the occurrence of chromosomal aberrations, compared to a negative control group of cells. Increasing concentrations of metals, reduces the growth of roots, reduces the mitotic index of meristematic cells, and increases the number of chromosomal aberrations.

Key words: $Pb(NO_3)_2$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, mitosis, *Allium cepa*

¹University of Tuzla, Faculty of natural Sciences and Mathematics, Univerzitetska 4, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina