АГРОІНЖЕНЕРІЯ

УДК 574.224.46
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/12604

КОНТРОЛЬ РІВНЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ МІКОТОКСИНІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТО-ВОЛОКОНОГО БІОСЕНСОРУ SOS-ТИПУ

М. Ф. СТАРОДУБ, *доктор біологічних наук, професор кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки,*
М. В. САВЧУК, *кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник,*
М. І. ФЕДЕЛЕШ-ГЛАДИНЕЦЬ, *кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки*
О. П. ТАРАН, *кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки*
Національний університет біоресурсів і природокористування України
Л. Н. ШУЛЯК, *старший науковий співробітник*
Центр лабораторної медицини "Альфа Лабсервіс", м. Харків
E-mail: okstar@ukr.net, nfstarodub@gmail.com

Анотація. *Мікотоксини є дуже небезпечними біогенними речовинами, і, як правило, вони характеризуються як такі, що мають загальну токсичність. Надається інформація про їх здатність до генотоксичності. Основною метою даної роботи була розробка методу експресного контролю рівня генотоксичності деяких мікотоксинів із застосуванням запропонованого опто-волоконного SOS-біосенсора. Визначено головну умову для такого експрес-аналізу та показано, що мікотоксини Т2, патулін, афлатоксин В1, зеараленон і охратоксин здатні впливати на генетичний апарат, а саме, в результаті їхньої активності підвищується експресія lux-оперона референтних клітин бактерій. Виявлено, що найвища генотоксичність була зареєстрована у випадку Т2 мікотоксину, афлатоксину В2 та патуліну. Показано, що різні мікотоксини характеризувалися різним рівнем генотоксичності.*

Ключові слова: *опто-волоконний SOS біосенсор, мікотоксини, генотоксичність, експрес-аналіз*

Актуальність.

Мікотоксини включають понад 400 низькомолекулярних сполук, що продукуються близько 200 видами мікроміцетів, але, ймовірно, кількість цих токсинів та їх виробників зростатиме у разі подальших досліджень [1-3]. Перші дослідження виявили, що різні види мікроміцетів здатні виробляти афлатоксини, патулін, охратоксин, фумонізин та трихотеціт. Мікотоксини – це група низькомолекулярних неімуногенних сполук, більшість з яких характеризуються відносною термічною стійкістю. Сьогодні мікотоксинам приділяється особлива увага, оскільки вони дуже небезпечні і токсичні та контамінують зерно і продути харчування [2, 4, 5]. Різні види мікотоксинів безпосередньо впливають на органи та тканини: печінку, нирки, слизову оболонку стравоходу та кишечник, а також головний мозок та тканини статевих органів. Відповідно, мікотоксини включені до переліку речовин, вміст яких підлягає регулюванню в їжі, кормах та сировині. У літературі є досить велика кількість інформації про розподіл мікотоксинів серед об›єктів навколишнього середовища, проте, їх обмеженість обумовлена, насамперед, відсутністю достатньо простих та надійних методів виявлення цих речовин. Розробка таких методів лежить в основі одного з найважливіших напрямків запобігання небажаному впливу навколишнього середовища на здоров›я людини. Використання високочутливих, простих та надійних методів аналізу мікотоксинів дозволить контролювати їх рівень на всіх етапах виробництва та переробки продуктів харчування, від заготівлі до кінцевого продукту, який надходить у людський організм. Сьогодні в провідних країнах Європи, Азії і Сполучених Штатах прийняті нормативні документи щодо регулювання допустимих концентрацій мікотоксинів у кормах тварин та продуктах харчування людини. В Україні також прийнята низка відповідних норм. Так, відповідно до Держстандарту України (ДСТУ 3768-98) максимальний допустимий вміст токсинів Т-2 у пшениці для харчових, технічних цілей, експорту та кормів встановлено на рівні 0,1 та 0,2 мг / кг зерна, відповідно. [3].

Враховуючи загальну токсичність мікотоксинів для живих організмів, було запропоновано різні методи, як для їх контролю скринінгу в різноманітних об›єктах навколишнього середовища та для перевірки попередніх отриманих результатів [5-7]. Але існує кілька різних аспектів дії хімічних речовин на живі організми. Вони можуть мати деяку загальну токсичність при відповідній концентрації (як правило, при високих рівнях вмісту та тривалих експозиціях) та/або генотоксичність, тобто здатність пошкоджувати генетичний апарат організмів. У попередніх наших роботах [8-10] показано розробку експрес-методу контролю генотоксичності деяких хімічних речовин і проаналізовано його ефективність у цьому аспекті.

Метою даного дослідження є узагальнення експериментальних результатів визначення рівня генотоксичності деяких мікотоксинів, щоб продемонструвати їх активність у впливі на процес мутацій в геномі.

Матеріали та методи дослідження.

Для дослідження було обрано декілька дуже поширених мікотоксинів, а саме Т2 мікотоксини (Т2), *зерале-*

нони (Zon), *охратоксини* (Ochra), *патулін* (Pat) та *афлатоксини* (AfB2). Відповідно до нашого попереднього дослідження [11], підготовку зразка за *мікотоксинового аналізу за допомогою імунного біосенсора проводили з використанням ацетонітрилу у якості розчинника. Дослідження проводили з використанням оптико-волоконного SOS-біосенсора із застосуванням мембрани для контакту аналітичних елементів з поверхнею перетворювача [9]. Всі хімічні реактиви були отримані з* Sigma-Aldrich *(США). Оптико-волоконний біосенсор на основі клітин поєднував систему SOS, яка реагує на ДНК-агенти, як рецепторний компонент і біологічну люмінесцентну систему, як швидкий репортер [5]. Цей пристрій працює в диференційному режимі, який дозволяє реєструвати порівняльний рівень фотолюмінесценції між присутністю аналізованої речовини в вимірювальній комірці та фізіологічним розчином. Окремі підходи підготовки зразків описані нижче при викладі результатів. На рисунках на осі ординат позначено відносні одиниці рівнів фотолюмінісценції*, на осі абсцис – час аналізу у хвилинах.

Результати дослідження та їх обговорення.

Першим завданням було встановлення оптимальної концентрації ацетонітрилу, яка може бути використана для розчинення мікотоксинів, щоб запобігти впливу присутності цього розчинника аналізованому зразку. Згідно з нашими даними [11], ацетонітрил не впливав на рівень реакції антиген-антитіла навіть при концентрації близько 40 %. Але інший органічний розчинник, такий як етанол,

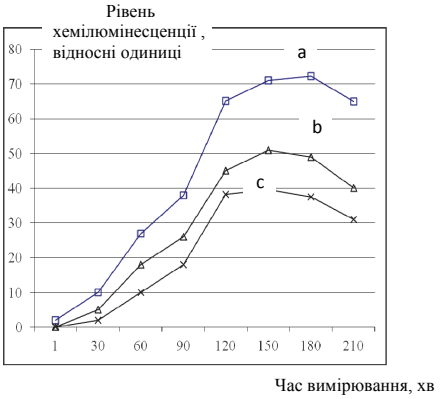

Рис. 1: Динаміка зміни рівня хемілюмінесценції біосенсора після додавання ацетонітрилу у вимірювальну комірку в концентрації:
а) 1 %; б) 0,2 %; с) 0,1 %.

може мати певний вплив на показник генотоксичності вже за концентрації близько 3,0 %. Крім того, ацетонітрил виявився більш ефективним за екстракції мікотоксинів, Тому досліджували рівень генотоксичності ацетонітрилу в діапазоні його концентрації від 0,1 % до 1,0 % (рис. 1).

Виявилося, що специфічний сигнал збільшувався із збільшенням концентрації ацетонітрилу в аналізованому зразку. Очевидно, ми спостерігали не тільки інтенсивність флуоресценції референтних клітин як результат включення їх оперону з комплексом репаративних генів та активацією інтенсивності їх роботи. Загальний комплекс цього процесу супроводжується зміщенням максимуму флуоресценції за короткий період часу, оскільки одночасно з репаративними генами активовано синтез якого-небудь гена з флуоресцентним білком, який вводиться в зазначений оперон.

Для наступних експериментів з мікотоксинами було обрано концен-

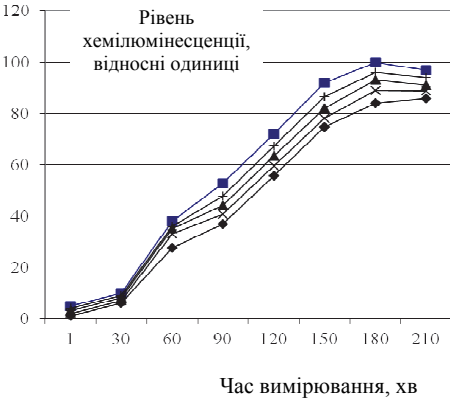

Рис. 2: Динаміка змін рівня флуоресценції біосенсора після додавання мікотоксинів до вимірювальної комірки. Зверху вниз: T2, AfB2, PAT, Ochra і Zon в концентрації 10 нг/мл

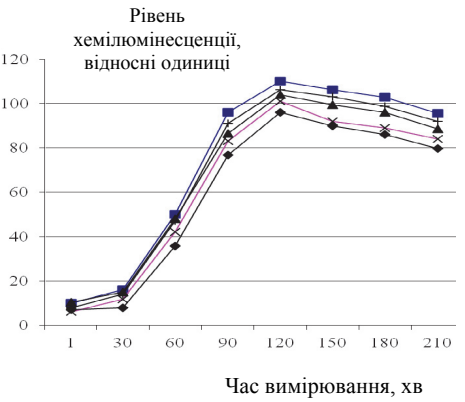

Рис. 3: Динаміка змін рівня флуоресценції біосенсора після додавання мікотоксинів в концентрації 20 нг/мл до вимірювальної комірки. Зверху вниз: T2, AfB2, PAT, Ochra і Zon

трацію ацетонітрилу 0,2 %. Спочатку відповідні мікотоксини розчиняли в 20,0 % ацетонітрилі за концентрації 1,0 і 2,0 мкг / мл, потім зразки розбавляли в 100 разів фізіологічним розчином і використовували для контролю генотоксичності.

Виявлено, що рівень флуоресценції системи підвищувався для всіх досліджуваних мікотоксинів (рис. 2). Однак найвищий ефект спостерігали для T2, афлатоксину B2 та патуліну.

Слід зауважити, що у разі підвищеної концентрації мікотоксинів в досліджуваному розчині інтенсивність флуоресценції зростає, а її максимум в аналізі досягається швидше (рис. 3).

Різниця в ефекті генотоксичності окремих мікотоксинів може бути пов›язана з дією певних чинників. Наприклад, однією із важливих причин є розчинність мікотоксину у вибраному розчиннику, що, відповідно, може впливати на активність генотокичного агента на референтні клітини. Крім того, проникність окремих мікотоксинів у клітини також може бути різною, а отже і пошкоджуючий ефект, який проявляється з підвищенням флуоресценції, може бути різним.

Висновки і перспективи.

Таким чином, продемонстровано простий підхід для експресного визначення генотокичності хімічних речовин, зокрема, мікотоксинів із застосуванням біосенсору на основі клітин із SOS-системою. Показано, що окремі мікотоксини мають різний рівень генотиоткчичності стосовно референтних клітин, які використовували у біосенсорі.

References

1. Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev., 16 (3), 497-516.
2. Artjuch, V. P., Gojstar, O, S., Chmelnitskij, G. A., Starodub, N. F. (2003). Trichitecene mycotoxins: determination in environmental objects. Biopolymers and cell, , 19(3), 216-223.

3. Ciegler, A, Bennett, J. W. (2014). Mycotoxins and mycotoxicoses. Bioscience, 30 (8), 512–515.
4. Starodub, N. F. (2010). Modern biooptical instruments for the express control of total toxicity, individual chemicals, viral and bacterial infections to prevent bio- and medical threats. In: NATO Science for Peace and Security Series E: Human and Social Dynamics, eds. A. Trufanov et.a., "Pandemics and Bioterrotism, 62, 127-133.
5. Starodub, N. F., Shpirka N. F. (2016). Efficiency of Non-label Optical Biosensors for the Express Control of Toxic Agents in Food. In Book: Biosensors for security and bioterrorism applications», Ed. Nikolelis D.P. and Georgia-Paraskevi Nikoleli, Springer Co., 385–418.
6. Turner, N. W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta, 632(2),168-180.
7. Nabok, A. V., Mustafa, M. K., Tsargorodskaya, A., at al. (2013). Mycotoxins: the detection and purification of contaminated substances. BioNanoSci. 3, 79–84.
8. Starodub, N. F. (2016). Biosensors for the express evaluation of the level of genotoxicity of chemical substances, in: Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, D. P. Nikolelis, G. P. Nikoleli (eds.), Springer, 181-197. DOI: 10.1007/978-3-319-28926-7_9.
9. Starodub, N. F., Taran, M. V. (2016). Analsis of the Efficiency of Fiber Optic Sos-Type Biosensor Work at the Different Ways of the Sensitive Layer Formation. Austin J Biosens & Bioelectron, 2 (2): id1022 (2016) ISSN : 2473-0629, |www.austinpublishinggroup.co.
10. Starodub, N. F., Savchuk, M. V., Lukin, V. E. (2017). Investigation of the genotoxicity of some nano-metal oxide particles by the fiber optic SOS-type biosensor. International Journal of Nanotechnology and Nanomedicine Research,1-4, Nanotechnology%20 and %20Nanomedicine-5%20(1).pdf, www.clytoaccess.com
11. Starodub, N. F., Savchuk, M. V., Székács, A., Marty, J. L. (2018). Peculiarities of sample preparation for the determination of certain mycotoxins in grain products and fruits by immunobiosensor analysis. World Journal of Engineering Research and Technology, 4(3), 174-185.

M. F. Starodub, M. V. Savchuk, M. I. Fedelesh-Gladinets, O. P. Taran, L. N. Shuliak (2019). Control of the level genotoxicity of micotoxins with the fiber–optic sos-biosensor. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 10(1): 38-43. http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/12604*

Abstract. *Mycotoxins are very dangerous nutrients, and, as a rule, they are characterized by general toxicity. Information about their ability to genotoxicity is provided. The main goal of this work was to develop a method for express control of the level of genotoxicity of some mycotoxins using the proposed fiber-optic SOS-biosensor. The main condition for such a rapid analysis was determined and it was shown that T2 mycotoxins, patulin, aflatoxin B2, zearalenone and ochratoxin are able to influence the genetic apparatus, namely, as a result of their activity, the expression of the lux-operon of reference bacteria cells is increased. It was revealed that the highest genotoxicity was registered in the case of T2 mycotoxin, aflatoxin B2 and patulin. It was shown that mycotoxins were characterized by different levels of genotoxicity.*

Keywords: *fiber optic SOS-biosensor, mycotoxins, genotoxicity, express-analysis*

М. Ф. Стародуб, М. В. Савчук, М. И. Феделеш-Гладинець, О. П. Таран, Л. Н. Шуляк (2019). Контроль уровня генотоксичности микотоксинов с помощью опто-волоконного биосенсора sos-типа.

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 10(1): 38-43.

http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/12604

Аннотация. *Микотоксины являются очень опасными биогенными веществами, и, как правило, они характеризуются общей токсичностью. Предоставляется информация об их способности к генотоксичности. Основной целью данной работы была разработка метода экспрессного контроля уровня генотоксичности некоторых микотоксинов с применением предложенного опто-волоконного SOS-биосенсора. Определено главное условие для такого экспресс-анализа и показано, что микотоксины Т2, патулин, афлатоксин В2, зеараленон и охратоксин способны влиять на генетический аппарат, а именно, в результате их активности повышается экспрессия lux-оперона референтных клеток бактерий. Выявлено, что самая высокая генотоксичность была зарегистрирована в случае Т2 микотоксина, афлатоксина В2 и патулина. Показано, что микотоксины характеризовались различным уровнем генотоксичности.*

Ключевые слова: *опто-волоконный SOS-биосенсор, микотоксины, генотоксичность, экспресс-анализ*