

TAIMEDES SISALDUVATE SAASTEAINETE TOKSILISUSE MÄÄRAMINE BIOKATSEGA

Ü. Pavel

SUMMARY: *Assessment of general toxicity of plant pollutants by means of bioassay. It is recommended that the embryotoxicity and immunosuppressive effect of pollutants be assessed during the perinatal period of chick development (measuring the perinatal mortality). On the 9th day of incubation the chloroform-ethanol (80:20 v/v) extracted material suspension in plant oil was injected into allantois (0.1 ml), as in Adebajo and Oyesiku (1994). The embryonic mortality is registered on the 12th and 18th incubation day and on the day of hatching. For the assessment of the immunosuppressive impact of the plant extract we are guided by R. R. Lochmiller et al. (1993). On the 10th post-hatching day the New Hampshire chicks (20 fertilized eggs were taken as control and 20 for the experiment) were challenged subcutaneously with *Salmonella gallinarum* killed cells (0.1 ml, 10⁸ cells). On the 8th postvaccinational day the chicks were bled and the specific agglutinin titers (log₂) were determined. The body mass, the mass of the spleen and bursa Fabricius were also determined.*

On the 15th day of their life, the CMI of the chicks was assessed by a phytohemagglutinin (PHA-P, Sigma, USA) skin test, injecting 0.05 ml (100 µg). After 24 hours the reaction was determined.

Mis ühist on fütohügieenil ja veterinaarmeditsiinil? Esialgselt näib, et mitte midagi. See järeldus on aga ennatlik. Nimelt taimed on peamiseks põllumajandusloomade ja ka mõningate meelisloomade sööda komponendiks ning, teiseks, veterinaartoksikoloogia pakub välja ka meetodeid taimedes ja nende saadustes esinevate toksiliste ainete määramiseks.

Käesolevas artiklis peatume lühidalt toksikoloogilisel ja immunotoksikoloogilisel meetodil. Viimane käsitleb taimedes esinevate saasteainete immunosupressiivse toime määramist kanal postembrüonaalsel perioodil.

Et areneva kana vastuvõtlikkus perinataalse arengu etappidel on vägagi erinev (Pavel, Peterson, 1969; Pavel, 1969), siis taimedes esinevate saasteainete summaarse toksilisuse määramist on vajalik teostada perinataalsel perioodil (9ndast hautamise päevast kuni 17nda koorumisjärgse päevani). Katse objektideks sobivad njuuhämp □iri tibud, kes on
loogiliselt varavalmivad (Pavel, 1977).

Taimede ekstrakti embrüotoksilisuse määramine toimub Adebajo ja Oyesiku (1994) ning Simovardi (1966, isiklik teadaanne) modifitseeritud meetodi järgi. Ellujäänud (koorunud) tibudel määratakse taimeekstrakti immunosupressiivne toime humoraalselt vahendatud immuunsusele (HMI) 17. päeval, vaktsineerides nii katse- kui ka kontrollrühma tibusid *Salmonella gallinarum*'i vaktsiiniga 10. elupäeval (juhindudes Pitcovski *et al.*, 1987, andmetest). Samuti registreeritakse tibudel postembrüonaalne suremus.

Raku poolt vahendatud immuunsus (CMI) kui ka humoraalselt vahendatud immuunsus (HMI) määratakse *in vivo*, juhindudes peamiselt Lochmilleri, Vestey ja Boreni (1993) poolt kasutatud meetodikast.

Tuleb märkida, et Eestis on transformeeride (mutageenide ja kantserogeenide ning nende eellaste) esinemist taimsetes saadustes uurinud nii meedikud, eeskätt akadeemik P. A. Bogovski (1985, vt. Bökorez *et al.*, 1985, lk. 97...134) koostöös TA Keemia Instituudiga, kui ka agronoomid. Viimastest tuleks esile tõsta professor Jaan Lepajõed (1976, 1979), kes uuris 3,4-bensopüreeeni sisaldust teraviljades olenevalt terade kuivatamise tehnoloogiast, ning doktor Heino Kärblast ja L. Kevvaid (1995).

Taimede saastumise ökoloogiat ja metodoloogiat käsitlevad teiste seas McEldowney ja kaastöötajad (1994). Meie lühiülevaade esitab olulisemaid mikrobioloogilisi meetodeid keemiliste mutageenide määramiseks uuritavas materjalis (Pavel, 1975). Toksilisuse määramise meetod on toodud ka Adebajo ja Oyesiku (1994) töös.

Kantserogeenivabade põllu- ja aiasaaduste tootmise eelduseks on taimede agrotehnoloogiline ja geneetiline uurimine. Selle kõrval on oluline taimede immunotoksikoloogiline analüüs, mis võimaldab määrata ka taimse materjali summaarset ehk üldist toksilisust. Asi on selles, et taimed sisaldavad väga mitmesuguseid transformeeride kombinatsioone.

Mudelloomadatel määratakse toksilisust 48- või 96-tunnise mürgi toime järel, mil hakkub umbes 50 % isendeist (LD_{50} või LC_{50} – keskmine surmav annus).

See protseduur on aga väga töömahukas. Samuti näitavad meie varasemad uurimised, et testobjektide nagu kanalooded ja tibu ontogeneesi eri etapid iseloomustuvad erineva resistentsuse astmega, mistõttu saasteainete toimet tuleb määrata perinataalsel perioodil; embrüotoksilisuse kõrval hinnatakse taimse materjali immuunsupressiivset toimet ka tibudel.

1. Embrüotoksilisuse määramine

1. **Kontsentreeritud ekstrakti valmistamine.** 25 g kuivale taimepulbrile 200 ml-ses kolvis, kus on 1,5 ml taimeõli, lisatakse 50 ml kloroform-etanooli (80:20 v/v) ja raputatakse 24 tundi. Seejärel kolvi sisu aurutatakse toatemperatuuril kuni 20 ml mahuni. Edasi asetatakse kolb keevale vesivannile ja evaporeeritakse. Saadud sade suspendeeritakse 5 ml-s taimeõlis.

2. **Embrüotoksilisuse määramine.** 9. hautamispäeval viiakse allantoisi 0,1 ml ekstrakti suspensiooni ja varem muna koorde puuritud auk suletakse sulaparafiiniga. Katsesse võetakse 20 viljastatud muna ja kontrolliks teist 20. Loote suremust registreeritakse 12., 18. ja koorumise päeval.

2. Immunosupressiivse toime määramine postembrüonaalsel perioodil

Suremust registreeritakse 5., 10., 15. ja 17. elupäeval.

Immunosupressiivse toime sedastamine *in vivo* toimub CMI ja HMI määramise teel. HMI määramiseks vaktsineeritakse 10 päeva vanuseid tibusid surmatud *Salm. gallinarum*'i vaktsiiniga (nahaalusi 0,1 ml, doos 10^8 bakterit).

15. elupäeval määratakse tibude CMI fütohemagglutiini (PHA-P, Sigma, USA) testi abil, süstides viimast 0,05 ml naha alla (doos $100\mu\text{g}$). Mõõdetakse nahavoldi paksus nii katse- kui ka kontrolltibudel. CMI registreeritakse 24 tunni pärast, mõõtes nahavoldi paksenemise.

17. elupäeval (s.o. 8. vaktsineerimisjärgsel päeval) kanatibud veretustatakse ja vere-seerumis määratakse spetsiifiliste aglutiniidide tiiter (\log_2). Samuti määratakse Fabriciuse pauna ja põrna mass ning tibu elusmass. Üksikutes proovides määratakse ka vere valgeliblede tsellulaarsus.

Olgu märgatud, et taimse materjali mutageensust võib määrata ka puuviljakärbsel, *Escherichia coli*'l või teistel mikroobidel (vt. Pavel, 1975). Et kindlaks teha võimalike promutageenide muundumist kantserogeenideks, mõjustatakse hiiri mutageene sisaldava materjaliga ja seejärel viiakse neile kõhuõõnde indikaatormikroobe, kellel mutageense intensiivsus määratakse hiljem.

Seega kantserogeenivabade aia- ja põllukultuuride tootmise edukus rajaneb agroomide, keemikute ja veterinaarimmunotoksikoloogide koostööl.

Addendum. C. B. Dabbert ja kaastöötajad (1996) avaldasid hiljaaegu uue meetodika, kus lindudel registreeritakse perinataalne suremus *Pasteurella multocida* tüüp 3 suhtes.

Kirjandus

- Adebajo L. O., Oyesiku, O. O. Investigation on the toxicity of fungi from rootstock snacks. – *Die Nahrung*, vol. 38, No. 1, p. 26...31, 1994.
- Bõkorez jt.: Быкорез А. И., Рубенчик Б. Л., Степан Э. И. и др. Экология и рак. – Научова думка, Киев. – 256 с., 1985.
- Dabbert C. B., Sheffield S. R., Lochmiller R. L. Northern Bobwhite egg hatchability and chick immunocompetence following a field application of diazinon. – *Bull. Environ. Contam. Toxicology*, vol. 56, p. 612...616, 1996.
- Dikun jt.: Дикун П. П., Калинина И. А., Лепайё Я. Я., Пани Э. А. Влияние сушки зерна с помощью барабанной (СЗПБ-2) и шалстной (СЗС-8) зерносушилок на содержание в нём 3,4-бензпирена. – *Гигиена и санитария*, № 4, с. 94...96, 1976.
- Kärblane H., Kevvai L. Raskmetallide sisaldus Eestis enamkasutatavates väetistes ja nende osa mulla raskmetallidega saastamisel. – *Agraarteadus*, nr. 4, lk. 393...404, 1995.
- Лерайёе jt.: Лепайё Я. Я., Пани Э. А. и др. Содержание в зерне бензопирена в зависимости от способа сушки. – *Растения и химические канцерогены*. Наука, Ленинград. – 133, 1979. – 133 с.
- Lochmiller R. L., Vestey M. R., Boren J. C. Relationship between protein nutritional status and immunocompetence in Northern Bobwhite chicks. – *The Auk*, vol. 110, No. 3, p. 503...510.
- Pavel: Павел Ю. Г. Некоторые возрастные и генетические аспекты иммунологической реактивности в перинатальном периоде. – Автореферат докт. диссертации, Тарту. – 45 с., 1969.
- Pavel: Павел Ю. Г. О методах определения мутагенной активности химических соединений. – *Цитология и генетика*, Киев, № 3, с. 264...265, 1975.
- Pavel Ü. Veterinaargeneetika. – Tallinn: Valgus, 1977. – 183 lk.
- Pavel Ü., Peterson K. The influence of maternal egg-white mucin-globulin on the resistance of offspring in the perinatal period. – *Acta Veter. Acad. Sci. Hungaricae*, vol. 19, No. 3, p. 211...215, 1969.
- Pitcovski J., Heller E. D., Cahaner A., Peleg B. A., Drabkin N. Immunological traits of chicks selected for early and late immune response to *E. coli* and newcastle disease virus. In “*Avian Immunology*” (eds. W. T. Weber and D. L. Ewert), p. 295...305. Alan R. Liss, Inc.