

Изучение протекторных свойств водного экстракта куколок дубового шелкопряда при фито- и цитотоксической активности ионов свинца в *Allium*-тесте

Т.А. Толкачева*, И.И. Концевая**

*Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

**Учреждение образования «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»

Целью работы явилось изучение протекторных свойств водного экстракта куколок дубового шелкопряда в условиях токсического действия ионов свинца на морфометрические и цитогенетические параметры в клетках корневых меристем *Allium cepa* L. Экстракт снижал фитотоксическое действие ионов свинца в концентрациях 100–500 мкМ и в меньшей степени при концентрации 1000 мкМ. Установлено также модифицирующее влияние экстракта на процесс клеточного деления в условиях стресса, вызванного ионами свинца в концентрациях 100–500 мкМ. Оптимальный протекторный эффект экстракта проявляется при его концентрации 10 мл/100 мл раствора. При такой концентрации экстракта были обнаружены все четыре фазы митотического деления клеток. Экстракт в оптимальной концентрации ослабляет действие нитрата свинца в широком диапазоне доз (1–500 мкМ): подавляет митотическую активность меристематических клеток, снижает у них показатель патологии митоза, существенно подавляет образование микроядер по сравнению с соответствующим контролем.

Ключевые слова: *Allium*-тест, митоз, нитрат свинца, водный экстракт куколок дубового шелкопряда.

Study of protective properties of aqueous extract of oak silkworm pupae during phyto- and cytotoxic activity of lead ions in *Allium*-test

T.A. Tolkacheva*, I.I. Kontsevaya**

*Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

**Educational establishment «Gomel State Francisk Skorina University»

The aim was to study the protective properties of aqueous extract of tread oak silkworm pupae in the conditions of toxic effect of lead ions on morphometric and cytogenetic parameters in the cells of root meristems of *Allium cepa* L. The extract reduced the phytotoxic effect of lead ions at concentrations of 100–500 mM and to a lesser degree with a concentration of 1000 microM. It has also modifying effect of the extract on the process of cell division under stress caused by lead ions at concentrations of 100–500 microM. The optimum protective effect of the extract is shown in its concentration of 10 ml/100 ml. At this concentration of the extract all the four phases of the mitotic cell division were found. The extract at the optimal concentration reduces the effect of lead nitrate in a wide dose range (1–500 mM): inhibits the mitotic activity of meristematic cells, reducing their rate of mitosis pathology, significantly inhibits the formation of micronuclei compared with the control.

Key words: *Allium*-test, mitosis, lead nitrate, aqueous extract of oak silkworm pupae.

Свинец существует во многих формах в различных экосистемах. В настоящее время это один из наиболее широко и достаточно распространенных тяжелых металлов (ТМ). Многочисленные исследования показали, что значительное количество свинца найдено в почве. Свинец относится к металлам, которые не выполняют существенно важные функции в метаболизме растений. Свинец негативно влияет на прорастание семян, удлинение корней и побегов, ингибирует синтез хлорофилла и ферментов, индуцирует развитие хлороза, способствует

повреждению клеточной структуры и нарушению прохождения митоза и цитокинеза и т.д. Таким образом, суммарный негативный эффект свинца приводит к уничтожению растений и целых экосистем [1].

В связи с широким распространением в биосфере ТМ в результате естественных природных процессов и антропогенной деятельности актуален поиск средств, уменьшающих негативное действие ТМ как на рост культурных растений, так и их накопление в растениеводческой продукции. Среди источников биологиче-

ски активных веществ, используемых в растениеводстве, до настоящего времени не применяли препараты из гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда, хотя по химическому составу гемолимфа может быть использована для получения высокоэффективных стимуляторов роста. Ранее было обнаружено ингибирующее действие водного экстракта куколок шелкопряда на образование *in vivo* активных форм кислорода и галогенов в нейтрофилах, что свидетельствует об его антиоксидантном действии. Выявлен состав гемолимфы и водного экстракта куколок шелкопряда, содержащий комплекс аминокислот, углеводов, микроэлементов и антиоксидантов, который оптимален для функционирования эукариотических клеток.

Целью работы было изучение возможных протекторных свойств водного экстракта куколок дубового шелкопряда в условиях токсического действия ионов свинца на морфометрические и цитогенетические параметры в клетках корневых меристем *Allium cepa* L.

Материал и методы. Исследование ответных реакций растений лука обыкновенного в условиях действия токсических концентраций ионов свинца при применении водного экстракта куколок дубового шелкопряда выполняли с помощью модифицированного *Allium*-теста.

Перед началом эксперимента луковицы *A. cepa* выдерживали при 4°C на протяжении двух недель для активизации и синхронизации процесса прорастания. В эксперименте на каждый вариант использовали по 12 репчатых луковиц сорта «Штуттгартен», диаметром 2,0–2,5 см. Предварительно у луковиц удалили внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, а затем поместили в 20-мл пробирки, наполненные дистиллированной водой. Проращивание луковиц проводили при комнатной температуре 20–25°C при естественном освещении.

Через 48 часов отбирали на каждый вариант опыта по 10 наиболее развитых луковиц, и помещали их на 24 часа в тестируемые растворы (табл. 1). Водный экстракт куколок дубового шелкопряда (далее по тексту – экстракта) получали в соответствии с авторским свидетельством СССР № 1787439А1 (В.А. Трокоз, Т.Д. Лотош, А.Б. Абрамова и др.). В работе тестировали водные растворы нитрата свинца ($Pb(NO_3)_2$, *M.m.* = 331,0, квалификации ч.д.а.), взятые в различных концентрациях: от 1 мкМ до 1000 мкМ. В подборе концентраций руководствовались предшественниками, а в качестве контроля использовали дистиллированную воду, ее выбор обоснован в работе [2].

Воду и растворы для обеспечения аэрации меняли каждые 24 часа. Через 72 часа культивирования от начала проращивания выполняли фиксацию корешков в растворе Карнуа, в течение 24 часов, в холодильнике. Фиксацию корешков проводили с 8 до 9 часов по летнему времени. Затем выполняли промывку корешков абсолютным спиртом и переносили их в 70% спирт. Хранили материал в холодильнике до приготовления препаратов.

Наиболее чувствительным показателем токсического воздействия загрязнителей окружающей среды на растения является ингибирование их корневого роста. Поэтому для изучения протекторных свойств экстракта при действии ионов свинца в *Allium*-тесте был выполнен морфометрический анализ роста корней луковиц после экспозиции с этим соединением. Оценку проращиваемого материала проводили через 12 дней культивирования по параметру «средняя длина корней». Для этого измеряли штангенциркулем длину срезанных корней. Также отмечали морфологические изменения корней (цвет, их внешний вид, наличие утолщений, ветвления и т.д.).

Таблица 1

Тестируемые концентрации водного экстракта и нитрата свинца: варианты опыта

Концентрация $Pb(NO_3)_2$, мкМ – вариант опыта	10 мл экстракта / 100 мл раствора (Э1)	0,1 мл экстракта / 100 мл раствора (Э2)
0–к	к'	к''
1–1	1'	1''
10–2	2'	2''
100–3	3'	3''
500–4	4'	4''
1000–5	5'	5''

Давленные препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по общепринятой методике. Анализировали по 10–30 проростков в каждом варианте опыта. В препаратах учитывали все клетки на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Особенности протекторных свойств экстракта при цитотоксической активности ионов свинца на клеточном уровне оценивали по митотическому индексу (МИ), который определяли с учетом профазных клеток и без учета профазных клеток, митотический индекс – только по профазным, метафазным, анафазным, телофазным клеткам. Для выявления стадии митоза, на которой происходит митотический блок, подсчитывали относительную продолжительность фаз митоза [3]. Для определения возможной задержки митоза на стадии метафазы использовали метафазно-профазный индекс (МПИ) [3]. Возможность ингибирующего либо стимулирующего эффектов экстракта при цитотоксической активности ионов свинца оценивали с использованием метафазного и ана-телофазного метода учета перестроек хромосом в клетках корневых меристем лука. Патологию митоза (ПМ) подсчитывали как отношение числа клеток с нарушениями митоза к общему числу делящихся клеток [3] и классифицировали отдельно для каждого корешка по И.А. Алову с незначительной модификацией [4]. Наряду с аберрациями (мостами и фрагментами) учитывали прочие цитогенетические нарушения, не связанные с повреждениями хромосом: отставание хромосом в метафазе или при расхождении к полюсам делящихся клеток, их слипание, асимметричное расположение веретена деления. Для получения более точной оценки по критерию «патология митоза» вычисляли их частоту без учета профаз. Также подсчитывали число интерфазных клеток с микроядрами. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Leica Gallen III при увеличении 40×10. По каждому варианту опытов было просмотрено более 20000 клеток.

Статистическую обработку результатов выполняли согласно методикам Г.Ф. Лакина [5] с использованием программ Excel. Для сравнения выборок по митотической активности, доли клеток на стадиях митоза и по патологиям митоза использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Фитотоксическая активность. При изучении визуальных признаков токсического влияния свинца на корневую систему лука было выявлено сле-

дующее: по сравнению с контролем отмечали тенденцию к уменьшению показателя «средняя длина корней» при концентрации 1–10 мкМ $Pb(NO_3)_2$ и существенное ($P < 0,001$) ингибирование корневого роста при концентрации 100–1000 мкМ $Pb(NO_3)_2$ (рис. 1), изменение цвета корней (побурение, потемнение) на средних и высоких концентрациях металла в растворе, легкое загнивание корешков и появление коричневых кончиков корешков при высоком содержании ионов свинца в воде (500–1000 мкМ). При концентрациях нитрата свинца 100–1000 мкМ отмечали изменение тургесцентности. Падение тургора корешков возрастало до 100% с увеличением концентрации ионов металла.

Культивирование луковиц при совместном воздействии тестируемых растворов экстракта и ионов свинца при концентрациях 1–500 мкМ на протяжении одного полного клеточного цикла не повлияло на изменение параметра «средняя длина корней» по сравнению с контролем. По мнению некоторых исследователей, суть явления стимуляции ростовых процессов в корневой системе лука может сводиться к восстановлению пролиферации вследствие синтеза в клетках соединений, выполняющих протекторную функцию по отношению к ионам металлов [6]. В нашем эксперименте таким веществом с протекторной функцией является, по-видимому, экстракт. Существенное подавление роста корней в длину ($P < 0,01$) наблюдали при совместном воздействии нитрата свинца в концентрации 1000 мкМ и обеих тестируемых концентраций экстракта.

Протекторные свойства экстракта при оценке фитотоксической активности корешков лука четко проявились при действии ионов свинца в концентрациях 100–500 мкМ и в меньшей степени при концентрации 1000 мкМ (рис. 1). Даже при высоких концентрациях ионов свинца при совместном его воздействии с экстрактом на корешки определяли до 10–90% нормальных корешков белого цвета без потери тургора.

Можно предположить, что наличие коричневых кончиков корней в вариантах использования только ионов свинца свидетельствует об индуцировании этим металлом некроза клеток меристемы. Обычно факторы, обуславливающие падение тургора корешков в ответ на действие многих тяжелых металлов, можно подразделить на внутренние – повышение проницаемости клеточных мембран и индуцируемый этим процессом выход электролитов [7], пони-

жение пула тургорогенов и пластичности клеточных оболочек [8–9], и внешние – высокая концентрация раствора в среде произрастания, затрудняющая поглощение растением воды вследствие осмотического эффекта [10]. Анализируя данные эксперимента можно предположить, что, во-первых, изменение тургесцентности корешков вызвано прежде всего вышеперечисленными внутренними факторами; во-вторых, тестируемые концентрации экстракта модифицируют влияние ионов свинца в результате частичного подавления их негативных эффектов.

Митотический индекс. Для установления модифицирующего влияния экстракта на возможные патологические изменения при действии ионов свинца на делящиеся клетки был проведен цитологический анализ корневых меристем лука, обработанных тестируемыми растворами. Результаты исследований представлены на рис. 2–4.

Анализ данных микроскопического исследования выявил, что при тестируемых концентрациях экстракта, независимо от количественного содержания в растворе нитрата свинца, встречаются видимые изменения в размерах и морфологии меристематических клеток лука. При этом отмечено варьирование изученных цитологических параметров по корешкам. При воздействии на корешки экстракта во всех вариантах определяли единичные клетки большого размера и до 1% интерфазных фрагментированных

клеток. Последние были представлены в виде клеток, не содержащих генетический материал, т.е. это какая-то часть цитоплазмы в межклеточном пространстве, либо это отдельные компоненты цитоплазмы с обособленной частью материала ДНК. По нашему мнению, химические соединения фрагментов клеток могут включаться в различные метаболические пути и тем самым выполнять позитивную роль, но фрагменты могут и чисто механически мешать дальнейшему делению близлежащих клеток.

Ростовые процессы у растений состоят из большого количества клеточных метаболизмов: это деление клеток корневой меристемы, растяжение клеток и прочее. Митозмодифицирующая активность (т.е. способность изменять частоту и прохождение митоза) включает как стимуляцию, так и угнетение пролиферации клеток, а также изменение времени прохождения клетками отдельных фаз митоза. Для многоклеточных организмов любое нарушение митотической активности клеток является потенциально опасным, поскольку может приводить к серьезным отклонениям от нормального роста и развития. Мы изучали способность экстракта модифицировать пролиферирующую активность клеток корневой меристемы лука при действии ионов свинца, используя показатели «митотический индекс» и «метафазно-профазный индекс». Результаты исследований суммированы на рис. 2–3.

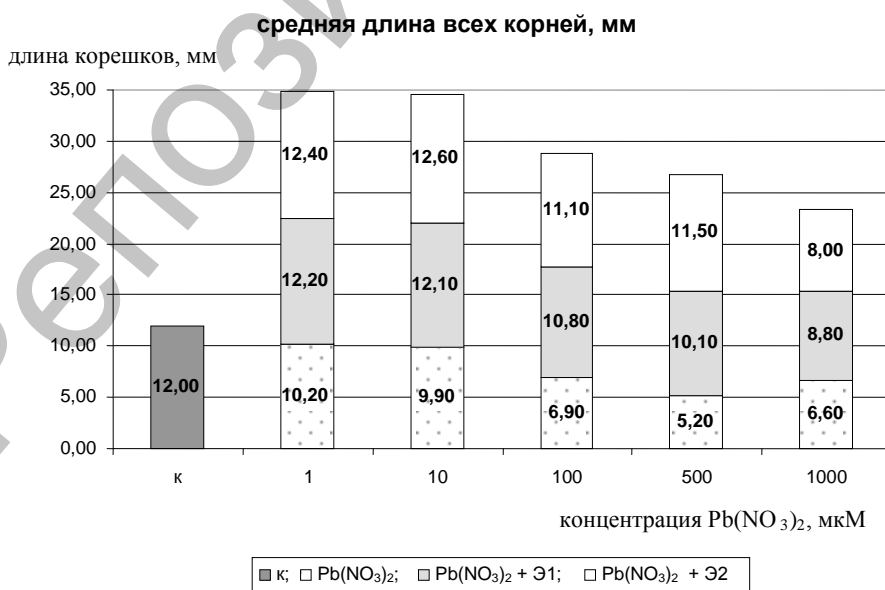


Рис. 1. Зависимость средней длины корней *A. cepa* L. от концентрации ионов свинца и экстракта.

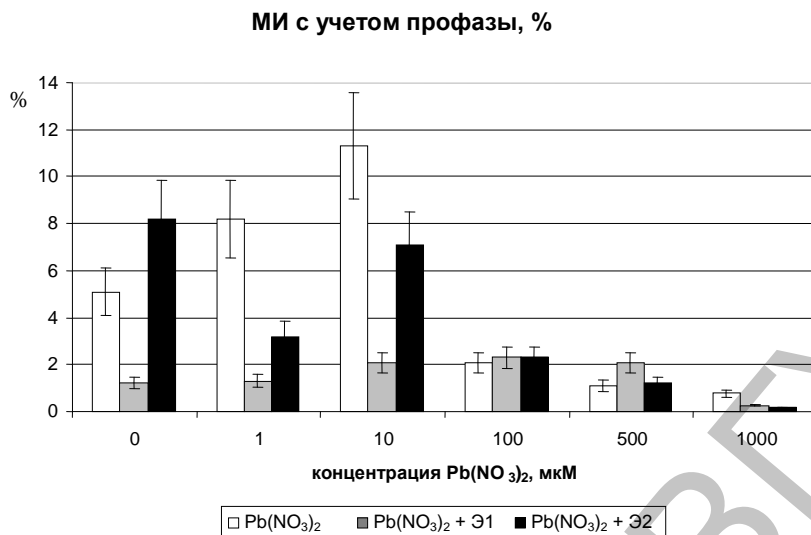


Рис. 2. Митотический индекс с учетом профазы в меристеме *A. сера L.* в зависимости от концентрации ионов свинца и экстракта.

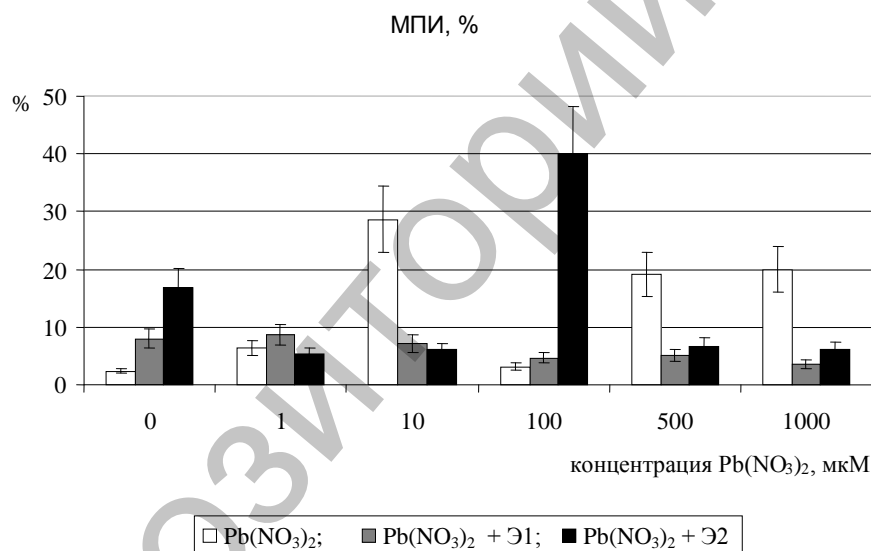


Рис. 3. Метафазно-профазный индекс в меристеме *A. сера L.* в зависимости от концентрации ионов свинца и экстракта.

Из представленных данных видно, что нитрат свинца в инициальной концентрации (1 мкМ) и при 10 мкМ повышает в 1,5–2,3 раза митотическую активность клеток корневой меристемы (рис. 2). Начиная с эффективных (100 мкМ), сублетальных и летальных (500–1000 мкМ) концентраций ионов свинца наблюдается снижение значений митотического индекса до 2,1–0,78% (в 2,5–6,0 раза).

Добавление экстракта в солевой раствор свинца при концентрации 1–10 мкМ приводит к существенному снижению в 1,5–5 раз значения МИ по сравнению с соответствующими вариантами, когда использовали только соли металла. Не было

отмечено значительного влияния экстракта на изменение величины МИ при использовании высоких концентраций свинца (100–1000 мкМ).

Коэффициент корреляции между МИ с учетом профаз и МИ без учета профаз имеет высокое положительное значение, равное 0,99. В то же время корреляционное отношение между МИ и МПИ находится в слабой связи и составляет $R=0,23$. Из рис. 3 заметно преобладание метафаз над профазами, соответственно, МПИ в вариантах опыта с использованием в растворе только ионов свинца составил 3,1–28,7 против 2,4 в контроле. Добавление экстракта в солевой раствор металла в концентрациях 10 мкМ

и 500–1000 мкМ существенно ($P < 0,01$) понижало значение величины МПИ.

Длительность фаз. Расчет различных типов митотического индекса и определение долей делящихся клеток необходимы для регистрации времени прохождения клетками различных стадий митоза, выявления возможной задержки клеток на какой-либо стадии вследствие повреждения цитогенетических структур клетки под действием внешних или внутренних факторов любой природы.

В зависимости от того, на какие процессы влияют тестируемые соединения, происходит остановка клеточного деления на определенной стадии митоза. Изучение распределения клеток по стадиям митоза показало, что наибольшее их число как в контрольных, так и в опытных вариантах приходится на метафазу (41,5–99,7%), доля клеток на стадиях ана- и телофазы суммарно составила 0,6–42,5%, на стадии профазы – 0,4–34,2% (рис. 4). Из приведенных данных видно значительное варьирование длительности фаз митоза между изученными вариантами.

Было отмечено, во-первых, модифицирующее влияние экстракта при совместном его действии с ионами свинца на длительность фаз митоза, во-вторых, различные концентрации экстракта по-разному влияют на клеточный цикл в зависимости от концентрации ионов свинца. Уже в контрольных вариантах тестируемая концентрация экстракта в варианте к' вызывала митотический блок на стадии анафазы, а в варианте к'' – на стадии профазы.

При низких концентрациях ионов свинца (1–10 мкМ) длительность профазы уменьшается, а ана- и телофазы увеличивается. При эффективной концентрации ионов свинца (100 мкМ) воз-

растает продолжительность профазы и метафазы, с существенным уменьшением до 2,1% длительности ана- и телофазы. При концентрации 500–1000 мкМ происходит блокировка на стадии метафазы при практическом отсутствии других стадий митоза, когда суммарно их длительность не превышает 1,5–4,0%.

Результаты сравнительного анализа процентных соотношений фаз митоза между вариантами совместного действия нитрата свинца в концентрации 10–500 мкМ и экстракта в концентрации 10 мл/100 мл раствора и соответствующими вариантами с действием солей металла свидетельствуют о том, что экстракт в силу своего модифицирующего эффекта в большей или меньшей степени способствует в стрессовых условиях восстановлению регуляторных клеточных процессов, и поэтому клеточное деление включает все четыре выраженные стадии митоза. В то же время экстракт в концентрации 0,1 мл/100 мл раствора при применении эффективных и сублетальных концентраций нитрата свинца проявляет слабую способность к модификации метаболических и регуляторных процессов. В этих вариантах длительность ана- и телофазы сохраняется на минимальном уровне (1–3,0%). При совместном применении экстракта и летальной концентрации ионов свинца блокировка на стадии метафазы сохраняется, определены стадии ана- и телофазы, но при почти полном отсутствии профазы (0,4%). Представленные данные указывают, что существенно нарушается ход событий в профазе и, несомненно, нарушается формирование митотического аппарата. А это, в свою очередь, и вызывает задержку деления на стадии метафазы.

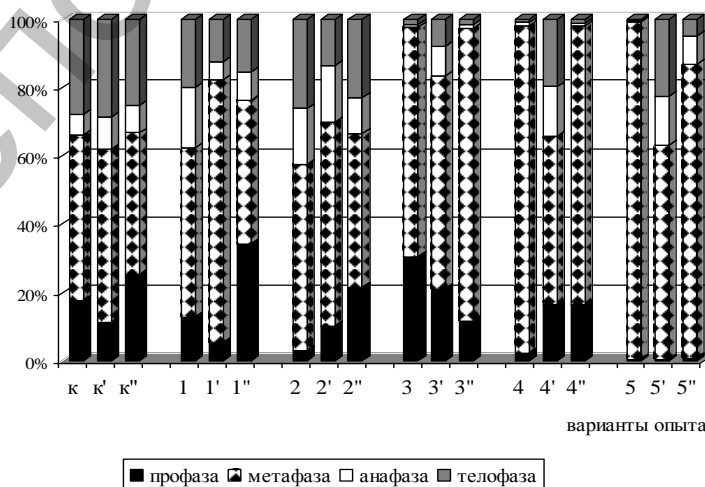


Рис. 4. Относительная продолжительность фаз митоза в корневой меристеме *A. cerea* L. в зависимости от концентрации ионов свинца и экстракта.

Выявление способности веществ останавливать клеточное деление на различных стадиях митоза, по мнению И.А. Алова [4], позволяет высказать мнение о механизме действия этих соединений. Так, блокировка на стадии профазы говорит о вмешательстве в метаболизм нуклеиновых кислот либо наблюдается при нарушениях репликации ДНК, блок на стадии метафазы характерен для всех патологий, связанных с повреждением митотического аппарата, в результате становится проблематичным расхождение хромосом к полюсам. Блок на стадии анафазы и телофазы свидетельствует о величине повреждения хромосомного аппарата, выражающейся в возрастании количества мостов [4].

При анализе результатов исследования установлено следующее: с возрастанием концентрации ионов свинца доля клеток на стадии метафазы возрастает по сравнению с контролем, что дает основание рассматривать изменение времени прохождения клетками данной стадии митоза как включение механизма адаптации к стрессовым факторам и поддержания гомеостаза клеточной популяции [11]. Можно также полагать, что нитрат свинца в концентрации 100–1000 мкМ действует на клетки подобно колхицину, который, как известно, нарушает образование микротрубочек, необходимых для шпинделя волокон отдельных хромосом в анафазе, тем самым способствуя накоплению клеток с метафазами и остановке клеточного цикла на этой стадии. В упомянутых вариантах добавление экстракта в солевой раствор свинца стимулирует включение адаптивных механизмов на разных стадиях метаболизма. И, по-видимому, как количественно, так и качественно при низкой концентрации экстракта, равной 0,1 мл/100 мл раствора, изменения в метаболических реакциях меристематических клеток протекают медленнее, и в итоге практически полностью происходит потеря одной–двух стадий митоза, в то время как при более высокой концентрации экстракта сохраняется в большем или меньшем объеме полноценность прохождения митоза.

Известно, что способность соединений вмешиваться в клеточный метаболизм коррелирует с их мутагенностью [4], поэтому следующим этапом работы был анализ возможной мутагенности экстракта при цитотоксической активности ионов свинца для *A. сера*.

Патология митоза. Поскольку многие соединения, стимулирующие или ингибирующие

митотическую активность, часто индуцируют мутации в анализируемых тест-системах, мы исследовали способность экстракта при совместном воздействии с различными концентрациями ионов свинца подавлять патологии митоза в клетках корневой меристемы лука. По данным В.Н. Калаева [12], подсчет патологий митоза с учетом профаз является экспресс-методом оценки состояния митотического аппарата, т.к. позволяет диагностировать изменение в его функционировании (возрастание патологий митоза и/или изменение времени прохождения клеткой стадий митоза). Для более точного определения причины нарушения митотического аппарата необходимо проводить подсчет патологий митоза без учета профазных клеток и распределение клеток по стадиям цикла.

Результаты анализа показали существенное возрастание значений патологии митоза при действии нитрата свинца в концентрациях 100–1000 мкМ с 4,0% в контроле до 7,0–100% в опыте (табл. 2). Выявлено, что экстракт во всех вариантах опыта при концентрации ионов свинца 1–500 мкМ подавляет протекание патологических процессов в клетке, что приводит к снижению показателя ПМ. Значение ПМ в этих вариантах колеблется от $0,3 \pm 0,1$ до $4,9 \pm 1,0\%$, что находится в пределах нормального значения уровня спонтанного мутирования: 2–5%. Превышение этого уровня до 100% ($P < 0,01$) отмечали в вариантах применения летальной концентрации нитрата свинца. Причем, определение корреляционных отношений между ПМ с учетом профазы и ПМ без учета профазы выявило высокое положительное значение, равное 0,98.

Полученные данные (рис. 2, 4, табл. 2) свидетельствуют о большей чувствительности показателей митозомодифицирующей активности к совместному действию экстракта и различных концентраций нитрата свинца по сравнению с изменением величин ПМ.

Уровень и спектр патологий митоза, частота встречаемости клеток с микроядрами. Спектр ПМ включал такие типы патологий, как асимметричное расположение веретена деления, забегание и отставание хромосом в анафазе митоза, обособление единичных хромосом и группы хромосом в метафазе, мосты в анафазе и телофазе, фрагментация, слипание хромосом, то есть наиболее общие типы митотических нарушений. Все они суммированы в общий количественный показатель – индекс патологии митоза (табл. 2).

Уровень и спектр патологий митоза в корневой меристеме *A. сера* под действием экстракта и нитрата свинца

Варианты опыта	ПМ, %	Патологии митоза, % от делящихся клеток					Микроядра, % от просмотренных клеток
		асимметричное расположение веретена деления	отставание и забегание хромосом в анафазе, обособление хромосом	мостики	фрагментация хромосом	слипание хромосом	
к	4,0±0,9	39,3±4,0	52,0±5,1	5,9 ±0,4	2,8 ±0,7	0	0,02±0,008
к'	2,5±0,9	35,0±4,2	65,0±7,1 ¹	0	0	0	
к''	3,7±0,6	40,0±4,2	57,4±5,0	2,6±0,4 ¹	2,0± 0,4	0	0,01±0,001 ^{1,2}
1	2,9±0,5	2,6±0,2 ¹	89,5±9,0 ¹	5,3±0,8	2,6±0,4	0	0,02±0,007
1'	0,6±0,1 ^{1,2}	100 ^{1,2}	0	0	0	0	0
1''	0,6±0,2 ^{1,2}	11,1±1,2 ^{1,2}	33,3±3,1 ^{1,2}	0	55,6±5,4 ^{1,2}	0	0,002±0,001 ^{1,2}
2	2,7±0,7	18,4±2,3 ¹	79,6±8,1 ¹	2,0±0,3 ¹	0	0	0
2'	1,8±0,6 ¹	10,5±1,1 ^{1,2}	78,9±7,9 ¹	5,2±0,4 ²	5,2±0,7 ^{1,2}	0	0
2''	2,4±0,7	10,3±1,4 ^{1,2}	87,2±9,0 ¹	0	2,6±0,3 ²	0	0,02±0,009 ²
3	7,0±1,0 ¹	0	100 ¹	0	0	0	0,12±0,01 ¹
3'	1,5±0,8 ^{1,2}	12,5±2,0 ^{1,2}	88,5±9,1 ¹	0	0	0	0,02±0,008 ²
3''	0,3±0,1 ^{1,2}	33,3±4,1 ²	66,7±5,9 ^{1,2}	0	0	0	0,08±0,007 ^{1,2}
4	95,0±5,0 ¹	0	0	0	95,0±5,0 ¹	95±5,0 ¹	0,10±0,09 ¹
4'	3,1±0,9 ²	25,0±2,5 ^{1,2}	75,0±6,8 ^{1,2}	0	0	60±6,3 ^{1,2}	0,01±0,007 ^{1,2}
4''	4,9±1,0 ²	0	80,0±8,9 ^{1,2}	0	20,0±2,4 ^{1,2}	70±7,9 ^{1,2}	0,01±0,001 ^{1,2}
5	100	0	0	0	0	100 ¹	0,2±0,02 ¹
5'	100	0	0	0	0	100 ¹	0
5''	100	0	0	0	0	100 ¹	0

Примечание: ¹различия достоверны по отношению к контролю (P < 0,05); ²различия достоверны по отношению к соответствующему варианту тестируемой концентрации ионов свинца (P < 0,05).

Выявлено, что в результате совместного действия экстракта при большинстве тестируемых концентраций ионов свинца уменьшается уровень различных типов патологий митоза по сравнению с контрольным вариантом в меристематических клетках корешков лука. Тот факт, что исходный опытный материал в контроле характеризуется определенным спектром патологий митоза и показывает достаточно высокий уровень по каждому регистрируемому типу, свидетельствует об особенностях партии луковиц, которую использовали в опыте.

Отставание и забегание хромосом в метакинезе и при расхождении к полюсам возникает при повреждении хромосом в области кинетохора. Поврежденные хромосомы пассивно «дрейфуют» в цитоплазме в единственном числе либо образуя группу хромосом, и в итоге ли-

бо разрушаются и элиминируются из клетки, либо случайным образом попадают в одно из дочерних ядер, либо образуют отдельное микроядро. В эксперименте доля клеток с таким признаком наиболее высокая. Значения данного признака увеличиваются в 1,5–2,0 раза с возрастанием концентрации ионов свинца от 1 до 100 мкМ (табл. 2). В пределах упомянутых концентраций нитрата свинца действие экстракта подавляет либо сохраняет на прежнем уровне образование данного типа патологий.

В этих же вариантах опыта довольно часто встречается асимметричное расположение митотического веретена. Следует отметить, что обычно меристематические клетки делятся продольно, и лишь немногие из них делятся поперечно. В контрольных вариантах значения данного признака наиболее высокие и достигают

35,0±4,2–40,0±4,2%. Исключение составляет вариант опыта 1', когда в делящихся клетках встречается только данный тип патологии митоза. Асимметричное расположение веретена деления было определено только в присутствии в растворе нитрата свинца в концентрациях 1 и 10 мкМ. В то же время использование экстракта совместно с нитратом свинца в концентрациях 100 и 500 мкМ индуцировало в стрессовых условиях появление данного типа патологии митоза в клетках. Следует подчеркнуть, что деление клетки нуждается не только в событиях, которые происходят в точной временной последовательности, но и в точном их расположении в месте деления. Чтобы гарантировать, что дочерние клетки получают одинаковые наборы ДНК, место деления должно разделять пополам митотическое веретено с определенной ориентацией. Асимметричное расположение веретена деления не влияет на распределение ядерного материала ДНК, однако может привести к неравномерному распределению цитоплазматических органелл и, соответственно, ДНК митохондрий и пластид.

Выявлено, что меристематические клетки корешков лука в контроле и в ряде вариантов с использованием ионов свинца в концентрации 1–10 мкМ содержат мосты, которые составляют 5,9±0,4–2,0±0,3% от всех патологий митоза. С повышением концентрации нитрата свинца уменьшается встречаемость мостов в клетках. Как известно, хромосомные и хроматидные мосты являются обычно следствием фрагментации хромосом, что частично прослеживается по нашим данным (табл. 2). Образование мостов приводит к генотипической разнородности дочерних клеток, а также нарушает течение завершающих стадий деления и задерживает цитокинез. Тестируемые концентрации экстракта, по-видимому, нивелируют негативные процессы, имеющие место при расхождении хромосом в анафазе.

Образование микроядер происходит вследствие фрагментации или отставания отдельных хромосом, вокруг которых в телофазе формируется ядерная оболочка, параллельно образованию оболочки вокруг основных дочерних ядер. Новообразованные микроядра либо сохраняются в клетке в течение всего дальнейшего клеточного цикла вплоть до очередного деления, либо подвергаются пикнозу, разрушаются и выводятся из клетки. В эксперименте обнаружено незначительное число микроядер как в контроле, так и в ряде вариантов опыта (от 0,002±0,001% до 0,12±0,01%), что, однако, яв-

ляется тревожным моментом, поскольку их присутствие служит индикатором начала патологических процессов и нестабильности генома [13]. Выявлено, что действие экстракта совместно с нитратом свинца в концентрациях 1 мкМ и 100–1000 мкМ существенно подавляет образование микроядер ($P < 0,01$) в меристематических клетках лука по отношению к соответствующим вариантам использования солевого раствора.

Среди митотических нарушений, наблюдаемых в клетках при сублетальной и летальной концентрации ионов свинца, следует выделить слипание хромосом (образование комков, набухание). Такое действие ионов металла на хромосомы называют диффузным, так как оно не локализовано, а распространяется на всю хромосому. Можно предположить, что диффузное действие нитрата свинца на хромосому объясняется какими-то нарушениями в белковой части нуклеопротеидов. Как правило, это действие обратимо: деление клеток продолжается, и образование комков хромосом при последующих делениях не возобновляется. Эта хромосомная aberrация указывает на высокую токсичность действующих веществ и представляет довольно часто нерепарируемый эффект, приводящий к клеточной смерти. Если при концентрации ионов свинца 500 мкМ применение экстракта способствовало подавлению процесса слипания хромосом, то при летальной концентрации металла данный тип патологии проявлялся на 100%.

Полученные данные о способности ионов свинца вызывать хромосомные повреждения в растительных клетках согласуются с результатами и других авторов [14]. Известно, что тяжелые металлы способны индуцировать следующие типы повреждений ДНК: односторонние разрывы, двойные разрывы ДНК, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, приводящие к изменению вторичной структуры ДНК. Любое первичное повреждение молекулы ДНК в результате серии ферментативных реакций может реализоваться в точечную мутацию или хромосомную aberrацию [15]. В то же время при воздействии экстракта стимулирование или ингибирование потенциальных повреждений различной природы регулируется с привлечением разных клеточных механизмов, о чем свидетельствует варьирование уровня и спектра патологий митоза. В результате проведенных исследований выявлен цитозащитный эффект экстракта и его активных компонентов против серьезных цитогенетических повреждений, вызванных свинцом.

Заключение. Таким образом, при исследовании совместного действия водного экстракта куколок дубового шелкопряда и различных концентраций (от инициальной до летальной) нитрата свинца в течение одного клеточного цикла на развитие луковиц *A. cerea* установлено проявление протекторных свойств экстракта и его активных компонентов против цитогенетических повреждений.

Полученные экспериментальные результаты во всех вариантах опыта свидетельствуют о большей чувствительности показателей митоз-модифицирующей активности в сравнении с изменением величин ПМ по отношению к совместному действию экстракта и различных концентраций нитрата свинца. Экстракт в исследуемых количествах при концентрациях нитрата свинца 1–500 мкМ подавляет митотическую активность меристематических клеток, снижает у них показатель патологии митоза, существенно подавляет образование микроядер по сравнению с соответствующими вариантами использования одной соли. При действии летальной концентрации нитрата свинца на корешки лука установлено влияние экстракта на цитологические и цитогенетические характеристики клетки: изменение размеров и форм клеток, существенное подавление митотической активности клеток, изменение длительности фаз митоза, сужение спектра представленных типов патологий.

Установлено модифицирующее влияние экстракта на процесс клеточного деления в условиях стресса, вызванного свинцом при концентрациях 100–500 мкМ. Позитивный репаративный эффект экстракта проявляется сильнее при концентрации 10 мл/100 мл раствора по сравнению с концентрацией 0,1 мл/100 мл раствора, о чем свидетельствует регистрирование в первом случае среди делящихся клеток всех четырех фаз митоза, и они более выражены по своей продолжительности.

Таким образом, в настоящем исследовании определены протекторные свойства экстракта

по отношению к цитогенетическим повреждениям различной природы в условиях токсического действия свинца. При более высокой концентрации экстракта его цитозащитные функции проявляются сильнее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nwosu, J.U. Cadmium and lead uptake by edible crops grown in a silt loam soil / J.U. Nwosu [et al.] // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1995. – Vol. 54. – P. 570–578.
2. Барсукова, В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. Аналитический обзор / В.С. Барсукова. – Новосибирск: Изд-во ГПНТБ СО РАН, 1997. – 63 с.
3. Калаев, В.Н. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма / В.Н. Калаев, С.С. Карпова. – Воронеж: ВГУ, 2004. – 80 с.
4. Алов, И.А. Цитофизиология и патология митоза / И.А. Алов. – М.: Медицина, 1972. – 264 с.
5. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
6. Obroucheva, N.V. Root growth responses to lead in young maize seedlings / N.V. Obroucheva [et al.] // *Plant and Soil*. – 1997. – Vol. 200. – P. 55–61.
7. Серегин, И.В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И.В. Серегин, В.Б. Иванов // *Физиология растений*. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606–630.
8. Серегин, И.В. Функционально-анатомическое изучение токсического действия кадмия и свинца на корень проростков кукурузы: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.00.05 / И.В. Серегин. – М., 1999. – 18 с.
9. Obata, H. Effects of cadmium on mineral nutrient concentration in plant differing in tolerance for cadmium / H. Obata, M. Umehayashi // *J. Plant Nutr.* – 1997. – Vol. 20, № 1. – P. 97–105.
10. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / под ред. Н.Н. Третьякова. – М.: Колос, 2000. – 640 с.
11. Artyukhov, V.G. Cytogenetic indices of English oak (*Quercus robur* L.) seminal progeny subject to radioactive radiation in the Chernobyl nuclear disaster and growing on territories with different levels of anthropogenic contamination / V.G. Artyukhov, V.N. Kalaev // *20 Years after Chernobyl Accident: past, present and future* / Editors E.V. Burlakova, V.I. Naidich. – N. Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2006. – P. 247–264.
12. Калаев, В.Н. Цитогенетические реакции листовых древесных растений на стрессовые условия и перспективы их использования для оценки генотоксичности окружающей среды: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.16; 03.00.15 / В.Н. Калаев; ГОУ ВПО. – Воронеж, 2009. – 47 с.
13. Захаров, В.М. Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов / В.М. Захаров, Д.М. Кларк. – М.: Моск. отд-ние Междунар. фонда «Биотест», 1995. – 68 с.
14. Wierzbicka, M. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead / M. Wierzbicka // *Environ. Exp. Bot.* – 1989. – Vol. 29, № 2. – P. 123–133.
15. Сьяксте, Т.Г. Химические соединения, повреждающие ДНК / Т.Г. Сьяксте, Н.И. Сьяксте. – Рига: Зинатие, 1991. – 152 с.

Поступила в редакцию 04.05.2012. Принята в печать 14.06.2012

Адрес для корреспонденции: г. Витебск, Московский пр-т, д. 33, тел. (8-029)518-29-17 – Толкачева Т.А.