

Изучение протекторных свойств водного экстракта куколок дубового шелкопряда при цитотоксической активности ионов меди 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»

В работе было изучено влияние водного экстракта куколок дубового шелкопряда на цитогенетические параметры в клетках корневых меристем *Allium cepa* L. в условиях токсического действия ионов меди. Экстракт защищал растения от цитогенетических повреждений, вызванных ионами меди в широком диапазоне концентраций (1–500 мкМ).

Установлено модифицирующее влияние экстракта на процесс клеточного деления в условиях стресса, вызванного ионами меди. Оптимальный протекторный эффект был выявлен при добавлении экстракта в растворы сульфата меди в диапазоне концентраций 100–500 мкМ в соотношении 10 мл/100 мл. При таком соотношении экстракта и раствора сульфата меди определено меньшее число митотических клеток со слипанием хромосом и меньшее число пикнотических клеток в интерфазе.

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

Study of protective properties of the aqueous extract of oak silkworm pupae with cytotoxic activity of copper ions in the *Allium*-test

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

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

**Educational establishment «Gomel State University named after Francisk Skorina»

The goal was to study the effect of aqueous extract of oak silkworm pupae on cytogenetic parameters in the cells of root meristems of *Allium cepa* L. in the conditions of the toxic effect of copper ions. The extract protected the plants from the cytogenetic damage induced by copper ions in a wide range of concentrations (1–500 mM). The modifying effect of the extract on the process of cell division under stress, caused by copper ions, is established. The optimum protective effect was found out when adding to the extract solutions of copper sulphate in the concentration range of 100–500 microM in the ratio 10 ml/100 ml. With such a ratio of the extract and the solution of copper sulfate a smaller number of mitotic cells with the adhesion of chromosomes and a smaller number of pyknotic cells in interphase were found out.

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

Медь — микроэлемент, необходимый для жизнедеятельности организмов, относится к группе тяжелых металлов (ТМ). В растениях медь является каталитическим кофактором в таких биологических процессах, как дыхание, фотосинтез, транспорт железа, фиксация азота, защита от окислительного стресса, рост и развитие [1]. Однако, благодаря своей химической активности, ионы меди могут оказывать отрицательный эффект, когда клетка не справляется с их детоксикацией. Если в нормальных условиях свободная медь не обнаруживается в клетке, то при избытке ионов Cu^{+2} свободные катионы вызывают серьезные нарушения в метаболизме растения. Одной из основных причин подобных нарушений является образование медью радикалов гидроксила, которые взаимодействуют с тиоловыми группами

белков, разрушая их вторичную структуру, а также вызывают деградацию липидов и нуклеиновых кислот. Как результат вышеперечисленного, ингибируются многочисленные метаболические процессы, повреждается структура клеток и тканей, наступает задержка роста и старение [1–3]. Растения весьма чувствительны к негативному влиянию меди, и ее вредное фито- и цитотоксическое действие проявляется уже при концентрации, лишь слегка превышающей оптимальную [4–5].

На сегодняшний день накоплен большой объем информации о фитотоксическом действии ТМ [6–7]. Устойчивый интерес к изучению механизмов токсического и мутагенного воздействия соединений металлов на растения с использованием корневой апикальной меристемы в качестве модельной системы объясняется тем, что именно кончики корней первыми непо-

средственно контактируют с различными химическими веществами в почве и воде [8–9]. Классическим методом для исследования токсического воздействия загрязнителей окружающей среды на живые объекты является тест на корневых клетках лука (*Allium*-тест), который позволяет осуществить относительно быстрый скрининг химических соединений с указанием их потенциального биологического риска [8]. Важным преимуществом этого метода цитогенетического мониторинга является хорошая корреляция его результатов с результатами, полученными на других тест-системах [10].

В связи с широким распространением в биосфере ТМ в результате естественных природных процессов и антропогенной деятельности актуален поиск средств, в том числе соединений различной природы, уменьшающих негативное действие ТМ как на рост культурных растений, так и их накопление в растениеводческой продукции. В последние годы возросло количество публикаций, в которых обсуждается возможность модификации действия ТМ на культурные растения при применении регуляторов роста.

Среди источников биологически 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 [11]. Исследован состав гемолимфы и водного экстракта куколок шелкопряда, содержащий комплекс аминокислот, углеводов, микроэлементов и антиоксидантов, который оптимален для функционирования эукариотических клеток.

Целью работы было изучение влияния водного экстракта куколок дубового шелкопряда на цитогенетические параметры в клетках корневых меристем *Allium cepa* L. в условиях токсического действия ионов меди.

Материал и методы. Исследование ответных реакций растений лука репчатого в условиях действия токсических концентраций ионов меди при одновременном применении водного экстракта куколок дубового шелкопряда (далее по тексту – ВЭКШ) выполняли с помощью модифицированного *Allium*-теста [10].

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 удаляли внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, а затем помещали в пробирки (объемом 20 мл), наполненные дистиллированной водой. Проращивание луковиц проводили при комнатной температуре и естественном освещении. Через 48 часов отбирали на каждый вариант эксперимента по 10 луковиц с наиболее развитыми корнями, и помещали их на 24 часа в тестируемые растворы (табл. 1). Водный экстракт куколок дубового шелкопряда получали в соответствии с авторским свидетельством СССР № 1787439А1 (В.А. Трокоз, Т.Д. Лотош, А.Б. Абрамова и др.). В работе тестировали водные растворы сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, М.м. = 249,7, квалификации ч.д.а.), взятые в различных концентрациях: от 1 мкМ до 500 мкМ. В подборе концентраций руководствовались литературными данными [4–5]. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

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 [12]. Затем проводили промывку корешков абсолютным спиртом и переносили их в 70% спирт. Хранили материал в холодильнике до приготовления препаратов. Давленные препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по общепринятой методике.

Таблица 1

Тестируемые концентрации ВЭКШ и сульфата меди: варианты опыта

Концентрация $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, мкМ – вариант опыта	10 мл ВЭКШ/100 мл раствора (Э1)	0,1 мл ВЭКШ/100 мл раствора (Э2)
0 – к	к'	к''
1 – 1	1'	1''
5 – 2	2'	2''
10 – 3	3'	3''
50 – 4	4'	4''
100 – 5	5'	5''
500 – 6	6'	6''

Анализировали по 10–30 проростков в каждом варианте эксперимента. В гистологических препаратах учитывали все клетки на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Влияние тестируемых растворов 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 [13]. Для определения возможной задержки митоза на стадии метафазы использовали метафазно-профазный индекс (МПИ) [13]. Возможность ингибирующего либо стимулирующего эффектов ВЭКШ 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 [13] и классифицировали отдельно для каждого корешка по И.А. Алову с незначительной модификацией [14]. 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 клеток с микроядрами, отмечая их количество в клетке и размеры. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Leica Gallen III при увеличении $40\times 10\times 1,5$. По каждому варианту эксперимента было просмотрено более 20000 клеток.

Полученный цифровой материал после проверки на правильность распределения вариационных рядов обрабатывали статистически с помощью критерия *t* Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Митотический индекс. Для установления возможного антицитотоксического модифицирующего потенциала ВЭКШ при патологических изменениях в результате действия ионов меди на делящиеся клетки был проведен цитологический анализ корневых меристем лука, совместно экспонированных в течение одного клеточного цик-

ла тестируемыми растворами. Результаты исследований представлены на рис. 1–3 и табл. 2.

Анализ данных микроскопического исследования выявил, что при тестируемых концентрациях ВЭКШ, независимо от количественного содержания в растворе сульфата меди, во всех соответствующих опытных вариантах встречаются видимые изменения в размерах и морфологии меристематических клеток лука. С возрастанием концентрации ионов меди отмечали усиление различий по изученным цитологическим параметрам между отдельными корнями. При воздействии на корни ВЭКШ определяли в каждом варианте на многих препаратах нетипичную картину для нормальных клеток меристем: единичные клетки большого размера, от 10 до 50% клеток имели форму пирамид, до 1% интерфазных клеток содержали лопастевидные либо фрагментированные ядра. 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.

Согласно данным литературы [1–3], ионы меди при избытке вызывают деградацию липидов. По этой причине во всех вариантах опыта, в которых тестировали сульфат меди в концентрации 100–500 мкМ, наблюдали интерфазные ядра с неровными контурами поверхности липопротеидной ядерной оболочки.

Основной функцией меристем, составляющих конус нарастания корня, является образование новых клеток путем деления. Как известно, 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 ВЭКШ модифицировать пролиферирующую активность клеток корневой меристемы лука при действии ионов меди, используя показатели «митотический индекс» и «метафазно-профазный индекс». Результаты исследований суммированы на рис. 1–2.

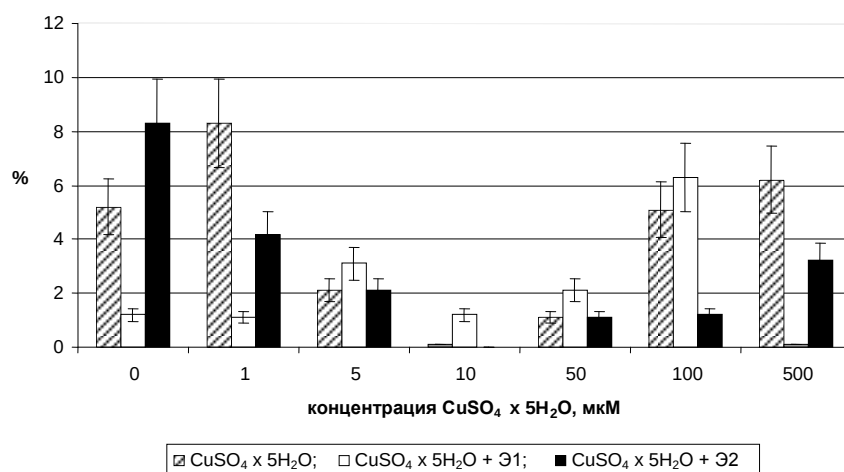


Рис. 1. Митотический индекс с учетом профазы в меристеме *A. cepa* L. в зависимости от концентрации ионов меди и ВЭКШ.

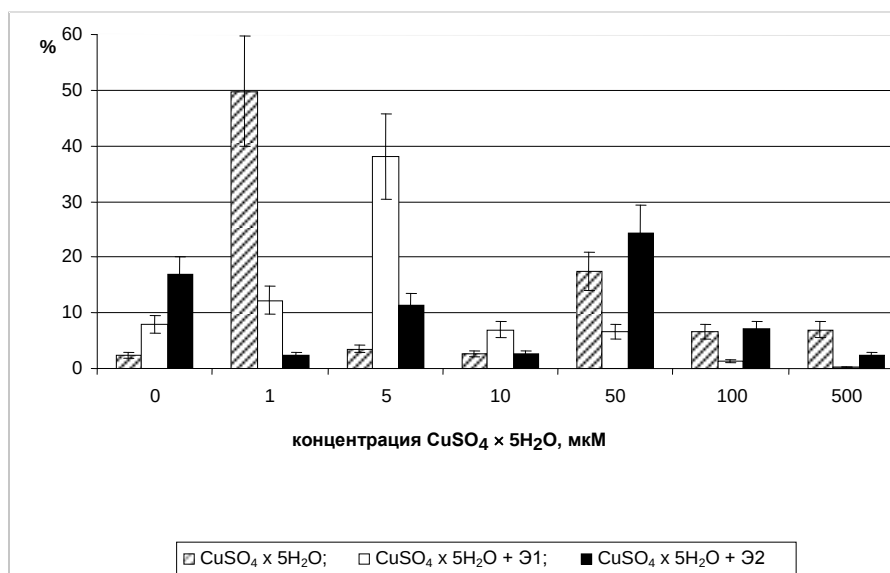


Рис. 2. Метафазно-профазный индекс в меристеме *A. cepa* L. в зависимости от концентрации ионов меди и ВЭКШ.

Согласно ранее выполненным исследованиям [3–5], по обнаруженным изменениям МИ, как и по макроскопическим параметрам, сульфат меди занимает первое место по токсичности в ряду исследуемых веществ, таких, как хлорид кадмия, ацетат свинца, сульфат никеля, нитрат алюминия, сульфат цинка. Из представленных в настоящей работе данных видно, что сульфат меди в субэффективной концентрации (1 мкМ) увеличивает значение МИ в 1,6 раза по отношению к контролю. При использовании более высоких концентраций 5–50 мкМ ионов металла отмечалось существенное замедление

скорости деления клеток до 0,2–2,1% (рис. 1). Тем не менее, в большей массе в этих вариантах наблюдали обычные клетки меристем, без отсутствия признаков пикноза. В то же время А.И. Довгалоук с соавторами [4] на проростках лука при концентрации ионов меди 5 и 10 мкМ регистрировали мертвые клетки при полном отсутствии митотических клеток на препаратах. Такое несоответствие результатов можно объяснить прежде всего применением разных модельных систем: в нашем эксперименте использовали кончики дополнительных корней проросших лукович, в работе [4] – корневую мери-

стему трех–четырёхдневных проростков *A. сера*. После обработки корней сверхлетальными концентрациями (100–500 мкМ) сульфата меди мы отмечали наличие делящихся клеток на препаратах, когда значение МИ находилось на уровне контроля (5,2–6,1%). Эти данные согласуются с результатами работы [4]. По утверждению А.И. Довгалюк с соавторами [4], в таких дозах сульфат меди действует как фиксатор, быстро убивая клетки, но не повреждая ядерный материал.

Добавление ВЭКШ в концентрации 10 мл экстракта/100 мл раствора в солевой раствор меди при концентрации 1–100 мкМ не влияет на изменение величины МИ либо повышает значение показателя по сравнению с вариантом использования одного ВЭКШ. При применении меньшей концентрации ВЭКШ количество делящихся клеток уменьшается до нуля с увеличением концентрации сульфата меди, а начиная со сверхлетальных концентраций отмечается снова наличие клеток в митозе. Коэффициент корреляции между МИ с учетом профаз и МИ без учета профаз имеет высокое положительное значение, равное 0,97 ($r^2 = 0,94$). В то время как корреляционное отношение между МИ и МПИ находится в более слабой связи и составляет $r = 0,48$ ($r^2 = 0,23$).

Из рис. 2 заметно преобладание метафаз над профазами, соответственно, МПИ в вариантах опыта с использованием в растворе только ионов меди составил 2,6–49,8 против 2,4 в контроле. Добавление ВЭКШ в солевой раствор металла почти при всех его тестируемых кон-

центрациях существенно ($P < 0,05$) изменяло значение МПИ по отношению к соответствующим вариантам использования чистого раствора сульфата меди.

Длительность фаз. В зависимости от того, на какие метаболические и регуляторные процессы совместно 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 (39,0–79,57%), доля клеток на стадиях ана- и телофазы суммарно составила 5,8–32,4%, на стадии профазы – 1,0–27,5% (рис. 3). В то же время при оптимальных физиологических условиях наиболее продолжительны стадии, связанные с процессами синтеза: профаза и телофаза. Стадии митоза, во время которых происходит движение хромосом, осуществляются быстро – это метафаза и анафаза. Перечисленным условиям в наибольшей мере соответствует распределение фаз митоза в контрольном варианте к.

Было отмечено модифицирующее влияние ВЭКШ при совместном его действии с ионами меди на длительность фаз митоза. При этом установлено, что различные концентрации ВЭКШ по-разному влияют на клеточный цикл в зависимости от концентрации ионов меди. Однако следует учесть, что уже в контрольных вариантах тестируемая концентрация ВЭКШ в варианте к' вызывала митотический блок на стадии анафазы, а в варианте к'' – на стадии профазы.

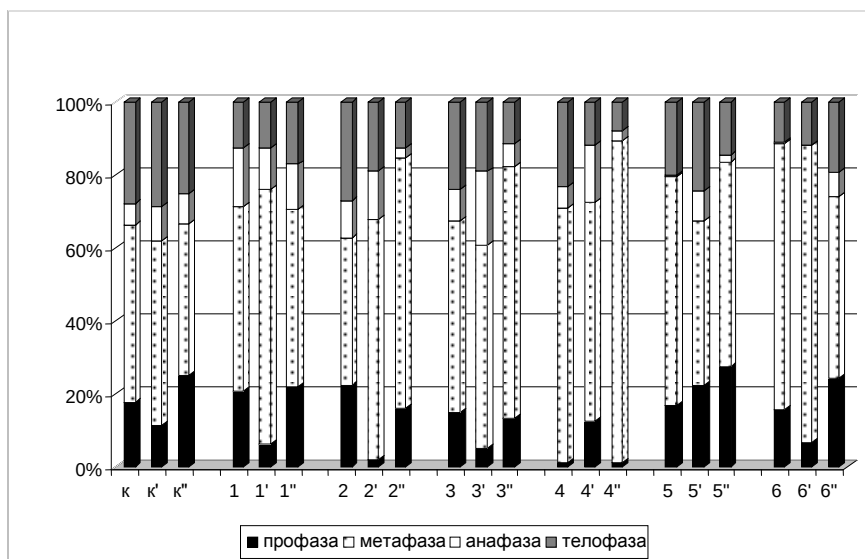


Рис. 3. Относительная продолжительность фаз митоза в корневой меристеме *A. сера* L. в зависимости от концентрации ионов меди и ВЭКШ.

При низких концентрациях ионов меди (1–5 мкМ) длительность профазы и ана- и телофазы возрастала по отношению к контролю. Известно, что ионы меди способны повреждать молекулы ДНК посредством одонитевых, двойных разрывов, сшивок ДНК-белок [15] и таким образом препятствовать нормальной конденсации хроматина, вследствие чего может наблюдаться накопление клеток в профазе. Также показано, что сульфат меди способен в незначительной степени повреждать митотический аппарат клетки [5], что может вызывать задержку митоза на стадии анафаз и телофаз. При сверхлетальных концентрациях сульфата меди происходит блокировка на стадии метафазы при практически полном отсутствии одной из стадий митоза.

Результаты сравнительного анализа процентных соотношений фаз митоза в контроле и при совместном действии сульфата меди и ВЭКШ в тестируемых концентрациях свидетельствуют о том, что ВЭКШ оказывает влияние на протекание всех митотических процессов, в большей или меньшей степени в зависимости от варианта опыта. Установлено следующее: с увеличением концентрации ионов меди доля клеток на стадии метафазы возрастает по сравнению с контролем либо находится на том же уровне, что дает основание рассматривать изменение времени прохождения клетками данной стадии митоза как включение механизма адаптации к стрессовым факторам и поддержания гомеостаза клеточной популяции.

Патология митоза. Поскольку многие соединения, стимулирующие или ингибирующие митотическую активность, часто индуцируют мутации в анализируемых тест-системах, мы исследовали способность ВЭКШ при совместном воздействии различных концентраций ионов меди подавлять патологии митоза в клетках корневой меристемы лука. Выявлено, что ВЭКШ в опытных вариантах при концентрациях ионов меди 1–50 мкМ имеет тенденцию как подавлять, так и усиливать патологические процессы в клетках, однако величина ПМ в этих вариантах колеблется от $0,2 \pm 0,1$ до $6,4 \pm 0,9\%$ (табл. 2), что находится в пределах нормального значения уровня спонтанного мутирования: 2–5%. Низкое значение величины ПМ в этих вариантах позволяет предположить у тестируемого объекта проявление высокой адаптивности в результате модифицирующего действия ВЭКШ. Превышение этого уровня до 80–90% ($P < 0,01$) отмечалось в вариантах применения сульфата меди в концентрациях

100–500 мкМ. Была установлена слабая положительная зависимость между изменениями величин ПМ и МИ, значение коэффициента корреляции составило $0,14$ ($r^2 = 0,02$).

Полученные данные (рис. 3, табл. 2) свидетельствуют о большей чувствительности показателей митозомодифицирующей активности к совместному действию ВЭКШ и различных концентраций сульфата меди 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). Отдельно учитывали изменения в ядрах интерфазных клеток: определяли наличие микроядер, фрагментацию ядер, пикноз ядерного материала от общего количества меристематических клеток.

Выявлено, что в результате действия ВЭКШ при большинстве тестируемых концентраций 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, образуя группу хромосом, и в итоге либо разрушаются и элиминируются из клетки, либо случайным образом попадают в одно из дочерних ядер, либо образуют отдельное микроядро. В большинстве опытных вариантов доля клеток с таким признаком в меристеме корешков, экспонированных в солевом растворе металла, одна из наиболее высоких: 50,0–100%. Эффект ВЭКШ, в зависимости от концентрации сульфата меди, усиливает либо подавляет образование данного типа патологий.

Уровень и спектр патологий митоза в корневой меристеме *Allium cepa* под действием ВЭКШ и медного купороса

Варианты опыта	ПМ, %	Патологии митоза, % от делящихся клеток					Микроядра, % от рассмотренных клеток
		асимметричное расположение веретена деления	отставание и забегание хромосом в анафазе, обособление хромосом	мосты	фрагментация хромосом	слипание хромосом	
к	4,1±0,6	39,3±4,0	52,0±5,1	5,9±0,4	2,8±0,7	0	0,02±0,008
к'	2,4±0,2 ¹	35,0±4,2	65,0±7,1 ¹	0	0	0	0
к''	3,7±0,4	40,0±4,2	57,4±5,0	2,6±0,4 ¹	2,0±0,4	0	0,01±0,001 ¹
1	1,1±0,1 ¹	40,0±4,0	60,0±7,2	0	0	0	0
1'	2,7±0,4	36,4±3,2	54,5±5,8	0	9,1±0,8 ^{1,2}	0	0,07±0,01 ^{1,2}
1''	5,7±0,7 ²	18,2±1,2 ^{1,2}	77,3±8,2 ^{1,2}	4,5±0,6	0	*5,6±0,8*	0,07±0,001 ^{1,2}
2	4,6±0,6	15,0±1,6 ¹	85,0±9,1 ¹	0	0	0	0,01±0,001 ¹
2'	0,2±0,1 ^{1,2}	0	100 ¹	0	0	0	0,03±0,01 ^{1,2}
2''	1,2±0,4 ^{1,2}	0	100 ¹	0	0	*6,0±0,9*	0,5±0,05 ^{1,2}
3	1,5±0,3 ¹	0	100 ¹	0	0	0	0,05±0,06 ¹
3'	0,3±0,1 ^{1,2}	100 ¹	0	0	0	0	0,20±0,03 ^{1,2}
3''	6,4±1,2	0	80,0±9,0 ^{1,2}	0	20,0±2,2 ^{1,2}	*50,9±8,4*	0,01±0,001 ^{1,2}
4	2,4±0,4 ¹	50,0±6,2	50,0±4,9	0	0	0	0,007±0,001 ¹
4'	2,7±0,3	16,7±1,8 ^{1,2}	66,7±7,2 ¹	8,3±0,9 ^{1,2}	8,3±1,2 ^{1,2}	0	0,37±0,031 ^{1,2}
4''	1,2±0,3 ¹	9,0±1,1 ^{1,2}	27,3±2,3 ^{1,2}	0	63,7±7,4 ^{1,2}	0	0,15±0,02 ^{1,2}
5	100 ¹	2,6±0,5 ¹	64,0±8,6	1,4±0,4 ¹	32,5±5,6 ¹	100*	0,09±0,02 ¹
5'	3,7±0,6 ²	27,4±3,1 ^{1,2}	72,6±9,6 ¹	0	0	0	0,005±0,001 ^{1,2}
5''	82,3±8,4 ¹	0	5,4±1,3 ^{1,2}	0	94,6±9,6 ²	80,0±0,6*	0,002±0,001 ^{1,2}
6	100 ¹	0	0	0	0	100*	0
6'	80,5±9,1 ¹	0	0	0	0	89,5±0,6*	0,03±0,001 ²
6''	90,5±9,9 ¹	33,4±5,7 ²	55,6±7,3 ²	8,9±1,6 ^{1,2}	2,2±0,6 ²	95,5±0,6*	0,005±0,001 ^{1,2}

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

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. Чтобы гарантировать получение дочерними клетками одинаковых наборов 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. В контрольных вариантах значения данного признака одни из наиболее высоких и достигают 35,0±4,2–40,0±4,2%. Применение только соли металла либо при совместном его действии с ВЭКШ подавляло появление этого типа патологии. Исключение составляет вариант 3', когда подобный тип патологии был

представлен во всех немногочисленных делящихся клетках.

Выявлено, что меристематические клетки корешков лука в контроле и в ряде вариантов с использованием ионов меди содержат одиночные мосты, которые составляют 1,4±0,4–8,3±0,9% от всех патологий митоза. Несколько больше в эксперименте представлена фрагментация хромосом. При использовании ионов меди в концентрации 1–100 мкМ установлено достоверное превышение данного типа патологий в опытных вариантах по сравнению с контролем.

Кроме митотических нарушений на препаратах были обнаружены многочисленные ядерные аномалии в интерфазных клетках, среди них – лопастевидные ядра, пикноз ядерного материала, микроядра.

Реститутивные клетки – клетки с лопастевидными ядрами – образуются вследствие выхода клеток из К-митоза посредством декон-

денсации хаотично разбросанных хромосом, минуя стадию расхождения хромосом и образования клеточной стенки. Такие клетки отмечали в единичных случаях при концентрациях ионов меди 10–50 мкМ и в 100% случаев при концентрации ионов металла 100–500 мкМ.

Пикноз ядерного материала регистрировали в 70 и 90% наблюдаемых клеток в вариантах с использованием раствора сульфата меди в концентрациях 100 и 500 мкМ, соответственно. Добавление ВЭКШ в солевой раствор подавляло образование пикнотических ядер до 10–20% при концентрации 10 мл/100 мл раствора и до 40–60% при концентрации ВЭКШ, равной 0,1 мл/100 мл раствора.

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 $0,002 \pm 0,001\%$ до $0,37 \pm 0,31\%$), что, однако, является тревожным моментом, поскольку их присутствие служит индикатором начала патологических процессов и нестабильности генома. Выявлено, что действие ВЭКШ совместно с сульфатом меди при всех тестируемых концентрациях металла существенно стимулирует образование микроядер ($P < 0,01$) (табл. 2). Данный результат объясняет наличие на препаратах фрагментированных интерфазных ядер, о которых мы говорили ранее, и указывает на один из реальных путей дальнейшего существования микроядер в клетке.

Среди митотических нарушений, наблюдаемых в клетках при концентрациях 5–100 мкМ ионов меди, 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 сульфата меди 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 абберрация указывает на высокую токсичность действующих

веществ и представляет довольно часто нерепарируемый эффект, приводящий к клеточной смерти [10]. Слипание хромосом в 100% случаев при действии сульфата меди наблюдалось только при концентрациях 100–500 мкМ. При меньших концентрациях металла отмечалось в делящихся клетках в единичных случаях слабое набухание хромосом. При меньшей концентрации металла в растворе данный тип патологии был зафиксирован в ряде вариантов с использованием ВЭКШ в концентрации 0,1 мл/100 мл раствора (табл. 2).

Полученные данные о способности ионов меди вызывать цитогенетические эффекты различной природы в растительных клетках во многом согласуются с результатами и других авторов [4–5, 8, 10]. В [4] показано, что сульфат меди относится к веществам очень токсичным, с узким диапазоном действующих концентраций – 1–10 мкМ. Тот факт, что при концентрации сульфата меди 5–50 мкМ мы наблюдали митотические клетки и только часть интерфазных клеток с существенными изменениями в морфологии клетки и ядра, но не 100% гибель клеток лука, как показано в [4–5], можно, по-видимому, объяснить тем, что мы работали с дополнительными корнями проросших лукович, а не с проростками семян, как в упомянутых работах. После экспонирования проросших лукович в солевом растворе при вышеуказанных концентрациях наблюдались визуально морфологически нормальные корни и корни, потерявшие тургор. Для фиксации мы брали оба типа корней. Однако часть из этих корней в результате стрессового действия ионов металла теряла самую верхушку, поэтому для приготовления препаратов использовались только корни с конусом нарастания. Такой характер морфологии корней на луковиче свидетельствует об их разной реакции в ответ на стрессовые условия.

Известно, что тяжелые металлы способны индуцировать следующие типы повреждений ДНК: одонитевые разрывы, двойные разрывы ДНК, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, приводящие к изменению вторичной структуры ДНК [15]. Любое первичное повреждение молекулы ДНК в результате серии ферментативных реакций может реализоваться в точечную мутацию или хромосомную абберацию [15]. В то же время при воздействии ВЭКШ стимулирование или ингибирование потенциальных повреждений различной природы регулируется с привлечением различных клеточных механизмов, о чем свидетельствует варьирование уровня и спектра патологий митоза. Итак, можно гово-

речь о проявлении цитозащитной роли ВЭКШ и его активных компонентов против серьезных цитогенетических повреждений, вызванных медью. Протекторные свойства проявляются сильнее при совместном экспонировании сульфата меди в концентрациях 1–50 мкМ и ВЭКШ в концентрации 10 мл/100 мл раствора, и существенно слабее при меньшей тестируемой в опыте концентрации ВЭКШ.

В [4] показано, что при сверхлетальных концентрациях 100–500 мкМ сульфат меди действует как фиксатор. Согласно нашим данным, в этих вариантах ВЭКШ ослабляет токсическое действие ионов меди, а цитозащитная его роль проявляется сильнее при более высокой тестируемой в опыте концентрации, чем при меньшей.

Заключение. При исследовании совместного действия ВЭКШ и различных концентраций (1–500 мкМ) сульфата меди на развитие луковиц *A. cepa* установлено проявление протекторных свойств ВЭКШ и его активных компонентов против цитогенетических повреждений, вызванных ионами меди.

Установлено модифицирующее влияние ВЭКШ на процесс клеточного деления в условиях стресса, вызванного медью при концентрациях 1–500 мкМ. Причем при концентрации сульфата меди 100–500 мкМ позитивный эффект ВЭКШ проявляется сильнее при концентрации 10 мл/100 мл раствора по сравнению с концентрацией 0,1 мл/100 мл раствора, о чем свидетельствует в первом случае меньшее число митотических клеток со слипанием хромосом и меньшее число пикнотических клеток в интерфазе.

Таким образом, определены протекторные свойства ВЭКШ на цитогенетические параметры в условиях токсического действия меди. При более высокой концентрации ВЭКШ его цитозащитные функции проявляются сильнее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fernandes, J.C. Biochemical, Physiological, and Structural Effects of Excess Copper in Plants / J.C. Fernandes, F.S. Henriques // Bot. Rev. – 1991. – Vol. 57. – P. 246–273.
2. Himelblau, E. Delivering Copper within Plant Cells / E. Himelblau, E.R.M. Amasino // Curr. Opin. Plant Biol. – 2000. – Vol. 3. – P. 205–210.
3. Maksymiec, W. Effect of Copper on Cellular Processes in Higher Plants / W. Maksymiec // Photosynthetica. – 1997. – Vol. 34. – P. 321–342.
4. Довгалюк, А.И. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью апикальной меристемы лука / А.И. Довгалюк [и др.] // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 1. – С. 3–7.
5. Довгалюк, А.И. Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L. / А.И. Довгалюк [и др.] // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 2. – С. 3–10.
6. 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.
7. Hall, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance / J.L. Hall // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53. – № 366. – P. 1–11.
8. Liu, D. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test / D. Liu [et al.] // Israel J. Plant Sci. – 1995. – Vol. 43. – P. 125–133.
9. Довгалюк, А.И. Токсична дія іонів металів на ріст та мітотичну активність клітин коренів цибулі *Allium cepa* L. / А.И. Довгалюк [и др.] // Доп. НАН України. – 1998. – № 6. – С. 173–178.
10. Fiskesjo, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring / G. Fiskesjo // Hereditas. – 1985. – Vol. 102. – P. 99–102.
11. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова»: сб. науч. ст. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2007. – С. 248–265.
12. Евсеева, Т.И. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *Allium cepa* L. низкими концентрациями Cd и ²³²Th / Т.И. Евсеева [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – № 5. – С. 73–80.
13. 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.
14. Алов, И.А. Цитофизиология и патология митоза / И.А. Алов. – М.: Медицина, 1972. – 264 с.
15. Сьякте, Т.Г. Химические соединения, повреждающие ДНК / Т.Г. Сьякте, Н.И. Сьякте. – Рига: Зинатне, 1991. – 152 с.

Поступила в редакцию 04.05.2012. Принята в печать 24.08.2012

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