

ID: 2018-01-4353-A-14974

Краткое сообщение

Шереметьева А.С., Жук А.А., Переверзева Я.О., Хомякова У.А.

Исследование влияния диоксида на митотическую активность корней *Allium cepa*

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра общей биологии, фармакогнозии и ботаники

Научный руководитель: д.б.н. Дурнова Н.А.

Резюме

Проведена оценка цитогенетического действия диоксида на клетки меристемы корешков лука с помощью *Allium test*. Учитывалась динамика роста корней *Allium cepa*, а также показатель митозмодифицирующего действия – митотический индекс. Установлено, что раствор диоксида в диапазоне концентраций 10 мг/л – 100 мг/л снижает митотическую активность тканей по сравнению с контролем и, следовательно, обладает митотоксической активностью.

Ключевые слова: диоксидин, митотоксическая активность, митотический индекс, *Allium test***Введение**

В настоящее время все большее внимание уделяется растительным тест-системам как средствам оценки уровня влияния тех или иных факторов на живые организмы [1, 2, 3]. Одной из наиболее распространенных и простых в освоении тест-систем является *Allium test* [1,4], который рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды [2]. *Allium test* используется для оценки цитогенетического действия химических и физических факторов с использованием *Allium cepa* – Лука репчатого (сорт Штутгартен ризен) и позволяет выявить митотоксическое действие какого-либо фактора, сказывающееся на скорости деления клеток меристемы корня через митотический индекс [5]. По сравнению с другими растительными тест-системами *Allium test* имеет ряд преимуществ, таких как высокая скорость оценки, доступность материалов и хорошая корреляция с результатами исследований на других эукариотических организмах (например, с результатами тестов на клетках млекопитающих и человека уровень корреляции достигает 82 %) [2, 4].

Данный тест может быть использован для оценки цитогенетического действия лекарственных препаратов, например, с помощью *Allium test* проводились исследования метотрексата [6]. Диоксидин – антибактериальный препарат широкого спектра, который действует на штаммы микроорганизмов, устойчивых к другим антибактериальным лекарственным средствам, но при этом до настоящего времени проводятся активные исследования не только по анализу чувствительности разных штаммов микроорганизмов по отношению к его воздействию [7], но и по изучению влияния диоксида на эукариотические клетки [3]. Установленные цитостатические свойства этого препарата позволили рекомендовать его в качестве противоопухолевого средства [8].

Цель: изучить цитогенетическую активность диоксида (растворы разных концентраций) с использованием *Allium test*.**Материал и методы**

Для оценки цитогенетического действия раствора диоксида с помощью *Allium test* использовали луковицы *Allium cepa*, помещали в стаканчики объемом 100 мл с растворами диоксида разных концентраций (10 мг/л, 20 мг/л, 30 мг/л, 40 мг/л, 50 мг/л, 60 мг/л, 70 мг/л, 80 мг/л, 90 мг/л, 100 мг/л) и проращивали в течение 3 суток. Одновременно исследовалась и контрольная группа с дистиллированной водой.

На первом этапе анализа митотической активности проводили первичный скрининг-тест, который заключался в измерении динамики роста корешков. На каждой луковице на 3-й день срезали по 5 самых длинных корешков, измеряли их длину линейкой и рассчитывали средний прирост для каждой луковицы.

Приготовление микропрепаратов меристем корешков *Allium cepa* проводили по стандартной методике [9] с модификациями: окрашивание корешков в ацетогематоксилине было заменено на окрашивание в этилорсеине вместо жидкости Гойера при помещении на предметное стекло использовалась молочная кислота, что позволило ускорить окрашивание микропрепаратов.

При анализе микропрепаратов использовали микроскоп «Микромед Р-1» и видеоокуляр CMOS EVS-5,17 mp. На каждом микропрепарате при увеличении 16×40 просматривали не менее 1000 клеток, среди них подсчитывали количество клеток на разных стадиях митоза и число клеток на стадии интерфазы [9,10, 11] (рис. 1).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ LibreofficeCalc.

Результаты

Наибольший прирост корешков *Allium cepa* был получен в контрольном варианте опыта, однако в эксперименте наблюдалась неравномерная динамика прироста, и статистическая обработка полученных данных не показала их достоверность (табл.1, рис.2), поэтому для дальнейшего изучения митотоксических эффектов диоксида анализировали микропрепараты корневых меристем *Allium cepa*. Анализ воздействия проводили в сравнении с контролем. Результаты показали отрицательную прямую зависимость значений митотического индекса от концентрации раствора диоксида, что свидетельствует о подавлении митотической активности клеток. По результатам статистической обработки данных различия достоверны (по критерию Стьюдента).

Обсуждение

Установлено, что наименьшее подавление митотической активности клеток меристемы лука наблюдается при концентрации раствора диоксида 10 мг/л, наибольшее митотоксическое воздействие – при концентрации 100 мг/л (табл.2, рис.3).

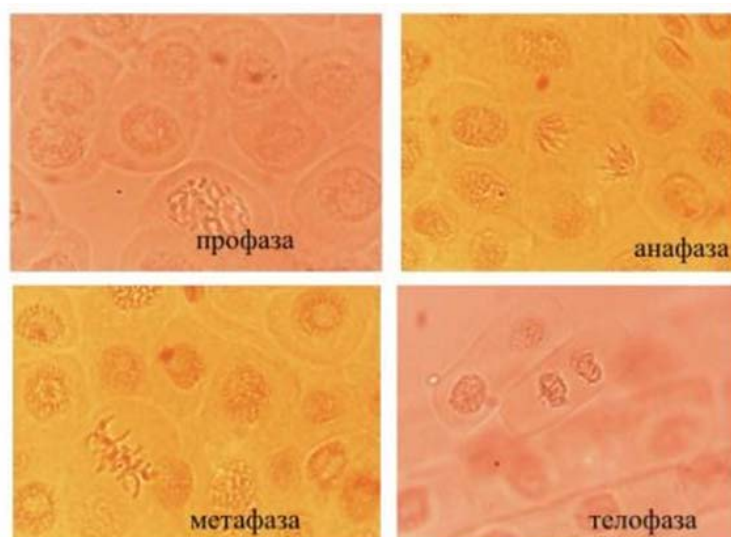


Рисунок 1. Микропрепараты меристем корешков Allium cepa

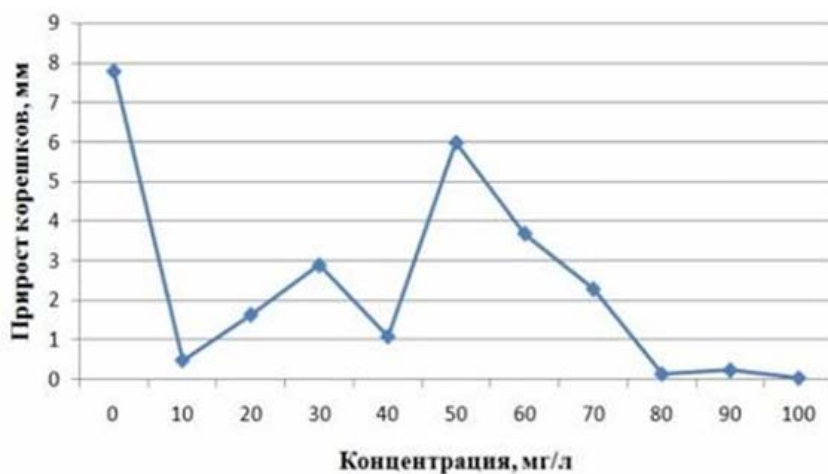


Рисунок 2. Зависимость прироста корешков от концентрации

Таблица 1. Зависимость прироста корешков от концентрации

<i>C, мг/л</i>	<i>Прирост 1 серия, мм</i>	<i>Прирост 2 серия, мм</i>	<i>Прирост сред., мм</i>
0	6,60	9,00	7,80 ± 1,16
10	0,60	0,40	0,50 ± 0,10
20	0,90	2,40	1,65 ± 0,72
30	2,80	3,00	2,90 ± 0,10
40	0,20	2,00	1,10 ± 0,87
50	4,20	7,80	6,00 ± 1,73
60	2,20	5,20	3,70 ± 1,45
70	1,70	2,90	2,30 ± 0,58
80	0,20	0,10	0,15 ± 0,05
90	0,40	0,10	0,25 ± 0,14
100	0,10	0,00	0,05 ± 0,05

Таблица 2. Зависимость митотического индекса MI от концентрации

<i>C, мг/л</i>	<i>MI 1, %</i>	<i>MI 2, %</i>	<i>MI ср, %</i>
0	47,14	46,80	46,97 ± 0,16
10	35,10	37,60	36,35 ± 1,21
20	36,80	34,30	35,55 ± 1,21
30	30,00	29,90	29,95 ± 0,05
40	37,03	26,16	31,59 ± 5,24
50	31,53	23,75	27,64 ± 3,75
60	12,34	21,55	16,95 ± 4,44
70	13,10	19,25	16,18 ± 2,96
80	15,22	15,20	15,21 ± 0,01
90	14,08	11,94	13,012 ± 1,03
100	11,83	12,73	12,28 ± 0,43

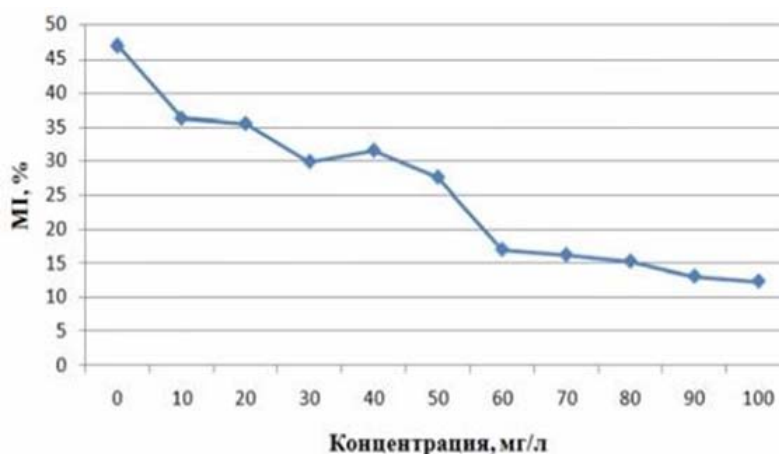


Рисунок 3. Зависимость митотического индекса MI от концентрации

Заключение

Исследование митотоксического воздействия раствора диоксида, проведенное нами с использованием Allium test, показало, что значения митотического индекса между контрольной группой и экспериментальными выборками достоверно отличались для проанализированных концентраций диоксида, что свидетельствует об угнетении митотической активности под влиянием этого препарата.

Литература

- Буданцев А.Ю. Измерение динамики роста корней при использовании Аллиум-теста // Биологические науки / Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6. – С. 1393-1396
- Песня Д.С., Романовский А.В., Прохорова И.М. Исследование токсического и генотоксических эффектов синтетических пищевого красителей методом Alliumtest // Ярославский педагогический вестник. – 2012. – №3. – Том III (Естественные науки). – С.86-93
- Шкарупа В.М., Бириляк П. Мутагенез, индуцированный диоксином в Allium-тесте // Цитология и генетика. – 2006. – 40, №5. – С.31-35
- Fiskesjo G. The Allium Test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – Т. 102. – С. 99-112
- Влияние электромагнитных колебаний различных частот на деление клеток в меристеме корня Allium сера / А.Ю.Лаврский, И.А.Лебединский, А.Ф.Кузаев [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – № 5-1 (12). – С. 43-45.
- Буданцев А.Ю., Кутышенко В. П. Действие метотрексата на первичный рост корней Allium сера // Фундаментальные исследования. – 2012. - №11. – С. 833-836
- Падейская Е.Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции // Инфекции и антимикробная терапия. – 2001. – Том 3, №5. – С. 150-155
- Применение диоксида в качестве противоопухолевого средства: пат. RU 2325162 С1 Рос. Федерация: МПК⁵¹ А61К 31/498, А61Р 35/00 / Одарюк Т.С., Ревельский И.А., Воробьев Г.И., Киселевский М.В., Шелыгин Ю.А., Расулов А.О., Полезина А.С.; заявитель и патентообладатель Одарюк Т.С., Ревельский И.А., Воробьев Г.И., Киселевский М.В., Шелыгин Ю.А., Расулов А.О., Полезина А.С. – № 2006139219/14; заявл. 08.11.2006; опубл. 27.05.2008, Бюл. №15
- Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма / В.Н. Калаев, С.С. Карпова; Воронежский государственный университет. – Воронеж, 2004. – 80 с.
- Калаев В.Н. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография / В.Н. Калаев, М.С. Нечаева, Е.А. Калаева; Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. – 136 с.
- Сальников В.Н., Полухина Н.В., Шереметьева А.С., Левина В.А., Егерова М.А. Применение микроядерного теста для оценки влияния зубных протезов на генетический аппарат человека // Клинические и теоретические аспекты современной медицины. 2011. С. 103-104.