

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ ЕФЕКТ СУМІСНОЇ ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І КІНЕТИНУ ТА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

Бессонова В.П., Чонгова А.С.

Дніпропетровський державний аграрний університет

Под влиянием тяжелых металлов (Fe^{2+} 0,25 мМ, Mn^{2+} 0,15 мМ, Zn^{2+} 0,15 мМ) угнетается митотическое деление клеток, возрастает уровень хромосомных aberrаций и анеугенных нарушений в меристематических клетках корешков *Vicia sativa* L. Замачивание семян в растворе тяжелых металлов с аскорбиновой кислотой или кинетином повышает митотический индекс и снижает число хромосомных aberrаций, изменяет их спектр по сравнению с вариантом, где на семена действуют лишь тяжелые металлы. Кинетин более благоприятно влияет на деление клеток, а аскорбиновая кислота на снижение количества хромосомных aberrаций.

Vicia sativa L.. семена, тяжелые металлы, аскорбиновая кислота, деление клеток, хромосомные aberrации

ВСТУП

Попередження генетичних наслідків мутаційної дії важких металів відноситься до числа задач великої важливості за своїм загальнобіологічним, медичним і народногосподарським значенням. З цієї точки зору заслуговує на увагу покращання контролю за зміною хімічних засобів захисту рослин, нормуванню та регламентації викидів мутагенних речовин в оточуюче середовище у процесі роботи різного роду підприємств тощо. Проте ці профілактичні засоби не дозволяють повністю попередити надходження мутагенів у повітря, воду та ґрунт. Тому перспективним є використання антимутагенів, які нейтралізують мутаген до його взаємодії з молекулою ДНК, або знижують ураження ДНК.

До антимутагенів відноситься декілька груп речовин [1, 9]. Серед них важливе місце займають нуклеотиди і нуклеозиди [15]. Модифікуючий ефект має кинетин [6, 11]. Антимутагенну дію спричинюють деякі вітаміни [2], у тому числі аскорбінова кислота [7, 13, 14].

Метою даної роботи є дослідження антимутагенної дії кинетину та аскорбінової кислоти за дії на насіння важких металів.

УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як об'єкт дослідження використовували насіння горошку посівного (*Vicia sativa* L.). Насіння контрольного варіанту замочували у воді. У другому варіанті насіння замочували у розчині важких металів Fe^{2+} – 0,25 мМ, Mn^{2+} – 0,15 мМ, Zn^{2+} – 0,15 мМ. У інших варіантах (третій і четвертий) у розчин металів такої ж концентрації вносили кинетин 0,1 мг/л або аскорбінову кислоту (0,1 мг/л). Після 18-годинного замочування насіння переносили на фільтрувальний папір, змочений водою (I-й варіант) або такими ж розчинами, в яких замочували насіння (II, III, IV варіант). Корінці довжиною 1,2–1,5 см відрізали і фіксували у фіксаторі Карнуа, виготовленого з трьох частин спирту і однієї частини крижаної оцтової кислоти.

Зафіксовані корінці переносили у пробірки з розчином ацетокарміну і витримували на водяній бані до їх пом'якшення. Корінець переносили на предметне скло, скальпелем відрізали його кінчик довжиною біля 2 мм і готували давлений препарат. Препарати розглядали під мікроскопом. У кожному варіанті аналізували 5000 клітин з 10 корінців. Підраховували кількість клітин у різних фазах мітозу (профаза, метафаза, анафаза, телофаза). Мітотичний індекс (МІ) виражали у проміле, тобто кількість мітозів на 1000 клітин:

$$MI = \frac{1000 \cdot n}{m},$$

де n – кількість клітин, що діляться; m – загальна кількість клітин.

Хромосомні аберації підраховували на давлених препаратах в анафазі і телофазі. Враховували хромосомні та хроматидні мости, одиночні і парні фрагменти. Також фіксували кількість відстаючих хромосом та інших геномних порушень.

Отримані результати обробляли статистично [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У клітинах кореневої меристеми горошку посівного як контрольного, так і дослідних варіантів найбільший відсоток клітин знаходиться у профазі.

Важкі метали пригнічують поділ клітин (табл. 1). Мітотичний індекс у цьому варіанті становить 48,8 % від контрольного значення (рис. 1). Аналіз профазної активності клітин свідчить про зниження їх кількості у варіанті з важкими металами на 62,12 % порівняно з контролем. Суттєвіше зменшується анафазний та телофазний індекси. Їх величини становлять всього 13,35 та

21,06 % до контролю відповідно. Кількість метафаз у клітинах кореневої меристеми, навпаки, зростає щодо контрольних значень (на 42,58 %).

Таблиця 1 – Вплив важких металів та антимурагенів на величину мітотичного індексу у клітин меристеми коренів горошку посівного

Варіант	Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза	Всього діляться
Контроль	65,25±5,11	32,01±3,50	45,84±5,36	21,55±3,60	164,65±10,15
ВМ	24,07±3,12	45,62±4,26	6,12±0,72	4,54±0,75	80,35±7,24
ВМ + кінетин	42,29±4,20	39,04±4,17	24,16±2,56	12,10±1,48	117,59±9,36
ВМ + АК	39,63±5,22	36,53±3,42	19,74±2,48	6,23±0,90	102,13±7,29

Примітка: ВМ – важкі метали; АК – аскорбінова кислота.

За дії важких металів змінюється співвідношення окремих фаз мітозу у клітинах коренів горошку посівного. Якщо кількість телофаз прийняти за одиницю, то співвідношення фаз мітозу у меристемі коренів контрольного варіанту таке – профаза : метафаза : анафаза : телофаза – 3,02 : 1,48 : 2,12 : 1, у дослідному варіанті 5,30 : 10,0 : 1,34 : 1. Отже збільшується частка клітин, що знаходиться у профазі і, особливо, у метафазі.

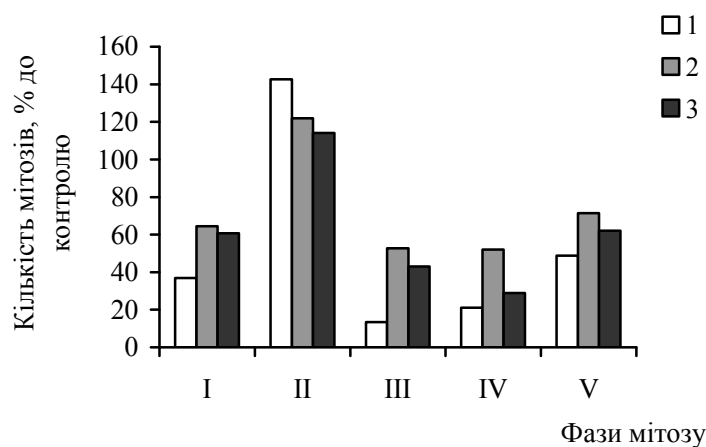


Рисунок 1 – Вплив важких металів та антимурагенів на величину мітотичного індексу клітин меристеми коренів, % до контролю. I. Профаза. II. Метафаза. III. Анафаза. IV. Телофаза. V. Мі. 1. Важкі метали. 2. Важкі метали + кінетин. 3. Важкі метали + аскорбінова кислота.

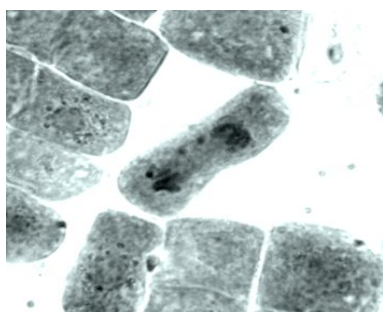
Збільшення кількості клітин у метафазі може бути зв'язано з подовженням терміну її протікання [5] або блокуванням. Подовження метафаз, можливо, може бути обумовлено впливом важких металів на сульфгідрильні групи мітотичного апарату. Так, у роботі Л. Рапкіна [16], яка може вважатися першою спробою підійти впритик до механізму клітинного поділу, важливим відкриттям було те, що протягом всього клітинного поділу діє «глутатіоновий» цикл. У подальшому була підтверджена роль сульфгідрильних груп у формуванні мітотичного апарату [12]. Встановлений нами факт активізації вільнорадикальних процесів у тканинах під впливом досліджуваних важких металів і підвищення долі дисульфідних груп від загального числа сірковмісних груп [3, 4, 5] дає підставу вважати, що збільшення кількості клітин у метафазі може бути пов'язане з окисненням SH-груп мітотичного апарату оскільки важкі метали посилюють перекисне окиснення. Факт легкого окиснення сульфгідрильних груп вільними радикалами і перекисами ліпідів добре відомий [8]. Затримання поділів у метафазі і свідчить про порушення структури веретена. Це виражається також у гальмуванні або повному виключенні механізмів розходження хромосом, наслідком чого є к-мітози, незначна кількість яких спостерігається у клітинах за дії важких металів (0,18 %).

Обробка насіння як кінетином, так і аскорбіновою кислотою позитивно впливає на поділ клітин, мітотичний індекс зростає (табл. 1). Кількість клітин у профазі збільшується порівняно з варіантом, де на рослини діють тільки важкі метали. Сприятливий вплив кінетину і аскорбінової кислоти проявляється у зростанні числа анафаз і телофаз у клітинах кореневої меристеми, особливо анафаз, хоча їх рівень не досягає контрольних значень. Кількість анафаз становить 52,70 % за дії кінетину та 43,06 % за дії аскорбінової кислоти до цього показника у контрольному варіанті, телофаз – 56,14 та 28,90 % відповідно (рис. 1). Порівняно з варіантом, де присутні тільки

важкі метали кінетин збільшує число анафаз на 294,77 %, телофаз на 166,50 %, аскорбінова кислота на 222,54 і 137,30% відповідно.

За дії важких металів у меристематичних клітинах коренів зростає рівень хромосомних аберацій у 7,84 рази стосовно контролю (табл. 2). Змінюється їх спектр, з'являються хроматидні мости з фрагментом й двома фрагментами, та хромосомні мости, які у контрольному варіанті відсутні (рис. 2). Суттєво знижується частка поодиноких фрагментів від загальної кількості аберацій стосовно контрольного варіанту, але збільшується частка хроматидних мостів. Кількість хроматидних мостів з фрагментом становить 12,77, з двома фрагментами 7,26, а хромосомних мостів – 2,69 % від загальної кількості аберацій анафаз (табл. 3, рис. 3).

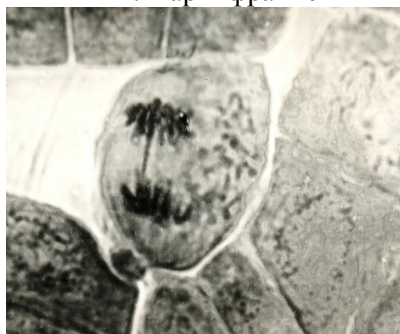
У клітинах меристем корінців горішку посівного з варіанту з важкими металами виявлені відстаючі хромосоми, багатополюсні анафази, κ-мітози та інші геномні порушення.



I. Парні фрагменти



II. Множинні порушення



III. Хроматидний міст



IV. Хромосомний міст

Рисунок 2 – Хромосомні аберації у клітинах кореневої меристеми горішку посівного (*Vicia sativa* L.)

Замочування насіння у розчині важких металів з кінетином або аскорбіновою кислотою зменшує кількість хромосомних аберацій. Загальна кількість перебудов у варіанті з кінетином становить 64,83 %, з аскорбіновою кислотою – 55,77 % до контролю.

Рівень численних порушень також зменшується у варіанті з кінетином у 1,70 рази, аскорбіновою кислотою – 2,02 рази. Змінюється і спектр хромосомних аберацій. Підвищується частка поодиноких та парних фрагментів, але падає кількість мостів з одиночним та парним фрагментами, а також хромосомних мостів. Так, частка хроматидних мостів з фрагментом становить у варіанті з кінетином 42,10 %, аскорбіновою кислотою 32,60 %, з парними фрагментами 59,70 і 25,00 %, хромосомних мостів – 62,50 та 37,50 % відповідно до їх числа у варіанті, де на насіння діяли лише важкі метали.

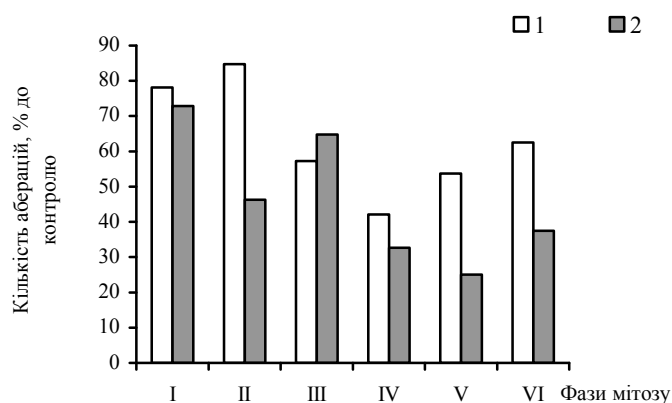


Рисунок 3 – Кількість хромосомних аберацій у клітинах меристеми корінців, % до варіанту з важкими металами. I. Фрагмент. II. Подвійний фрагмент. III. Хроматидний міст. IV. Хроматидний міст з фрагментом. V. Хроматидний міст з двома фрагментами. VI. Хромосомний міст. 1. Кінетин. 2. Аскорбінова кислота.

Таким чином, важкі метали призводять як до кластогенних, так і анеугенних порушень (к-мітози, багатополюсні мітози, відстаючі хромосоми). Рівень модифікуючого впливу на хромосомні аберації аскорбінової кислоти проявляється дещо більше ніж кінетину. За дії аскорбінової кислоти у більшому ступені знижується кількість парних фрагментів, хроматидних мостів з одним та двома фрагментами, хромосомних мостів, а також множинних порушень.

Таблиця 2 – Кількість хромосомних аберацій у клітинах меристем корінців горошку посівного, %

Варіант	Загальна кількість перебудов	Фрагмент	Подвійний фрагмент	Хроматидний міст	Хроматидний міст з фрагментом	Хроматидний міст з двома фрагментами	Хромосомний міст	Численні порушення
Контроль	1,90±0,15	1,31±0,11	0,21±0,02	0,38±0,04	-	-	-	-
ВМ	14,86±0,72	3,80±0,27	2,42±0,23	5,26±0,42	1,90±0,11	1,08±0,27	0,40±0,03	2,25±0,21
ВМ + кінетин	9,66±0,53	2,97±0,20	2,05±0,14	3,01±0,31	0,80±0,04	0,58±0,05	0,25±0,02	1,32±0,15
ВМ + АК	8,31±0,61	2,77±0,21	1,12±0,13	3,38±0,33	0,62±0,05	0,27±0,03	0,15±0,02	1,11±0,12

Таблиця 3 – Спектр хромосомних аберацій у клітинах меристеми корінців горошку посівного

Варіант	% від абераційних анафаз					
	фрагмент	подвійний фрагмент	хроматидний міст	хроматидний міст з фрагментом	хроматидний міст з двома фрагментами	хромосомний міст
Контроль	68,94	11,05	20,00	-	-	-
ВМ	225,57	15,28	35,39	12,77	7,26	2,69
ВМ + кінетин	30,74	21,22	31,57	8,28	6,00	2,59
ВМ + АК	33,33	13,48	40,67	7,47	3,24	1,80

У подальшому доцільно дослідити антимуtagenну дію інших сполук цитокінового ряду.

ВИСНОВКИ

1. Важкі метали (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) пригнічують мітотичний поділ меристематичних клітинах корінців. Знижуються профазний і, особливо, анафазний і телофазний індекси, метафазний індекс підвищується. Змінюється співвідношення фаз мітозу у клітинах корінців.

2. За дії важких металів у меристематичних клітинах корінців зростає рівень хромосомних аберацій та анеугенних порушень.

3. Намочування насіння у розчині важких металів з аскорбіною кислотою або кінетином підвищує мітотичний індекс на фоні зниження числа метафаз у меристемах корінців.

4. Виявлено модифікуючий вплив кінетину та аскорбінової кислоти на спектр та кількість хромосомних аберацій, що виникають під впливом важких металів. За дії аскорбінової кислоти у більшому ступені знижується кількість хроматидних мостів з одним та двома фрагментами і хромосомних мостів.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Аликперов У.К. Особенности действия анти мутагенов и перспектива их практического применения / У.К. Аликперов // *Успехи современной генетики*. – М.: Наука. – 1979. – Т. 8. – С. 168–175.
2. Ахундова Д.Д. Изучение цитогенетической активности некоторых витаминов как возможных элементов естественной системы антимуtagenов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Д.Д. Ахундова – Баку. – 1974. – 26 с.
3. Бессонова В.П. Вплив важких металів на пігментну систему листка / В.П. Бессонова // *Укр. бот. ж.* – 1992. – Т. 49, № 2 – С. 63–66.
4. Бессонова В.П. Перекисное окисление липидов в вегетативных и генеративных органах растений – показатель загрязнения среды тяжелыми металлами / В.П. Бессонова, И.И. Лыженко // *Экологические проблемы охраны живой природы: тезисы Всесоюз. конф.* – М., 1990. – Ч. 2. – С. 46–47.
5. Бессонова В.П. Клеточный анализ роста корней *Lathyrus odoratus L.* при действии тяжелых металлов / В.П. Бессонова, И.И. Лыженко // *Циология и генетика*. – 1991. – Т. 25, № 6 – С. 18–22.
6. Бибик Е.В. Мутагенез ярового ячменя, индуцированный гамма-лучами и НММ, и его модификация: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Е.В. Бибик – Харьков, 1984. – 21 с.
7. Бобылева Л.А. Модификация аскорбиновой кислоты спонтанного и индуцированного уровней ХА и СХО в лимфоцитах рабочих, контактирующих с солями молибдена / [Бобылева Л.А., Чопикашвил В.Л., Алехина Н.И., Засухина Г.Д.] // *Генетика*. – 1993. – Т. 29, № 3. – С. 430–434.
8. Владимиров Ю.А. Механизм перекисного окисления липидов и его действие на биологические мембраны / [Владимиров Ю.А., Оленев В.И., Сулова Т.Б. и др.] // *Биофизика*. – Т. 5. – Молекулярная патология мембранных структур. – М.: ВИНТИ, 1975. – 56 с.
9. Гончарова Р.И. Антимутагенез. / Р.И. Гончарова – Минск: Наука и техника, 1974. – 144 с.
10. Лакин Ф.Ф. Биометрия: уч. пособ. для биол. спец. / Ф.Ф. Лакин – М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.
11. Мехти-Зде Э.Р. Антимутагенная активность кинетина / Э.Р. Мехти-Зде, Д.А. Нагиева // *IV съезд ВОГиС: тез. докл.* – Ч. 3. – Кишинев: Штиинца, 1981. – С. 51.
12. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. / Д. Мэзия – М.: ИЛ, 1963. – 427 с.
13. Перминова Е.В. Эколого-генетическое обоснование защиты генома при профессиональном воздействии никеля с помощью аскорбиновой кислоты: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Е.В. Перминова – Апатиты, 2003. – 20 с.
14. Семибекова Д.Д. Цитогенетическая активность кумаринов и аскорбиновой кислоты / Д.Д. Семибекова // *Материалы науч. сессии по вопросам генетики и селекции*. Баку, 1967. – С. 37.
15. Navick A. Antimutagens. / A. Navick – *Nature*. – 1952. – 170, N 4335. – P. 926–927.
16. Rapkine L. *Ann. Physiol. physicchem. biol.* / L. Rapkine – 1931. – N 7. – P. 382–385.

CYTOGENETIC EFFECTS JOINT ACTIONS OF HEAVY METALS, KINETYN AND ASCORBIC ACID

Bessonova V.P., Chongova A.S.

At the root meristem the highest percentage of cells is in prophase for control as well as for experimental variants of green pea seed.

The heavy metals inhibit the cell division. In this case the mitotic index is 48,8 % of the control values. Prophase cells activity analysis shows their quantity decreasing with heavy metals effect to 62,12 % comparing with the control variant. Anaphase and telophase indexes are decreasing more essentially. Other side the quantity of metaphases are increasing in reference to control values (by 42,58 %) in the cells of the root meristem).

By the action of heavy metals the ratio of individual phases of mitosis varies at roots cells of green pea seed: the proportion of cells are located in prophase and especially in metaphase is increasing.

Treatment of seeds by kinetin as well as ascorbic acid affects to cell division. Mitotic index increases. In prophase the number of cells increases comparing with the case where the heavy metals make impact to the plants only, but their level does not reach the control values. Positive impact of kinetin and ascorbic acid exhibits as increasing of the number of anaphase and telophase in cells of the root meristem, especially anaphase. Compared to the option where there are heavy metals only kinetyn increases the number of anaphase at 294,77 %, telophase at 166,50 %, ascorbic acid at 222,54 and 37,30 %, accordingly.

In root meristematic cells by the action of heavy metals the level of chromosomal aberrations increases 7,84 times more according control. The proportion of single pieces of the total aberration for a specific option is significantly reduced, but share of chromatid bridges is increasing.

In the cells of root meristems option for the actions of heavy metals found lagging chromosomes, multipolar anaphase, c-mitosis and other genomic disorders.

Soak the seeds in a solution of heavy metals from kinetynom or ascorbic acid reduces the number of chromosomal aberrations. Total number of mutations in the variant with kinetynom constitutes 64,83 % of the control with ascorbic acid – 55,77 %, respectively. Level of numerous violations in the form of reduced cytokinin at 1,70 times, ascorbic acid – 2,02 times. Changing the range of chromosomal aberrations. Increased proportion of single and paired fragments, but decreases the number of bridges with single and paired fragments and chromosome bridges. Thus, the number of bridges hromatydnyh piece is in the form of cytokinin 42,10, 32,60 ascorbic acid, with even fragments of 59,70 and 25,00, chromosome bridges – 62,50 and 37,50 according to their numbers in the form, where the seeds were only heavy metals.

Thus, heavy metals as a result clastogenic and aneuhennyh disorders (k – mitosis, multipolar mitosis, lagging chromosomes). Modifying effect on the level of chromosomal aberrations ascorbic acid appears slightly more than cytokinin. By the action of ascorbic acid to a greater extent reduced the number of paired fragments hromatydnyh bridges with one and two fragments of chromosomal bridges and multiple violations.

УДК 575.155:546.3+575.224.6

Бессонова В.П., Чонгова А.С. Цитогенетичний ефект сумісної дії важких металів і кінетину та аскорбінової кислоти // Питання біоіндикації та екології. – 2013. – Вип. 18, № 2. – С. 134–145.

За дії важких металів (Fe^{2+} 0,25 мМ, Mn^{2+} 0,15 мМ, Zn^{2+} 0,15 мМ) пригнічується мітотичний поділ клітин, зростає рівень хромосомних аберацій та анеугенних порушень у меристематичних клітинах корінців *Vicia sativa* L. Намочування насіння у розчині важких металів з аскорбіновою кислотою або кінетином підвищує мітотичний індекс та знижує рівень хромосомних аберацій, змінює їх спектр порівняно з варіантом, де на насіння діють тільки важкі метали. Кінетин сприятливіше впливав на поділ клітин, а аскорбінова кислота на зниження кількості хромосомних аберацій.

Бібл. 16. Табл. 3. Рис. 3.