

ГЕНОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА СЕМЕНА *ALLIUM CERA L.*Н.Д.САДЫХОВА¹, С.А.МАМЕДЛИ²,¹Бакинский Государственный Университет²Институт Радиационных Проблем НАН Азербайджана,

Проведено исследование генозащитной активности рутината железа и экстракта грецкого ореха при остром гамма-облучении семян лука *Allium cera L.* Предварительная обработка семян этими препаратами приводила к значительному снижению хромосомных aberrаций в апикальной меристеме проростков лука, полученных из облученных семян.

Ключевые слова: *Allium cera L.*, *Sophora japonica L.*, *Juglans regia L.*, семена, гамма-излучение, рутинат железа, экстракт грецкого ореха, хромосомные aberrации

Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность – одна из форм общей генетической нестабильности, проявляющаяся в ответ на действие радиационного фактора. Индуцированная облучением общая нестабильность хромосомного аппарата выражается в увеличении выхода хромосомных aberrаций самых различных типов [4]. Изучение закономерностей генетической нестабильности у растений имеет важное фундаментальное и прикладное значение, в частности, для прогнозирования отдаленных последствий облучения различных видов растений с целью сохранения их генофонда. Возможно также использование растений с известными характеристиками геномной нестабильности в качестве тест-систем для оценки генетических последствий радионуклидного загрязнения и других стрессовых факторов, проведения мониторинга природных экосистем на больших территориях в зонах экологических катастроф; оценки экологических рисков; получение новых форм в селекции.

В качестве перспективного источника веществ с радиопротекторными свойствами рассматривают растительный материал, что связано, прежде всего, с его относительной доступностью как сырья, нетоксичностью или низкой токсичностью получаемых из него продуктов, их стабильностью, положительным системным характером воздействия на организмы [4]. В числе других были исследованы генозащитные и иммуностимулирующие свойства препаратов из грецкого ореха *Juglans regia L.*, настои и отвары которого используются в фитотерапии при многих заболеваниях [1].

Среди широкого набора радиопротекторов растительного происхождения, кроме стабилизаторов мембран и ДНК, ингибиторов метаболизма и адаптогенов, особое внимание привлекает группа антиоксидантов.

Известно, что при действии ионизирующей радиации в результате прямых и непрямых эффектов излучения (за счет образования радикалов воды, выход которых увеличивается в присутствии O₂) в течение долей секунды происходит повреждение генома. Предполагается, что радиационно-индуцированная нестабильность генома, формой проявления которой является образование *de novo* с высокой частотой на протяжении многих поколений хромосомных aberrаций и генных мутаций, связана с поддержанием увеличенного образования активных форм кислорода (АФК) [3]. Антиоксиданты, устраняющие токсическое действие АФК и продуктов свободнорадикального окисления, представляют интерес с точки зрения изучения их антимуtagenных свойств. В настоящее время известно много веществ природного происхождения с антиоксидантными свойствами, среди которых одним из наиболее изученных является β-каротин и его производные [6]. В литературе представлено много данных об антимуtagenном действии растительных экстрактов, исследуются их свойства и состав [2].

Целью данной работы было исследование генозащитных свойств экстракта грецкого ореха и рутина, полученного из софоры с использованием метода цитогенетической оценки количества хромосомных aberrаций (ХА) в анафазных клетках *Allium cepa* L..

МЕТОДИКА

Генозащитное действие препаратов растительного происхождения оценивали по выходу ХА в апикальной меристеме корешков проростков лука *Allium cepa* L., полученных из облученных семян. Цитогенетический анализ нарушений митоза в первичной меристеме лука *A. cepa* рекомендован группой экспертов ВОЗ для оценки мутагенных эффектов [5]. В то же время применение этой тест-системы возможно также при скрининге веществ с радиопротекторными и антиоксидантными свойствами.

В опытных вариантах семена *A. cepa* перед облучением предварительно обрабатывали в течение 15 ч раствором рутина или экстрактом грецкого ореха, внося по 10 мл этих растворов на вариант, в контроле использовали дистиллированную воду. Концентрация растворов составляла 0,01 %.

Для получения рутина 20 г цветков софоры (*Sophora japonica* L.) заливали 150 мл этилового спирта и кипятили в течение 2 ч в аппарате Сокслет. Полученный экстракт фильтровали и выпаривали на водяной бане. Для удаления масел и других веществ экстракт 2 раза обрабатывали 10 мл этилового эфира.

Экстракт грецкого ореха (*Juglans regia* L.) получали из зеленых плодов. Плоды измельчали и промывали пентаном или гексаном для удаления масел. Затем кипятили в течение 5 ч в изопропиловом спирте. После этого раствор выпаривали до получения экстракта темно-коричневого цвета.

Облучение семян лука в дозах 1, 2,5, 5, 10 и 15 Гр проводили на установке «ИССЛЕДОВАТЕЛЬ» при мощности дозы 0,02 Гр/с. После облучения семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 24 - 28 °С. При появлении первичных корешков длиной 1,0-1,5 см их фиксировали в смеси Карнуа (этиловый спирт : ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) и красили ацетоорсеином [1,2].

На цитологических препаратах подсчитывали количество aberrантных анафаз и определяли количество ХА на клетку. При применении анафазного метода подсчитывают образующиеся мосты, хромосомные фрагменты, отстающие хромосомы и другие нарушения. В каждом варианте анализировали 100 анафаз и ранних телофаз, не разделяя хромосомные aberrации по отдельным категориям, как рекомендуется в [1,4]. Частоту aberrантных анафаз выражали в процентах от просмотренных соответствующих фаз митоза (по 200 на каждый вариант). Для статистической обработки полученных данных рассчитывали t_d и p по общепринятой методике .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острое гамма-облучение семян лука в диапазоне доз от 2,5 до 15 Гр вызвало резкое увеличение количества aberrантных анафаз и ХА в меристеме проростков лука по сравнению с контролем (табл.1,2).

Таблица 1

Влияние гамма-облучения и рутината железа на выход хромосомных aberrаций у *Allium cepa*, у.е.

Доза, Гр	Контроль (без обработки препаратом)	П (0 Гр)	Рутинат железа	П(0 гр)	П
0	1.87±0.00 (1.86-1.89)		2.07±0.00 (2.00-2.11)		$p<0.01$
1	2.99±0.00 (2.96-3.04)	$p<0.01$	2.35±0.00 (2.27-2.41)	$p<0.01$	$p<0.01$
2.5	3.63±0.00 (3.59-3.68)	$p<0.01$	2.91±0.00 (2.86-3.00)	$p<0.01$	$p<0.01$
5	3.05±0.00 (3.03-3.08)	$p<0.01$	2.76±0.00 (2.70-2.80)	$p<0.01$	$p<0.01$
10	8.42±0.00 (8.37-8.46)	$p<0.01$	5.41±0.00 (5.34-5.50)	$p<0.01$	$p<0.01$
15	8.60±0.00 (8.55-8.63)	$p<0.01$	6.01±0.00 (5.91-6.06)	$p<0.01$	$p<0.01$

П – достоверность различий между группами контроля и с обработкой рутинатом железа

Таблица 2

Влияние гамма-облучения и экстракта грецкого ореха на выход хромосомных aberrаций у *Allium cepa*

Варианты	Доза, Гр		
	0	10	15
Контроль	2.01 (1.96-2.05)	9.01 (8.95-9.09)	11.99 (11.83-12.14)
П(0 Гр)		$p<0.01$	$p<0.01$
Экстракт ореха	2.03 (1.97-2.08)	3.08 (3.04-3.11)	2.43 (2.33-2.50)
П(0 Гр)		$p<0.01$	$p<0.01$
П	$p>0.05$	$p<0.01$	$p<0.01$

П – достоверность различия по отношению к контролю

Предшествующая облучению обработка рутинатом железа приводила к существенному снижению как выхода aberrантных анафаз, так и количества ХА на клетку. Даже при сравнительно высоких дозах облучения в 10 и 15 Гр количество ХА уменьшалось в пределах 1,3 и 1,6, раз соответственно.

Экстракт грецкого ореха обладал еще более выраженными генозащитными свойствами и уменьшение выхода ХА при этих дозах облучения достигало приблизительно 4,5 и 5,6 раз. Ранее были исследованы радиопротекторные, иммуностимулирующие и антимуtagenные свойства масел грецкого ореха. В наших опытах впервые показано наличие выраженных антимуtagenных свойств у очищенного от масел экстракта.

Таким образом, снижение выхода ХА при одних и тех же дозах облучения в случае предварительной обработки семян экстрактами рутин и грецкого ореха указывает на наличие у этих препаратов радиопротекторных свойств.

Можно предположить, что генозащитный эффект данных растительных экстрактов связан с наличием в их составе веществ с антиоксидантными свойствами.

Известно, что АФК у растений, как и у других организмов, образуются в определенных количествах в процессах нормального клеточного метаболизма и повышение их концентрации происходит в условиях стресса. Облучение вызывает повышение концентрации АФК как через неметаболическое образование (вдоль треков ионизации), так и через активацию их метаболической продукции [3]. Участие АФК в формировании генетической нестабильности растений может обуславливаться их повреждающим воздействием на геном клеток (генотоксичностью), воздействием на клеточные мембраны с изменением их проницаемости (мембранный механизм действия АФК) и через функционирование АФК как внутриклеточных посредников в трансдукции сигналов.

Вещества-антиоксиданты (токоферолы, каротиноиды, витамины А, Е, К и др.) обладают значительными защитными свойствами, что проявляется в повышении выживаемости клеток и снижении цитогенетических эффектов облучения. Известно, что выращивание потомства облученных клеток в присутствии низкомолекулярных антиоксидантов изменяет выраженность радиационно-индуцированной генетической нестабильности, приводя к снижению количества апоптических клеток, восстановлению клоногенной активности клеточных популяций [3]. Согласно одной из концепций относительно возможных механизмов протекторного воздействия такого антиоксиданта, как ретинол, он, как и его предшественник β -каротин, участвует в нормализации процессов окислительно-восстановительного метаболизма, предотвращая развитие цепи свободно-радикальных и перекисных процессов. Согласно другой версии, ретинол может выступать как акцептор электронов, конкурируя с цитохромом Р-450 за электроны, что приводит к ингибированию определенных форм цитохрома Р-450 и других микросомальных ферментов, участвующих в метаболической активации промутагенов. Показано, что ретинол-ацетат наряду с позитивным влиянием на выживаемость облученных клеток, снижает эффективность УФ-мутагенеза в клетках *Escherichia coli* дикого типа и мутантов *recBC* и *sbcB* [2]. Было высказано предположение, что в случае УФ-облучения ретинол-ацетат осуществляет коррекцию УФ-индуцированного мутагенеза на этапе реализации предмутаций в конечные мутационные события и способствует уменьшению ошибочности процессов репарации.

Ранее было установлено, что антимуtagenная активность водно-спиртового экстракта из плодов киви проявлялась на фоне снижения перекисного окисления

липидов и нормализации содержания малонового диальдегида, что связывают с наличием в экстракте веществ с антирадикальной и антиокислительной активностью, в частности, аскорбиновой кислоты, пероксидазы, каталазы, катехина и каротиноидов [1]. Радиопротекторные свойства растительных экстрактов также связывают с наличием в их составе веществ группы кумаринов, обладающих антиоксидантными свойствами [5]. Генозащитное действие растительных конденсированных экстрактов типа «Эраконд» объясняют высоким содержанием токоферола [4]. В случае масла грецкого ореха *J. regia*, его радиозащитное действие связывают с содержанием в нем витаминов А, Е, С, каротиноидов и флавоноидов, обладающих антиоксидантными свойствами [6]. Адаптогенное действие концентрата масла грецкого ореха связывают со способностью ингибировать процессы перекисного окисления липидов [6].

Не исключено, что вещества, входящие в состав исследованных нами растительных препаратов обладают подобными свойствами.

О наличии антиоксидантов в растительных экстрактах свидетельствуют полученные нами данные о влиянии обработки рутинном и экстрактом грецкого ореха на уровень радиационно-индуцированного ПОЛ у растений по параметру накопления его маркера – малонового диальдегида (МДА). Было показано, что предшествующая облучению обработка семян экстрактами рутина, грецкого ореха и софоры вызывала уменьшение концентрации МДА в тканях растений, полученных из облученных семян. Таким образом, уменьшение содержания МДА, обусловленное воздействием растительных экстрактов, указывает на наличие у них антиоксидантных свойств [5].

Таким образом, с использованием в качестве параметра количества aberrantных анафаз в корневой меристеме лука *A. cepa*, нами показано, что предварительная обработка семян рутинатом железа и экстрактом грецкого ореха значительно снижают количество ХА при гамма-облучении. Это свидетельствует о наличии у этих препаратов генозащитных свойств.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барияк И.Р., Исаева А.В. Антимутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика. –1994.- 28, № 3. – С. 3-17.
2. Гудков И.Н. Стратегия биологической противорадиационной защиты: радиопротекторы, радиоблокаторы, радиодекорпоранты // Проблемы безопасности атомных электростанций і Чернобиля. – 2005. – Вип. 3. Ч. 1. – С. 133-139.
3. Rank J., Jensen A.G., Skov B., Pedersen L.H., Jensen K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test // Mutat. Res. – 1993. – № 300. – P. 29-36.
4. Гродзинський Д.М., Шиліна Ю.В., Куцоконь Н.К., Міхєєв О.М., Гуца М.І., Коломиєць О.Д., Фалінська Т.П., Овсяннікова Л.Г., Кутлахмедов Ю.О., Пчеловська С.В. Застосування рослинних тест-систем для оцінки комбінованої дії факторів різної природи: Методичні рекомендації по оцінці допустимих рівнів радіонуклідного та хімічного забруднення за їх комбінованої дії. - Київ: Фітосоціоцентр, 2006. - 60 с.
5. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 240 с.

6. Мамедли С.А., Гродзинский Д.М. Роль типа опыления в проявлении радиационно-индуцированной нестабильности генома у растений.//Доповиди НАН України.-№ 7.- 2007.-С.165-170.

**ALLIUM CEPA L. TOXUMLARINDA BİTKİ MƏNŞƏLİ
PREPARATLARIN GENOMÜDAFIƏ TƏSİRİ**

N.D.SADIXOVA, S.A.MƏMMƏDLİ

XÜLASƏ

Qamma şüaları ilə şüalandırılmış *Allium cepa L.* hüceyrələrində dəmir rutinat və qoz ekstraktının genomüdafiyə təsiri tədqiq olunmuşdur. Soğan toxumlarının əvvəlcədən bu preparatlarla işlənməsi cücərtilərin meristem hüceyrələrində xromosom abberasiyalarını aşağı salmışdır.

Acar sözlər: Allium cepa L., Sophora japonica L., Juglans regia L., toxum, qamma-şüalanma, dəmir rutinat, qoz ekstraktı, xromosom abberasiyaları.

**GENE PROTECTIVE INFLUENCE OF HERBAL PREPARATIONS ON
ALLIUM CEPA L. SEEDS**

N.D.SADIXOVA, S.A.MAMEDLİ

SUMMARY

The gene protective activity of routine and walnut extract at the sharp gamma-irradiation of *Allium cepa L.* seeds was investigated. Preliminary processings of seeds by these preparations resulted in significant decrease of chromosomal aberrations in root apex meristem of onion seedlings received from irradiated seeds.

Key words: Allium cepa L., Sophora japonica L., Juglans regia L., seeds, gamma-irradiation, routines, walnut extract, chromosomal aberrations.