

Д. С. Песня, Д. А. Серов, С. А. Вакорин, И. М. Прохорова

Исследование токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия Борщевика Сосновского

Исследовано влияние водного экстракта Борщевика Сосновского на живые клетки. Использовался метод Allium test. Произведена оценка токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия фактора. Обнаружено, что водный экстракт Борщевика Сосновского ингибирует рост корешков, угнетает митоз, индуцирует хромосомные мутации и вызывает апоптоз. Степень эффектов напрямую зависит от концентрации экстракта.

Ключевые слова: Ана-телофазный анализ, меристематические клетки, хромосомные aberrации, Allium cepa, Allium test, мутации, *Heracleum sosnowskyi*, митотический индекс, гигантский борщевик, генотоксичность, цитогенетика, токсичность.

D. S. Pesnya, D. A. Serov, S. A. Vakorin, I. M. Prokhorova

Research of the Toxic, Mitosis Modifying and Mutagen Effect of *Heracleum Sosnowskyi*

The influence of a water extract of *Heracleum sosnowskyi* on live cells is investigated. The Method Allium test was used. The estimation of the toxic, mitosis modifying and mutagen effect is made. It was revealed that the water extract of *Heracleum Sosnowskyi* inhibits the growth of roots, oppresses mitosis, induces chromosomal mutations and causes apoptosis. The effect degree directly depends on concentration of the extract.

Keywords: an ana-telophase analysis, meristematic cells, chromosomal aberrations, Allium sulfur, Allium test, mutations, *Heracleum sosnowskyi*, a mitotic index, huge *Heracleum*, genotoxicity, cytogenetics, toxicity.

Введение

В настоящее время Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden., сем. *Apiaceae*), наряду с другими гигантскими борщевиками: Борщевиком Мантегацци (*H. mantegazzianum* Manden.) и Персидским (*H. persicum* Manden.) является активным инвазивным видом в Европе. Гигантские борщевики оказывают серьезное негативное воздействие на биоразнообразие, разрушая природные экосистемы, причиняя существенный экономический ущерб и представляя опасность для здоровья людей. Универсальные способы борьбы с ними не разработаны, поэтому данные виды требуют детального изучения [9].

Хорошо известен фототоксический эффект сока различных видов гигантских борщевиков (*H. sosnowskyi*, *H. mantegazzianum*, *H. persicum*) [9]. Данные растения выделяют прозрачный водянистый сок, который содержит фотосенсибилизирующие соединения фуранокумарины. При прикосновении к человеческой коже и под воздействием ультрафиолетового излучения эти соединения активируются и вызывают ожоги [9].

Сок различных видов борщевиков может обладать и другими негативными свойствами. Эксперименты с использованием гидробионта Арте-

мии (*Artemia salina* L.) позволили установить, что экстракты *H. persicum* и *H. sphondylium* обладают сильным токсическим эффектом и в отсутствие фотоактивации и вызывают гибель гидробионтов [8]. В другом исследовании установлено, что экстракт борщевика сибирского (*H. sibiricum* Manden.) обладает мутагенными свойствами в культуре лимфоцитов млекопитающих [4]. В целом, несмотря на остроту проблемы и необходимость всестороннего изучения инвазивных видов, исследования их потенциальной опасности единичны. Генотоксикологические исследования по *H. sosnowskyi* не известны ни в отечественной литературе, ни в зарубежной.

Целью данного исследования являлось изучение токсического и цитогенетического (митозмодифицирующего и мутагенного) действия Борщевика Сосновского.

Материалы и методы исследования

Для изучения действия *H. sosnowskyi* был выбран Allium test, который рекомендован экспертами Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды. Результаты, полученные в данном тесте, хорошо коррелируют с ре-

зультатами тестов на клетках млекопитающих и человека [6]. Объектом исследования в данном тесте является меристема проростков корешков лука посевного – *Allium cepa* сорта Штутгартен-Ризен [2, 6]. Ряд авторов рекомендует использовать *Allium test* для изучения токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия водных экстрактов различных растений [5].

Выбранный тест на растительном организме экономичен, так как на нем (в отличие от микроорганизмов) можно регистрировать все типы генетических повреждений: геномные, хромосомные, генные. Он позволяет выявлять как мутагены, непосредственно повреждающие ДНК, так и промутагены, то есть факторы, генетически безопасные, но приобретающие мутагенную активность в процессе метаболизма в организме [2].

Материал исследования – черешки и листья *H. sosnowskyi*. Растения были собраны с заброшенных полей (Некрасовский район Ярославской области, окр. п. Бурмакино). Сок извлекали прессованием, затем разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:2 для получения водного экстракта. Исходный экстракт имел рН=7. Экстракт разбавляли дистиллированной водой (рН=6,7) для получения различных концентраций. Нами использованы следующие концентрации: 30 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0,5 % и 0,1 %.

Луковицы *A. cepa* высаживали в стаканчики на 25 мл, в которых содержались рабочие растворы. Всего было поставлено семь вариантов опытов в зависимости от концентрации экстракта: 30 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0,5 %; 0,1 % и контроль. Для каждого варианта использовали повторности в соответствии с рекомендациями современного стандарта на проведение экспериментов по методу *Allium test* (по пять луковиц для каждого варианта (n=35) [3]. Луковицы проращивали 4 дня при искусственном освещении, которое не содержало ультрафиолета. Затем у каждой луковицы корни срезали под основание донца.

1. Для оценки токсического действия определяли длину корней. Изменение длины корней в *Allium test* является показателем токсичности изучаемого фактора. Это очень чувствительный показатель, который легко регистрируется визуально и не требует сложной аппаратуры при измерениях, хорошо коррелирует с микроскопическими параметрами и потому предложен в качестве краткосрочного скрининг-теста [6]. Данный тест можно проводить в широком диапазоне рН (3,5–11), в

пределах которого не наблюдается каких-либо эффектов на росте корневой системы *A. cepa* [6].

Измеряли длину каждого корешка. Всего измерено 509 корешков. Определялось среднее арифметическое (\bar{X}) и ошибка среднего (m) для варианта опыта. После измерений корни фиксировали в фиксаторе Кларка [2]. Для цитогенетического анализа готовили препараты (по 10 препаратов на вариант опыта) давленных корневых меристем, согласно методике [2, 3].

2. Показателем митозмодифицирующего действия фактора является митотический индекс (МИ,%) [2]. Определяется как отношение числа делящихся клеток к общему числу проанализированных на препарате клеток [2]. В ходе данного анализа на препаратах под микроскопом просматривали около 700–800 клеток. Среди них подсчитывали количество делящихся клеток, которые находились на разных стадиях митоза и число не делящихся клеток (интерфаз).

Чтобы вскрыть причины изменения митотической активности, анализировали продолжительность каждой фазы митоза и определяли фазные индексы. Фазные индексы (ПИ,% – профазный индекс; МИ,% – метафазный; АИ,% – анафазный; ТИ,% – телофазный) определяются как количество клеток, которые находятся на стадии профазы, метафазы и т. д. к общему количеству проанализированных митозов [2]. Проводили сравнение долей различных фаз в контрольном и опытных вариантах.

3. Мутагенное действие определяли с использованием ана-телофазного анализа [2]. Он позволяет изучать частоту мутаций путем учета суммы хромосомных aberrаций (ХА) и отставаний хромосом (отс.) на стадиях анафазы и телофазы к общей сумме ана-телофаз на препарате ($\Sigma \text{отс.} + \text{ХА}$, %) [2]. Хромосомные aberrации – нарушения структуры хромосом – включают мосты и фрагменты, являющиеся следствием делеций и транслокаций. Отставания хромосом связаны с повреждением веретена деления или с нарушением поведения хромосом на веретене деления [2].

Степень мутагенного эффекта оценивали по ВМЭ (выраженности мутагенного эффекта) [2]. ВМЭ определяется как кратность превышения процента индуцированных мутаций над контрольным значением (спонтанным уровнем) и выражается в баллах. Баллы ВМЭ ранжировали по уровням мутагенного эффекта и классифицировали как сильный, средний, слабый или отсутствие [2].

4. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета “Statistica” (t-test и ANOVA). За уровень значимых принимали значения при $p < 0,05$ (*).

Результаты экспериментов

Токсический эффект *H. sosnowskyi*. Полученные нами данные представлены на рисунке 1 и в таблице 1. Как видно, достоверный токсический эффект регистрируется с 0,5 % концентрации (рис. 1). Начиная с данной концентрации прирост корешков резко уменьшается и становится минимальным при 30 % концентрации. При концентрации 30 % большинство корешков у луковиц темнеют и гибнут. Кроме того, в опытных образцах отмечались корни с таким изгибом, что их апикальная часть начинала выходить из воды и в

итоге засыхала. Альберт Леван – создатель метода Allium test – писал, что подобное явление связано с токсическим действием некоторых соединений [7].

А. П. Дубровин также регистрировал угнетение роста корней у других растений: огурцов, кукурузы и кабачков, семена которых проращивал на водной вытяжке из семян *H. sosnowskyi* [1]. Эксперименты А. П. Дубровина и наши опыты на *A. cepa* позволяют предполагать, что различные органы *H. sosnowskyi* выделяют в окружающую среду физиологически активные вещества – колины, которые оказывают регулирующее действие (в данном случае угнетающее) на рост и развитие других растений [1].

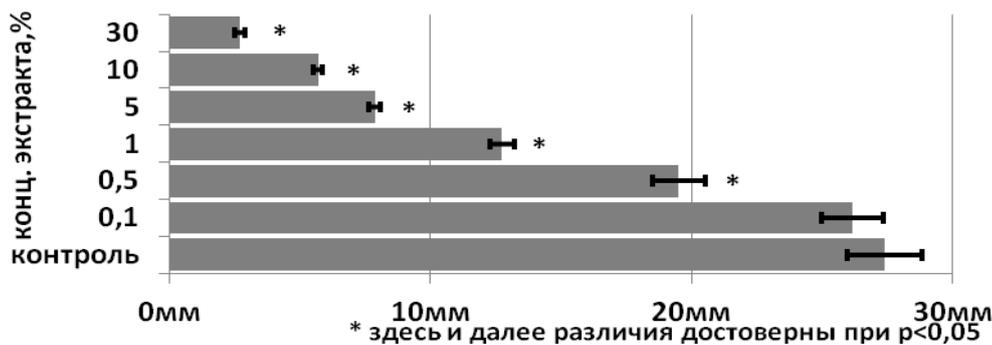


Рис. 1. Средняя длина корешков (мм) в контроле и после воздействия различных концентраций экстракта *H. sosnowskyi*

Митозмодифицирующий эффект *H. sosnowskyi*. Одной из ведущих причин подавления роста корней может являться угнетение деления клеток, то есть митотоксичность. Анализ митотической активности позволил установить, что достоверный

митотоксический эффект начинается с концентрации 1 % и усиливается с ростом концентрации (рис. 2, табл. 1). При этом доля клеток, которые находятся в митозе, резко падает.

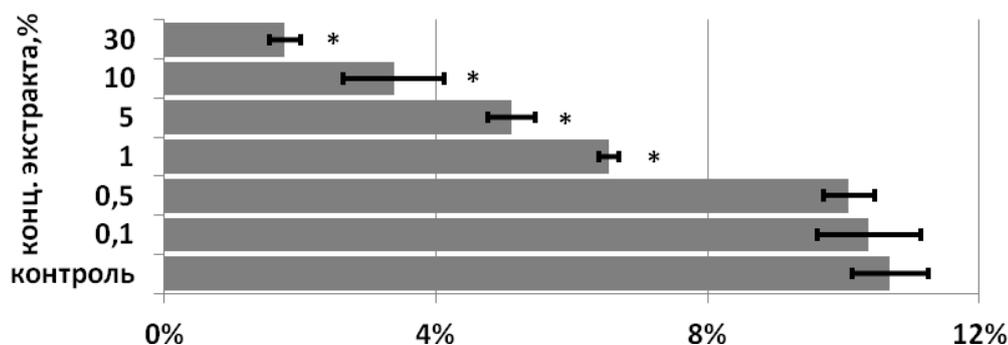


Рис. 2. Значение митотического индекса (МИ, %) в контроле и после воздействия различных концентраций экстракта *H. sosnowskyi*

Для выявления причин митотоксического эффекта нами проведено сравнение фазных индексов в контрольных и опытных вариантах (рис. 3, табл. 1). При низких концентрациях (0,1–0,5 %) водного экстракта *H. sosnowskyi* доля профаз, то есть клеток, которые вступили в митоз, достаточно большая и не отличается от контрольного уровня (рис. 3, табл. 1). При этом другие фазные индексы не претерпевают значительных изменений. Следовательно, ингибирование корневого прироста у *A. сера* при низких концентрациях (см. рис. 1.) вызвано не угнетением митотической активности клеток, а другими причинами, например, апоптозом. При средних концентрациях (1–5 %) происходит резкое падение профазного индекса, то есть уменьшается доля клеток, вступивших в первую фазу митоза (рис. 3, табл. 1). Это означает, что при данных кон-

центрациях основным действием фактора является угнетение митотической активности. При средних концентрациях происходит повышение метафазного индекса, что может быть вызвано действием фактора на веретено деления. При высоких концентрациях (10–30 %) наблюдается повышение доли клеток, вступивших в профазу (профазный индекс растет) (рис. 3, табл. 1). Но это кажущееся благополучие, поскольку при данной концентрации зарегистрирован максимальный митотоксический эффект. Видимо, деление вошедших в митоз клеток останавливается на стадии профазы, и поэтому число зарегистрированных профаз соответствует контрольному уровню. А те клетки, которые прошли стадию профазы, останавливаются в телофазе, чему соответствует повышение доли телофаз (рис. 3, табл. 1).

Таблица 1

Данные по средней длине корешков, значению митотического и фазных индексов в контроле и при различных концентрациях экстракта *H. sosnowskyi*

вариант опыта	Средняя длина, мм	МИ, %	ПИ, %	МИ, %	АИ, %	ТИ, %	
контроль	27,4±1,4	10,7±0,6	65,5±1,8	20,2±1,6	9,6±1,8	9,9±0,5	
Конц. экстракта %	0,1	26,2±1,2	10,4±0,8	66,3±1,0	21,1±1,5	11,5±1,4	12,7±0,9*
	0,5	19,5±1,0*	10,1±0,4	65,6±3,2	18,8±1,9	9,8±2,3	15,6±4,2
	1	12,7±0,5*	6,5±0,1*	50,9±1,7*	25,8±2,9	12,7±1,5	12,4±2,0
	5	7,9±0,2*	5,1±0,4*	47,7±1,7*	27,9±2,3*	12,9±2,4	11,4±2,0
	10	5,7±0,2*	3,4±0,8*	56,3±6,1	13,9±6,2	8,2±2,9	21,6±4,6*
	30	2,7±0,2*	1,8±0,2*	64,9±0,6	18,9±0,7	13,6±1,0	16,2±0,1*

Таким образом, фазные индексы свидетельствуют о том, что фактор нарушает процессы, которые происходят в интерфазу при подготовке клетки к делению (синтез белка,

репликация ДНК и т. д.). Степень нарушений такова, что клетка не вступает в митоз. Изменения в клетках, которые вступили в митоз, определяются уже иной активностью фактора.

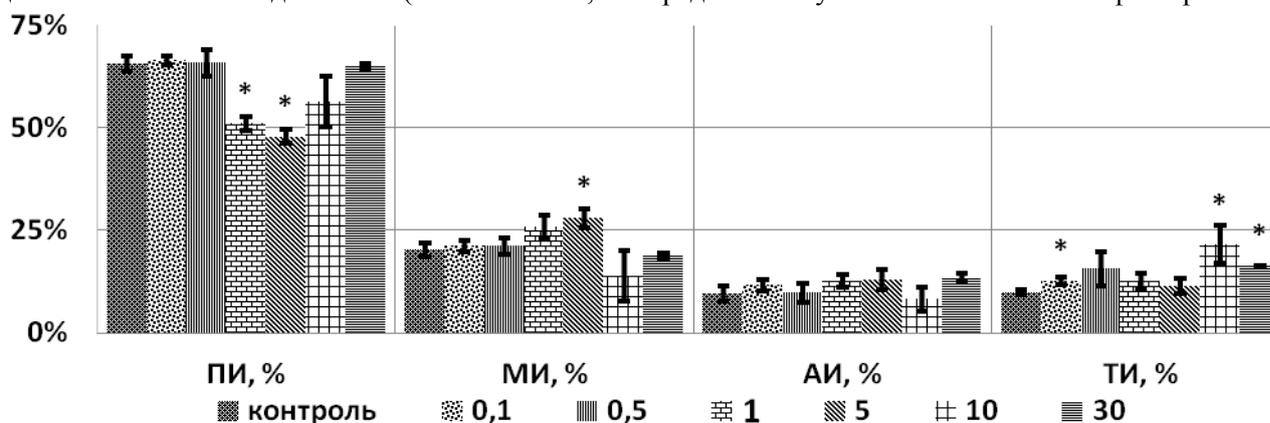


Рис. 3. Соотношение фазных индексов в контроле и после воздействия различных концентраций экстракта *H. sosnowskyi*

Мутагенный эффект *H. sosnowskyi*

Ана-телофазный анализ позволил зарегистрировать повышение частоты хромосомных aberrаций и отставаний в меристемах *A. sepa*. при увеличении концентрации экстракта (рис. 4, табл. 2). Достоверный мутагенный эффект, как и в случае угнетения корневого прироста, отмечается с концентрации 0,5 % и достигает максимума при концентрации 30 %. Одной из причин может быть то, что при концентрации 0,5 % угнетение корневого прироста вызвано апоптозом, то есть гибелью клеток. При средних концентрациях, вероятно, апоптоз также имеет место, но, помимо него, отмечается и угнетение деления

клеток, что показывают фазные индексы. При высоких концентрациях выражены и накладываются друг на друга оба эффекта, что в итоге приводит к гибели корневых меристем *A. sepa*.

Таким образом, токсический эффект – угнетение корневого прироста – связан не только с угнетением процесса деления клеток, но и с процессами апоптоза. Среди хромосомных нарушений подавляющее большинство составляют отставания хромосом, что свидетельствует о повреждении веретена деления или повреждении в прицентромерной области хромосом.

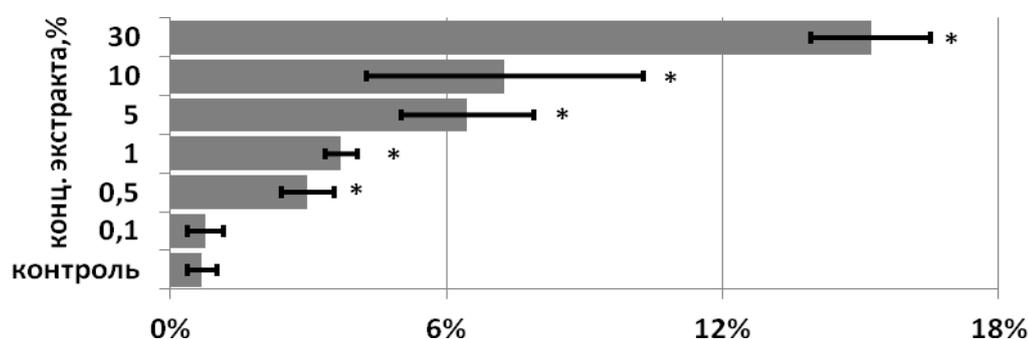


Рис. 4. Частота хромосомных aberrаций и отставаний (Σотс.+ХА, %) при различных концентрациях экстракта *H. sosnowskyi* и в контроле

ВМА и уровни мутагенного эффекта представлены в таблице 2. При концентрации 0,1 % частота хромосомных aberrаций и отставаний не отличалась от контрольного уровня. При концентрации 0,5 % наблюдалось повышение данного показателя в 4 раза по сравнению с

контрольным уровнем, что соответствует слабому уровню мутагенного эффекта (МЭ). При концентрациях 1–5 % превышение было уже в 5–9 раз (средний уровень МЭ). При концентрациях 10–30 % соответственно в 10–22 раза (сильный уровень МЭ).

Таблица 2

Данные по частоте хромосомных aberrаций и отставаний (Σотс.+ХА, %) и уровням мутагенного эффекта

вариант опыта	Σотс.+ХА, %	ВМЭ, балл	Уровень МЭ	
контроль	0,7±0,6	0	отсутствует	
Конц. экстракта, %	0,1	0,8±0,4		0
	0,5	3,0±0,6*	4	слабый
	1	3,7±0,4*	5	средний
	5	6,5±1,4*	9	
	10	7,3±3,0*	10	сильный
	30	15,2±1,3*	22	

Таким образом, уровень мутагенного эффекта напрямую зависит от применяемой в опыте концентрации водного экстракта *H. sosnowskyi*.

Результаты данного исследования необходимо принять во внимание и в отношении человека. Это связано, прежде всего, с тем, что структура и функции (хранение, реализация и передача наследственной информации) генного аппарата одинаковы у всех эукариот. Кроме того, для данного биотеста показана высокая корреляция с тестами на культуре клеток человека. Следовательно, обнаруженный в данном исследовании генотоксический эффект является индикатором того, что водный экстракт *H. sosnowskyi* (в отсутствие фотоактивации) может проявить генотоксическую активность и в отношении клеток человека.

Выводы

1. Водный экстракт Борщевика Сосновского угнетает прирост корешков у *A. cepa*. Степень угнетения прямо пропорциональна дозе и достигает 90 %. Следовательно, водный экстракт Борщевика Сосновского обладает токсической активностью.

2. Водный экстракт Борщевика Сосновского угнетает митотическую активность корневых меристем *A. cepa*. Степень угнетения зависит от дозы и достигает 83 %. Следовательно, водный экстракт Борщевика Сосновского обладает митотоксической активностью.

3. Митотоксический эффект связан как с индукцией апоптоза и гибелью клеток, так и с угнетением деления клеток, которое происходит из-за нарушений в интерфазу при подготовке клетки к делению.

4. Водный экстракт Борщевика Сосновского вызывает хромосомные мутации и увеличивает частоту хромосомных aberrаций и отставаний, которая превышает контрольный уровень до 22 раз. Уровень мутагенного эффекта классифицируется как сильный. Следовательно, водный экстракт Борщевика Сосновского обладает мутагенной активностью. Степень мутагенного эффекта прямо пропорциональна дозе.

Allium test может быть рекомендован для оценки токсического, митозмодифицирующего и мутагенного потенциала растительных организмов.

Библиографический список

1. Дубровин, А. П. Биотестирование активности водорастворимых веществ, содержащихся в плодах *Heracleum Sosnowskyi* Manden [Текст] / А. П. Дубровин // Вест. Московск. Обл. Ун. – 2009. – № 1. – С. 56–59.

2. Прохорова, И. М., Ковалева, М. И., Фомичева А. Н., Бабаназарова, О. В. Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз. Неро [Текст] / И. М. Прохорова и др. – Биология внутренних вод; Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина РАН, – М.: Наука, 2008. – 59 с.

3. Barberrio A., Voltolini J. C., Mello M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the Allium test [Text] / A. Barberrio, J. C. Voltolini, M. L. S. Mello // *Ecotoxicology*. – 2011. – Vol. 20. – P. 927–935.

4. Bogucka-Kocka A., Rulka Ja., Kocki Ja., Kubis P., Buzala E. Bergapten of *Heracleum sibiricum* apoptosis induction in blood lymphocytes of cattle [Text] / A. Bogucka-Kocka, Ja. Rulka, Ja. Kocki, P. Kubis, E. Buzala // *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. – 2004. – Vol. 48 – P. 99–103.

5. De Souza L.F.B., Laughinghouse IV H.D., Pastori T., Tedesco M. Genotoxic potential of aqueous extracts of

Artemisia verlotorum on the cell cycle of *Allium cepa* [Text] / L.F.B. De Souza, H.D. Laughinghouse IV, T. Pastori, M. Tedesco // *Int. J. of Environ. Stud.* – 2010. – Vol. 67. – P. 871–877.

6. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring [Text] / G. Fiskesjo // *Hereditas*. – 1985. – Vol. 102. – P. 99–112.

7. Levan A. The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the Allium test [Text] / A. Levan // *Hereditas*. – 1949. – Vol. 35. – P. 325–337.

8. Mosham M. H., Sharififar F., Dehghana G.-R., Ameri A. Bioassay screening of the various extracts of fruits of *Heracleum Persicum* desf. using brine shrimp cytotoxicity assay [Text] / M. H. Mosham, F. Sharififar, G.-R. Dehghana, A. Ameri // *Iranian J. of Pharmac. Res.* – 2009. – Vol. 8(1). – P. 59–63.

9. Nielsen C., Ravn H.P., Nentwig W., Wade M. The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe [Text] / C. Nielsen, H.P. Ravn, W. Nentwig, M. Wade // *Forest & Landscape. Denmark. Hoersholm*. – 2005. 44 p.