

УДК 576.312.36

**Бахшалиева Н.З., Бабаев М.Ш., Фарзалиев В.М.,
Аллахвердиев М.А., Рзаева И.А.**

**АНТИМУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА
НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ У СЕМЯН ПШЕНИЦЫ
РАЗНЫХ СОРТОВ, ХРАНИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ОЗОНА***

Аннотация. Проведена оценка антимутагенной активности ряда синтетических антиоксидантов в отношении мутационного процесса, индуцированного озоном у семян пшеницы 2 сортов – А 2992 КА и А 4412 ВХ. Установлены наиболее эффективные концентрации испытываемых соединений.

Ключевые слова: озон, антиоксидант, семена, пшеница, абберрации хромосом.

N. Bakhshalieva, M. Babaev, V. Farzaliev, M. Allakhverdiyev, I. Rzaeva
ANTIMUTAGEN ACTIVITY OF SOME SYNTHETIC ANTIOXIDANTS IN SEEDS
OF WHEAT WHICH WERE KEPT UNDER CONDITIONS OF OZONE

Abstract. It is lead an estimation of antimutagen activity of some synthetic antioxidants concerning the mutational process induced by ozone in seeds of wheat. The most effective concentration of tested solutions was established.

Key words: ozone, antioxidant, seeds, wheat, the aberration of chromosomes.

Введение

Биосфера Земли в настоящее время подвергается нарастающему антропогенному воздействию. При этом можно выделить несколько наиболее существенных процессов, любой из которых не улучшает экологическую ситуацию на планете.

Наиболее масштабным и значительным является химическое загрязнение среды несвойственными ей веществами химической природы. Среди них – газообразные и аэрозольные загрязнители промышленно-бытового происхождения [1].

Учитывать влияние окружающей среды на наследственность живых организмов крайне необходимо ввиду того, что мутационная изменчивость ведет к наследственной патологии. Влияние мутагенов среды на генетический аппарат человека и других организмов имеет сложный, комплексный характер. Чтобы понять характер и размеры этих влияний, нарушающих жизнедеятельность организмов и эволюцию живого, осознать их генетические последствия, необходимо всесторонне оценить роль нарушений наследственного аппарата организмов под действием мутагенов среды и значение способов защиты от повреждений ДНК, в которой записаны генетические программы организмов [2]. Управление процессами устойчивости организмов с помощью антимутагенов считается на сегодняшний день одним из наиболее радикальных и перспективных путей поддержания на оптимальном уровне частоты спонтанных мутаций и коррекции индуцированного мутагенеза.

На сегодняшний день при существующем уровне загрязнения окружающей среды различными физическими и химическими факторами, в том числе озоном, поиск новых высокоэффективных антиоксидантов для защиты организмов особенно актуален. Озон – сильнейший окислитель в приземном воздухе, относится к веществам наивысшего класса опасности и превосходит по токсичности цианистый газ. Механизм его биологического

* © Бахшалиева Н.З., Бабаев М.Ш., Фарзалиев В.М., Аллаxвердиев М.А., Рзаева И.А.

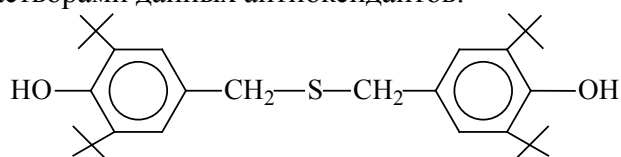
действия, по крайней мере – частично, по-видимому, включает участие радикалов [3]. В атмосфере озон образуется на свету при реакции оксидов азота с углеводородами.

Он возникает во время грозы, при ударе молнии, работе рентгеновского оборудования, его запах можно ощутить возле работающего копировального оборудования. В загрязненном оксидами озона воздухе под действием солнечных лучей образуется озон, способствующий образованию опасного явления, называемого фотохимическим смогом [4]. Озон в тропосфере снижает продуктивность сельскохозяйственных культур. Механизм воздействия озона на биологические объекты на генетическом уровне не выяснен до конца. Необходимы также фундаментальные исследования, направленные на изучение механизма генозащитного действия антиоксидантов. Этим вопросам и посвящено настоящее исследование.

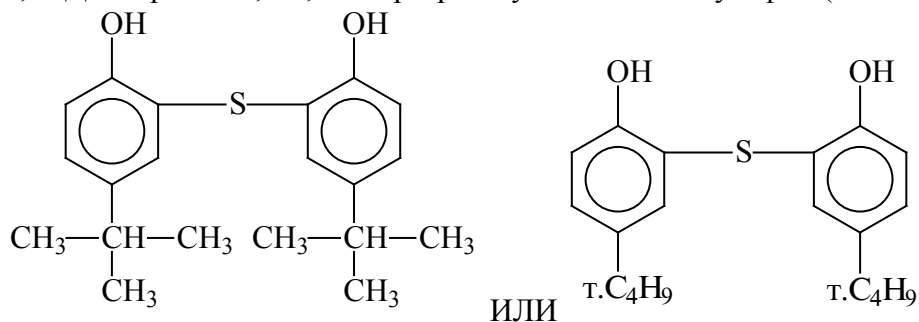
Материал и методика

Объектом исследования служила важнейшая сельскохозяйственная культура – пшеница. Работа проводилась на свежих семенах 2 сортов пшеницы – А 2992 КА и А 4412 ВХ (урожай 2009 г.). Семена хранились в условиях озона 15 минут при постоянной дозе озона (1,3 мг/л). В опытах был использован озонатор, созданный в отделе физико-биологических систем института физических проблем при БГУ [5]. В работе использовались четыре новосинтезированных на кафедре органической химии химического факультета БГУ антиоксиданта, любезно предоставленные нам для исследований в качестве высокоэффективных антимуtagens.

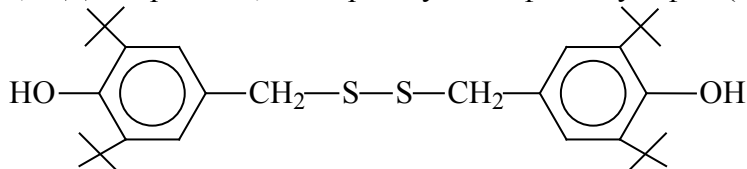
Хранившиеся в условиях озона семена далее обрабатывались свежеприготовленными растворами данных антиоксидантов:



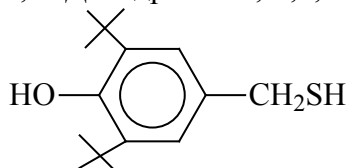
1,1'-Дигидрокси-2,2',6,6'-тетратерьбутилдобензилсульфид (соединение I);



1,1'-Дигидрокси-4,4'-дитерьбутилдифенилсульфид (соединение II)



1,1'-Дигидрокси-2,2',6,6'-тетратерьбутилдобензилдисульфид (соединение III)



1-Гидрокси-2,6-дитретьютилбензилмеркаптан (соединение IV)

в течение 20 часов при комнатной температуре. Это производные ароматических фенолов, плохо растворяющиеся в воде и хорошо растворяющиеся в спирте. Использовались 0,1%, 0,1%, 0,001%, 0,0001%, 0,25% и 0,5% концентрации антиоксидантов.

По истечении времени обработки антиоксидантами семена промывали проточной водопроводной водой в течение 20 минут и помещали в чашки Петри для проращивания в термостате при температуре 24-25°C.

Далее проростки (0,8-1,0 см) фиксировали в смеси этилового спирта в уксусной кислоте (3:1). Корневую меристему окрашивали ацетокармином и готовили временные давленные препараты. Анализировали частоту aberrаций хромосом в клетках апикальной меристемы проростков семян пшеницы, а также уровень клеточной пролиферации. Контролями служили интактные семена, проращиваемые на воде. Все экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами математической статистики [6].

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследования представлены в виде таблиц и графиков. В таблицах 1, 2, 3 и 4 приведены результаты изучения модификации антиоксидантами мутационного процесса, индуцированного озоном в клетках апикальной меристемы проростков семян пшеницы сорта А2992 КА.

Из полученных данных видно, что обработка семян соединением I после их хранения в озоновой среде значительно снижает частоту aberrаций, индуцированных испытываемой дозой озона (табл. 1).

Таблица 1

Влияние разных концентраций 1,1'-Дигидрокси-2,2',6,6'-тетратретьютилдобензилсульфида на частоту структурных перестроек в клетках семян пшеницы сорта А 2992 КА, хранившихся в среде озона разные сроки

Варианты опыта	Изучено		Измененные анафазы		P	ФЭА
	корешков	анафаз	число	% ± m		
Контроль	10	702	24	3,42 ± 0,68	-	-
O ₃	10	594	35	5,89 ± 0,96	< 0,001	
O ₃ + 0,0001 %	10	570	26	4,56 ± 0,87	< 0,01	0,33
O ₃ + 0,001 %	10	693	25	3,61 ± 0,71	< 0,001	0,05
O ₃ + 0,01 %	10	602	19	3,15 ± 0,71	< 0,05	0,08
O ₃ + 0,1%	10	670	20	2,98 ± 0,65	< 0,05	0,13
O ₃ + 0,25 %	10	633	28	4,42 ± 0,82	< 0,01	0,29
O ₃ + 0,5 %	10	525	23	4,38 ± 0,89	< 0,01	0,28

В этих случаях более низкая концентрация соединения I вызывает и наибольшее снижение частоты хромосомных aberrаций. Так, под действием 0,1% раствора соединения I частота aberrаций хромосом, индуцированных озоном в дозе 1,3 мг/л, составляла 2,98±0,65 %, тогда как в том же озонированном варианте без последующей обработки соединением I она достигала 5,89±0,96 %. Следует отметить, что 0,01% концентрация соединения I также эффективно снижала частоту aberrаций хромосом почти в 2 раза (3,15±0,71%). Однако при высоких концентрациях соединения I не наблюдалось снижения частоты спонтанного мутирования по сравнению с индуцированной озоном частотой aberrаций хромосом.

При обработке семян соединением II после хранения их в озоновой среде также наблюдалось снижение частоты aberrаций, индуцированных испытываемой дозой озона (таблица 2). Так, 0,1% раствор соединения II снижал частоту aberrаций хромосом до значения $3,18 \pm 0,65$ %, в то время как в варианте без обработки соединением II эта частота составляла $5,89 \pm 0,96$ %. Отметим, что 0,01% концентрация соединения II также снижала частоту aberrаций хромосом ($3,51 \pm 0,69$ %). Как видно из табл. 2, при высоких концентрациях соединения II не наблюдалось снижения частоты индуцированных озоном хромосомных aberrаций.

Таблица 2

Влияние разных концентраций 1,1'-Дигидрокси-4,4'-дитретьютилдифенилсульфида на частоту структурных перестроек в клетках семян пшеницы сорта А 2992КА, хранившихся в среде озона разные сроки

Варианты опыта	Изучено		Измененные анафазы		P	ФЭА
	корешков	анафаз	число	% ± m		
Контроль	10	702	24	$3,42 \pm 0,68$	-	-
O ₃	10	594	35	$5,89 \pm 0,96$	< 0,001	-
O ₃ + 0,0001 %	10	455	24	$5,27 \pm 1,04$	< 0,001	0,54
O ₃ + 0,001 %	10	621	27	$4,35 \pm 0,82$	< 0,01	0,27
O ₃ + 0,01 %	10	711	25	$3,51 \pm 0,69$	< 0,01	0,03
O ₃ + 0,1%	10	723	23	$3,18 \pm 0,65$	< 0,05	0,07
O ₃ + 0,25 %	10	702	27	$3,84 \pm 0,72$	< 0,01	0,12
O ₃ + 0,5 %	10	533	24	$4,5 \pm 0,89$	< 0,01	0,31

Соединения III и IV также обладают антимуtagenной активностью. Снижение частоты aberrаций хромосом при обработке соединением III наблюдалось в случае применения 0,1% ($3,15 \pm 0,64$ %) и 0,01% ($3,61 \pm 0,69$ %) растворов антиоксиданта (табл. 3). Аналогично, обработка семян, хранившихся в условиях озона, соединением IV снижала частоту aberrаций в концентрациях 0,1% ($2,49 \pm 0,59$ %) и 0,01% ($3,28 \pm 0,67$ %) (табл. 4). Согласно полученным данным, высокие концентрации испытываемых антиоксидантов не снижали частоту индуцированных озоном хромосомных aberrаций.

Таблица 3

Влияние разных концентраций 1,1'-Дигидрокси-2,2',6,6'-тетратретьютилдибензилдисульфида на частоту структурных перестроек в клетках семян пшеницы сорта А 2992 КА, хранившихся в среде озона разные сроки

Варианты опыта	Изучено		Измененные анафазы		P	ФЭА
	корешков	анафаз	число	% ± m		
Контроль	10	702	24	$3,42 \pm 0,68$	-	-
O ₃	10	594	35	$5,89 \pm 0,96$	< 0,001	-
O ₃ + 0,0001 %	10	619	29	$4,68 \pm 0,85$	< 0,01	0,37
O ₃ + 0,001 %	10	688	29	$4,21 \pm 0,76$	< 0,01	0,23
O ₃ + 0,01 %	10	719	26	$3,61 \pm 0,69$	< 0,01	0,05
O ₃ + 0,1%	10	730	23	$3,15 \pm 0,64$	< 0,05	0,08
O ₃ + 0,25 %	10	727	34	$4,67 \pm 0,78$	< 0,01	0,36
O ₃ + 0,5 %	10	654	29	$4,43 \pm 0,8$	< 0,01	0,29

Таблица 4

Влияние разных концентраций 1-Гидрокси-2,6-дитретьютилбензилмеркаптана на частоту структурных перестроек в клетках семян пшеницы сорта А 2992 КА, хранившихся в среде озона разные сроки

Варианты опыта	Изучено		Измененные анафазы		Р	ФЭА
	корешков	анафаз	число	% ± m		
Контроль	10	702	24	3,42 ± 0,68	-	-
O ₃	10	594	35	5,89 ± 0,96	< 0,001	
O ₃ + 0,0001 %	10	703	25	3,55 ± 0,69	< 0,01	0,04
O ₃ + 0,001 %	10	727	29	3,99 ± 0,72	< 0,01	0,16
O ₃ + 0,01 %	10	700	23	3,28 ± 0,67	< 0,05	0,04
O ₃ + 0,1%	10	681	17	2,49 ± 0,59	< 0,05	0,27
O ₃ + 0,25 %	10	591	24	4,06 ± 0,81	< 0,01	0,19
O ₃ + 0,5 %	10	602	26	4,32 ± 0,83	< 0,01	0,26

Результаты оценки антимуtagenной активности испытываемых соединений на пшенице сорта А 4412 ВХ приводятся на рисунках 1, 2, 3 и 4. Как видно из этих данных, результаты аналогичны полученным ранее. Так, соединение I при обработке им семян сорта А 4412 ВХ, хранившихся в условиях озона, значительно снижает частоту aberrаций хромосом (рис. 1). Если в варианте без обработки антиоксидантом частота aberrаций составляла 5,31±0,91%, то после обработки 0,1% раствором соединения I эта частота падала до 2,74±0,63%. Эффективность проявляла также 0,01% концентрация антиоксиданта (3,14±0,74%). Отметим, что как и в случае с предыдущим сортом пшеницы сорта А 2992 КА, более высокие концентрации антиоксиданта не проявили существенной антимуtagenной активности при обработке ими семян, хранившихся в условиях озона.

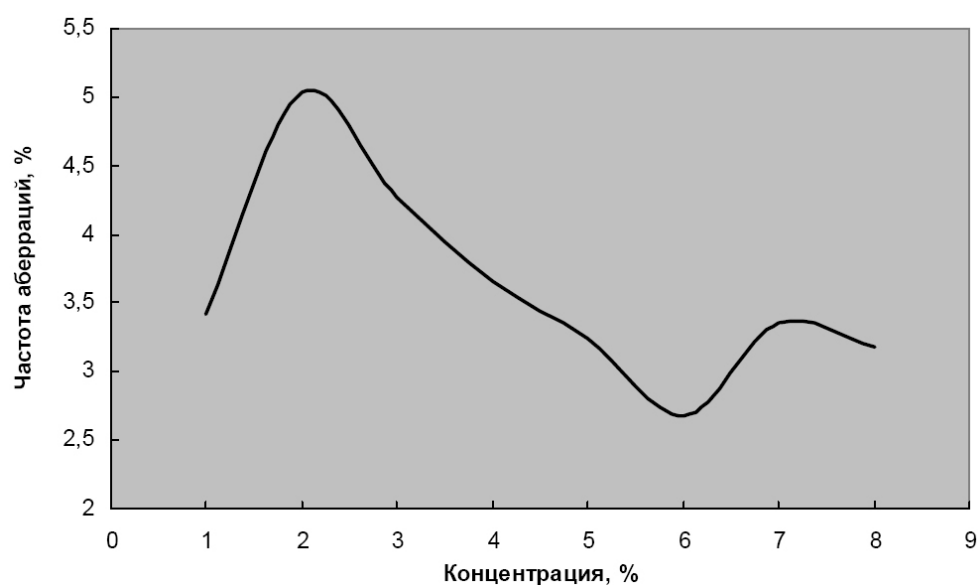


Рис. 1. Антимуtagenная активность 1,1'-Дигидрокси-2,2'6,6'-тетратретьютилдибензилсульфида у корешков семян пшеницы сорта А 4412 ВХ, хранившихся в среде озона (15 минут)

Обработка семян, хранившихся в условиях озона, соединением II наиболее эффективно снижала частоту индуцированных перестроек хромосом в концентрациях 0,1% ($2,77 \pm 0,61\%$) и 0,01% ($3,53 \pm 0,69\%$) (рис. 2).

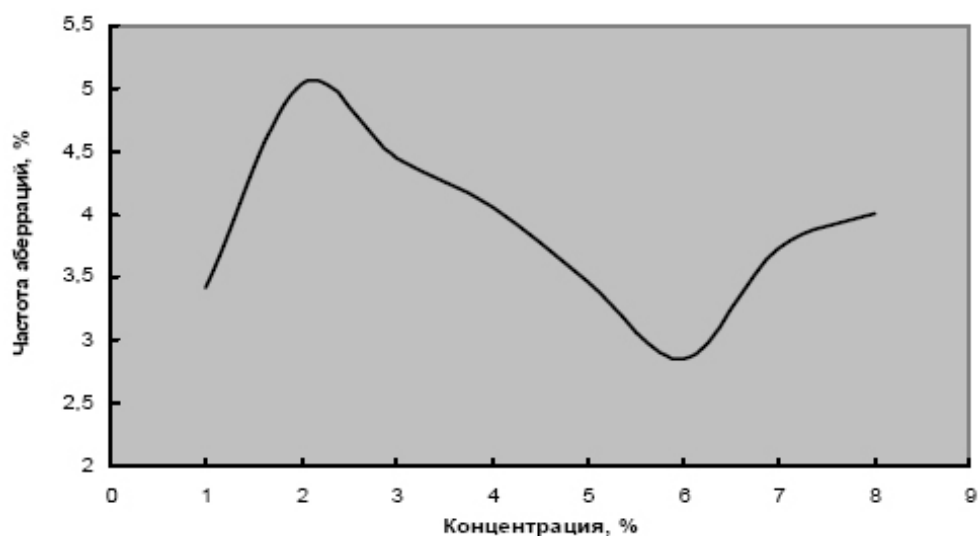


Рис. 2. Антимутагенная активность 1,1'- Дигидрокси-4,4'- дитретьютилдифенилсульфида у корешков семян пшеницы сорта А 4412 ВХ, хранившихся в среде озона (15 мин.)

Аналогично, в случае применения соединений III и IV мы наблюдали антимутагенное действие испытываемых соединений в отношении мутационного процесса, индуцированного у семян пшеницы озонем. Наибольшее снижение частоты хромосомных аббераций у семян пшеницы сорта А 4412 ВХ при обработке соединением III было отмечено в случае применения 0,1% и 0,01% концентраций антиоксиданта (рис. 3).

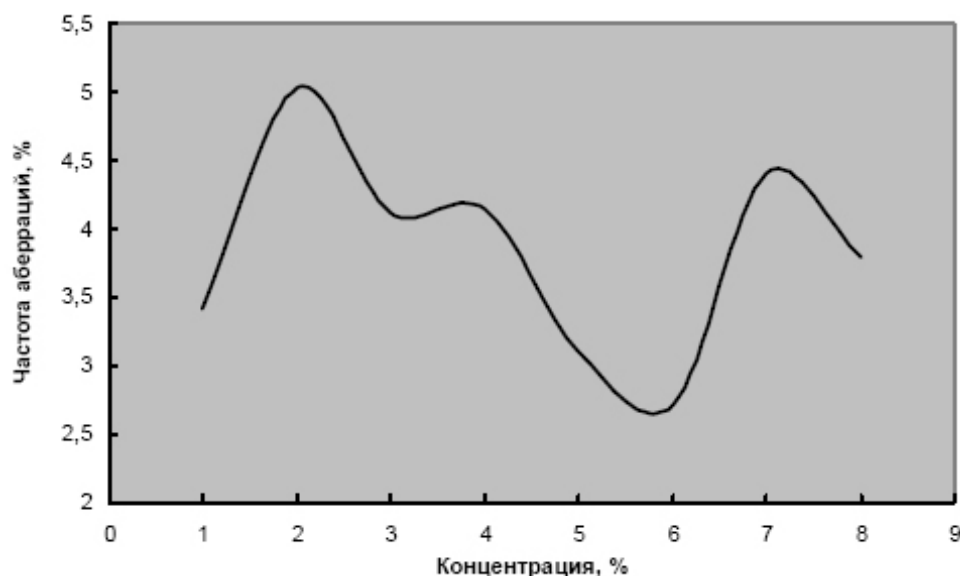


Рис. 3. Антимутагенная активность 1,1'-Дигидрокси-2,2',6,6'-тетратретьютилдипенилдисульфид у корешков семян пшеницы сорта А 4412 ВХ, хранившихся в среде озона (15 мин.)

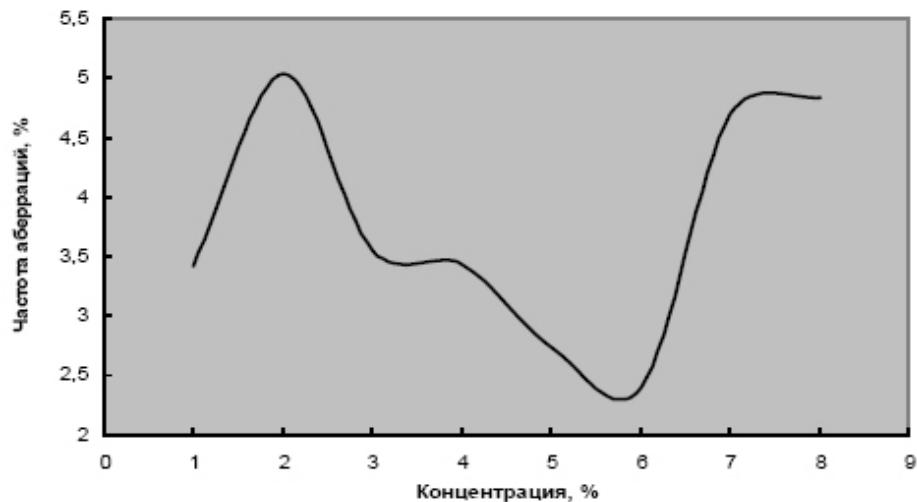


Рис. 4. Антимутагенная активность 1-Гидрокси-2,6-дитретьбутилбензилмеркаптана у корешков семян пшеницы сорта А 4412 ВХ, хранившихся в среде озона (15 мин.)

Активность соединения IV показана на рисунке 4 – если в варианте без обработки антиоксидантом частота хромосомных аббераций составляла $5,31 \pm 0,91\%$, то последующая обработка семян соединением IV достоверно снизила этот показатель и оказалась наиболее эффективной при 0,1% ($2,29 \pm 0,56\%$) и 0,01% ($2,66 \pm 0,59\%$) концентрациях испытываемого антиоксиданта.

Таким образом, нами было проведено исследование антимутагенных свойств четырех синтетических антиоксидантов и обнаружено, что каждый из них обладает антимутагенной активностью в отношении мутационного процесса, индуцированного у семян пшеницы разных сортов озоном. Исходя из полученных данных, следует отметить, что все испытываемые антиоксиданты при 0,1 и 0,01% концентрациях оказались наиболее эффективными. Для установления универсальности антимутагенного действия этих концентраций испытываемых антиоксидантов считаем целесообразным испытать их и на других биологических объектах.

Выводы

1. При изучении антимутагенных свойств испытываемых антиоксидантов не было выявлено особой сортозависимости.
2. При обработке семян пшеницы разных сортов различными концентрациями соединений I, II, III и IV после воздействия озоном в дозе 1,3 мг/л, наибольшую антимутагенную активность проявляли 0,1 и 0,01%-ные концентрации испытываемых антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Садовникова Л.К., Орлов Д.С., Лозановская И.Н. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении. М.: Высшая школа, 2008.
2. Клаг У.С., Каммингс М.Р. Основы генетики. М.: Изд. Техносфера РИЦ ЗАО, 2009.
3. Бабаев М.Ш., Бахшалиева Н.З. Влияние антиоксидантов на частоту аббераций хромосом, индуцированных озоном у семян пшеницы разных сортов. Вестник, Серия естественных наук. 2009. № 4. С.53-60.
4. Векслер И. Экологические катаклизмы: опасности реальные и мнимые. Вестник Бакинского Университета... 1998. № 14(195). С. 35-38.
5. Бахшалиева Н.З., Бабаев М.Ш., Давудов Б.Б. Влияние озона на частоту аббераций хромосом у семян пшеницы в зависимости от времени его экспозиции // Успехи современного естествознания. М., 2009. № 5. С.11-14.
6. Васильева Л.А. Статистические методы в биологии: Учебное пособие. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. 2004.