

*А. И. Ольшевский*

*Науч. рук.: И. И. Концевая, канд. биол. наук, доцент*

## **ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ АЗИТРОМИЦИНА НА ОСНОВАНИИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА В ALLIUM ТЕСТЕ**

*Оценка генотоксичных эффектов азитромицина с помощью микроядерного теста в клетках образовательной ткани лука обыкновенного показала увеличение клеток с микроядрами в 2,0 и 1,3 раза в вариантах использования антибиотика в концентрациях 50,0 и 100,0 мг/л, соответственно. При повышении концентрации тестируемого антибиотика с 300,0 до 1000,0 мг/л наблюдали уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем либо сопоставимые с ним значения.*

Микроядра считаются маркерами генотоксического влияния разных веществ, но кроме того являются индикаторами геномной нестабильности, поскольку наличие микроядер существенно больше в опухолевых клетках, а также в клетках с дефектной системой репарации ДНК либо в клетках с разрушением механизма контрольной точки клеточного цикла [1].

В контексте исследования генотоксической активности микроядерный тест является одним из наиболее чувствительных и хорошо воспроизводимых методов. Микроядерный тест позволяет обеспечить быструю и информативную диагностику кластогенных, анеугенных и цитотоксических эффектов [2]. Формирование микроядер может происходить спонтанно или быть инициировано воздействием внешних факторов [3]. Разработаны методики учета микроядер в клетках разных тканей, органов, организмов, в том числе полиорганный микроядерный тест [4].

Цель работы: оценить генотоксичность азитромицина с помощью микроядерного теста.

Данный опыт был поставлен на луковицах лука обыкновенного сорт «Штуттгартен», которые были приобретены в специализированном магазине. Для исследования ответных реакций растений лука обыкновенного на действие водных растворов азитромицина была выбрана модифицированная версия Allium теста [5]. В качестве

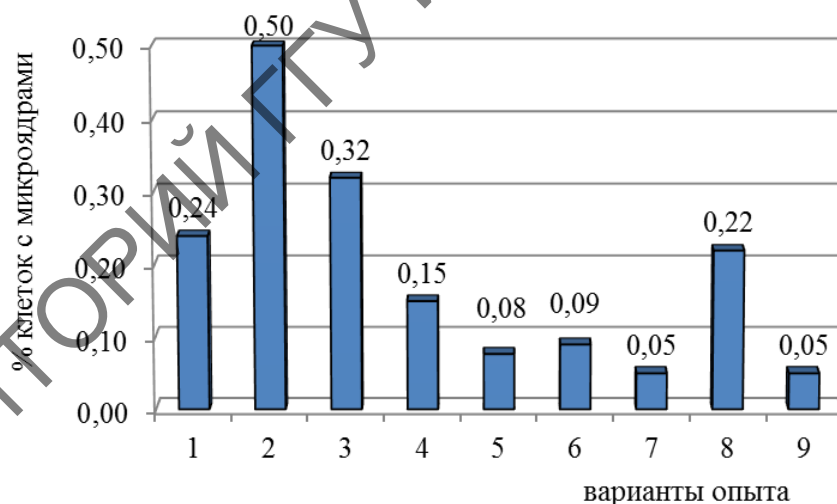
контроля использовали дистиллированную воду, так же на ее основе готовили и растворы антибиотика. Воду и растворы для обеспечения аэрации в опыте меняли каждые 24 часа.

Для данного эксперимента в качестве тестируемого антибиотика был выбран азитромицин (в виде азитромицина дигидрата) (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Концентрации в мг/л указаны на рисунке 1. Для высоких концентраций азитромицина (300–1000 мг/л) применяли дополнительный восстановительный период [6] длительностью в 48 часов. Давленные препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по общепринятой методике [7].

Анализировали по 10–30 проростков в варианте. Просмотр препаратов осуществляли на компьютеризированной кариологической станции, оснащенной световым микроскопом Olympus BX-40 при увеличении 40 x 10. По каждому варианту было просмотрено не менее 10 000 клеток.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с помощью пакета прикладного программного обеспечения Microsoft Excel.

При анализе данных выборки, полученных на интерфазных клетках, выявлено наличие микроядер в контрольном варианте, число клеток с микроядрами достигало 0,24 % (рисунок 1).



1 – контроль (вода дистиллированная); 2 – азитромицин, 50 мг/л;  
3 – азитромицин, 100 мг/л; 4 – азитромицин, 300 мг/л; 5 – восстановительный период после варианта № 4; 6 – азитромицин, 500 мг/л; 7 – восстановительный период после варианта № 6; 8 – азитромицин, 1000 мг/л;  
9 – восстановительный период после варианта № 8.

Рисунок 1 – Влияние азитромицина на процент клеток с микроядрами

Увеличение клеток с микроядрами в 2,0 и 1,3 раза отмечали в вариантах использования азитромицина в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л, соответственно. При повышении концентрации тестируемого антибиотика с 300,0 до 1000,0 мг/л наблюдали уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем либо сопоставимые с ним значения. В соответствующих восстановительных периодах определяли единичные клетки с микроядрами. Необходимо подчеркнуть, что микроядра были очень маленького размера.

Механизм формирования микроядер рассматривается в первую очередь из интерфазных ядер через отпочковывание ядерных почеч, которые удаляются из ядра посредством активного процесса во время S-фазы (фаза синтеза) клеточного цикла [8], в меньшей степени – через фрагменты хромосом либо утерю целых хромосом в митозе [6, 9]. Акцентируем внимание, что ядерные почки классифицируются как маркеры полиплоидизации и амплификация генов, и их формирование приводит к изгнанию лишнего генетического материала из анеуплоидных клеток [10]. Однако ряд исследователей описывают подобный процесс как селективную приядерную аутофагию [11] или нуклеофагию [12], не называя отпочковывающиеся структуры микроядрами.

Микроядерный тест был использован, потому что он технически прост в освоении, надежен, наименее дорог и отмечена чрезвычайно быстрая система скрининга для кластогенных (агенты, которые вызывают разрывы ДНК и формирование микроядер, содержащих ацентрические фрагменты хромосом, в принципе неспособные к сегрегации и миграции к полюсам) и анеугенных (агенты, которые вызывают потерю хромосомы в основном из-за вмешательства в шпиндельный аппарат) эффектов.

Наличие микроядер в клетках, как правило, рассматривается как морфологический пассивный маркер генетической нестабильности [2]. Однако, согласно некоторым данным, сами микроядра также могут являться источником возникновения дополнительной генетической нестабильности. Характерные для микроядер структурные дефекты вызывают нарушение таких ключевых процессов, как репарация и репликация в микроядре, что, в свою очередь, приводит к накоплению множественных повреждений ДНК. В случае, если клетка с микроядром продолжает продвижение по клеточному циклу, генетический материал микроядра может быть инкорпорирован в ядро дочерней клетки с привнесением множественных локальных мутаций, что, в свою очередь ведёт в соматических клетках млеко-

питающих к озлокачествлению опухолевого процесса. Показано, что формирование микроядер может также быть инициировано рядом применяемых в современной противоопухолевой терапии цитостатиков. А таким свойством обладают и некоторые антибиотики [13].

Оценка генотоксичных эффектов азитромицина с помощью микроядерного теста в клетках образовательной ткани лука обыкновенного показала увеличение клеток с микроядрами в 2,0 и 1,3 раза в вариантах использования антибиотика в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л, соответственно. При повышении концентрации тестируемого антибиотика с 300,0 до 1000,0 мг/л наблюдали уменьшение числа клеток с микроядрами по сравнению с контролем либо сопоставимые с ним значения. В соответствующих восстановительных периодах определяли единичные клетки с микроядрами, часть из них по происхождению – ядерные почки.

### Литература

1 Fenech, M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans / M. Fenech // *Mutagenesis*. – 2011. – Vol. 26. – P. 63–67.

2 Минина, В. И. Оценка генотоксических эффектов действия противоопухолевых препаратов с помощью микроядерного теста на лимфоцитах крови человека / В. И. Минина, В. Ю. Буслаев // *Фундаментальная и клиническая медицина*. – 2019. – 4(3). – P. 95–101.

3 Кисурин-Евгеньева, О. П. Биогенез микроядер / О. П. Кисурин-Евгеньева, О. И. Сулягина, Г. Е. Онищенко // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81, № 5. – С. 612–624.

4 Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / под ред. Ю. А. Рахманина, Л. П. Сычёвой. – М. : Генниус, 2007. – 312 с.

5 Fiskesjö, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring / G. Fiskesjö // *Hereditas*. – 1985. – Vol. 102. – P. 99–112.

6 Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals / Prepared for the IPCS by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens Environmental Health Criteria. 51 WORLD HEALTH ORGANIZATION GENEVA. – 1985. – 212 с.

7 Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений: учебники и учеб. пособия для студентов высших учеб. заведений – 4-е изд. перераб. и доп. / З. П. Паушева – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.

8 Shimizu, N. Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements / N. Shimizu // *Mutagenesis*. – 2011. – Vol. 26, N1. – P. 119–123.

9 Hoffelder, D. R. Resolution of anaphase bridges in cancer cells / D. R. Hoffelder, L. Luo, N. A. Burke // *Chromosoma*. – 2004. – Vol. 112. – P. 389–397.

10 Fernandes, T. C. C. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, Pest. / T. C. C. Fernandes, E. C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales // *Biochem Physiol*. – 2007. – Vol. 88. – P. 252–259.

11 Roberts, P. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae* / P. Roberts [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. – 2003. – Vol. 14, N 1. – P. 129–141.

12 Park, Y. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells / Y. Park [et al.] // *Autophagy*. – 2009. – Vol. 5, N 6. – P. 795–804.

13 Концевая И. И. Эффект антибиотиков разных химических групп на генотоксичность в *Allium* тесте. / И. И. Концевая // *Известия ГГУ им. Ф. Скорины*. – 2021. – № 3 (126). – С. 33 – 38.

УДК 57.083.36:577.182.62

*А. И. Ольшевский*

*Науч. рук.: И. И. Концевая, канд. биол. наук, доцент*

## **ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ В ALLIUM ТЕСТЕ**

*В Allium тесте показано, что критерию цитотоксичности соответствуют варианты: азитромицин в концентрации 500,0 мг/л, азитромицин в концентрации 1000,0 мг/л; восстановительный период после использования азитромицина в концентрации 300,0 мг/л.*

Митотический индекс (МИ) показывает интенсивность деления по наличию клеток в фазе роста. Чем выше значение, тем интенсивнее происходит процесс деления клеток и наоборот. Индекс может свидетельствовать о нормальном протекании митоза, об угнете-