

УДК 577.182.24:577.182.26
AGRIS F30

https://doi.org/10.33619/2414-2948/77/03

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНОВ НА ПАТОЛОГИЮ МИТОЗА В КЛЕТКАХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ТКАНИ КОРНЕЙ *Allium cepa* L.

©**Концевая И. И.**, канд. биол. наук, Гомельский государственный университет
им. Ф. Скорины, г. Гомель, Беларусь, ikantsavaya@mail.ru
©**Минина А. В.**, Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,
г. Гомель, Беларусь, minina_anastasia17@gmail.com

THE EFFECT OF TETRACYCLINES ON MITOSIS'S PATHOLOGY IN THE CELLS OF ROOT MERISTEM *Allium cepa* L.

©**Kantsavaya I.**, Ph.D., F. Scorina Gomel State University,
Gomel, Belarus, ikantsavaya@mail.ru
©**Minina A.**, F. Scorina Gomel State University,
Gomel, Belarus, minina_anastasia17@gmail.com

Аннотация. Исследуется влияние тетрациклинов (тетрациклина и доксициклина) на повреждения генетического аппарата в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L. в первой метафазе после обработки и после завершения восстановительного периода. Методы исследования: *Allium* тест, цитогенетический анализ, статистический анализ. Опыт был выполнен на партии луковиц лука обыкновенного (сорт Штуттгартен), которая по итогам микроядерного теста характеризовалась как генетически нестабильный материал. Установлено, что реакция тестируемого материала на действие тетрациклинов зависит от концентрации и длительности действия антибиотиков. В делящихся клетках преобладали aberrации анеугенного типа, такие как к-митоз, слипание хромосом, вплоть до образования комков. Для данного генотипа после восстановительного периода установлено возрастание доли ПМ (слипание хромосом, множественные мосты), исходом которых является пикноз ядер и гибель клеток. Выявлено, что после восстановительного периода при действии тетрациклина в концентрации 20,0 мг/л при экспозиции 24 и 48 часов существенно возростала доля клеток с к-митозом. Отмечено негативное действие тетрациклина в концентрации 100,0 мг/л, значение ПМ достигало 64,2%; после восстановительного периода уменьшение доли клеток с ПМ не отмечено. В обоих вариантах доминировали клетки с к-митозом и слипанием хромосом. Эффект доксициклина при тестируемых концентрациях (20,0 и 100,0 мг/л) вызывал увеличение значений ПМ более чем в 2 раза по сравнению с контролем. После восстановительного периода независимо от опытной концентрации доксициклина число клеток с ПМ возрастало за счет увеличения числа клеток с к-митозом и слипанием хромосом. Следует указать на разную реакцию меристематических клеток корешков лука при действии структурных изомеров, каковыми являются тетрациклин и доксициклин. Необходимо учитывать, что повышение концентрации антибиотиков бактериостатического действия (тетрациклина, доксициклина), с одной стороны, необходимо для максимальной инактивации бактерий, с другой стороны, в клетках эукариотических организмов возрастают негативные процессы при прохождении клеточного цикла, в частности митоза.

Abstract. The effect of tetracyclines (tetracycline and doxycycline) on genetic apparatus damage in the cells of root meristem *Allium cepa* L. in the first metaphase after processing and after finishing the recovery period is investigated. *Research methods:* Allium test, cytogenetic analysis, statistical analysis. The experiment was conducted on a batch of the Stuttgart variety which is genetically unstable as the result of micronucleus test. It's indicated that the reaction of the tested material to the effect of tetracyclines depends on the concentration and duration of antibiotics. Aneugenic type aberrations such as mitosis, chromatic agglutination up to the formation of clots were prevailing in the cycling cells. An increase in the proportion of PM (chromatic agglutination, various bridges), the result of which is nucleus pycnosis and cell death was indicated for this genotype after the recovery period. It's observed that after the recovery period there is a significant increase of cells with mitosis under the influence of tetracycline in the concentration of 20.0 mg/l, on exposure of 23 and 48 hours. The negative influence of tetracycline in the concentration of 100.0 mg/l was investigated, PM value reached 64.2%; the decrease of cells with PM wasn't observed after the recovery period. In both cases cells with mitosis and chromatic agglutination were dominating. Doxycycline effect in the concentration of 20.0 and 100.0 mg/l caused the doubling of PM in comparison with control. After the recovery period a number of cells regardless of experienced concentration grew due to the increased number of cells with mitosis and chromatic agglutination. It's necessary to mention different effects of meristematic cells of onion roots under the action of structural isomer which are tetracycline and doxycycline. It's worth mentioning that the increase in concentration of bacteriostatic antibiotic (tetracycline and doxycycline) is necessary for maximum inactivation on the one hand. On the other hand, negative processes increase in the cells of eukaryotic organisms during the passage of the cell cycle, particularly, mitosis.

Ключевые слова: Allium тест, тетрациклины, патология митоза.

Keywords: Allium test, tetracycline, mitosis pathology.

Порой бесконтрольное применение антибиотиков на практике переводит в ранг актуальности вопрос об изучении влияния побочных воздействий антибиотиков, оказываемых на эукариотический организм. В частности, побочные эффекты тетрациклинов связаны с неизбирательностью действия антибиотиков на синтез белка как в клетках микро-, так и макроорганизмов [1].

В настоящее время существует ряд современных молекулярно-биологических тестов, но из-за высокой технологической сложности и стоимости их применение ограничено. Наблюдения за особенностями корневой системы лука обыкновенного (*Allium cepa* L.) показали, что это растение может быть использовано как тест-система для обнаружения потенциально генотоксичных соединений [2]. В качестве показателей цито- и генотоксичности корневой меристемы лука, согласно методике, предлагаемой ВОЗ [3], были выбраны длина и количество корешков, митотическая активность, доля аберрантных клеток. Результаты тестов с *A. cepa* имеют корреляцию с другими тестами на животных, растениях и микроорганизмах, а также могут быть экстраполированы на человека [3].

Тетрациклины (тетрацилин, доксицилин) относятся к группе антибиотиков, которые блокируют синтез белка прокариот. Они являются ингибиторами элонгации белковой цепи и препятствуют связыванию aa-тРНК с А-участком рибосомы 70S [4, 5]. В обычно применяемых дозах тетрациклины функционируют бактериостатически [6]. Понятия бактерицидности и бактериостатичности относительны, поскольку ряд препаратов могут

быть бактерицидными по отношению к одним микроорганизмам и бактериостатическими — к другим [7]. Помимо этого эффект зависит от дозы.

Цель работы: выявление повреждений генетического аппарата в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L. в первой метафазе после обработки в течение одного–трех клеточных циклов тетрациклинами и после завершения восстановительного периода.

Материал и методы исследований

Исследование ответных реакций растений лука обыкновенного в условиях действия водных растворов антибиотиков выполняли с помощью Allium теста [2] на сорте «Штуттгартен». В качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду.

Тестировали следующие антибиотики: тетрациклин (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь) и доксициклин (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Варианты опыта с указанием концентраций, длительности действия и способа действия указаны в таблице 1 раздела «Результаты исследований». Согласно рекомендации ВОЗ [3], в эксперименте дополнительно выдерживали период восстановления длительностью 24 часа, в течение которого тестируемое вещество не воздействует (вариант последствия, восстановительный период), и только затем выполняли фиксацию корешков. Во всех вариантах опыта фиксация производилась с 6.30 до 7.00 утра.

Давленные препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по общепринятой методике [8]. Просмотр препаратов осуществляли на компьютеризированной кариологической станции, оснащенной микроскопом Leica DMR при увеличении $40 \times 10 \times 1,5$. Цитогенетический анализ выполняли по [8, 9].

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладного программного обеспечения Microsoft Excel и Statsoft (USA) Statistica v.7.0. Для данных, подчиняющихся нормальному закону распределения, использовали t-критерий Стьюдента. Нулевую гипотезу отклоняли при уровне статистической значимости $p < 0,05$ [10].

Результаты исследований

При микроскопировании препаратов в вариантах опыта наблюдали в апикальной меристеме некоторых придаточных корней лука практически отсутствие деления (таблица 1). У них митотический индекс был близок к нулю и большинство клеток находились в профатическом состоянии. Однако следует отметить, что повышение концентрации тетрациклина с 20,0 до 100,0 мг/ и увеличение времени экспозиции антибиотика (вариант 10) не повлияло существенно на протекание митоза в придаточных корнях лука. В то же время доксициклин в концентрации 20,0 мг/л приводил практически к полному снижению процесса деления клеток на момент пика митотической активности клеток, при этом клетки и ядра были на вид нормальными. Увеличение концентрации доксициклина до 100,0 мг/л не подавляло процесс митоза в образовательной ткани корней, но при этом наблюдали свыше 80,0% атипичных по форме и виду ядер. Анализ восстановления процесса деления в меристематических клетках корешков показал в группе вариантов более жесткого воздействия (варианты 5, 9, 11) подавление митоза и увеличение количества атипичных ядер. В наибольшей степени это проявилось в варианте 9 (Таблица 1).

При анализе данных, полученных в результате микроядерного теста (Рисунок 1), наблюдали наличие микроядер в контрольном варианте, число клеток с микроядрами достигало 0,29%. Более чем в 3–4 раза увеличивалось число клеток с микроядрами в

варианте применения доксициклина (20 мг/л — 24 часа) и в варианте его последействия. В остальных вариантах было установлено либо увеличение клеток с микроядрами в 2 раза по сравнению с контролем, либо отмечены единичные клетки с микроядрами. Необходимо подчеркнуть, что микроядра были очень маленького размера. Таким образом, на основании результатов микроядерного теста можно констатировать, что для луковиц из партии тестируемого в опыте лука характерна геномная нестабильность.

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНОВ НА ЧИСЛО КОРЕШКОВ С МИТОЗОМ

№ варианта опыта	Тестируемые вещества, концентрация в мг/л	Число корешков с митозом, %
1	контроль (вода дистиллированная)	100,0
2	тетрациклин, 20,0 — 24 часа	88,5
3	последействие варианта 2	91,6
4	тетрациклин, 20,0 — 48 часов	100,0
5	последействие варианта 4	60,0
6	тетрациклин, 100,0 — 24 часа	88,5
7	последействие варианта 6	47,4
8	доксициклин, 20,0 — 24 часа	2,8
9	последействие варианта 8	50,0
10	доксициклин, 100,0 — 24 часа	96,6
11	последействие варианта 10	2,2

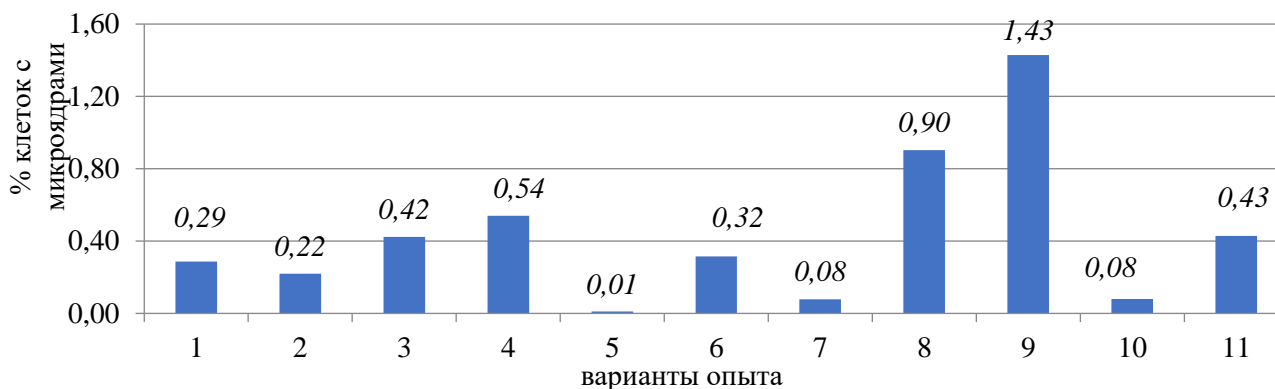


Рисунок 1. Влияние тетрациклинов на процент клеток с микроядрами. Варианты опыта: 1 — вода дистиллированная, 2 — тетрациклин, 20,0 мг/л — 24 часа, 3 — восстановительный период варианта 2; 4 — тетрациклин, 20,0 мг/л — 48 часов; 5 — восстановительный период варианта 4; 6 — тетрациклин, 100,0 мг/л — 24 ч; 7 — восстановительный период варианта 6; 8 — доксициклин, 20,0 мг/л — 24 ч; 9 — восстановительный период варианта 8; 10 — доксициклин, 100,0 мг/л — 24 ч, 11 — восстановительный период варианта 10

При действии тетрациклинов наблюдали существенное возрастание значений ПМ, с 6,1% — в контроле до 11,0–63,0% — в большинстве опытных вариантах и до 100% после восстановительного периода действия доксициклина (при концентрации 100,0 мг/л в течение 24 ч) (Рисунок 2).

Повышение концентрации тетрациклина и доксициклина с 20,0 мг/л до 100,0 мг/л инициировало увеличение количества патологических митозов в клетках. Пролонгированный эффект тетрациклина не усиливал негативную реакцию на образование патологических митозов (Рисунок 2, вариант 10) по сравнению с более кратковременным действием антибиотика (вариант 2).

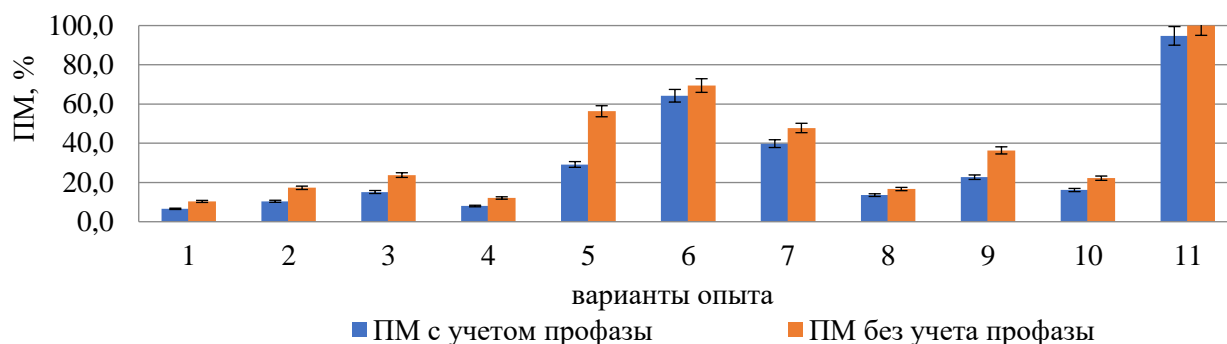


Рисунок 2. Влияние тетрациклинов на патологию митоза. Обозначения вариантов — те же, что для Рисунка 1

В вариантах «последствия» существенное снижение патологических митозов наблюдали при обработке тетрациклином в концентрации 100,0 мг/л (варианты 4 и 5), что свидетельствует о работе механизмов адаптации и репарации. В остальных опытных вариантах, наоборот, отмечали возрастание патологических митозов в клетках после восстановительного периода. Эффект тетрациклина в концентрации 20,0 мг/л, независимо от времени экспозиции: 24 и 48 часов, имел практически один и тот же состав и спектр патологий митоза (Рисунок 3: вариант 2 и 10). Однако в вариантах «последствия» наблюдали к-митоз с незначительно развитой липкостью хромосом.

Повышение концентрации тетрациклина до 100,0 мг/л инициировало появление в 50,0% случаев к-митоза и в 30,1% — слипание хромосом. Этот же эффект сохранялся и спустя 2–3 клеточных циклов после снятия действия стрессового фактора (вариант 4 и 5). Действие доксициклина в концентрации 20,0 мг/л индуцировало появление в митозе у 20,1% клеток выброс хромосом и одиночные и множественные мосты (вариант 6). В варианте «последствия» у 60,0% клеток отмечали к-митоз (вариант 7). Увеличение концентрации доксициклина инициировало появление слипания хромосом у 40,2% клеток (вариант 8).

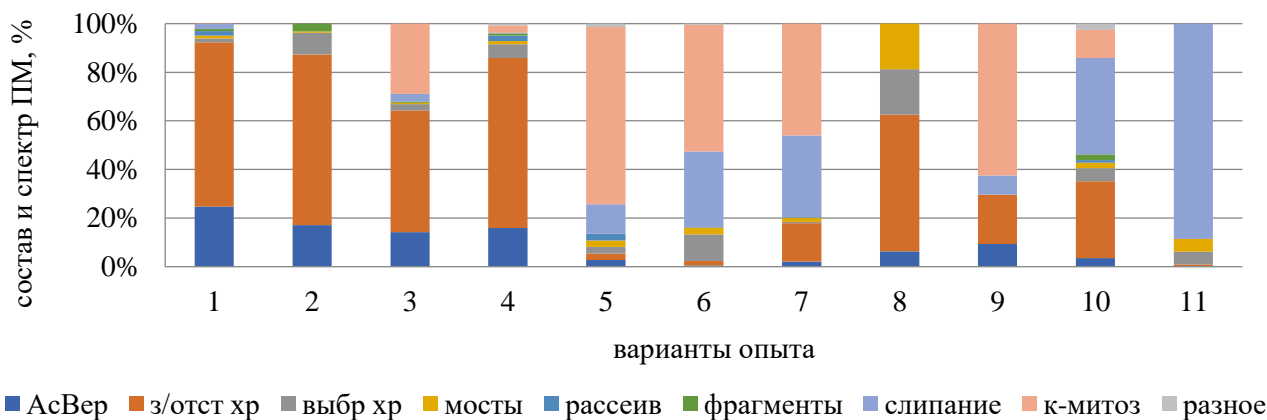
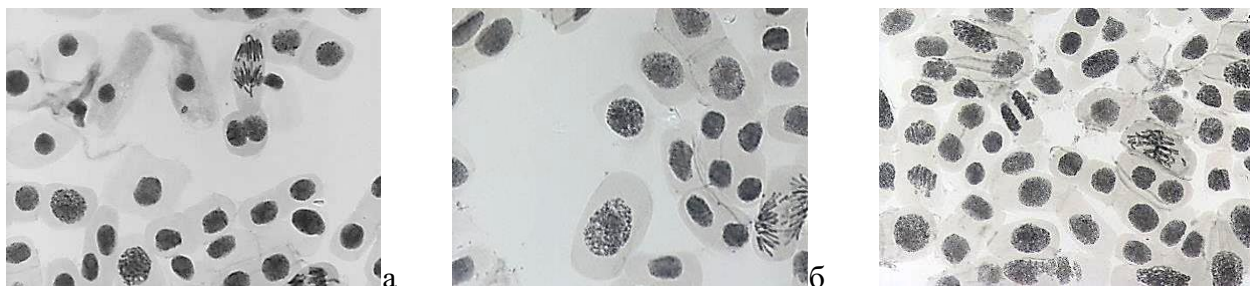


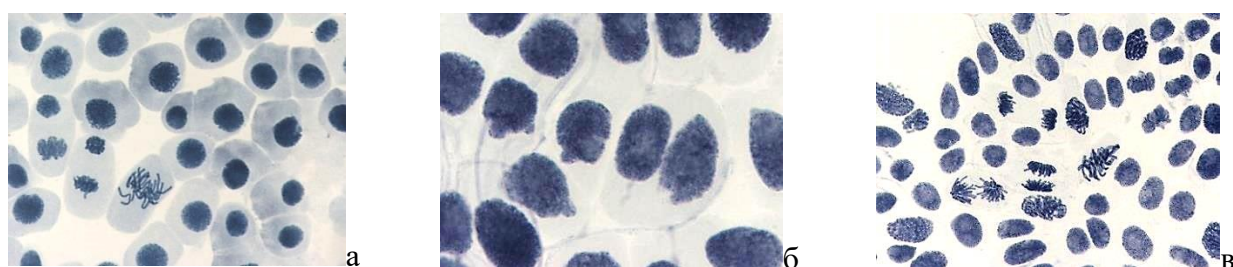
Рисунок 3. Влияние тетрациклинов на состав и спектр патологий митоза. Обозначения вариантов — те же, что для Рисунка 1

Влияние тетрациклинов на типы патологий митоза представлено на рисунке 4. Во всех препаратах при действии тетрациклинов наблюдали из-за набухания хромосом формирование странных фигур в метафазе, регистрировали рассеивание хромосом, их слипание (вплоть до образования комков), мосты одиночные и двойные, в частности, вариант «тетрациклин, 100,0 мг/л — 24 ч» (Рисунок 5 — 3а, 3б). Повышение концентрации

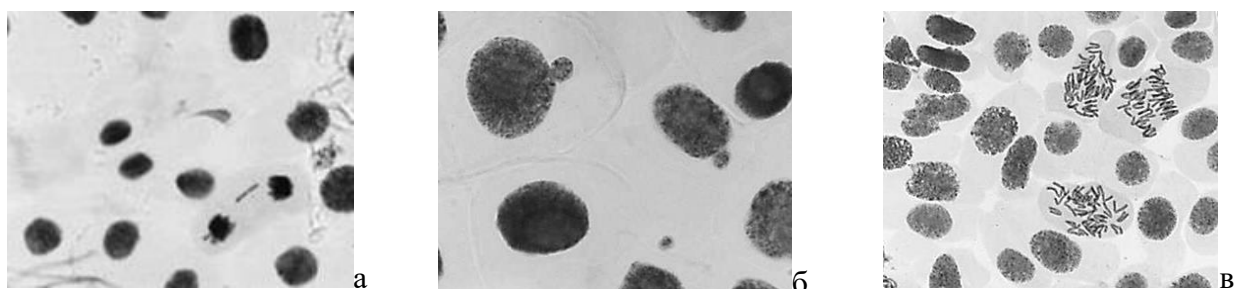
тетрациклина и доксициклина до 100,0 мг/л индуцировало появление до 30–40,0% клеток с липкими хромосомами, что свидетельствует о возможной гибели клеток. Этот же эффект сохранялся и спустя 2–3 клеточных циклов после снятия действия стрессового фактора.



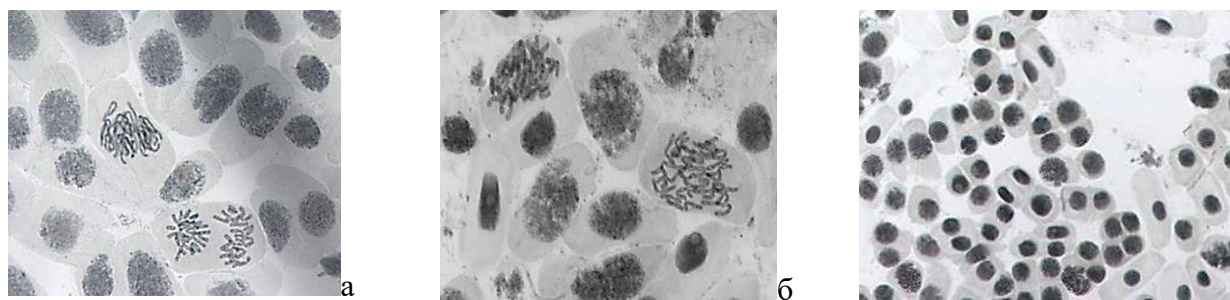
1) тетрациклин, 20,0 мг/л — 24 ч: а — забегание хромосом; б, в — асинхронное веретено деления; в — выбросы хромосом за веретено деления



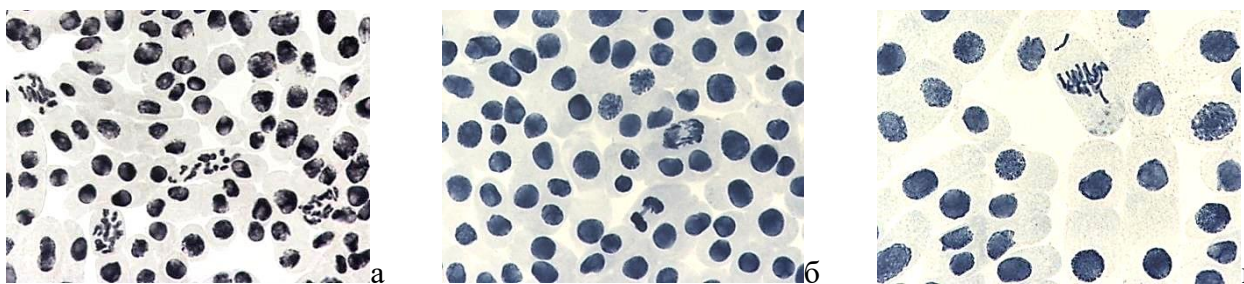
2) последствие (тетрациклин, 20,0 мг/л — 24 ч): а — выбросы хромосом за веретено деления; б — ядерные почки; в — асинхронное веретено деления



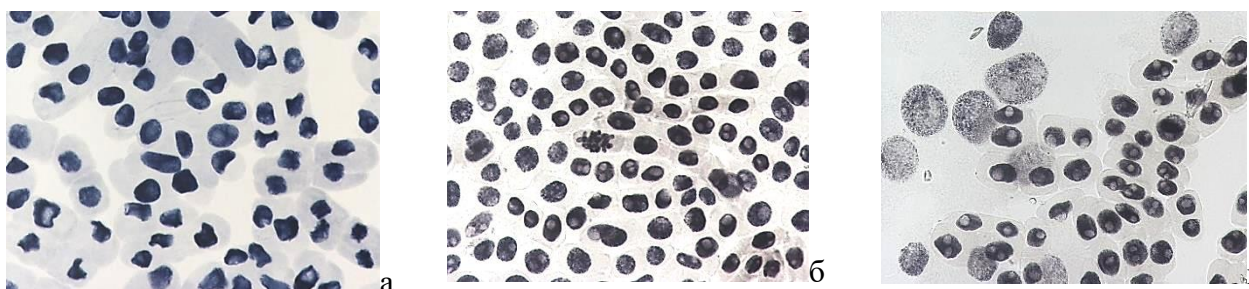
3) тетрациклин, 20,0 мг/л — 48 ч: а — выброс хромосомы; б — ядерные почки и микроядра в — рассеивание хромосом



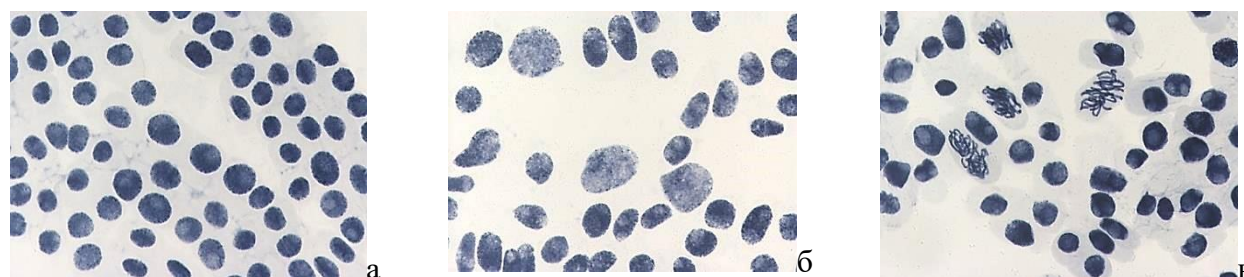
4) последствие (тетрациклин, 20,0 мг/л — 48 ч): а, б — рассеивание хромосом; б — асинхронное веретено деления; в — интерфазные клетки (в норме)



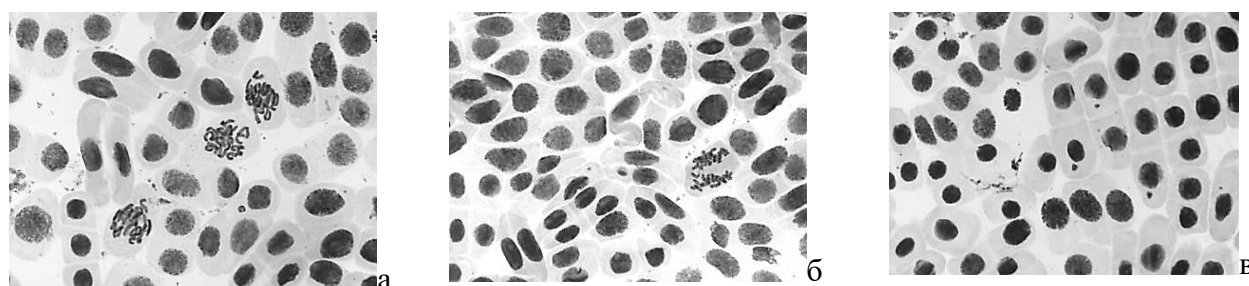
5) тетрациклин, 100,0 мг/л — 24 ч: а — комки + рассеивание хромосом; б — одиночные и множественные мосты; в — выбросы хромосом за веретено деления



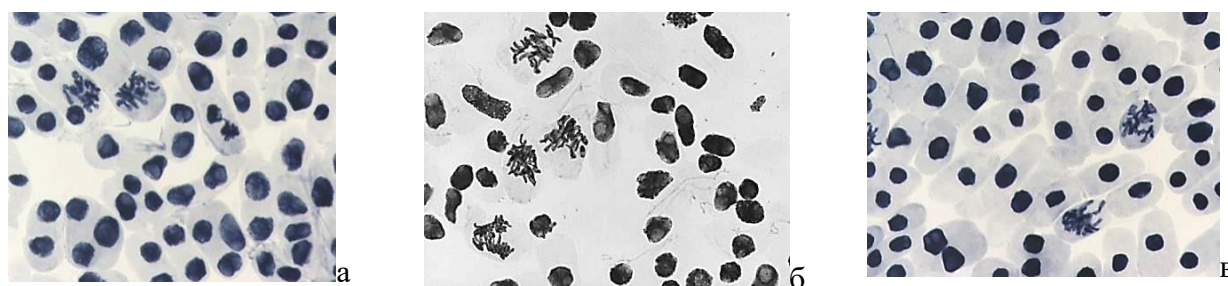
6) последствие (тетрациклин, 100,0 мг/л — 24 ч): а — пикноз; б — слияние хромосом; в — наличие ядер большого размера



7) доксициклин, 20,0 мг/л — 24 ч: а — отсутствие митоза, ядра в норме; б — отсутствие митоза, есть атипичные ядра (ядерные протрузии); в — атипичная метафаза



8) последствие (доксициклин, 20,0 мг/л — 24 ч): а — рассеивание хромосом; б — асинхронное веретено деления + рассеивание; в — микроядра



9) доксициклин, 100,0 мг/л — 24 ч: а-в — атипичная метафаза + мост

Рисунок 4. Влияние тетрациклинов на типы патологий митоза (увеличение микроскопа 400×, 100×)

Следует акцентировать внимание на более токсичном действии доксициклина по сравнению с тетрациклином в данном эксперименте. Несмотря на то, что и тетрациклин и доксициклин, являясь структурными изомерами, имеют одинаковую молекулярную массу и химическую суммарную формулу, по номенклатуре IUPAC у них есть отличия [1; 5]. Необходимо напомнить, что ранее при работе с партией луковиц сорта «Стурон», который по результатам микроядерного теста характеризовался как генетически стабильный материал, наоборот, была установлена большая токсичность именно тетрациклина [11].

Заключение

Таким образом, опыт был выполнен на партии луковиц лука обыкновенного сорта Штуттгартен, которая по итогам микроядерного теста характеризовалась как генетически нестабильный материал. Установлено, что реакция тестируемого материала на действие тетрациклинов зависит от концентрации и длительности действия антибиотиков. В делящихся клетках преобладали аберрации анеугенного типа, такие как к-митоз, слипание хромосом, вплоть до образования комков. Для данного генотипа после восстановительного периода установлено возрастание доли ПМ (слипание хромосом, множественные мосты), исходом которых является пикноз ядер и гибель клеток.

Выявлено, что после восстановительного периода при действии тетрациклина в концентрации 20,0 мг/л при экспозиции 24 и 48 часов существенно возростала доля клеток с к-митозом. Отмечено негативное действие тетрациклина в концентрации 100,0 мг/л, значение ПМ достигало 64,2%; после восстановительного периода уменьшение доли клеток с ПМ не отмечено. В обоих вариантах доминировали клетки с к-митозом и слипанием хромосом.

Эффект доксициклина при тестируемых концентрациях (20,0 и 100,0 мг/л) вызывал увеличение значений ПМ более чем в 2 раза по сравнению с контролем. После восстановительного периода независимо от опытной концентрации доксициклина число клеток с ПМ возрастало за счет увеличения числа клеток с к-митозом и слипанием хромосом.

Следует указать на разную реакцию меристематических клеток корешков лука при действии структурных изомеров, каковыми являются тетрациклин и доксициклин. Необходимо учитывать, что повышение концентрации антибиотиков бактериостатического действия (тетрациклина, доксициклина), с одной стороны, необходимо для максимальной инактивации бактерий, с другой стороны, в клетках эукариотических организмов возрастают негативные процессы при прохождении клеточного цикла, в частности, митоза.

Список литературы:

1. Селизарова Н. О. Антибиотики, нарушающие синтез макромолекул // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2003. Т. 1. №1. С. 71-79.
2. Fiskesjö G. The Allium test for screening chemicals: evaluation of cytological parameters // *Plants for environmental studies*. New York: CRC Press LLC, 1997. P. 308-333.
3. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных канцерогенных химических соединений. Гигиенические критерии окружающей среды. Женева: ВОЗ, 1989. №51. 212 с.
4. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. СПб., 2012. 760 с.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
6. WHO. Model List of Essential Medicines 18th list (April 2013) (Final Amendments - October 2013) 2013. <https://clck.ru/eQ8si>

7. Остерман И. А. Поиск и изучение новых антибиотиков ингибиторов синтеза белка: дисс. ... д-ра хим. наук. М., 2018. 291 с.
8. Калаев В. Н., Карпова С. С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж: ВГУ, 2004. 80 с.
9. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с.
10. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
11. Концевая И. И., Жадько С. В., Алексеенко О. Г. Тестирование антибиотиков бактериостатического действия в *Allium* тесте // Разнообразие растительного мира. 2020. №1 (4). С. 81-88.

References:

1. Selizarova, N. O. (2003). Antibiotiki, narushayushie sintez makromolekul. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*, 1(1), 71-79. (in Russian).
2. Fiskesjö, G. (1997). The *Allium* test for screening chemicals; evaluations of cytological parameters. *Plants for environmental studies, New York, CRC Press LLC*, 308-333.
3. Rukovodstvo po kratkosrochnym testam dlya vyyavleniya mutagennykh kantserogennykh khimicheskikh soedinenii. *Gigienicheskie kriterii okruzhayushei sredy* (1989). Zheneva. (in Russian).
4. Korotyayev, A. I., & Babichev, S. A. (2012). *Medicinskaya mikrobiologiya, immunologiya i virusologiya: uchebnik dlya med. vuzov*. St. Petersburg. (in Russian).
5. Mashkovskii, M. D. (2012). *Lekarstvennye sredstva*. Moscow. (in Russian).
6. WHO. Model List of Essential Medicines 18th list (April 2013) (Final Amendments - October 2013). <https://clck.ru/eQ8si>
7. Osterman, I. A. (2018). *Poisk i izuchenie novykh antibiotikov ingibitorov sinteza belka: Dr. diss. Moscow*. (in Russian).
8. Kalaev, V. N., & Karpova, S. S. (2004). *Tsitogeneticheskii monitoring: metody otsenki zagryazneniya okruzhayushchei sredy i sostoyaniya geneticheskogo apparata organizma*. Voronezh. (in Russian).
9. Alov, I. A. (1972). *Tsitofiziologiya i patologiya mitoz*. Moscow. (in Russian).
10. Lakin, G. F. (1990). *Biometriya*. Moscow. (in Russian).
11. Kantsavaya, I. I., Zhadko, S. V., & Alekseenko, O. G. (2020). Testirovanie antibiotikov bakteriostaticeskogo deistviya v *Allium* teste. *Raznoobrazie rastitel'nogo mira*, (1 (4)), 81-88. (in Russian).

*Работа поступила
в редакцию 01.03.2022 г.*

*Принята к публикации
05.04.2022 г.*

Ссылка для цитирования:

Концевая И. И., Минина А. В. Влияние тетрациклинов на патологию митоза в клетках образовательной ткани корней *Allium cepa* L. // Бюллетень науки и практики. 2022. Т. 8. №4. С. 33-41. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/77/03>

Cite as (APA):

Kantsavaya, I., & Minina, A. (2022). The Effect of Tetracyclines on Mitosis's Pathology in the Cells of Root Meristem *Allium cepa* L. *Bulletin of Science and Practice*, 8(4), 33-41. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/77/03>