

ВЛИЯНИЕ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ НА МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ В ALLIUM-ТЕСТЕ

©Концевая И. И., канд. биол. наук, Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, г. Гомель, Беларусь, ikantsavaya@mail.ru

©Алексеенко О. Г., Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, г. Гомель, Беларусь, alekseenkoogagennadevna@gmail.com

EFFECT OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS ON MICROSCOPIC PARAMETERS IN THE ALLIUM-TEST

©Kantsavaya I., Ph.D., F. Skorina Gomel State University, Gomel, Belarus, ikantsavaya@mail.ru

©Alekseenko O., F. Skorina Gomel State University, Gomel, Belarus, alekseenkoogagennadevna@gmail.com

Аннотация. В работе исследуется влияние бета-лактамных антибиотиков (цефотаксима, ампициллина, аугментина) на патологию митоза в Allium-тесте. *Методы исследования:* Allium-тест, цитогенетический анализ, статистический анализ. Установлено, что использование отдельных тестируемых бета-лактамных антибиотиков повышает процент патологических митозов в клетке в 1,8–3,3 раза по сравнению со значением в контроле. При комбинированном применении цефотаксима и аугментина проявился синергизм, в результате значение патологии митоза оказалось на уровне цифры в контроле; minimally представлены патологии, указывающие на повреждения митотического аппарата. Выявлено, что все три тестируемых бета-лактамных антибиотика оказывали выраженное статмокинетическое воздействие. В тоже время при совместном использовании цефотаксима и аугментина к-митоз не регистрировали в делящихся клетках. Сравнение спектра патологических митозов в вариантах опыта показало, что во всех вариантах доминирует патология «забегание/отставание хромосом» в анафазе митоза. Повышение концентрации аугментина и ампициллина вызвало подавление патологических процессов в меристематических клетках лука, отмечено снижение значений ПМ. На состав и спектр патологических митозов увеличение концентрации аугментина не влияет, у ампициллина отмечено снижение уровня большинства регистрируемых патологий митоза. Полученные данные свидетельствуют, что бета-лактамные антибиотики способны проникать в активно пролиферирующие клетки высших растений и изменять скорость вступления их в митоз и нормальное протекание процессов деления.

Abstract. The work examines the effect of beta-lactam antibiotics (cefotaxime, ampicillin, augmentin) on the pathology of mitosis in the Allium-test. *Research methods:* Allium-test, cytogenetic analysis, statistical analysis. It was established that the use of individual tested beta-lactam antibiotics increases the percentage of pathological mitoses in the cell by 1.8–3.3 times compared with the value in the control. With the combined use of cefotaxime and Augmentin, synergism appeared, as a result, the value of mitosis pathology turned out to be at the level of the number in the control; minimally represented pathologies indicating damage to the mitotic

apparatus. It was revealed that all three beta-lactam antibiotics tested had a pronounced statmokinetic effect. At the same time, with the joint use of cefotaxime and Augmentin, k-mitosis was not registered in dividing cells. Comparison of the spectrum of pathological mitoses in the variants of the experiment showed that the pathology ‘chromosome runaway/backlog’ in anaphase of mitosis dominates in all variants. An increase in the concentration of Augmentin and ampicillin caused the suppression of pathological processes in onion meristematic cells, a decrease in PM values was observed. An increase in Augmentin concentration does not affect the composition and spectrum of pathological mitoses; ampicillin has a decrease in the level of most of the recorded pathologies of mitosis.

Ключевые слова: Allium-тест, бета-лактамные антибиотики, патология митоза.

Keywords: Allium-test, beta-lactam antibiotics, mitosis pathology.

Актуальным вопросом является изучение влияния побочных свойств антибиотиков, оказываемых на эукариотический организм, на который происходит воздействие. Поскольку в культуре клеток и тканей растений все шире применяется антибактериальная терапия с использованием антибиотиков [1], необходимо понимать их последствия для клонированных растений. Например, в культуре *in vitro* для многих растений установлено стимулирование роста их клеток при ингибировании роста микробов в результате добавления в состав питательной среды цефотаксима и карбенициллина [2–3]. Однако можно предположить, что антибактериальные вещества могут вызывать изменения генетического аппарата, приводя к неминуемым, как положительным, так и отрицательным последствиям.

Имеются единичные сведения о влиянии антибиотиков на клеточном и молекулярном уровнях [3–4].

В настоящее время в качестве инструмента для обнаружения потенциально генотоксичных соединений активно используют корневую систему лука посевного (*Allium sera* L.) [5]. Результаты тестов с *A. sera* имеют корреляцию с другими тестами на животных, растениях и микроорганизмах, а также могут быть экстраполированы на человека [5].

Цель работы: изучить влияние бета-лактамных антибиотиков (цефотаксима, аугментина, ампициллина) на цитогенетические эффекты в *Allium*–тесте.

Методика исследований

Исследование ответных реакций растений лука обыкновенного в условиях действия водных растворов антибиотиков выполняли с помощью *Allium*–теста [5] на сорте лука Стурон. В качестве контроля использовали очищенную водопроводную воду.

Тестируали следующие антибиотики: цефотаксим (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) в концентрации 500,0 мг/л; аугментин («СмитКляйн Бичем Фармасьютикалз» — 300,0 и 800,0 мг/л, Великобритания), ампициллин (ампициллина натриевая соль) (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) — 100,0 и 1000,0 мг/л.

Давленые препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по общепринятой методике [6]. Просмотр препаратов осуществляли на компьютеризированной кариологической станции, оснащенной микроскопом Leica DMR при увеличении 40×10×1,5. По каждому варианту было просмотрено не менее 10 000 клеток. Цитогенетический анализ выполняли по [6–7].

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 $p<0,05$ [8].

Результаты исследований

На протяжении клеточного цикла происходят не только односторонние физиологические процессы, но и патологические изменения. Достаточно просто они регистрируются на клеточном уровне с применением цитологических методов в фазе деления. Патологический митоз является одним из способов возникновения мутаций и развития анеуплоидии. Воздействие небольших доз внешних стрессовых факторов обратимо для большинства форм патологий митоза, поскольку в течение нескольких часов может восстановиться митотический аппарат и продолжаться митотическое деление [7].

Результаты тестирования показали, что использование отдельных бета-лактамных антибиотиков повышает процент патологических митозов (с учетом профазы) в клетке в 1,8–3,3 раза по сравнению со значением в контроле (Рисунок 1, вариант опыта 2, 3, 4, 6, 7). Причем, определение корреляционных отношений между патологией митоза (ПМ) с учетом профазы и ПМ без учета профазы выявило высокое положительное значение, равное 0,95. В контроле значение ПМ с учетом профазы составило 12,0%, что превышает нормальное значение уровня спонтанного мутирования: 2–5% [9].

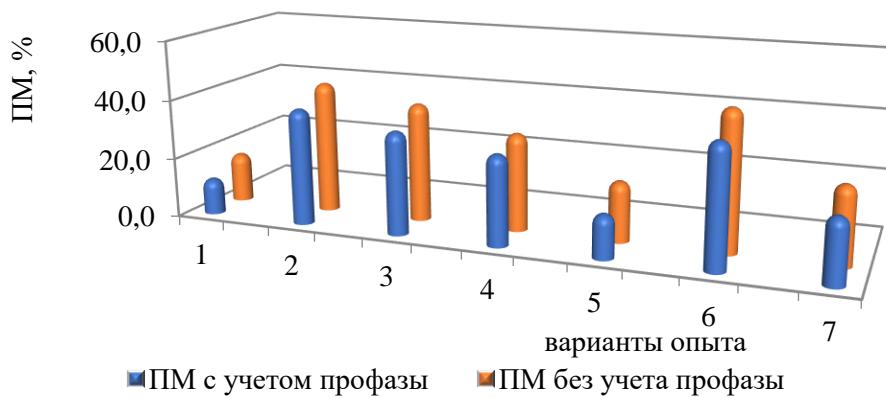


Рисунок 1. Влияние бета-лактамных антибиотиков на патологию митоза: варианты опыта: 1 — контроль; 2 — цефотаксим, 500,0 мг/л; 3 — аугментин, 300,0 мг/л; 4 — аугментин, 800,0 мг/л; 5 — цефотаксим, 500,0 мг/л + аугментин, 800,0 мг/л; 6 — ампициллин, 100,0 мг/л; 7 — ампициллин, 1000,0 мг/л.

Однако необходимо подчеркнуть, что значение МПИ в контролльном варианте равно 1,34 (Рисунок 2), что свидетельствует фактически об отсутствии патологий, связанных с повреждением митотического аппарата [10].

Необходимо отметить, что при совместном использовании цефотаксима и аугментина (Рисунок 1, вариант опыта 5) проявился синергизм, в результате значение патологии митоза оказалось на уровне цифры в контроле. И также важным моментом является тот факт, что в обсуждаемом варианте комбинированного применения антибиотиков минимально представлены патологии, указывающие на повреждения митотического аппарата. Об этом свидетельствует значение МПИ (Рисунок 2). В остальных вариантах опыта отмечено увеличение МПИ в 2–6 раз по сравнению со значением в контроле.

Расчет различных типов митотического индекса и определение долей делящихся клеток (фазовых индексов (ФИ) [11]), необходимы для выявления возможной задержки клеток на

какой-либо стадии митоза вследствие повреждения цитогенетических структур под действием стрессовых факторов.

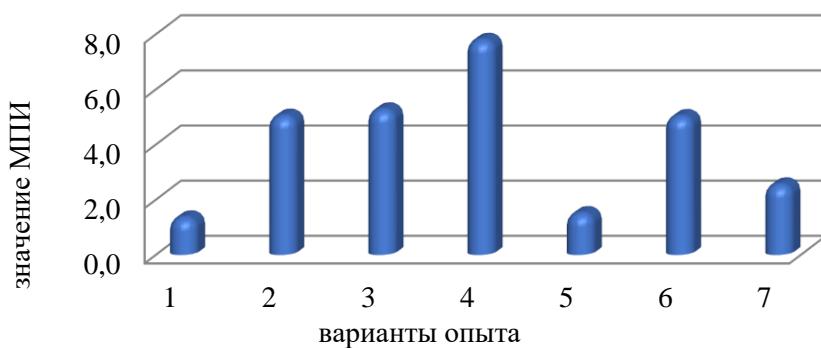


Рисунок 2. Влияние бета-лактамных антибиотиков на метафазно-профазный индекс: варианты опыта: 1 — контроль; 2 — цефотаксим, 500,0 мг/л; 3 — аугментин, 300,0 мг/л; 4 — аугментин, 800,0 мг/л; 5 — цефотаксим, 500,0 мг/л + аугментин, 800,0 мг/л; 6 — ампициллин, 100,0 мг/л; 7 — ампициллин, 1000,0 мг/л.

Следует отметить, что комбинированное применение цефотаксима и аументина не влияет на изменение фазных индексов по сравнению со значением в контроле. В остальных вариантах опыта доли делящихся клеток на стадиях митоза варьируют по отношению к контрольным цифрам.

Изучение доли клеток на стадии профазы показало, что по сравнению с контролем в вариантах опыта: 2–4, 6, 7, она снижается, соответственно, с 28,4% до 10,8% (Рисунок 3).

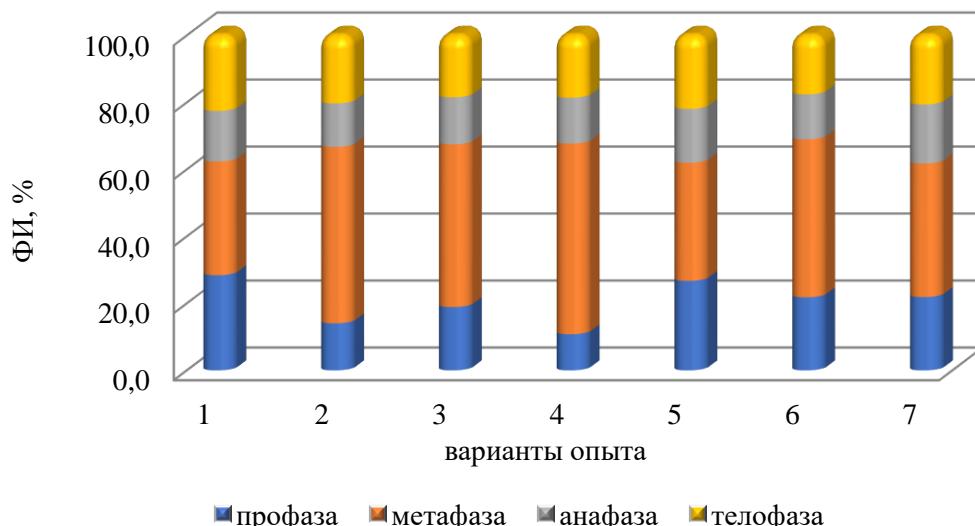


Рисунок 3. Влияние бета-лактамных антибиотиков на фазовый индекс: варианты опыта: 1 — контроль; 2 — цефотаксим, 500,0 мг/л; 3 — аугментин, 300,0 мг/л; 4 — аугментин, 800,0 мг/л; 5 — цефотаксим, 500,0 мг/л + аугментин, 800,0 мг/л; 6 — ампициллин, 100,0 мг/л; 7 — ампициллин, 1000,0 мг/л.

В тоже время увеличилась доля клеток на стадии метафазы во всех опытных вариантах. Наиболее существенно по сравнению с контролем метафазный индекс возрос в 1,7 раза в вариантах опыта 2 и 4 (Рисунок 2). Задержка митоза на стадии метафазы относится к патологиям митоза, связанных с повреждением митотического аппарата [7]. Накопление

клеток на стадии метафазы свидетельствует о блокировании дальнейшего протекания митоза в точке контроля «метафаза–анафаза» [12].

Доля клеток на стадии анафазы возросла с 15,12% в контроле до 16,1% и 17,6% в вариантах «цефотаксим, 500 мг/л + аугментин, 800,0 мг/л» и «ампициллин, 1000,0 мг/л», соответственно. В остальных опытных вариантах данный показатель, наоборот, уменьшается. Значения телофазного индекса в опытных вариантах несколько ниже значения в контроле (Рисунок 2).

Таким образом, при рассмотрении фазных индексов отмечено индуцирование тестируемыми бета-лактамными антибиотиками такой патологии митоза как задержка митоза в метафазе, что связано с повреждением митотического аппарата. Об этом свидетельствует и расчет метафазно–профазного индекса по результатам эксперимента (Рисунок 2).

Спектр ПМ включал наиболее общие типы митотических нарушений. В контрольном варианте из всех регистрируемых патологий митоза наблюдали в 73% случаев патологию «забегание/отставание хромосом» и в 23% — патологию «асинхронное веретено деления». Однако необходимо подчеркнуть, что первая форма патологии может возникать не только в патологических, но и физиологических условиях [12]. А вторая форма патологии не влияет на распределение ядерного материала ДНК, однако может привести к неравномерному распределению цитоплазматических органелл и, соответственно, ДНК митохондрий и пластид.

Во всех вариантах опыта в числе доминирующих является патология «забегание/отставание хромосом» в анафазе митоза. Патологию «мосты» наблюдали в 8% из всех случаев патологий митоза при воздействии аугментина (концентрация 800,0 мг/л), в остальных вариантах опыта регистрировали только в единичных клетках.

Установлено, что использование отдельных тестируемых бета-лактамных антибиотиков оказывало выраженное статмокинетическое воздействие: от 22,0% до 69,0% клеток из всех клеток с патологией митоза находились в состоянии к-митоза. Хромосомы при этом были гиперспириализованы, укорочены, наблюдался задержанный митоз, у части клеток — рассеивание хромосом в метафазе. При к-митозе не только страдают митотический аппарат и хромосомы, но нарушаются и процессы цитотомии [7]. В тоже время при комбинированном действии цефотаксима и аугментина к-митоз не регистрировали в делящихся клетках.

Повышение концентрации аугментина и ампициллина содействовало подавлению патологических процессов в меристематических клетках лука; отмечено снижение значений ПМ (Рисунок 1). Однако если повышение концентрации аугментина вызывает увеличение доли клеток с патологиями, связанных с повреждением митотического аппарата, то повышение концентрации ампициллина, наоборот, снижает количество таких клеток (Рисунки 2–3). На состав и спектр патологических митозов увеличение концентрации аугментина не влияет, у ампициллина отмечено снижение уровня большинства регистрируемых патологий митоза.

При микроскопировании препаратов в вариантах опыта наблюдали в апикальной меристеме некоторых придаточных корней лука отсутствие деления. У них митотический индекс был близок к нулю. Мы полагаем, что это один из механизмов адаптации на клеточном уровне при действии стрессовых факторов. Следует отметить, что на изменение данного показателя наиболее сильно оказывал влияние аугментин во всех трех вариантах опыта. При этом число корешков с митозом уменьшалось в 2 раза по сравнению с контролем. В то время как в вариантах с цефотаксимом и ампициллином корешков с делением насчитывалось свыше 80,0%. Похожие результаты были обнаружены на луке при

проращивании луковиц в пробах воды из Нижней Волги, когда констатировали достоверное мутагенное воздействие [11].

Полученные данные свидетельствуют, что изученные бета-лактамные антибиотики, используемые по отдельности, способны проникать в активно пролиферирующие клетки высших растений и изменять скорость вступления их в митоз и нормальное протекание процессов деления. Это позволяет предположить, что механизм антибактериального широкого спектра действия бета-лактамных антибиотиков не ограничивается только влиянием на биосинтез клеточной стенки бактерий. Результаты эксперимента согласуются с данными литературы о влиянии изучаемых антибиотиков на пролиферативные процессы в соматических клетках высших растений [1, 4, 11].

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что бета-лактамные антибиотики способны проникать в активно пролиферирующие клетки высших растений и изменять скорость вступления их в митоз и нормальное протекание процессов деления.

Установлено, что использование отдельных тестируемых бета-лактамных антибиотиков повышает процент патологических митозов в клетке в 1,8–3,3 раза по сравнению со значением в контроле. Выявлено, что все три тестируемых бета-лактамных антибиотика (цефотаксим, аугментин, ампициллин) оказывали выраженное статмокинетическое воздействие. В тоже время при совместном использовании цефотаксима и аугментина к-митоз не регистрировали в делящихся клетках. Сравнение спектра патологических митозов в вариантах опыта показало, что во всех вариантах доминирует патология «забегание/отставание хромосом» в анафазе митоза.

Повышение концентрации аугментина и ампициллина вызвало подавление патологических процессов в меристематических клетках лука, отмечено снижение значений ПМ. На состав и спектр патологических митозов увеличение концентрации аугментина не влияет, у ампициллина отмечено снижение уровня большинства регистрируемых патологий митоза.

Список литературы:

1. Дунаева С. Е., Оследкин Ю. С. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре *in vitro*: идентификация и возможная роль // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 5. №1. С. 3-15. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.3rus>
2. Pollock K., Barfield D. G., Shields R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures // Plant cell reports. 1983. V. 2. №1. P. 36-39. <https://doi.org/10.1007/BF00269232>
3. Концевая И. И. Использование антибиотиков в культуре тканей березы // Лесоведение. 2011. №1. С. 45-51.
4. Редькин Ю. В., Пеньевская Н. А., Гурова О. П. Цитогенотоксические эффекты бета-лактамных антибиотиков // Ученые записки биологического факультета ОмГПУ. Омск, 1996. С. 16-28.
5. Fiske G. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters // Plants for environmental studies. 1997. V. 101. P. 307-333.
6. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
7. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
9. Захаров В. М., Кларк Д. М. Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов. М.: Моск. отд-ние междунар. фонда «Биотест», 1995. 68 с.

10. Калаев В. Н., Карпова С. С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж: ВГУ, 2004. 80 с.

11. Козак М. Ф., Марченко Н. В. Цитогенетические эффекты взаимодействия антропогенного загрязнения вод Нижней Волги. Астрахань: Астраханский университет, 2011. 116 с.

12. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига, 2004. 495 с.

References:

1. Dunaeva, S. E., & Osledkin, Yu. S. (2015). Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role. *Agricultural Biology*, 5(1). 3-15. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.1.3rus> (in Russian).
2. Pollock, K., Barfield, D. G., & Shields, R. (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant cell reports*, 2(1), 36-39. <https://doi.org/10.1007/BF00269232>
3. Kontsevaya, I. I. (2011). The Use of Antibiotics in Birch Tissue Culture. *Lesovedenie*, (1). 45-51. (in Russian).
4. Redkin, Yu. V., Penevskaya, N. A., & Gurova, O. P. (1996). Tsitogenetoksicheskie effekty beta-laktamnykh antibiotikov. Uchenye zapiski biologicheskogo fakul'teta OmGPU, Omsk, 16-28. (in Russian).
5. Fiskesjo, G. (1997). Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. *Plants for environmental studies*, 101, 307-333.
6. Pausheva, Z. P. (1988). Praktikum po tsitologii rastenii. Moscow, Agropromizdat, 271. (in Russian).
7. Alov, I. A. (1972). Tsitofiziologiya i patologiya mitoza. Moscow, Meditsina, 264. (in Russian).
8. Lakin, G. F. (1990). Biometriya. Moscow, Vyssh. shk., 352. (in Russian).
9. Zakharov, V. M., & Klark, D. M. (1995). Biotest: integral'naya otsevka zdorov'ya ekosistem i otdel'nykh vidov. Moscow, 68. (in Russian).
10. Kalaev, V. N., & Karpova, S. S. (2004). Tsitogeneticheskii monitoring: metody otsevki zagryazneniya okruzhayushchey sredy i sostoyaniya geneticheskogo apparata organizma. Voronezh, 80, (in Russian).
11. Kozak, M. F., & Marchenko, N. V. (2011). Tsitogeneticheskie effekty vzaimodeistviya antropogenного загрязнения вод Нижней Волги. Astrakhan, 116. (in Russian).
12. Chentsov, Yu. S. (2004). Vvedenie v kletochnyu biologiyu. Moscow, Akademkniga, 495. (in Russian).

Работа поступила
в редакцию 11.09.2019 г.

Принята к публикации
16.09.2019 г.

Ссылка для цитирования:

Концевая И. И., Алексеенко О. Г. Влияние бета-лактамных антибиотиков на микроскопические параметры в Allium-тесте // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №10. С. 25-31. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/47/03>

Cite as (APA):

Kantsavaya, I., & Alekseenko, O. (2019). Effect of Beta-lactam Antibiotics on Microscopic Parameters in the Allium-test. *Bulletin of Science and Practice*, 5(10), 25-31. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/47/03> (in Russian).