

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ (+) И (–) УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОРОСТКОВ *Allium fistulosum*

© 2020 г. И. А. Прокопьев^{a,*}, Г. В. Филиппова^a

^aИнститут биологических проблем криолитозоны
Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия

*e-mail: ilya.a.prokopiev@gmail.com

Поступила в редакцию 30.01.2020 г.

После доработки 24.03.2020 г.

Принята к публикации 21.04.2020 г.

Проведено исследование влияния (+) и (–)-усниновой кислоты (УК) на физиолого-биохимические и цитологические характеристики проростков *Allium fistulosum* L. Показано, что проращивание семян в среде обоих энантиомеров УК в концентрациях 62.5–1000 мкМ приводило к снижению лабораторной всхожести, угнетению ростовых процессов, замедлению митотической активности корневых меристем и депигментации тканей. Выявлен дозозависимый рост частоты хромосомных aberrаций и степени повреждения ядерной ДНК в клетках, что указывает на потенциально генотоксический и мутагенный эффект изученных энантиомеров УК. Однако (–)-УК индуцировала большее число атипичных ДНК комет, чем (+)-энантиомер, что может говорить о ее более сильном действии на фрагментацию ДНК в клетках. При действии обоих энантиомеров УК наблюдалось повышение активности ферментов антиоксидантной защиты и снижение содержания флавоноидов на фоне накопления продуктов ПОЛ в клетках проростков, что указывает на развитие окислительного стресса. В то же время, значимых различий между активностью (+) и (–)-УК на уровне физиолого-биохимических параметров проростков нами не выявлено.

Ключевые слова: *Allium fistulosum*, усниновая кислота, фитотоксичность, генотоксичность, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0015330320060147

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники синтезируют ряд специфических соединений различной химической природы, объединяемые термином лишайниковые вещества. Среди этих веществ наиболее распространенной является усниновая кислота (УК), встречающаяся в лишайниках в виде двух энантиомеров, различающиеся *R* и *S* конфигурацией хирального атома C^{9b} (рис. 1). Считается, что основной биологической функцией УК является защита фотобионта лишайника путем поглощения избыточного ультрафиолетового излучения [1]. Кроме того, известно о высокой антибактериальной активности энантиомеров УК в отношении грамположительных микроорганизмов и микобактерий, включая штаммы, устойчивые к антибиотикам [1, 2]. При этом (+)-УК обладает большей антибактериальной активностью по сравнению с (–)-УК [2].

Многие лишайниковые вещества проявляют фитотоксические свойства, выраженные в ингибировании прорастания семян и роста проростков, в то же время сведения о фитотоксичности УК носят противоречивый характер. Так, было показано, что УК оказывала ингибирующие действие на прорастание семян маша и пшеницы [3]. Однако другими авторами было показано отсутствие токсического действия УК на проростки латука и сеянцы сосны [4].

Помимо семян и проростков, УК оказывала влияние на рост и развитие уже сформировавшихся растений. При внесении в среду (+)-УК в виде натриевой соли, в концентрациях 1–40 мкМ наблюдалось замедление скорости роста, уменьшение площади листьев и биомассы побегов томата [5]. Кроме того, УК в концентрации 50 мкМ приводила к снижению скорости транспирации и патологическим изменениям в морфологии корневой системы у подсолнечника и кукурузы [6].

Цель работы – изучение влияния различных концентраций энантиомеров усниновой кислоты

Сокращения: УК – усниновая кислота; МИ – митотический индекс; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ПОК – пероксидаза

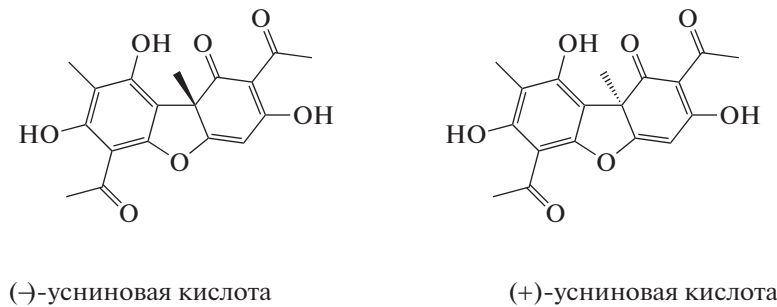


Рис. 1. Структурные формулы энантиомеров усниновой кислоты.

на физиологические и цитолого-генетические характеристики проростков *Allium fistulosum*, содержание фотосинтетических пигментов и флавоноидов, а также активность ферментативных антиоксидантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили семена и проростки лука батуна – *Allium fistulosum* L. (сорт Апрельский, урожай 2017 г., $n = 16$). Выбор модельного объекта обусловлен широким использованием лука для оценки токсичности различных физических и химических факторов [7].

Стереоизомеры УК выделяли из лишайников *Cladonia arbuscula* и *C. stellaris* – (+) и (-) энантиомер, соответственно, исходя из их преимущественного содержания в талломах. Методика выделения энантиомеров УК описана в работе [8]. Идентификацию УК проводили, сопоставляя полученные ИК- и ^1H -ЯМР-спектры с данными литературы [9]. Оптическую активность выделенных энантиомеров УК определяли поляриметрическим методом. Степень чистоты выделенных энантиомеров по данным тонкослойной хроматографии составляла 95–97%.

Одним из препятствий, затрудняющих исследование биологической активности УК, является ее низкая растворимость в воде [10]. УК титруется как одноосновная кислота, поэтому для получения растворимой в воде соли энантиомеры УК смешивали с эквимольным водным раствором гидроксида калия. При необходимости избыток щелочи нейтрализовали соляной кислотой до pH 7.5. Измерение pH проводили на ионметре “Эко-тест-2000” (Россия). Полученные водные растворы солей (+) и (-) УК использовали для дальнейших исследований.

Для определения влияния разных концентраций калиевых солей (+) и (-) УК на физиолого-биохимические и цитологические характеристики проростков, семена *A. fistulosum* были разделены на 12 опытных и одну контрольную группу. В опытных группах, перед посевом семян, в чашки Петри вно-

сили растворы энантиомеров УК в диапазоне концентраций 1000 – 31.2 мкМ. Контрольная группа проращивалась на дистиллированной воде. Выбор концентраций основан на данных полученных в работах [3, 11], в которых было показано, что в данном диапазоне концентраций калиевой соли усниновой кислоты наблюдались значимое снижение лабораторной всхожести семян и торможение роста проростков пшеницы, овса, кресс-салата, маша.

Семена проращивали на фильтровальной бумаге (по 50 шт. в каждой чашке, в четырех повторностях) при 16-часовом световом периоде и температуре 20–25°C. Энергию прорастания определяли на 5 день эксперимента. Лабораторную всхожесть, а также длину надземной части и корешка проростков определяли на 12 день наблюдений.

Цитологические исследования проводили на корешках проростков длиной 0.3–0.8 см ($n = 10$) для каждого варианта, которые фиксировали (на третий день) смесью 96% этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение 12 ч, после чего окрашивали ацетоорсеином. Давленные препараты просматривали под световым микроскопом Axiostar plus (“Carl Zeiss”, Германия). Аберрации хромосом учитывали анателофазным методом. В отдельные группы выделяли мосты и фрагменты. Нарушения клеточных делений, представленные отставанием, “выбросом”, забеганием хромосом, хромосомами на экваторе, многополюсными анафазами и др. относили к группе с нетипичным расположением хромосом – прочие аномалии. Для определения активности деления клеток использовали показатель митотического индекса (МИ), который определяли отношением числа клеток, находящихся в митозе, от их общего числа выраженным в процентах [12].

Степень фрагментации ДНК в корнях проростков определяли с помощью щелочной версии метода ДНК-комет (pH > 13) [13], позволяющего количественно измерить повреждения ДНК, включая однонитевые, двунитевые разрывы и щелочелабильные сайты. Все операции по выделению изолированных ядер клеток проводили

под тусклым желтым светом. С помощью острого лезвия бритвы корешки были аккуратно нарезаны в чашке Петри на льду. Кончики корешков с апикальной меристемой отсекали. Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I ("Sigma-Aldrich", США) (20 мкг/мл) в течение 30 мин. Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе ("ЛабМед-2Л", Россия), используя возбуждающий и отсекающий светофильтры на 490, 530 нм, соответственно. Полученные с микропрепаратов изображения "ДНК-комет" анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте комет (% ДНК в хвосте от общего количества ДНК в комете). Атипичные ДНК-кометы, характеризующиеся отсутствующей или практически отсутствующей головой и широким диффузным хвостом, выделяли в отдельную категорию и подсчитывали процентное содержание на каждые 100 шт. [14].

Все спектрофотометрические измерения были проведены на приборе UV-2600 ("Shimadzu", Япония). Для исследования брали навески 0.1–0.3 г сырой ткани 12-дневных проростков и гомогенизировали их в керамической ступке в присутствии 0.1 М Na-фосфатного буфера pH = 7.4 для извлечения фемента и 96% этанол с 1% тритоном X-100 для экстракции флавоноидов и ТБК-реактивных продуктов. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 6000 g, полученный супернатант использовали для дальнейших исследований.

Активность супероксиддисмутазы (СОД; КФ 1.15.1.1) измеряли по модифицированной методике [15]. Реакцию инициировали светом люминесцентной лампы в течение 5 мин. Активность фермента оценивали по ингибированию образования на свету окрашенного продукта восстановления нитросинего тетразолия ($\epsilon = 3.98/(\text{мМ см})$, $\lambda = 560 \text{ нм}$).

Для определения активности пероксидазы (ПОК; КФ 1.11.1.7) к 0.1 мл супернатанта добавляли 0.1 мл 4.3 мМ раствора (о)-дианизидина и 0.7 мл 0.1 М Na-фосфатного буфера pH=7.4, реакцию инициировали внесением 0.1 мл 0.45 мМ пероксида водорода. Активность фермента определяли по увеличению оптической плотности при образовании окрашенного продукта окисления (о)-дианизидина в течение 1 мин ($\epsilon = 30/(\text{мМ см})$, $\lambda = 460 \text{ нм}$) [16].

Для определения активности каталазы (КАТ; КФ 1.11.1.6) к 0.1 мл супернатанта добавляли 0.8 мл 0.1 М Na-фосфатного буфера pH = 7.4, реакцию инициировали внесением 0.1 мл 0.45 мМ пероксида водорода. Активность фермента определяли по уменьшению оптической плотности при раз-

ложении H_2O_2 в течение 1 мин ($\epsilon = 39.4/(\text{мМ см})$, $\lambda = 240 \text{ нм}$) [17].

Для определения суммарного содержания флавоноидов в проростках к 0.2 мл супернатанта добавляли 0.8 мл лимоннокислого боратного реактива (этанольный раствор 2.5% борной и 10% лимонной кислот). Оптическую плотность растворов измеряли через 15 мин. Содержание флавоноидов определяли по накоплению окрашенного комплекса с лимоннокислым борным реактивом ($\epsilon = 4.4/(\text{мМ см})$, $\lambda = 420 \text{ нм}$) [18].

Определение содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в проростках (без корешков) в расчете на сырую массу проводили в экстрактах с 80% ацетоном при максимумах поглощения 663, 647 и 470 нм, соответственно [19].

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению карбонильных соединений, образующих окрашенные комплексы с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты), количество которых выражали через концентрацию комплекса малонового диальдегида-ТБК ($\epsilon = 155/(\text{мМ см})$, $\lambda = 532 \text{ нм}$) [20].

Все измерения были выполнены на свежих образцах в 4 биологических и аналитических повторностях. Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической величины и ее стандартной ошибки. Сравнение средних значений выборок проводили методом ANOVA. Значимость отличий между средними определяли, используя критерии Ньюмена-Кейлса и Даннета для множественных сравнений при уровне $P < 0.05$. Расчеты проводили с помощью пакета Analyst-Soft, StatPlus (программа статистического анализа, v. 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование влияния различных концентраций энантиомеров (+) и (-) УК на физиологические характеристики проростков *A. fistulosum*. Показано, что при концентрациях (+) и (-) УК 500 и 1000 мкМ наблюдалось достоверное снижение энергии прорастания (в 1.6 и 2.7 раз) и лабораторной всхожести семян (в 1.4 и 2.6 раз) относительно контроля (табл. 1). При этом показатели длины побега и корня начинали достоверно уменьшаться уже при концентрации УК 125 мкМ. Ранее на ингибирование ростовых процессов у проростков кресс-салата и овса при действии (-)-УК в концентрации выше 100 мкМ указывалось в работе [11], что согласуется с полученными нами данными.

Нами проведено исследование митотической активности корневых меристем проростков *A. fistulosum* при действии различных концентраций энантиомеров УК. Показано, что митотическая ак-

Таблица 1. Физиологические показатели проростков *Allium fistulosum* при действии различных концентраций энантиомеров усниновой кислоты

Концентрация УК, мкМ	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина побега, см	Длина корешка, см
Контроль	55.3 ± 4.7	66.0 ± 9.2	3.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2
(+)-усниновая кислота				
31.2	50.0 ± 4.0	62.7 ± 1.7	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2
62.5	47.3 ± 6.4	58.7 ± 6.4	2.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
125	46.0 ± 2.3	50.7 ± 4.4	1.6 ± 0.1*	0.2 ± 0.1*
250	45.3 ± 5.8	54.7 ± 7.0	1.6 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*
500	34.7 ± 6.8*	47.3 ± 7.4*	1.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*
1000	22.0 ± 3.1*	25.3 ± 4.4*	1.0 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*
(-)-усниновая кислота				
31.2	54.0 ± 3.5	62.0 ± 4.2	3.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2
62.5	44.0 ± 5.1	61.8 ± 5.1	2.9 ± 0.1*	0.9 ± 0.1*
125	47.3 ± 7.9	59.1 ± 4.8	2.3 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*
250	47.3 ± 4.8	58.0 ± 7.0	1.7 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*
500	36.0 ± 3.1*	40.7 ± 2.7*	1.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*
1000	20.7 ± 5.2*	24.7 ± 3.5*	1.5 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($P < 0.05$, ANOVA, критерий Даннета).

Таблица 2. Цитологические характеристики проростков *Allium fistulosum* при действии различных концентраций энантиомеров усниновой кислоты

Концентрация УК, мкМ	Митотический индекс, %	Хромосомные aberrации, %			
		мосты	фрагменты	прочие аномалии	всего
Контроль	7.9 ± 0.6	7.5 ± 2.3	1.6 ± 0.6	4.0 ± 1.0	13.1 ± 2.4
(+)-усниновая кислота					
31.2	8.2 ± 1.3	8.0 ± 1.8	2.5 ± 0.9	6.8 ± 2.4	17.3 ± 1.7
62.5	7.5 ± 0.8	10.2 ± 2.8	4.7 ± 1.5*	8.2 ± 2.3*	23.1 ± 4.1*
125	6.4 ± 0.6*	14.8 ± 4.3*	5.4 ± 1.9*	9.3 ± 2.4*	29.5 ± 7.0*
250	6.0 ± 1.0*	15.1 ± 2.9*	5.5 ± 1.9*	16.7 ± 4.7*	37.3 ± 8.6*
500	5.7 ± 0.9*	15.2 ± 3.9*	5.1 ± 1.2*	20.1 ± 7.6*	40.4 ± 8.2*
1000	4.8 ± 1.0*	16.1 ± 3.1*	7.8 ± 3.2*	29.7 ± 11.1*	53.6 ± 11.1*
(-)-усниновая кислота					
31.2	8.8 ± 0.8	10.6 ± 2.0	2.5 ± 0.8	7.7 ± 1.5	20.8 ± 2.2
62.5	8.6 ± 1.2	13.8 ± 4.3*	6.4 ± 1.9*	7.9 ± 2.3*	28.1 ± 4.9*
125	5.8 ± 0.9*	14.4 ± 3.7*	7.6 ± 2.7*	14.2 ± 3.3*	36.2 ± 6.3*
250	5.2 ± 1.6*	16.1 ± 5.3*	7.9 ± 3.6*	15.2 ± 2.9*	39.2 ± 4.8*
500	4.1 ± 0.8*	17.0 ± 6.3*	8.3 ± 2.3*	26.4 ± 7.7*	51.7 ± 4.2*
1000	3.5 ± 1.0*	24.3 ± 9.9*	8.6 ± 3.6*	27.7 ± 10.3*	60.6 ± 10.3*

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($P < 0.05$, ANOVA, критерий Даннета).

тивность клеток начинала значимо снижаться относительно контроля при концентрации энантиомеров УК 125 мкМ. Максимальный эффект наблюдался при концентрации (+) и (-)-УК 1000 мкМ, при которой значение МИ было ниже в 1.6 и 2.2

раза, соответственно, относительно контроля (табл. 2). Ранее было показано, что (+)-УК проявляет антимиотический эффект в отношении растительных клеток *A. sepa* начиная с концентрации 580 мкМ [21]. Полученные нами данные указыва-

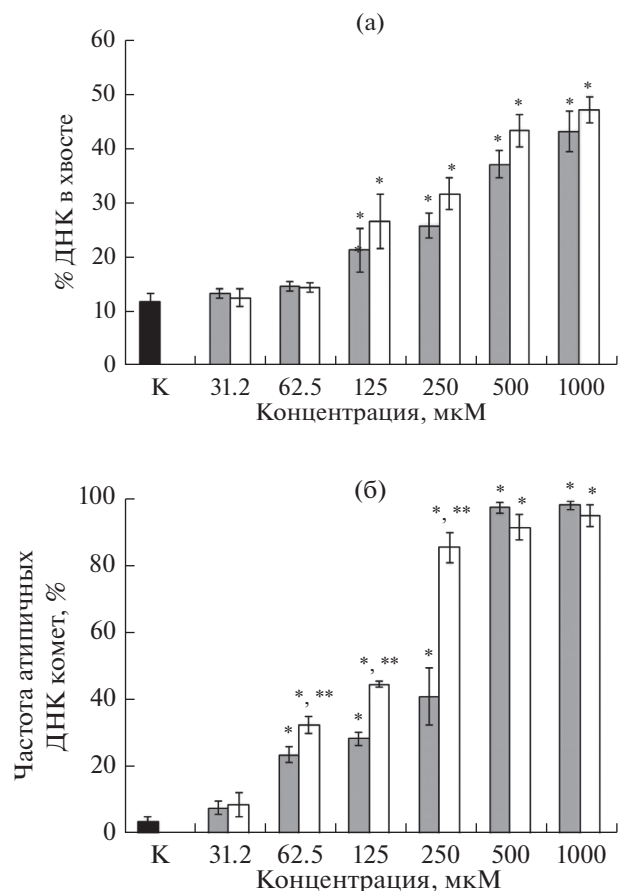


Рис. 2. Генотоксическое действие различных концентраций энантиомеров урсниновой кислоты в отношении проростков *A. fistulosum*: (а) – процент ДНК в хвосте кометы; (б) – частота атипичных ДНК комет. Серые столбцы – (+)-энантиомер, белые столбцы – (–)-энантиомер; * – статистически значимые отличия от контроля (К) при $P \leq 0.05$ (ANOVA, t – тест Даннета), ** – статистически значимые отличия между энантиомерами при $P \leq 0.05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса).

ют на то, что клетки проростков *A. fistulosum* были более чувствительны к действию энантиомеров УК, чем *A. cepa*.

Изучено влияние энантиомеров УК на частоту образования хромосомных aberrаций в делящихся клетках корешков проростков *A. fistulosum*. Показано, что в диапазоне концентраций (+) и (–)-УК 62.5–1000 мкМ наблюдалось повышение в 1.8–4.1 и 2.1–4.6 раз, соответственно, частоты образования патологических митозов по сравнению с контролем, что указывает на мутагенный эффект изученных соединений (табл. 2). Основными типами нарушений были отставания хромосом, одиночные (хроматидные дицентрики) и двойные мосты (хромосомные асимметричные обмены), одиночные фрагменты (хроматидные делеции). Это свидетельствует о дозозависимых нарушениях как в

самих хромосомах, так и в ахроматиновом веретене деления.

Ранее при изучении клеток лимфоцитов периферической крови отмечалось отсутствие роста частоты хромосомных aberrаций в клетках при действии на них (+)-УК в диапазоне концентраций 3–580 мкМ [22]. Кроме того, исследование влияния обоих энантиомеров УК на лимфоциты микроядерным тестом, также не выявило повышения частоты образования микроядер в клетках [23]. Можно предположить, что генетический аппарат растительных клеток является более чувствительным к действию УК по сравнению с животными клетками.

Изучение генотоксического действия УК в отношении растительных клеток ранее не проводилось. Генотоксичность (+) и (–)-УК оценивали с использованием щелочной версии метода ДНК-комет. Выявлено, что при концентрациях (+) и (–) энантиомеров УК 125–1000 мкМ степень повреждения ядерной ДНК (% ДНК в хвосте кометы) была в 1.8–3.6 и 2.2–3.9 раз, соответственно, выше по сравнению с контролем (рис. 2).

Помимо сформированных ДНК комет нами были выявлены кометы с отсутствующей или практически отсутствующей головой и широким диффузным хвостом, называемые *ghost cells*, или *hedgehogs*. По имеющимся представлениям, появление таких атипичных ДНК-комет является следствием процесса клеточной гибели, связанного с высоким уровнем оксидативного стресса, либо формирования апоптотических клеток, находящихся на стадии фрагментации хроматина [14].

Показано, что доля клеток с атипичными ДНК кометами в проростках при действии (+) и (–)-УК в концентрациях 62.5–1000 мкМ была выше в 6–25 и 8–24 раз, соответственно, по сравнению с контролем. Выявлено, что действие (–)-УК в диапазоне концентраций 62.5–250 мкМ приводило к формированию большего числа атипичных ДНК комет (в 1.4–2.1 раз), чем (+) энантиомер, что может говорить о ее более сильной способности индуцировать клеточные процессы, ведущие к фрагментации ДНК.

В предыдущем нашем исследовании было показано, что оба энантиомера УК проявляют генотоксические свойства в отношении лимфоцитов человека, при этом (–)-УК индуцировала больше атипичных комет, чем ее (+) энантиомер [8], что подтверждается данными, полученными в настоящем исследовании, для растительных клеток.

Нами было проведено исследование действия энантиомеров УК на суммарное содержание хлорофиллов ($a + b$) в проростках *A. fistulosum*. Показано, что содержание хлорофиллов в тканях снижалось при действии (+) и (–)-УК в диапазоне концентраций 62.5–1000 мкМ в 1.4–10.0 и 1.7–7.5 раз, соответственно, относительно контроля, приводя

при концентрациях 1000 мкМ практически к полному обесцвечиванию проростков (рис. 3).

Ранее при исследовании действия энантиомеров УК в отношении проростков *Lactuca sativa* и *A. serpa* было выявлено дозозависимое обесцвечивание семядольных тканей, связанное с уменьшением количества хлорофиллов и каротиноидов, у растений, обработанных только (–)-УК, в то время как (+)-энантиомер практически не оказывал никакого влияния на содержание пигментов [24], что не подтверждается полученными нами данными.

Одним из возможных механизмов депигментации растений при действии энантиомеров УК является необратимое ингибирование ферментов 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы и протопорфириногенаксидазы, участвующих в биосинтезе фотосинтетических пигментов [24].

Механизм биологической активности УК связывают с ее влиянием на функциональную активность хлоропластов и митохондрий. При изучении действия УК на хлоропласты отмечали подавление фотосинтеза в тилакоидах, инактивацию реакционных центров ФС II и дестабилизацию тилакоидных мембран [25]. В митохондриях наблюдалось разобщение окислительного фосфорилирования и подавление синтеза АТФ [26]. Считается, что вышеперечисленные процессы могут приводить к гиперпродукции АФК в клетках [27]. Хотя и известно, что УК обладает антиоксидантной активностью, но по имеющимся экспериментальным данным для нее характерны концентрационно-зависимые инверсии эффектов, связанные с переходом антиоксидантной активности в прооксидантную [1, 28]. Так, при воздействии УФ-облучения на клетки лимфоцитов человека УК в сравнительно низких концентрациях (0.01–1 мкМ) проявляла антиоксидантные свойства, тогда как в концентрации 100 мкМ – прооксидантные, усиливая повреждающее действие УФ-облучения [28]. Похожие результаты были получены и при исследовании влияния УК на ДНК-повреждающие эффекты прооксиданта диоксида [29]. В отношении лимфоцитов человека было показано, что оба энантиомера в концентрациях до 10 мкМ снижали токсические эффекты, вызванные диоксином, а при концентрации 100 мкМ, напротив, приводили к их усилению.

Гиперпродукция АФК может инициировать мобилизацию ответных реакций, способных существенно увеличить антиоксидантный потенциал растений [27]. Нами установлено, что в диапазоне концентраций обоих энантиомеров УК 62.5–1000 мкМ наблюдалось повышение активности ферментов антиоксидантной защиты (СОД, КАТ, ПОК) по сравнению с контролем (табл. 3). В то же время при концентрациях (+) и (–)-УК 125–1000 мкМ содержание флавоноидов (выполняющих, в том числе, функцию низкомолекулярных

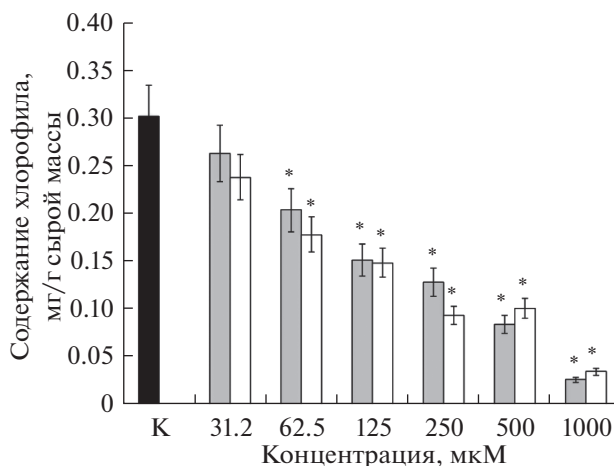


Рис. 3. Содержание хлорофилла в тканях проростков *A. fistulosum* при действии различных концентраций (+) и (–)-энантиомеров усниновой кислоты. Серые столбцы – (+)-энантиомер, белые столбцы – (–)-энантиомер; * – статистически значимые отличия от контроля (K) при $P \leq 0.05$ (ANOVA, *t*-тест Даннета).

антиоксидантов) в клетках тканей проростков снижалось в 1.2–3.7 и 1.4–6.5 раз, соответственно. При концентрациях (+) и (–)-УК от 125 до 1000 мкМ отмечался рост накопления ГБК-реактивных продуктов в клетках проростков в 1.3–1.9 и 1.4–2.3 раз, соответственно, по сравнению с контролем. Ранее при действии (+)-УК в концентрации 30 мкМ на корни проростков томата также фиксировали повышение активности фермента каталазы и содержания малонового диальдегида (основной продукт ПОЛ), что в целом, согласуется с полученными нами данными [30].

Можно предположить, что в диапазоне концентраций энантиомеров УК 31.2–62.5 мкМ гиперпродукция АФК компенсировалась за счет активации защитных антиоксидантных систем, обеспечивающих сбалансированное протекание окислительно-восстановительных реакций в тканях проростков *A. fistulosum*. В то же время при действии более высоких концентрации УК наблюдалось смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону активации ПОЛ и развития окислительного стресса.

Таким образом, микромолярные концентрации (+) и (–)-УК вызывали фитотоксические эффекты, выраженные в снижении лабораторной всхожести, угнетении ростовых процессов, замедлении митотической активности корневых меристем и депигментации тканей проростков *A. fistulosum*. Показан дозозависимый рост частоты хромосомных aberrаций и степени повреждения ядерной ДНК в клетках, что указывает на потенциально генотоксический и мутагенный эффект изученных энантиомеров УК. При этом (–)-УК индуцировала большее число атипичных ДНК ко-

Таблица 3. Биохимические характеристики проростков *Allium fistulosum* при действии различных концентраций энантиомеров усниновой кислоты

Концентрация УК, мкМ	Активность СОД, мМ/(г сырой массы мин)	Активность ПОК мМ/(г сырой массы мин)	Активность КАТ, мМ/(г сырой массы мин)	Содержание флавоноидов, мг/г сырой массы	Содержание ТБК-реактивных продуктов, нМ/г сырой массы
Контроль	2.2 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.0	2.6 ± 0.1	17.2 ± 2.7
(+)-усниновая кислота					
31.2	2.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	2.5 ± 0.1	17.4 ± 2.2
62.5	2.7 ± 0.2*	1.5 ± 0.1*	0.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1	18.3 ± 2.2
125	3.7 ± 0.3*	1.8 ± 0.2*	0.4 ± 0.1*	2.1 ± 0.2*	21.5 ± 2.8*
250	3.5 ± 0.4*	1.8 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	2.0 ± 0.2*	25.6 ± 2.3*
500	5.1 ± 0.5*	1.9 ± 0.5*	0.8 ± 0.2*	1.3 ± 0.1*	30.2 ± 3.4*
1000	8.5 ± 0.9*	2.5 ± 0.2*	0.6 ± 0.1*	0.7 ± 0.2*	32.5 ± 6.3*
(-)-усниновая кислота					
31.2	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	17.2 ± 2.2
62.5	3.0 ± 0.2*	1.7 ± 0.1*	0.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	19.8 ± 2.2
125	5.2 ± 0.6*	1.6 ± 0.2*	0.4 ± 0.1*	1.8 ± 0.2*	23.4 ± 2.8*
250	5.3 ± 0.5*	1.9 ± 0.3*	0.4 ± 0.1*	1.6 ± 0.1*	29.1 ± 3.3*
500	7.4 ± 0.6*	2.3 ± 0.5*	0.8 ± 0.2*	1.4 ± 0.2*	35.0 ± 4.9*
1000	9.1 ± 1.4*	3.2 ± 0.6*	0.7 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	39.6 ± 5.6*

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($P < 0.05$, ANOVA, критерий Даннета).

мет, чем (+)-энантиомер, что может указывать на ее более сильное действие на фрагментацию ДНК в клетках. В диапазоне концентраций энантиомеров УК 62.5-1000 мкМ наблюдалось повышение активности ферментов антиоксидантной защиты и снижение содержания флавоноидов на фоне роста концентрации продуктов ПОЛ в клетках, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. В то же время значимых различий между активностью (+) и (-)-УК на уровне физиолого-биохимических параметров проростков нами выявлено не было.

Работа выполнена в рамках госзаданий Института биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук на 2017-2020 № АААА-А17- 117020110055-3 “Разработка биопрепаратов из тканей растений и животных Якутии на основе изучения особенностей их биохимического состава и механизмов адаптации к условиям Севера” и АААА-А17- 117020110056-0 “Фундаментальные и прикладные аспекты изучения разнообразия растительного мира Северной и Центральной Якутии”

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Araujo A.A.S., de Melo M.G.D., Rabelob T.K., Nunes P.S., Santosa S.L., Serafinic M.R., Santosa M.R.V., Quintans-Ju'niora L.J., Gelainc D.P.* Review of the biological properties and toxicity of usnic acid // *Nat. Prod. Res.* 2015. V. 29. P. 1. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007455>
2. *Galanty A., Pasko P., Podolak I.* Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives // *Phytochem Rev.* 2019. V. 18. P. 527. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09605-3>
3. *Dalvi R.R., Singh B., Salunkhe D.K.* Physiological and biochemical investigations on the phytotoxicity of usnic acid // *Phyton.* 1972. V. 29. P. 63.
4. *Kytöviita M.M., Stark S.* No allelopathic effect of the dominant forest-floor lichen *Cladonia stellaris* on pine seedlings // *Funct. Ecol.* 2009. V. 23. P. 435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01508.x>
5. *Lechowski Z., Mej E., Bialczyk J.* Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid // *Environ. Exp. Bot.* 2006. V. 56. P. 239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.03.001>
6. *Lasceve G., Gaugain F.* Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets // *J. Plant Physiol.* 1990. V. 136. P. 723. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81352-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81352-0)

7. *Fiskesjo G.* The Allium test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. V. 102. P. 99. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
8. *Прокопьев И.А., Филиппов Э.В., Филиппова Г.В., Гладкина Н.П.* Генотоксичность энантиомеров усниновой кислоты *in vitro* в лимфоцитах периферической крови человека // *Цитология*. 2017. Т. 59. С. 13.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X17020031>
9. *Huneck S., Yoshimura I.* Identification of lichen substances. 1996. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 493 p.
10. *Jin J., Rao Y., Bian X., Zeng A., Yang G.* Solubility of (+)-usnic acid in water, ethanol, acetone, ethyl acetate and n-hexane // *J Solution Chem*. 2013. V. 42. P. 1018. <https://doi.org/10.1007/s10953-013-0010-1>
11. *Huneck S., Schreiber K.* Wachstumsregulatorische Eigenschaften von flechten-und moos-inhaltsstoffen // *Phytochemistry*. 1972. V. 11. P. 2429.
12. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 288 с.
13. *Gichner T., Patkova Z., Szakova J., Demnerova K.* Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves // *Mutat. Res*. 2004. V. 559. P. 49. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.008>
14. *Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д.* Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет // *Прикладная токсикология*. 2011. Т. 2. № 4. С. 28.
15. *Giannopolitis C.N., Ries S.K.* Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol*. 1977. V. 59. P. 309. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
16. *Лебедева О.В., Узарова Н.Н., Березин И.В.* Кинетическое изучение реакции окисления (o)-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // *Биохимия*. 1977. Т. 42. С. 1372.
17. *Aebi H.* Catalase *in vitro* // *Meth. Enzymol*. 1984. V. 105. P. 121. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
18. *Рогожин В.В.* Методы биохимических исследований. Якутск: ЯГУ, 1999. 93 с.
19. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes // *Method. Enzymol*. 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
20. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
21. *Ozturk S., Guvenc S., Arikan N., Yilmaz Ö.* Effect of usnic acid on mitotic index in root tips of *Allium cepa* L // *Lagascalia*. 1999. V. 21. P. 47.
22. *Polat Z., Aydın E., Türkez H., Aslan A.* *In vitro* risk assessment of usnic acid compound // *Toxicol. Ind. Health*. 2013. V. 32. P. 468. <https://doi.org/10.1177/0748233713504811>
23. *Koparal A.T., Tüylü B.A., Türk H.* *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes // *Nat. Prod. Res*. 2006. V. 20. P. 1300. <https://doi.org/10.1080/14786410601101910>
24. *Romagni J.G., Meazza G., Nanayakkara N.P.D., Dayan F.E.* The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase // *FEBS Letters*. 2000. V. 480. P. 301. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01907-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01907-4)
25. *Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Sato F.* Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1998. V. 62. P. 2023. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2023>
26. *Abo-Khatwa A.N., al-Robai A.A., al-Jawhari D.A.* Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria // *Nat. Toxins*. 1996. V. 4. P. 96. <https://doi.org/10.1002/19960402NT7>
27. *Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В.* Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012, Т. 59. С. 163.
28. *Kohlhardt-Floehr C., Boehm F., Troppens S., Lademann J., Truscott T.G.* Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - studies on human cells // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2010. V. 101. P. 97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017>
29. *Прокопьев И.А., Филиппов Э.В., Филиппова Г.В., Жанатаев А.К.* Про/антигенотоксическая активность энантиомеров усниновой кислоты *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 164. С. 289.) <https://doi.org/10.1007/s10517-018-3979-z>
30. *Latkowska E., Bialczyk J., Lechowski Z., Czaja-Prokop U.* Responses in tomato roots to stress caused by exposure to (+)-usnic acid // *Allelopathy J*. 2008. V. 21. P. 239.