

УДК 57.044; 576.08

**К ОЦЕНКЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ВУЛЬПИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

М. В. Горина

В статье приведены результаты оценки цитогенетического эффекта вторичного метаболита лишайника *Vulpicida pinastri* вольпинной кислоты с помощью Allium-теста. Показана способность вольпинной кислоты в концентрациях 0,0275; 0,055; 0,11 мг/мл ингибировать прорастание семян, пролиферативную активность в клетках корневой меристемы, что выражается в снижении митотического индекса. Блокирование митозов при воздействии высокой концентрации вольпинной кислоты происходило на стадии профазы, в более низкой концентрации – на стадиях анафазы и телофазы.

**Ключевые слова:** вольпинная кислота, цитотоксичность, Allium-тест, митотический индекс.

Экологический успех симбиозов, создающих лишайники, может, хотя бы отчасти, объясняться образованием органических соединений – вторичных метаболитов. Вторичные метаболиты лишайников формируются грибами, а их присутствие ограничено собственно лишайниками. Они отлагаются в виде кристаллов на поверхности гиф, на лишайниковых водорослях, и обычно составляют от 0,1 до 5 % от сухого веса таллома. Более 1000 вторичных метаболитов обнаружено в составе лишайников, но только для 7 % из них также показано присутствие в нелихенизированных грибах и даже в высших растениях [1–3]. Они слабо растворимы в воде и обычно извлекаются из талломов органическими растворителями [3]. Свыше тысячи вторичных метаболитов, главным образом моноароматические соединения, депсиды, депсидоны, пульвинаты, дибензофураны, антрахиноны и ксантоны, выделены из лишайников [4]. Лишайниковые вещества обладают широким спектром направлений биологической активности, включая антибиотическое, противогрибное, противовирусное, противовоспалительное, обезболивающее, жаропонижающее, противоопухолевое и цитотоксическое действия [5, 6].

Лишайник Вульпицида сосновая является довольно распространенным видом в лесах Самарской области [7]. Из анализа литературных данных известно, что основным токсическим

компонентом лишайника, вызывающим смерть позвоночных, в частности млекопитающих, является вольпинная кислота, способная, кроме того, ингибировать рост РНК и ДНК-содержащих вирусов, а также рост раковых опухолей [8]. Поскольку основным свойством вирусов является способность к делению, возможно, вольпинная кислота способна влиять на метаболизм ДНК не только вирусов, но и эукариот.

В данной работе представлены результаты оценки цитотоксичности экстрагированной из талломов лишайника *Vulpicida pinastri* (Scop.) J.-E. Mattson et M. J. Lai. вольпинной кислоты с использованием Allium-теста, рекомендованного в качестве тест-систем для оценки генотоксичности природных и техногенных агентов [9, 10].

**Условия и методы исследования**

Пробы талломов лишайника *Vulpicida pinastri* были отобраны территории Красносамарского лесного массива летом 2012 и 2013 гг. со стволов деревьев *Betula pendula* Roth. и *Pinus sylvestris* L. в количестве до 10 грамм. Подробная биоэкологическая характеристика данных образцов приводится в нашей предыдущей работе [11]. Собранные образцы очищались от субстрата, восходящие лопасти таллома отделяли и высушивали несколько дней до воздушно-сухого состояния, затем экстрагировали ацетоном (1 г лишайника на 50 мл растворителя) в течение 30 дней. Вытяжку наносили на силикагелевые пластины «Sorbfil» на алюминиевой подложке в виде штриха в количестве 0,1 мл для восходящей хроматограммы в системе растворителей н-бутанол-аммиак (25 %) в соотношении 4:1.

© Горина М. В., 2015.

Горина Мария Владимировна  
(gorina.mariya2011@yandex.ru),  
аспирант биологического факультета,  
Самарского государственного университета,  
443011, Россия, г. Самара, ул. Академика Павлова, 1.

На хроматограммах производили идентификацию лишайниковых веществ по цвету пятна и по величине Rf. Участки хроматограммы с Rf = 0,92 (пятна желтого цвета) вырезали и элюировали 3 мл ацетона [12]. Полученные растворы выпаривали до образования кристаллов чистой вьюльпиновой кислоты, которые использовали для приготовления растворов и оценки их гено- и цитотоксичности по стандартной методике Allium-теста [13].

В качестве тест-объекта использовали семена лука *Allium cepa* L. сорта «Ред-барон», которые высевали в количестве 30 штук на чашку Петри и проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной тестируемыми растворами вьюльпиновой кислоты в трех концентрациях: 0,0275; 0,055; 0,11 мг/мл. Растворителем служил 5 %-ный водный раствор изопропанола.

Оценка цитотоксического эффекта проводилась для гидрофобного раствора вьюльпиновой кислоты с расчетом митотического индекса и проведением ана-телофазного анализа. При анализе анафаз учитывались только те клетки, в которых расстояние между хромосомными группами больше ширины одной ана-телофазной группы. Не проводили анализ ана-телофаз с наложением клеток и при нарушении целостности оболочек. Для каждого варианта опыта исследовали не менее 1000 клеток, не менее 300 ана-телофаз, для расчета митотического индекса в сумме было проанализировано не менее 7000 клеток, 2100 ана-телофаз.

Микроскопирование препаратов выполняли на микроскопе ЛОМО «Микмед-1»

при 600-кратном увеличении. Достоверность отличий между действиями различной концентрации вьюльпиновой кислоты на величину митотического индекса и относительную длину фаз митоза оценивали с помощью полного двухфакторного дисперсионного анализа.

### Результаты и их обсуждение

При оценке генотоксичности вьюльпиновой кислоты с помощью *Allium*-теста одним из первых этапов работы был анализ способности растворов вьюльпиновой кислоты влиять на всхожесть семян лука (рис. 1).

Оказалось, что в избранном диапазоне концентрации вьюльпиновая кислота слабо влияет на всхожесть. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверные отличия между опытом и контролем, но необходимо отметить, что наиболее низкая концентрация вьюльпиновой кислоты проявляла ингибирующие свойства по сравнению с более высокими концентрациями, что, возможно, связано с затрудненным прохождением данного соединения в высоких концентрациях через семенную кожуру.

Проанализируем способность вьюльпиновой кислоты влиять на пролиферативную активность корневой меристемы *Allium cepa* (рис. 2). Оказалось, что в низких концентрациях вьюльпиновая кислота ингибирует клеточное деление. Наблюдаемое стимулирование высокими концентрациями растворов можно понять при анализе продолжительности фаз митоза в опыте и контроле (рис. 3).

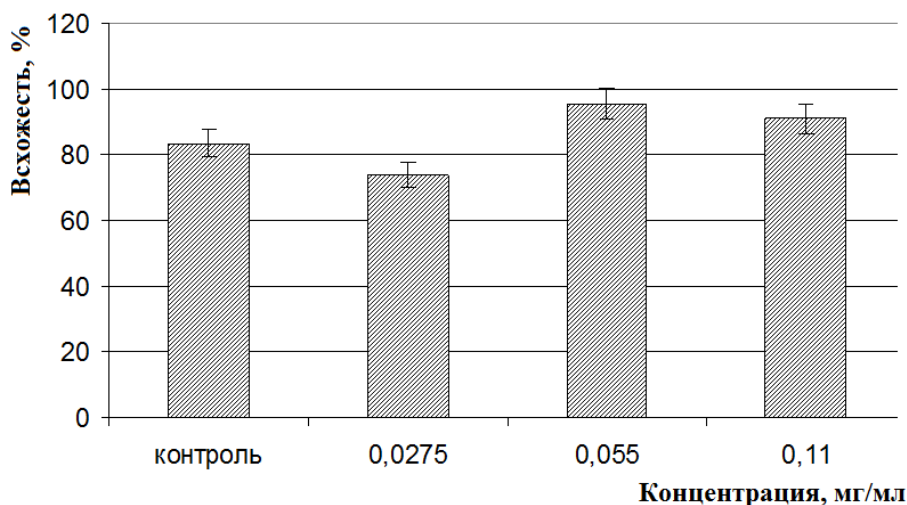
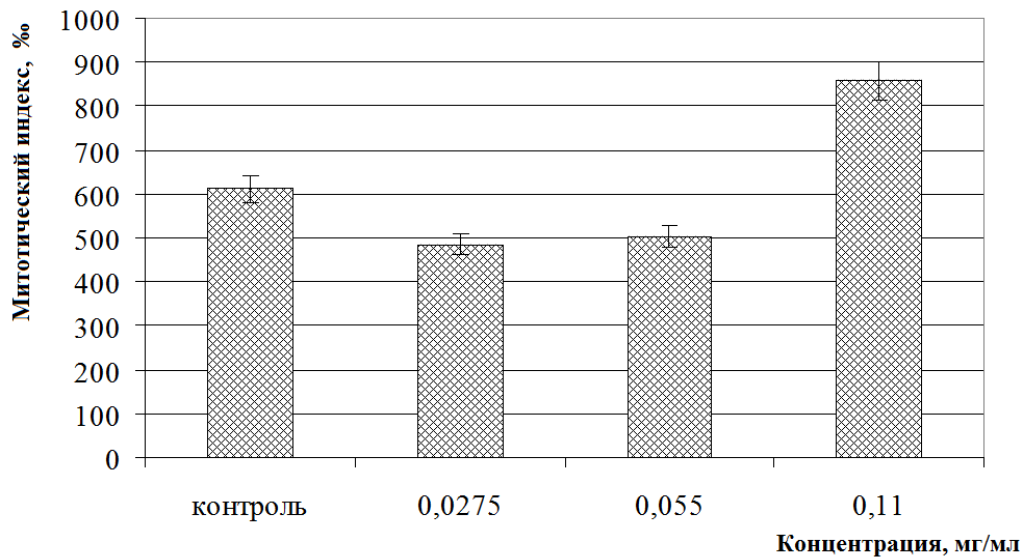
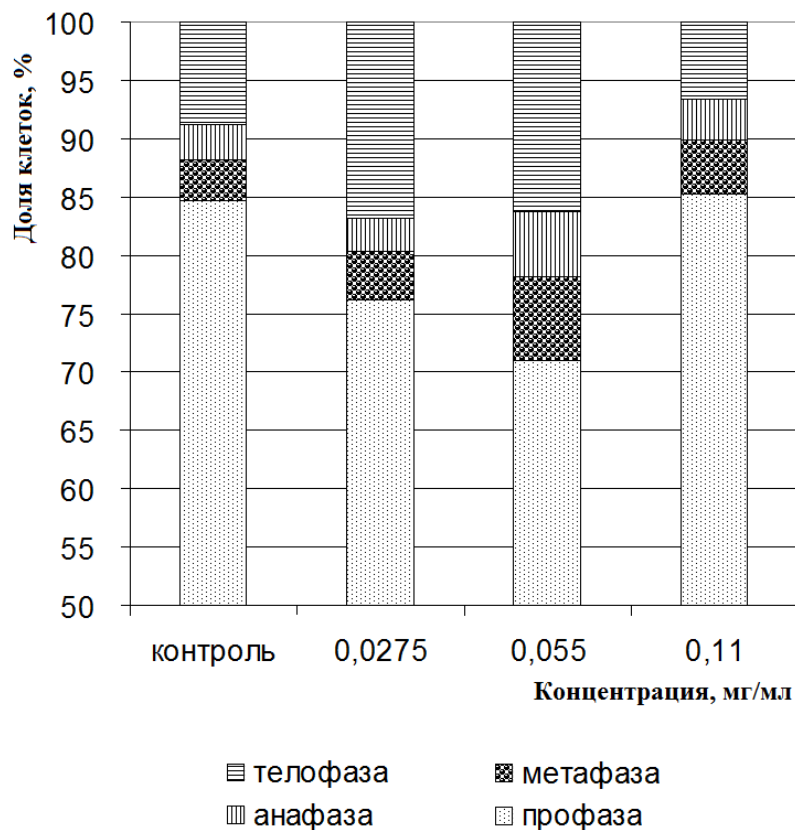


Рис. 1. Влияние разной концентрации вьюльпиновой кислоты на всхожесть семян *Allium cepa*



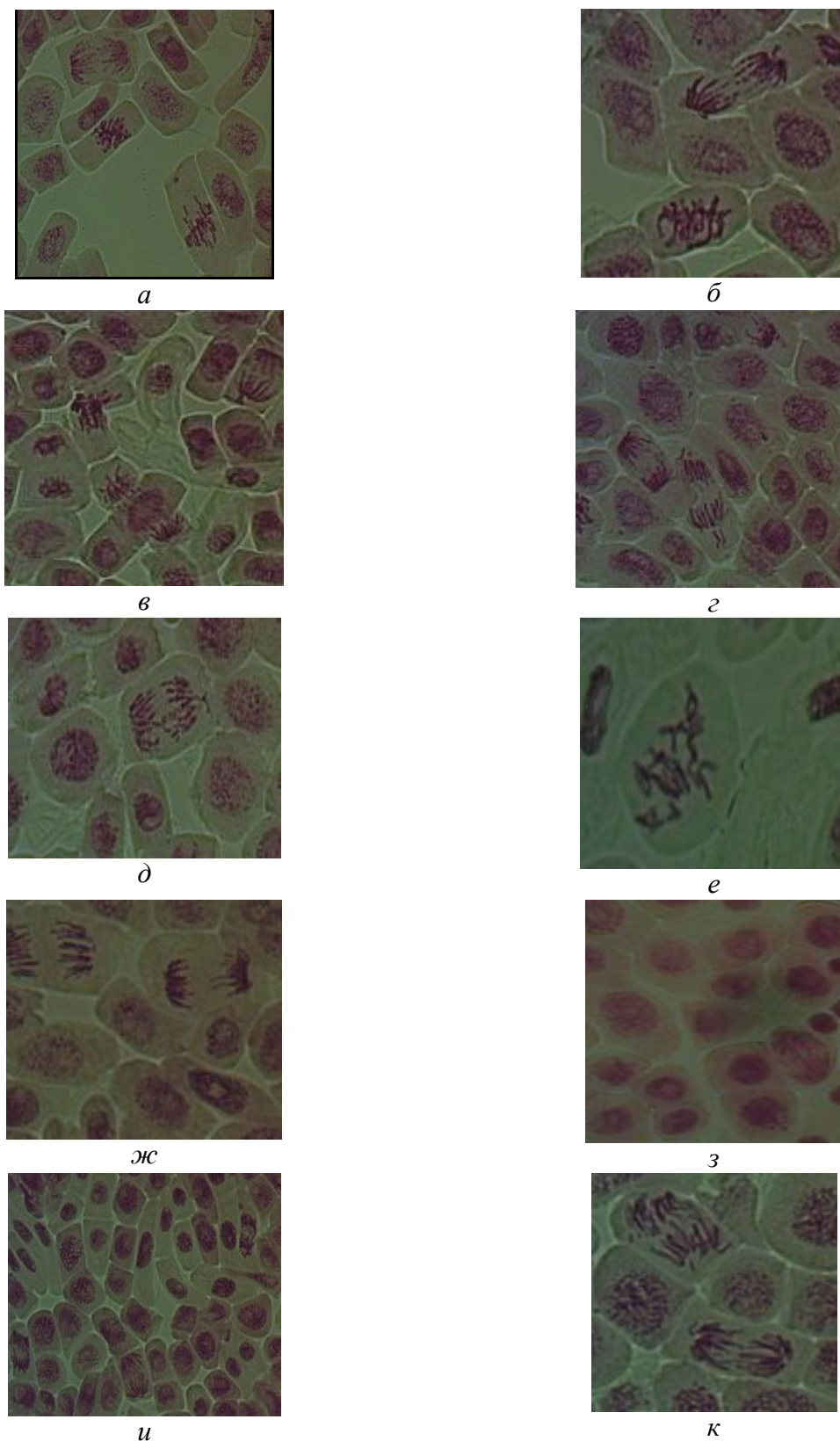
**Рис. 2. Влияние разной концентрации вальпиновой кислоты на пролиферативную активность клеток корневой меристемы *Allium cepa***



**Рис. 3. Влияние разной концентрации вальпиновой кислоты на относительную продолжительность фаз митоза клеток корневой меристемы *Allium cepa***

Анализируя приведенные выше результаты, можно заключить, что увеличение митотического индекса после воздействия вальпиновой кислоты в самой высокой концентрации связано с торможением клеточного деления на стадии профазы, что свидетельствует о высокой токсичности этого соединения и его способности вмешиваться в метаболизм предше-

ков синтеза ДНК. Из рис. 3 видно, что наблюдается торможение деления во время стадии анафазы при концентрации 0,0275 мг/мл и на стадии телофазы при концентрации 0,055 мг/мл соответственно. Такого рода ингибирование обычно ведет к появлению самых различных патологий митоза. Мы их наблюдали при анализе цитогенетических препаратов (рис. 4).



**Рис. 4. Различные виды хромосомных aberrаций в клетках меристемы корня *Allium cepa* при воздействии вольфиновой кислоты (ориг. х 400, 2014г.):**  
**а – потеря хромосом, хроматидный мост, б – дефрагментация хромосомного моста, в – фрагментированные хромосомные хвосты, г – двойная зеркальная потеря хромосом, д – дефрагментированная потеря хромосом, е – разрушение нитей веретена деления хромосом, ж – хромосомный хвост, з – множественное нерасхождение хромосом, и – нерасхождение, потеря и задержка хромосом, к – потеря хромосомы и хромосомный хвост.**

Результаты проведенных исследований показали, что при любой исследуемой нами концентрации вульпиновой кислоты возникают все известные типы хромосомных патологий, за исключением многополюсных митозов, что свидетельствует о влиянии вульпиновой кислоты на репликацию ДНК и ее рекомбинацию, вследствие чего появляются инверсии, транслокации, выражающиеся в наблюдаемых цитогенетических повреждениях. Количественный ана-телофазный анализ показал, что число хромосомных патологий растет с увеличением концентрации вульпиновой кислоты ( $p < 0,05$ ).

### Заключение

Таким образом, вульпиновая кислота способна влиять на прорастание семян, ингибируя или ставя их в зависимость от концентрации, а также ингибировать пролиферативную активность в клетках корневой меристемы, что выражается в снижении ее митотического индекса, блокируя митотические деления в высокой концентрации на стадии профазы, а в более низкой – на стадии анафазы и телофазы.

Вульпиновая кислота индуцирует хромосомные aberrации, и с ростом ее концентрации возрастает и мутагенная активность. Можно также отметить, что цитотоксичность и мутагенная активность определяется скоростью ее проникновения через мембраны живых клеток и ее высокой липофильностью. Присутствие фуранозного кольца в данной молекуле может, на наш взгляд, обеспечивать два пути поступления кислоты внутрь клетки: растворение в мембранах и пиноцитоз. Наличие гидроксильных групп и двойных связей у кислорода позволяют думать, что данное соединение может выступать как фактор сенсбилизации действия гамма-излучения, именно поэтому в экспериментах с оценкой действия вульпиновой кислоты на меланомы ее цитотоксичность резко возрастала даже при малой интенсивности гамма-излучения. Возможно, именно цитотоксичность вульпиновой кислоты приводит к подавлению роста миксомицетов и ингибированию ДНК-содержащих вирусов. Проведенные нами исследования показали и мутагенность, и цитотоксичность вульпиновой кислоты. Ее дериваты не только мутагенны и цитотоксичны, но и могут проявлять антиоксидантную активность.

### Литература

1. Allelopathic effects of lichen secondary metabolites on photobiont *Trebouxia erici* / M. Bačkor, V. Ivanova, H. Laatsch [et al.] // *Allelopathy Journal*. 2013. Vol. 31. P. 189–198.
2. Beckett R. P., Minibayeva F. V. Ecological roles of lichen secondary metabolites // *South African Journal of Botany*. 2013. Vol. 86. P. 170.
3. Effect of usnic acid on mitotic index in root tips of *Allium cepa* L. / S. Ozturk, S. Guvenc, N. Arikan [et al.] // *Lagascalia*. Vol. 21. 1999. P. 47–52.
4. Molnar K., Farkaš E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review // *Zeitschrift fur Naturforschung*. Bd. 65. 2010. P. 157–173.
5. Kosanić M., Ranković B., Stanojković T. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 Umbilicaria species // *Journal of Food Science*. 2012. Vol. 77. P. 20–25.
6. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites / N. Manojlović, B. Ranković, M. Kosanić [et al.] // *Phytomedicine*. 2012. Vol. 19. P. 1166–1172.
7. Корчиков Е. С. Лишайники Самарской Луки и Красносамарского лесного массива. Самара: Самарский университет, 2011. 320 с.
8. Vulpinic acid inhibits the growth of murine melanoma cells in vitro / ed. by H. Ibrahim, F. Mamadou, A. Diop. Dakar: Sall University Research Hospital of Dakar, 2009. 19 p.
9. Leme D. M., Marin-Morales M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application // *Mutation Research*. 2009. Vol. 682. P. 71–81.
10. Fiskesjo G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. Vol. 102. P. 99–112.
11. Горина М. В., Корчиков Е. С. Биоэкологические особенности лишайника *Vulpicida pinastri* в условиях Красносамарского лесного массива // *Вестник молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета*. 2014. № 2 (5). С. 16–21.
12. Хроматография на бумаге / под ред. И. М. Хайса и К. Мацека. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 852 с.
13. Levan A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium* // *Hereditas*. 1938. Vol. 24. P. 471–486.

## ASSESSMENT OF VULPINIC ACIDS CYTOTOXICITY

M. V. Gorina

The article says results of evaluation of the cytotoxicity effect of the secondary metabolite lichen *Vulpicida pinastri* vulpinic acid using Allium-test. Shows the ability vulpinic acid in concentrations 0,0275; 0055; 0,11 mg/ml to inhibit pullulation seeds, proliferative activity in cells of the root meristem, represented by a mitotic index decrease. Blocking of mitosis at impact high concentration of vulpinic acid at the stage of prophase, in much lower concentrations at the stages of anaphase and telophase.

**Key words:** vulpinic acid, cytotoxicity, Allium-test, mitotic index.

*Статья поступила в редакцию 29.10.2015 г.*