

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА МУТАГЕНЕЗ У ПОДСОЛНЕЧНИКА *Helianthus annuus* L., ИНДУЦИРОВАННЫЙ НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНОЙ

© 2005 г. А. В. Усатов, Е. В. Машкина, Е. П. Гуськов

Научно-исследовательский институт биологии при Ростовском государственном университете,
Ростов-на-Дону 344090; e-mail: genlab@bio.rsu.ru

Поступила в редакцию 12.01.2004 г.

В работе исследован эффект мутагенного действия нитрозометилмочевины (НММ), модифицированный гипербарической оксигенацией (ГБО). Показано, что ГБО в изученных режимах усиливает мутагенный эффект НММ на пластидный генетический материал клеток подсолнечника. Обсуждаются механизмы усиления НММ-мутагенеза гипербарической оксигенацией.

С момента открытия И.А. Рапопортом мутагенного эффекта нитрозометилмочевины (НММ) на биологических объектах прошло уже несколько десятилетий, однако механизм действия этого агента по-прежнему не полностью ясен. Ранее было показано, что НММ в концентрациях 0.01–0.015% эффективно индуцирует внеядерные мутации у подсолнечника [1, 2]. С увеличением концентрации мутагена до 0.02% и выше возникают ядерные хлорофилльные мутации и аберрации хромосом [3–4]. Широкий спектр действия НММ некоторые авторы объясняют тем, что этот агент вступает в реакции не только алкилирования, но также нитрозирования и карбомоилирования, т.е. обладает комплексным действием на макромолекулы [5]. При этом полагают, что основной вклад в мутагенный эффект вносят реакции взаимодействия продуктов распада мутагена с биополимерами, а не прямой атаки НММ молекул ДНК [6].

Известно, что становление мутаций – это сложный многоэтапный процесс, зависящий от многих факторов, в том числе и от физиологического состояния организма. При нормальных условиях жизнедеятельности в клетке поддерживается равновесие между скоростью образования активных форм кислорода и скоростью их детоксикации компонентами антиоксидантной защиты [7, 8]. Неспецифической реакцией организма на действие стрессорных факторов различной природы является развитие окислительного стресса и интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Избыточная генерация активных форм кислорода и накопление продуктов ПОЛ могут либо непосредственно индуцировать мутации, либо изменять чувствительность клеток к другим мутагенам [9, 10]. Классическим способом моделирования окислительного стресса является гипербарическая оксигенация (ГБО), воздей-

ствие которой индуцирует в тканях свободные радикалы как первичных деструкторов нуклеиновых кислот, так и вторичные аутомутагены – оксидериваты метаболитов, способных взаимодействовать с ДНК. Цель данной работы – изучение влияния гипербарической оксигенации на генетические последствия действия НММ на подсолнечник *Helianthus annuus* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования использовали инбредную линию 3629 подсолнечника *Helianthus annuus* L. Для полевого эксперимента семена замачивали в воде в течение 18 ч, а затем проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при 26°C. Обработку НММ (0.015%) проводили с 12-ГО по 15-Й ч прорастания семян. Временной интервал действия мутагена был выбран не случайно. Ранее было показано, что обработка прорастающих семян подсолнечника НММ в концентрации 0.015% с экспозицией 0–24 ч индуцирует пластомные мутации только в интервале 9–18 ч с максимальным эффектом, приходящимся на 12–15 ч прорастания [2]. Окислительный стресс моделировали гипербарической оксигенацией в режиме 0.4 МПа чистого кислорода 3 ч. Обработку ГБО проводили в следующие временные интервалы: с 3-го по 6-й ч; с 9-го по 12-й ч; с 12-го по 15-й ч; с 18-го по 21-й ч прорастания. Обработанные и контрольные проростки высаживали в поле. В каждом варианте опыта было высажено по 150 проростков. Для выяснения генетической природы индуцированных пестролистных форм подсолнечника проводили реципрокные скрещивания с растениями исходной линии 3629. Изучали F₁–F₃ поколения.

Для цитогенетического анализа были выбраны две концентрации НММ – 0.015 и 0.03%. Обра-

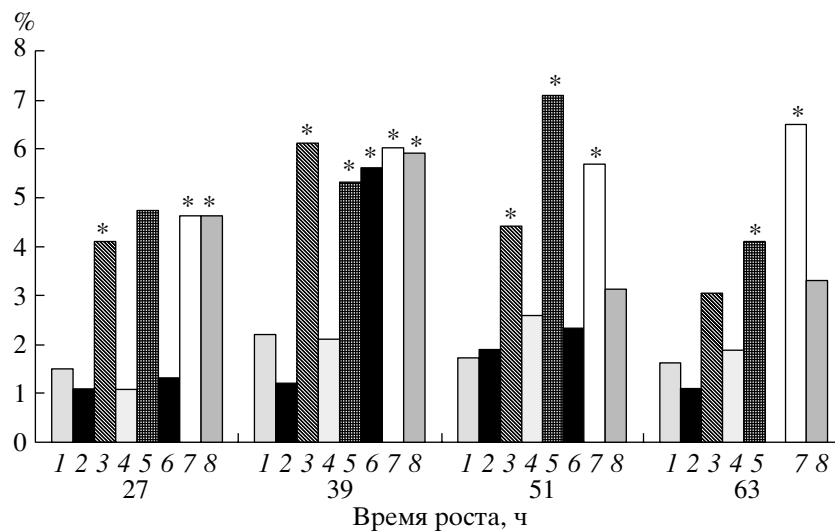


Рис. 1. Уровень aberrаций хромосом (ось ординат, %) в клетках корневой меристемы проростков подсолнечника после действия НММ и ГБО. 1 – контроль, 2 – НММ (0.015%, 3 ч), 3 – НММ (0.03%, 3 ч), 4 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч), 5 – ГБО (0.7 МПа, 9 ч), 6 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч) + НММ (0.015%), 7 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч) + НММ (0.03%), 8 – НММ (0.03%) + ГБО (0.7 МПа, 3 ч). “*” – достоверные отличия по сравнению с контролем.

ботку ГБО проводили в следующих режимах: 0.7 МПа – 3 ч, 0.7 МПа – 9 ч. Корешки фиксировали в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) через 27, 39, 51 и 63 ч от начала проращивания семян. В корневой апикальной меристеме проростков анализировали уровень aberrаций хромосом на стадии анафазы – телофазы (не менее 8–10 корешков на вариант).

Биохимические анализы проводили на корневой меристеме проростков сразу и через 24 ч после окончания обработок. Гомогенаты готовили в 1/15 М фосфатном буфере (рН 7.8). Соотношение среды гомогенизации и массы растительного материала составляло 10:1. Гомогенаты использовали для определения уровня хемилюминесценции. Активность двух сопряженных ферментов антиоксидантной защиты – СОД и каталазы – определяли в супернатанте после центрифугирования гомогената (500 г, 10 мин).

Анализ хемилюминесценции проводили в системе H_2O_2 –люминол (5-амино-2,3-дигидрофталазиндион-1,4), которая позволяет определять изменение в тканях концентрации гидроксильного радикала, играющего основную роль в повреждении макромолекул при окислительном стрессе. Пробы объемом 0.025 мл переносили в кювету с 2.8 мл трис-НСI-буфера (рН 6.8). Подготовленные образцы помещали в термостатируемое (37°C) кюветное отделение хемилюминометра, разработанного в НИИ биологии РГУ на базе сцинтилляционного спектрометра 22028 (RTF, ГДР). Динамику метаболических изменений после введения 450 мкл 0.35 М H_2O_2 оценивали по высоте быстрой вспышки хемилюминесценции (мм).

Активность СОД определяли с использованием нитросинего тетразолия [11]. Определение активности каталазы проводили по методу Королюка с соавт. [12]. Активность ферментов рассчитывали на белок, концентрацию которого определяли по методу Lowry [13].

В таблицах представлены средние арифметические 8–9 повторностей и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Алкилирующий мутаген НММ индуцирует как точечные мутации в хлоропластной ДНК, так и перестройки ядерного генетического материала. Различные генетические последствия обработки семян НММ зависят от используемой концентрации. Обработка проростков подсолнечника НММ в концентрации 0.015% не изменяет уровень перестроек хромосом в клетках корневой апикальной меристемы, однако пролиферативная активность клеток резко снижена на протяжении 48 ч после окончания воздействия (рис. 1). Мутаген в концентрации 0.03% индуцирует повышенный уровень aberrаций хромосом уже через 12 ч после окончания обработки, т.е. НММ в данной концентрации является мутагеном прямого действия с “не задержанным” эффектом. В то же время продленный выход aberrаций хромосом (на протяжении 36 ч после окончания обработки) указывает на существенный вклад внутриклеточных продуктов метаболизма НММ в индукцию повреждений ядерной ДНК.

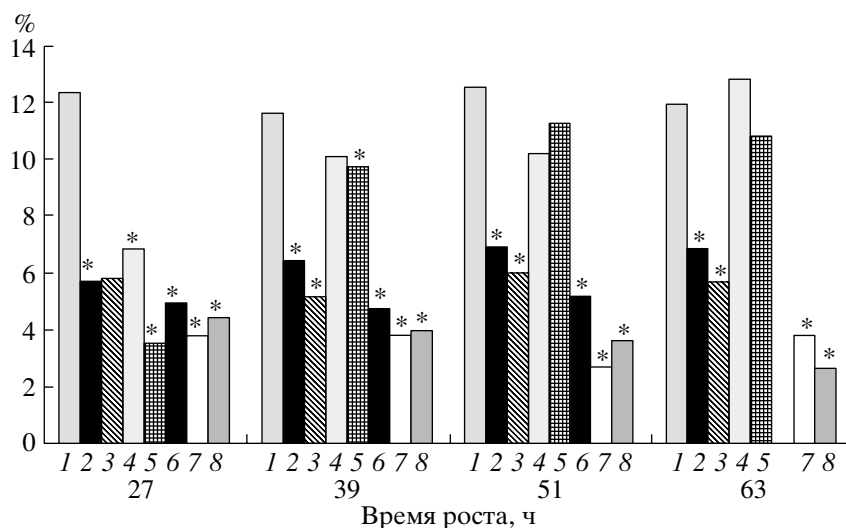


Рис. 2. Митотический индекс клеток (ось ординат, %) корневой меристемы проростков подсолнечника после действия НММ и ГБО. 1 – контроль, 2 – НММ (0.015%, 3 ч), 3 – НММ (0.03%, 3 ч), 4 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч), 5 – ГБО (0.7 МПа, 9 ч), 6 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч) + НММ (0.015%), 7 – ГБО (0.7 МПа, 3 ч) + НММ (0.03%), 8 – НММ (0.03%) + ГБО (0.7 МПа, 3 ч). “*” – достоверные отличия по сравнению с контролем.

Повышенное давление кислорода (0.4 МПа или 0.7 МПа – 3 ч) не индуцирует увеличения хромосомных перестроек у подсолнечника (рис. 1). Однако ранее было показано, что данные режимы ГБО достоверно повышают уровень aberrаций хромосом в клетках корневой меристемы лука, ячменя и пшеницы [14, 15]. Цитогенетический эффект на подсолнечнике обнаружен нами только после действия ГБО в режиме 0.7 МПа – 9 ч (рис. 1), причем максимальное количество aberrаций хромосом, зафиксированное после действия ГБО, приходится на 51-й ч роста. Следовательно, повреждения в ядерном генетическом материале индуцирует не сам кислород и его свободные радикалы, а вторичные продукты – эндогенные метаболиты активных форм кислорода.

Повышенное давление кислорода подавляет деление клеток (рис. 1 и 2). Пролиферативная активность клеток корневой меристемы проростков в первые часы после окончания обработки ГБО достоверно снижена по сравнению с контролем. Степень снижения митотического индекса (МИ) зависит от используемого режима ГБО. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами на других растениях [15]. В то же время пороговая величина ГБО, вызывающая цитогенетический эффект, видоспецифична.

ГБО в режиме, не индуцирующем aberrации хромосом у подсолнечника (0.7 МПа 3 ч), модифицирует цитогенетический эффект НММ. Совместное действие НММ и ГБО (независимо от варианта) оказывает значительный синергический эффект на пролиферативную активность клеток корневой апикальной меристемы проростков.

Влияние комбинированного действия НММ и ГБО на индукцию aberrаций хромосом не однозначно и зависит от последовательности действия физического и химического агентов. В варианте действия ГБО перед обработкой мутагеном в концентрации 0.015% через 24 ч после окончания воздействия уровень aberrаций хромосом был достоверно выше не только по сравнению с контролем, но и действием одной НММ. Более того, предобработка ГБО пролонгирует цитогенетическое действие НММ в концентрации 0.03% (через 48 ч после окончания воздействия уровень перестроек хромосом достоверно выше по сравнению с действием одного мутагена). В то же время постобработка ГБО не увеличивает уровень перестроек хромосом, индуцируемых НММ, а к третьей фиксации (51-й ч роста) уровень aberrаций хромосом не отличается от контрольных значений. Таким образом, результаты цитогенетического анализа свидетельствуют, что только предварительное воздействие гипербарической оксигенации способно усиливать генотоксичный эффект НММ.

НММ как эффективный индуктор мутаций пластидной и митохондриальной ДНК, вероятно, способна непосредственно нарушать структуру генетического материала органелл цитоплазмы или формировать вторичные мутагенные продукты, обладающие специфической активностью. Количественная оценка появления внеядерных хлорофильных мутантов подсолнечника после комбинированного воздействия НММ и ГБО на проростки подсолнечника может дать основание для прояснения этой проблемы. В связи с этим была изучена частота хлорофильных мутаций у

Таблица 1. Частота внеядерных пестролистных мутаций у подсолнечника *Helianthus annuus L.* после обработки проростков НММ (0.015%) и ГБО (0.4 МПа)

Вариант	Выживаемость, %	Частота пестролистных растений в М ₁ , % ± m	Число семей М ₂	
			всего	с пестролистными растениями, % ± m
Контроль	78	0	117	0
НММ (12–15 ч)	67	38.6 ± 4.84	101	35.6 ± 4.76
ГБО (3–6 ч)	84	0	126	0
ГБО (9–12 ч)	85	0	128	0
ГБО (12–15 ч)	88	0	132	0
ГБО (18–21 ч)	87	0	131	0
ГБО (3–6 ч) +НММ (12–15 ч)	77	63.5 ± 4.49***	116	60.3 ± 4.54***
ГБО (9–12 ч) +НММ (12–15 ч)	79	59.7 ± 4.49**	119	57.1 ± 4.54**
ГБО (12–15 ч) +НММ (12–15 ч)	74	38.7 ± 4.62	111	36.9 ± 4.58
НММ (12–15 ч) + ГБО (18–21ч)	75	34.5 ± 4.47	113	35.4 ± 4.49

*** Достоверные отличия по сравнению с действием одной НММ при *** $P < 0.001$ и ** $P < 0.01$.

подсолнечника после действия НММ и ГБО и определена их генетическая природа. Для модификации мутагенного эффекта НММ был выбран режим ГБО (0.4 МПа), не индуцирующий повреждений в ядерном генетическом материале.

Анализ растений М₁ показал, что НММ снижает всхожесть проростков подсолнечника на 14% по сравнению с контролем и индуцирует появление в М₁ пестролистных растений с частотой 38.6% (табл. 1). Данные пестролистны формы не являются морфозами, о чем свидетельствуют результаты анализа растений М₂. ГБО не снижает выживаемости растений и не индуцирует хлорофилльных аномалий как в М₁, так и в М₂ (табл. 1). Однако воздействие ГБО перед обработкой проростков НММ достоверно повышает количество пестролистных форм в М₁ и М₂, в то время как действие ГБО одновременно с НММ или после обработки мутагеном не изменяет частоту пестролистности, индуцируемой НММ.

Следует отметить, что индуцированные пестролистны мутанты удовлетворяют основным критериям внеядерной наследственности [16]. Для них характерно однородительское материнское наследование мутантного признака, неменделевское расщепление в потомстве при самоопылении на зеленые, пестрые, желтые или белые проростки. Следовательно, предобработка ГБО увеличивает частоту пластидных мутаций, индуцируемых НММ.

Одной из возможных причин усиления генотоксичного эффекта НММ гипербарической оксигенацией может быть индукция свободнорадикальных процессов после действия ГБО. Свободные радикалы способны не только повреждать ДНК, но и влиять на пролиферативную актив-

ность клеток - торможение пролиферации происходит при повышении концентрации свободных радикалов и снижении антиоксидантной емкости тканей [17]. Изменение уровня свободнорадикальных продуктов в клетках и тканях может играть ведущую роль в устойчивости или чувствительности генетического аппарата к внешним воздействиям.

Для оценки окислительного напряжения в тканях после действия НММ и ГБО был проведен модельный эксперимент. У проростков подсолнечника после обработки НММ и ГБО определяли интенсивность хемилюминесценции и активность ключевых антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы. Несмотря на то, что прорастание семян сопровождается резкой активацией окислительно-восстановительных реакций, что может приводить к повышению внутриклеточной концентрации свободных радикалов, в контроле показатели хемилюминесценции в клетках корневой апикальной меристемы проростков на протяжении 39 ч развития остаются стабильными (табл. 2). Вероятно, это связано с активацией первичного ферментативного звена антиоксидантной защиты, так как в клетках корневой меристемы проростков за этот временной интервал активность каталазы достоверно повышается (табл. 3).

Воздействие НММ в концентрации 0.015% также не изменяет уровень хемилюминесценции у проростков подсолнечника. В то же время сразу после действия мутагена активность СОД резко снижается, а активность каталазы остается на уровне контроля, что, вероятно, и предотвращает усиление свободно-радикальных реакций окисления и зарождение цепного процесса ПОЛ. Ис-

Таблица 2. Уровень быстрой вспышки хемилюминесценции (мм) в системе люминол–H₂O₂ в корневой меристеме проростков подсолнечника

Вариант	Время роста, ч			
	6	15	30	39
Контроль	70.5 ± 7.43	80 ± 4.89	80.2 ± 2.36	69.5 ± 1.5
НММ 0.015%	–	70.8 ± 3.84	–	72.7 ± 2.97
НММ 0.03%	–	97 ± 6.62*	–	–
ГБО 0.4 МПа (3–6 ч)	78.8 ± 7.20	86.5 ± 7.29	83.2 ± 9.88	–
ГБО 0.4 МПа (12–15 ч)	–	81.8 ± 1.47	–	79.6 ± 5.56
ГБО (3–6 ч) + НММ (0.015%)	–	81.6 ± 2.28 [^]	–	82.3 ± 1.45*** [^] [^]
ГБО (12–15 ч) + НММ (0.015%)	–	75.0 ± 9.87	–	92 ± 5.70 *** [^] [^]

* Достоверные отличия по сравнению с контролем при $P < 0.05$; [^] – достоверные отличия по сравнению с действием одной НММ.

Таблица 3. Активность каталазы (ед/мг белка) и СОД (ед/мг белка) в корневой меристеме проростков подсолнечника

Вариант	Фермент	Время роста, ч			
		6	15	30	39
Контроль	СОД	30.1 ± 6.94	50.7 ± 9.42	31.1 ± 3.36	25.8 ± 4.06
	Каталаза	4.8 ± 0.62	6.6 ± 0.51	8.4 ± 1.18	9.6 ± 0.82
НММ 0.015% (12–15 ч)	СОД	–	10.1 ± 1.33***	–	41.2 ± 1.85***
	Каталаза	–	7.1 ± 0.31	–	15.0 ± 0.86***
НММ 0.03%	СОД	–	3.8 ± 1.61***	–	–
	Каталаза	–	5.1 ± 0.29*	–	–
ГБО 3 ати (3–6 ч)	СОД	4.6 ± 0.84***	47.2 ± 5.48	3.5 ± 0.6***	41.3 ± 5.69*
	Каталаза	7.6 ± 0.63**	3.3 ± 0.34***	11.2 ± 0.78*	5.6 ± 0.39***
ГБО 3 ати (12–15 ч)	СОД	–	6.6 ± 2.4***	–	36.4 ± 6.23
	Каталаза	–	5.5 ± 0.21*	–	9.7 ± 1.54
ГБО (3–6 ч) + НММ (0.015%)	СОД	–	17.7 ± 3.02*** [^]	–	50.5 ± 12.85
	Каталаза	–	4.0 ± 0.17*** [^] [^] [^]	–	6.5 ± 0.85*** [^] [^]
ГБО (12–15) + НММ (0.015%)	СОД	–	2.3 ± 0.29*** [^] [^] [^]	–	38.4 ± 7.69
	Каталаза	–	4.3 ± 0.60*** [^] [^] [^]	–	6.4 ± 0.61*** [^] [^] [^]

* Достоверные отличия по сравнению с контролем $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $P < 0.001$; [^] – достоверные отличия по сравнению с НММ.

пользование НММ в концентрации 0.03% приводит к увеличению высоты быстрой вспышки хемилюминесценции, которое сопровождается ингибированием активности как каталазы, так и СОД. Таким образом, в данном эксперименте установлено, что НММ может нарушать динамическое равновесие в системе про- и антиоксиданты у подсолнечника, активируя свободно-радикальные реакции, что в свою очередь приводит к дополнительным повреждениям генетических структур, индуцируемых свободными радикалами, природа которых неясна, так как квантово-химическая структура НММ не предусматривает

возможного образования основных активных форм кислорода, в том числе гидроксильного радикала и супероксиданиона.

ГБО в режиме 0.4 МПа 3 ч (с 3-го по 6-й ч роста) не изменяет уровень хемилюминесценции в клетках корневой меристемы проростков как сразу, так и через 24 ч после окончания воздействия (табл. 2). При этом непосредственно после действия происходит ингибирование активности СОД (на 85%), в то время как активность каталазы повышается на 58%. Через 9 ч после воздействия активность СОД достигает контрольного уровня, но активность каталазы достоверно ниже

по сравнению с контролем. Таким образом, ГБО в данном режиме вызывает нарушение сопряженного действия СОД и каталазы, однако это не приводит к активации хемилюминесценции, возможно, за счет эффективной работы других звеньев антиоксидантной защиты, в том числе и низкомолекулярных. После действия ГБО с 12-го по 15-й ч роста корешков наблюдали снижение активности СОД, а через сутки после окончания обработки активность ключевых антиоксидантных ферментов не отличалась от контрольных значений.

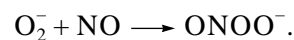
Обработка проростков ГБО и НММ в концентрации 0.015% индуцирует увеличение быстрой вспышки хемилюминесценции через 24 ч после окончания воздействия. При этом происходит снижение активности как СОД, так и каталазы. Через сутки после воздействия активность СОД достигла контрольных значений, однако активность каталазы оставалась сниженной как по сравнению с контролем, так и действием одной НММ. Увеличение интенсивности хемилюминесценции через сутки после окончания обработки ГБО и НММ еще раз указывает на то, что индуцированные свободные радикалы формируются как вторичные долгоживущие продукты внутриклеточного метаболизма с задержанным эффектом.

Повышение эффективности мутагенеза НММ после воздействия гипербарической оксигенации может быть связано с нарушением работы антиоксидантных ферментов. Результаты модельного эксперимента свидетельствуют, что обработка ГБО не индуцирует повышения уровня гидроксильного радикала в тканях проростков подсолнечника, хотя после предобработки ГБО к моменту воздействия мутагена в тканях корневой меристемы наблюдается дисбаланс в работе ключевых антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы (табл. 2, 3). При отсутствии дополнительного внешнего воздействия это не приводит к интенсификации свободнорадикальных реакций, кластогенным последствиям и к появлению хлорофилльных мутантов. Однако последующее воздействие НММ значительно повышает частоту пластидных хлорофилльных мутаций.

При одновременном воздействии НММ и ГБО генотоксичный эффект алкилирующего мутагена не изменяется, хотя активность антиоксидантных ферментов также снижена. При этом частота индуцированных внеядерных хлорофилльных мутантов соответствует частоте, которую индуцирует только НММ (табл. 1). Отсутствие синергического эффекта при одновременной обработке и усиление эффекта НММ после предобработки ГБО указывают на существование специфического механизма взаимодействия ГБО и НММ. Несомненно, что модификация эффекта НММ связана с возникновением мутагенных продуктов

метаболизма, реализация которых требует определенного времени. Причины вторичных изменений связаны с появлением и накоплением продуктов метаболизма НММ и их взаимодействием с активными формами кислорода.

В процессе метаболизма нитро-, нитрозо- и других азотсодержащих соединений в клетках инициируется образование оксида азота NO. Увеличение его концентрации может быть обусловлено и активацией NO-синтазы, которая у растений локализуется в пероксисомах [18]. По данным литературы известно, что увеличение продукции NO происходит при действии кратковременных или умеренных стрессов, в том числе и при оксидативном стрессе [19]. NO способен взаимодействовать с супероксидным радикалом (концентрация которого в тканях после действия ГБО и ингибирования СОД может повышаться) с образованием высоко токсичного пероксинитрита:



Пероксинитрит является источником возникновения другого высоко токсичного радикала – гидроксильного [20, 21], повышение концентрации которого мы и зафиксировали по увеличению интенсивности хемилюминесценции через 24 ч после действия ГБО и НММ (табл. 2). Однако если гидроксильный радикал практически мгновенно вступает в реакции с биополимерами, то пероксинитрит, так же как и оксид азота, обладает достаточным для миграции в ткани временем жизни.



Как NO, так и пероксинитрит способны ингибировать многие ферменты, в том числе СОД, глутатионпероксидазу [22, 23]. В присутствии пероксинитрита возникают радикалы глутатиона, способные индуцировать процессы перекисного окисления липидов. Таким образом, происходит нарушение функционирования различных звеньев антиоксидантной защитной системы.

Известно ингибирующее влияние данных соединений на ферменты цикла Кребса, ферменты дыхательной цепи митохондрий, содержащие в активных центрах железосерные группы, что приводит к подавлению синтеза АТФ, снижению пролиферативной активности клеток [24–26]. Этим можно объяснить ингибирующий синергический эффект комбинированного действия ГБО и НММ на пролиферацию клеток корневой апикальной меристемы проростков подсолнечника. Чувствительность клеток к мутагену зависит от их физиологического состояния, в частности от стадии клеточного цикла и степени синхронизации митотических делений. Ранее было показано, что с 3-го по 9-й ч прорастания семян подсолнечника происходит интенсивный синтез как ядер-

ной, так и хлоропластной ДНК [27]. Воздействие ГБО в данный временной интервал может существенно повысить чувствительность генетического аппарата клеток к внешним воздействиям, поскольку известно, что гипербарическая оксигенация тормозит митотический цикл на стадии G₁-S, но при этом происходит синхронизация делений меристематических клеток [28, 29]. Последующее воздействие мутагена реализуется на стадии S-G₂, когда генетический аппарат клетки наиболее чувствителен к внешним воздействиям. Увеличение концентрации NO и пероксинитрита усиливает и продлевает цитостатический эффект. Более того, оксид азота и его производные способны непосредственно индуцировать повреждения в ДНК, ингибировать ДНК-лигазу, влиять на процессы репликации ДНК [30–33].

Высокая проникающая и реакционная способность NO и пероксинитрита, их ингибирующее влияние на многие ключевые ферменты метаболизма, содержащие железосерные группы, могут как прямо, так и опосредованно индуцировать повреждения в ядерной ДНК и в ДНК цитоплазматических органелл.

Таким образом, усиление НММ-мутагенеза гипербарической оксигенацией, индуцирующего выход плазматических мутантов (на что указывают результаты как модельных, так и полевых экспериментов) связано с формированием высокомутагенного пероксинитрита, который способен индуцировать повреждения в ДНК хлоропластов.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования России по фундаментальным исследованиям в области естественных и точных наук (Е02–6.0–146).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белецкий Ю.Д., Разорителева Е.К., Жданов Ю.А. Цитоплазматические мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозометилмочевинной // Докл. Акад. наук. СССР. 1969. Т. 186. С. 1425–1426.
2. Усатов А.В., Таран С.Ф., Гуськов Е.П. Зависимость плазматического мутагенеза, индуцированного N-нитрозо-N-метилмочевинной, от возраста прорастающих семян подсолнечника в момент обработки // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 222–227. (Usatov A.V., Taran S.F., and Gus'kov E.P. Relationship between plastid mutagenesis induced by N-nitrosomethylurea and age of germinating sunflower seeds at the time of treatment // Rus. J. Genetics. 1995. V. 31. № 2. P. 191–196.)
3. Белецкий Ю.Д. Искусственные мутации хлоропластов у высших растений. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1989. 80 с.
4. Гуськов Е.П., Маркин Н.В., Усатов А.В., Машикина Е.В. Модификация действия нитрозометилмочевинной на проростки подсолнечника тепловым шоком // Генетика. 2001. Т. 37. № 3. С. 336–343. (Gus'kov E.P., Markin N.V., Usatov A.V., Mashkina E.V. Modification of the effect of nitrosomethylurea on sunflower seedlings by heat shock // Rus. J. Genetics. 2001. V. 37. № 3. P. 257–263.)
5. Серебрянный А.М., Рандалу К.Х.А. Карбомоилирование оснований в ДНК НММ // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 5. С. 633–638.
6. Серебрянный А.М., Сальникова Л.Е., Бахитова Л.М. и др. Специфичность мутагенного действия НММ и связь ее мутагенной активности с карбомоилирующими свойствами // Генетика. 1988. Т. 24. № 10. С. 1786–1793.
7. Alscher R., Erturk N., Heath L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // J. Exptl. Bot. 2002. V. 372. P. 1331–1341.
8. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 9. P. 405–410.
9. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // Ann. Bot (Lond). 2003. Spec. No. P. 179–194.
10. Guetens G., De Boeck G., Highley M. et al. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2002. № 4–5. P. 331–457.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678–681.
12. Королюк М., Иванова Л., Майорова И., Токарев В. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
13. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the folin reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
14. Гуськов Е.П. Цитогенетический эффект повышенного давления кислорода на клетках корешков лука // Генетика. 1975. Т. 11. № 5. С. 147–152.
15. Гуськов Е.П., Дворкина Р.М., Гончаренко И.И. Действие гипербароксигенации на деление клеток корней проростков растений // Цитология. 1982. Т. 24. № 3. С. 257–263.
16. Белецкий Ю.Д., Усатов А.В., Разорителева Е.К. Частота индуцированной N-нитрозометилмочевинной внеядерной пестролистности у подсолнечника в зависимости от уровня репликации плазматической ДНК // Докл. Акад. наук СССР. 1990. Т. 313. № 3. С. 716–718.
17. Бурлакова Е., Архипова Г., Голощанов А. И др. Мембранные липиды как переносчики информации // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М.: Наука, 1982. С. 74–83.
18. Corpas F., Barroso J., Del Ro L. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. № 4. P. 145–150.
19. Duval D., Sieg D., Billings R. Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione // Arch. Biochem. and Biophys. 1995. V. 316. № 2. P. 699–706.
20. Beckman J., Beckman K., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1620–1624.

21. *Freeman B.* Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side // *Chest*. 1994. V. 105. Suppl. S79–S84.
22. *Troy C., Derossi D., Prochiantz A. et al.* Downregulation of Cu / Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. P. 253–261.
23. *Asahi M., Fujii J., Suzuki K. et al.* Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 36. P. 21035–21039.
24. *Lepoivre M., Raddassi K., Oswald I. et al.* Antiproliferative effects of NO synthase products // *Res. Immunol.* 1991. V. 142. P. 580–583.
25. *Punjabi C., Laskin D., Heck D., Laskin J.* Production of nitric oxide by murine bone marrow cells. Inverse correlation with cellular proliferation // *J. Immunol.* 1992. V. 149. P. 2176–2184.
26. *Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.* DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 1753–1758.
27. *Усатов А.В., Таран С.Ф., Дмитриев В.В., Белецкий Ю.Д.* Динамика включения ³H-тимидина в пластидную и ядерную ДНК зародышей на начальных этапах проращивания семян подсолнечника // *Цитология*. 1990. Т. 32. № 3. С. 298–300.
28. *Гуськов Е.П., Шкурат Т.П.* Цитогенетические последствия гипербарической оксигенации в ряду клеточных циклов лимфоцитов периферической крови человека // *Генетика*. 1985. Т. 21. № 8. С. 1361–1367.
29. *Гуськов Е.П., Шкурат Т.П., Камынина М.В.* Цитологические последствия фракционированного и пролонгированного действия гипербарической оксигенации // *Генетика*. 1985. Т. 21. № 10. С. 1693–1699.
30. *Salgo M., Stone K., Squadrito G. et al.* Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 210. P. 1025–1030.
31. *Inoue S., Kawanishi S.* Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide // *FEBS Letters*. 1995. V. 371. P. 86–88.
32. *deRojas-Walker T., Tamir S., Ji H. et al.* Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA // *Chem. Res. Toxicol.* 1995. V. 8. P. 473–477.
33. *Graziewicz M., Wink D., Laval F.* Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage // *Carcinogenesis*. 1996. V. 17. P. 2501–2505.