

РОЛЬ СТРУКТУРЫ КСЕНОБИОТИКА В РАЗВИТИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА НА ПРИМЕРЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОТРИАЗОЛА

© 2012 Е.С. Селезнева, Э.А. Валиева, Е.И. Теньгаев¹ З.П. Белоусова²

Исследовали токсичность и цитогенетическую активность шести производных бензотриазола: 4-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол, 1-бензилбензотриазол, 1-[4-(бензилокси)бензил]-1Н-бензотриазол, 1-[2-(бензилокси)бензил]-1Н-бензотриазол, 2-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол, 1-[4-(3-фенолпропокси)бензил]-1-Н-бензотриазол для *Allium fistulosum*.

Соединения, имеющие ОН- и бензильные группы в пара-позиции, более токсичны. В зависимости от строения вещества блокировали пролиферативную активность на разных стадиях митоза. Все соединения проявили мутагенность. Обсуждается роль структуры соединения в развитии биологического ответа.

Ключевые слова: *Allium fistulosum*, производные бензотриазола, токсичность, цитогенетическая активность.

Введение

Среди антропогенных ксенобиотиков, поступающих в окружающую среду, многие обладают мутагенной активностью. У популяций, контактирующих с ними, может произойти увеличение генетического груза, последствием которого является снижение общей приспособленности видов. Степень наносимого вреда определяется сходством ксенобиотика с природными высокоактивными соединениями, способностью использовать путь проникновения к органу или ткани (мишени), характерный для его природного аналога.

Поэтому проблема поиска связи между строением органических веществ и их биологической активностью представляет не только научный, но и практический интерес как для прикладной экологии, так и для медицины, а также сельского хозяйства. Полученная информация о зависимости биологического ответа от строения вещества позволит синтезировать высокоэффективные лекарственные препараты и пестициды, обладающие избирательным действием.

В связи с вышеизложенным особый интерес представляют вещества, являющиеся структурными аналогами природных соединений. К ним относятся бензо-

¹Селезнева Екатерина Сергеевна (catana7@yandex.ru), Валиева Эльвира Амировна (valieva_elvira@list.ru), Теньгаев Евгений Иванович (tenev@samsu.ru), кафедра зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Белоусова Зоя Петровна (zbelousova@mail.ru), кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

триазол и его производные, которые являются структурными аналогами пуринов, витаминов, аминокислот, гормонов, алкалоидов [4; 6].

В данной работе предпринята попытка проанализировать влияние структуры некоторых производных бензотриазола, содержащих фенольные, бензильные и бензилоксибензильные группы, на их биологическую активность. Исследования такого рода обычно проводятся на растениях или на прокариотах, но мы в нашем исследовании решили использовать часто используемый в генотоксикологическом анализе тест-объект *Allium fistulosum*.

1. Материал и методы исследования

В качестве объектов исследования выбраны 4-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол (1), 1-бензилбензотриазол (2), 1-[4-(бензилокси)бензил]-1Н-бензотриазол (3), 1-[2-(бензилокси)бензил]-1Н-бензотриазол (4), 2-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол (5), 1-[4-(3-фенолпропокси)бензил]-1-Н-бензотриазол (6), структурные формулы которых представлены на рис. 1.

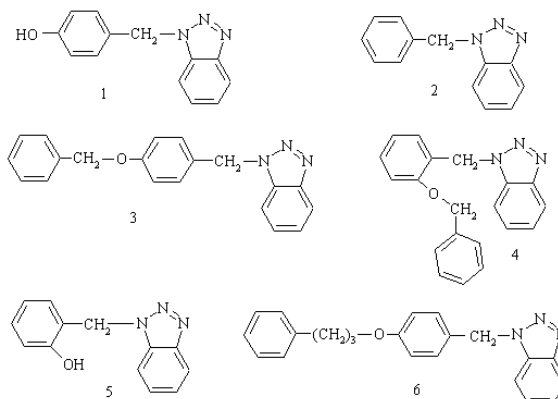


Рис. 1. Структурные формулы производных бензотриазола

Для изучения цитогенетической активности соединения 1–6 использовали в виде спиртовых растворов в концентрации 0,001; 0,01 мг/мл. Растворителем служил 1 % изопропиловый спирт.

Семена *Allium fistulosum* проросшие в термостате в чашках Петри при температуре +22 °С в спиртовых растворах соединений 1–6 в течение 5 суток. Контролем служили семена, пророщенные в растворителе. Токсичность оценивали по способности подавлять всхожесть семян и рост корней. По стандартной методике готовили давленные и окрашенные ацетокармином препараты меристемы корней. Для анализа влияния исследуемых веществ на пролиферативную активность клеток корневой меристемы определяли величину митотического индекса путем подсчета отношения числа клеток, находящихся на разных стадиях деления, к сумме проанализированных клеток. Анализировали не менее 1000 клеток для каждого опыта.

Оценку влияния соединений на определенные стадии митоза производили, считывая относительную продолжительность фаз митоза по формуле:

$$tFM = \left(\frac{\Sigma FM}{\Sigma N} \right) 100\%,$$

где tFM — относительная длительность исследуемой фазы митоза, ΣFM — число клеток исследуемой фазы митоза, ΣN — сумма всех делящихся клеток.

Цитогенетическую активность соединений оценивали по проценту aberrantных "ана-телофаз" от общего числа проанализированных (300) "ана-телофаз" [3].

Достоверность различий между действием соединений оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа [5].

2. Результаты и их обсуждение

Одним из адекватных показателей общей токсичности органических веществ является анализ их способности влиять на всхожесть семян. Как показали проведенные исследования, все проанализированные соединения 1–6 достоверно ингибируют всхожесть семян (см. табл. 1). Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверные отличия в действии соединений ($p < 0,01$). Для большинства соединений выявлено увеличение способности ингибировать всхожесть семян с ростом концентрации растворов за исключением (4, 5). Анализ структурных свойств и способности ингибировать всхожесть семян показал, что 4-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол (1), обладающий свойствами фенола, менее токсичен по сравнению с 1-бензилбензотриазолом (2), не имеющим свободной гидроксильной группы. На способность ингибировать всхожесть семян влияют не только факт наличия гидроксильной группы, но и ее расположение в бензольном кольце относительно фрагмента (-CH₂-BzTr). Так (1) оказался более токсичным, чем 2-(1-Н-бензотриазол-1-илметил)фенол (5). Необходимо отметить, что перемещение не только гидроксильной, но и бензильной группы из *пара*- в *орто*- положение снижает ингибирующие свойства соединения (3, 4).

Таблица 1

Влияние соединений (1–6) на всхожесть семян *Allium fistulosum*

Соединения	Всхожесть в %		
	контроль	0.001 мг/мл	0.01 мг/мл
1	86,0±2,0	80,0±2,3	80,0±2,3
2	86,0±2,0	81,0±2,3	75,5±2,5
3	86,0±2,0	86,0±2,0	75,5±2,5
4	91,1±1,6	88,9±1,8	93,3±1,4
5	91,1±1,6	88,9±1,8	93,3±1,4
6	91,1±1,6	87,8±1,9	88,9±1,8

Сходные результаты были получены и при оценке способности производных бензотриазола (1–6) влиять на ростовые процессы (рис. 2).

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверный рост токсичности соединений при увеличении концентрации их растворов, а также изменении их структуры ($p < 0,01$).

Феномен токсичности антропогенных органических веществ изучается давно. Обнаруженные нами зависимости токсичности производных бензотриазола от их строения совпадают с результатами исследователей, изучающих негативный ответ, вызванный другими структурно похожими органическими соединениями. Так,

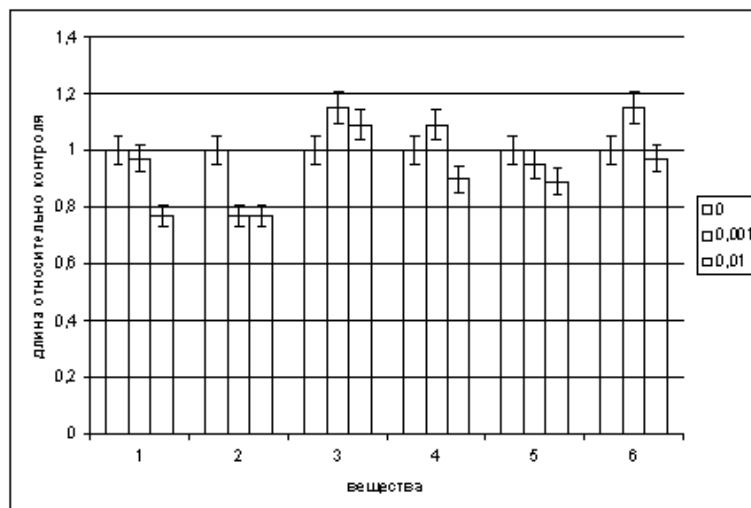


Рис. 2. Влияние соединений (1–6) на длину корней *Allium fistulosum*

факт того, что (1) — фенольное производное, содержащее ОН-группу в *пара*-положении — токсичнее своего аналога, содержащего ОН-группу в *орто*-положении (5), согласуется с результатами исследователей, изучавших токсичность других фенольных соединений [12]. Такой же вывод можно сделать, сравнивая ингибирующие свойства ростовых процессов *Allium fistulosum* соединений (3) и (4). Увеличение количества метиленовых звеньев с одного до трех приводит к росту токсичности 1-[4-(3-фенолпропокси)бензил]-1Н-бензотриазола (6) по сравнению с 1-[4-(бензилокси)бензил]-1Н-бензотриазолом (3).

Можно предположить, что более высокая токсичность фенолов с ОН-группой в *пара*-позиции связана с возрастанием сил электростатического притяжения между веществом и мембранными рецепторами [8].

Особенности негативного действия на ростовые процессы фенольных, бензильных и бензилоксибензильных производных бензотриазола (1–6) хорошо согласуются с результатами, полученными при изучении фенольных производных бензидазола [10].

Рост тканей растений определяется пролиферативной активностью меристем, и для понимания механизмов действия токсичности (1–6) необходим анализ их цитотоксичности. Поэтому было исследовано влияние (1–6) на величину митотического индекса корневой меристемы *Allium fistulosum*.

Исследования показали, что все изученные вещества снижают пролиферативную активность, но различаются по способности ингибировать клеточное деление ($p < 0,04$). С увеличением концентрации растет их цитотоксичность ($p < 0,001$). Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние (1–6) на митотическую активность в клетках корневой меристемы *Allium fistulosum*

Соединения	Митотический индекс, промилле		
	контроль	0.001 мг/мл	0.01 мг/мл
1	546	530	520
2	517	500	472
3	517	505	453
4	551	461	485
5	551	509	502
6	551	450	399

Ингибирующие свойства рассмотренных соединений проявились в задержке клеточного деления на определенной стадии митоза. В зависимости от строения они вызывали остановку деления на разных стадиях митоза. Так (1) вызывал блок на стадии анафазы, (3, 5) — на стадии профазы, (2, 4, 6) — на стадии метафазы и второй блок на стадии анафазы. Полученные различия говорят о том, что исследованные соединения действуют на разные механизмы клеточного метаболизма.

Известно, что блоки на стадии профазы наблюдаются при нарушении синтеза ДНК [11]. Остановка деления на стадии метафазы указывает на повреждение аппарата деления митотического аппарата клетки: центриолей, веретена деления и кинетохоров, что может привести либо к гибели, либо к полиплоидизации клетки. Задержки клеточного деления на стадии анафазы и телофазы свидетельствуют о нарушении цитотомии, запускающей ряд изменений, приводящих к ненормальному течению митоза в ряду следующих поколений клеток [2].

Выявленная цитотоксичность указывает на способность исследованных соединений индуцировать мутагенез. Именно поэтому мы провели оценку мутагенности соединений методом ана-телофазного анализа. В табл. 3 суммированы результаты этого анализа.

Таблица 3

Способность (1–6) индуцировать хромосомные патологии в клетках корневой меристемы *Allium fistulosum*

Соединения	Хромосомные аберрации, %		
	контроль	0.001 мг/мл	0.01 мг/мл
1	13,0±1,9	26,0±2,5	31,0±2,7
2	13,0±1,9	20,0±2,3	24,0±2,5
3	13,0±1,9	30,0±2,6	35,0±2,6
4	19,0±2,3	29,0±2,6	26,0±2,5
5	19,0±2,3	24,0±2,5	26,0±2,5
6	19,0±2,3	26,0±2,5	22,0±2,4

Мы не выявили отличий в типе хромосомных патологий, вызываемых исследуемыми соединениями, все они выявили однотипные хромосомные аномалии: простые и двойные мосты, фрагментирование хромосом и отставания, однако число индуцированных aberrантных ана-телофаз было различным. Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что все соединения досто-

верно различаются ($p < 0.04$) по способности индуцировать цитогенетические патологии в клетках корневой меристемы, увеличение концентрации растворов не приводило к увеличению мутагенной активности.

Мы выявили зависимость мутагенной активности от строения бензотриазолидов: положение групп в *пара*-положении достоверно увеличивает мутагенность соединений, фенильные производные мутагеннее бензильных, а увеличение молекулярной массы за счет числа $-CH_2$ групп снижает их мутагенность. Наблюдаемый биологический ответ после воздействия исследуемыми производными бензотриазола в значительной степени может зависеть от способов проникновения данных ксенобиотиков в клетки корневой меристемы *Allium fistulosum*, которые в высокой степени определяются топологией молекулы.

Сходные результаты были получены при исследовании аналогичных соединений бензимидазолидов [10].

Эффективность и адекватность анализа негативного воздействия любых ксенобиотиков на живые организмы зависит от тест-объекта. Выбранный тест-объект *Allium fistulosum* дает интегральную оценку негативного действия ксенобиотиков, так как позволяет оценить и общую и клеточную токсичность, и мутагенность соединений, являющихся изомерами. Выявленная нами зависимость токсичности и мутагенности от взаимного расположения заместителей в молекуле соединения при использовании этого тест-объекта хорошо согласуется с данными исследователей, анализирующих различные ксенобиотики в других тест-системах [1], что подтверждает наличие общих закономерностей при изучении взаимосвязи строения и биологической активности.

Можно предположить, что *пара*-изомеры (1) и (3) могут использовать мембранные рецепторы, а (6), обладающее максимальной липофильностью, проникают в клетки корневой меристемы путем диффузии через мембраны.

Таким образом, все исследованные производные бензотриазола индуцируют мутагенную активность, поэтому при попадании в природные экосистемы могут негативно влиять на генофонды продуцентов.

Литература

- [1] Абилов С.К. Выявление и прогнозирование мутагенной активности химических соединений окружающей среды: автореф. дис. ... д-ра биол. наук, М., 2003. 49 с.
- [2] Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза: М.: Медицина, 1972. 264 с.
- [3] Практикум по цитогенетике / С.А. Гостимский [и др.] М.: Изд-во МГУ, 1974. 275 с.
- [4] Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокенинов // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 4. С. 1–15.
- [5] Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- [6] Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. / пер. с англ. М.: Мир, 1985. Т. 3. 367 с.
- [7] Любимова И.К., Абилов С.К., Мигачев Г.И. Влияние некоторых структурных особенностей в молекулах производных пирена и его гетероциклических аналогов на мутагенную активность // Генетика. 1995. № 1. С. 128–132.
- [8] Оксенгендлер Г.И. Яды и организм. Проблемы химической опасности. СПб.: Наука, 1991. 317 с.

- [9] Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Генетические оценки состояния окружающей среды. 51. ВОЗ. Женева. М.: Медицина, 1989. 212 с.
- [10] Селезнева Е.С., Белоусова З.П., Моисеева Л.М. Генотоксичность синтетических фенольных производных бензимидазола // Вестник ОГУ. 2010. № 5(111). С. 111–115.
- [11] Смирнова Е.А. Организация митотического веретена в клетках высших растений // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 2. С. 198–207
- [12] Peroxidases / Th. Gaspar [et al.]. Geneve: Univ. of Genev., 1982. 324 p.

Поступила в редакцию 18/I/2012;
в окончательном варианте 19/II/2012.

CONCERNING THE ROLE OF XENOBIOTIC STRUCTURE IN THE BIOLOGICAL ANSWER (ON THE EXAMPLE OF BENZOTRIAZOLE)

© 2012 E.S. Selezneva, E.A. Valieva, E.I. Tengayev,³ Z.P. Belousova⁴

The toxicity and cytogenetic activity for *Allium fistulosum* were investigated for six imidazole derivatives 4-(1-H-benzotriazole-1-ylmethyl)phenol, 1-benzylbenzotriazole, 1-[4-(benzyloxy)benzyl]-1H-benzotriazole, 1-[2-(benzyloxy)benzyl]-1H-benzotriazole, 2-(1-H-benzotriazole-1-ylmethyl)phenol, 1-[4-(3-phenylpropoxy)benzyl]-1H-benzotriazole. The substances with OH- and benzyl groups in para-position were more toxic. Depending on their molecular structure the substances blocked the proliferative activity on different mitosis stages. All the substances demonstrated mutagenic activity. The role of molecular structure in biological answer development is discussed in the article.

Key words: *Allium fistulosum*, imidazole derivative, cytogenetic activity.

Paper received 18/I/2012.

Paper accepted 19/II/2012.

³Selezneva Ekaterina Sergeevna (catana7@yandex.ru), Valieva Elvira Amirovna (valieva_elvira@list.ru), Tengayev Evgeniy Ivanovich (tenev@samsu.ru), Zoya Petrovna Belousova, the Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.

⁴Belousova Zoya Petrovna (zbelousova@mail.ru), the Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.