

УДК 577.1+547.7+57.083.36

О.Я. Мельник, О.С. Ястребова, Д.О. Мельник, А.О. Стецьків

Дослідження цитотоксичної активності енаміну та діоксодекагідроакридину на основі тесту *Allium* сера

*Івано-Франківський національний медичний університет,
вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018, Україна*

Синтезовано енамін на основі дімедону та гліцину. Проведено подальшу взаємодію цього енаміну з формальдегідом та утворено діоксодекагідроакридин, що має люмінесцентні та протимікробні властивості. З метою встановлення цитотоксичності синтезованих речовин використано рослини *Allium* сера з однаковим генотипом. Їх пророщували в розчинах досліджуваних речовин різних концентрацій (10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М). Було визначено довжину корінців, мітотичний індекс первинної меристеми корінців *Allium* сера, вирощених у досліджуваних розчинах різної концентрації. Вивчено перебіг мітозу в первинній меристемі корінців *Allium* сера та кількість і спектр хромосомних аберацій. Проведено порівняльний аналіз та статистичну обробку одержаних результатів.

Ключові слова: антимікробні препарати, енамін, дімедон, гліцин, формальдегід, діоксодекагідроакридин, генотоксичність, мутагенна та мітотична активність, мітотичний індекс, хромосомні аберації.

O.Ya. Melnyk, O.S. Yastrebova, D.O. Melnyk, A.O. Stetskiy

Cytotoxic Activity of Enamines and Dioxodecahydroacridines Investigation based on *Allium Cepa* Test

*Ivano-Frankivsk National Medical University,
2, Galytska Str., Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine*

Enamines with dimedone and glycine was synthesized. A further interaction the enamines with formaldehyde was made and formed dioxodecahydroacridines which has luminescent and antimicrobial properties. To establish the cytotoxicity of the synthesized compounds used *Allium cepa* plants with the same genotype. They were germinated in solutions of different concentrations of the test substances (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M). A conducted lengths of grown roots, mitotic index of primary meristem of rootlet *Allium cepa* that grow in solutions with different concentration was studied. Studied the course of mitosis in the primary meristem *Allium cepa* and number and range of chromosome aberration. A comparative analysis and statistical processing of the results was made.

Key words: antimicrobial drugs, enamines, dimedone, glycine, formaldehyde, genotoxic, mutagenic and mitotic activity, mitotic index, chromosome aberration.

Стаття постуила до редакції 19.08.2013; прийнята до друку 30.09.2013.

Вступ

Синтез нових біологічно активних препаратів у наш час має надзвичайно важливе значення, оскільки мікроорганізми мають здатність звикати до лікувальних препаратів, які широко застосовуються. Дослідження цитотоксичної активності таких

препаратів дозволяє визначити потенційну активність перспективних антимікробних препаратів.

Серед великого набору протимікробних речовин важливе місце займають енаміни та продукти їхньої подальшої взаємодії. Саме тому пошук перспективних енамінів та продуктів їх подальшої взаємодії (діоксодекагідроакридинів) робить актуальною проблему дослідження їхньої мутагенної

активності, встановлення їхнього впливу на проліферативну здатність клітин і, що дуже важливо, на хромосомну стабільність не тільки прокаріот, а й еукаріот.

Основним об'єктом дослідження у роботі були новосинтезовані речовини (єнамін та діоксодекагідроакридин), які у різних концентраціях були досліджені на корінцях рослини *Allium* сера.

Предмет дослідження – вивчення впливу досліджуваних речовин на мітотичну активність клітин та їх мутагенну дію.

Багато хімічних речовин, які синтезуються, використовуються як медикаменти, консерванти, харчові добавки, пестициди тощо. Щоб уникнути забруднення ними, як потенційними мутагенами, доквілля, необхідне тестування їх впливу на живі організми [1]. Ці питання є актуальними з позиції екологічної генетики. Здатність окремих хімічних речовин пошкоджувати спадковий апарат була встановлена понад 50 років тому. Хімічні речовини, які прямо або опосередковано потрапляють у живий організм, можуть викликати зміни генетичного матеріалу. Більшість із них спричиняють декілька типів пошкоджень спадкового матеріалу, починаючи від точкових мутацій і закінчуючи хромосомними і геномними аномаліями. Це поєднується з універсальністю явищ хімічного мутагенезу для всіх біологічних об'єктів. У живому організмі ксенобіотики підлягають біотрансформації (метаболізму) [2]. Потрапляючи в навколишнє середовище, вони можуть викликати алергічні реакції, загибель організмів, мутації, знижувати імунітет, порушувати обмін речовин та хід процесів у природних екосистемах до рівня біосфери. Включаючись у метаболічні процеси клітини, вони можуть перетворюватися в інші сполуки і втрачати генотоксичність – властивість хімічних, фізичних, біологічних чинників пошкоджувати структурно-функціональний стан генетичного апарату клітин або набувати нових мутагенних властивостей. Хімічним речовинам властива висока специфічність по відношенню до індукції генетичних подій. Отже, актуальними є екологічні дослідження, які включають у себе методи біоіндикації (оцінки якості середовища існування) мутагенів у об'єктах доквілля. Дослідження мутагенної актив-

ності проводять на об'єктах різних рівнів організації – прокаріотах (бактеріях) та еукаріотах (тваринах та рослинах) і на різних рівнях організації спадкового матеріалу (геному, хромосомному, геномному).

Описано більше 100 тест-методів для дослідження генотоксичності, які охоплюють різні рівні організації. Запропоновано ряд характеристик для тест-систем:

- достатня чутливість для статистично достовірного визначення малих мутаційних ефектів;
- високий рівень відтворюваності в межах однієї і різних лабораторій;
- здатність до виявлення всіх типів мутацій.

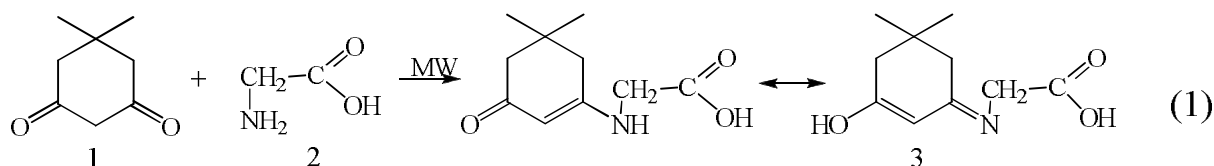
Allium test – рослинна тест система для оцінки мутагенного мітозмодифікуючого і токсичного ефектів чинників хімічної чи фізичної природи на основі рослини *Allium* сера – Цибуля ріпчаста сорт Штутгарт [3, 4]. Даний метод є простим, економічним, короткостроковим, рекомендований у еколого-генетичних дослідженнях групою експертів [5] і досить чутливим для визначення «мутаген» чи «не мутаген» [6]. По мірі синтезу нових речовин тест отримує нові рекомендації, що робить його одним з найбільш популярних.

Метод дозволяє реєструвати хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, наслідком яких є наявність мостів і фрагментів в ана-телофазі. Метод дозволяє виявляти патологічні зміни в ході клітинного поділу.

Таким чином, використання *Allium* сера – тесту є повністю виправданим і відповідає меті і завданням дослідження.

I. Експериментальна частина

Серед єнамінів на основі циклічного дікетону – дімедону, особливий інтерес представляють продукти взаємодії дімедону з амінокислотами. Такий продукт був синтезований Нейландом [7] та Гальперном [8] у вигляді метилового ефіру. У подальшому було отримано продукти взаємодії дімедону з найважливішими амінокислотами та виявлена їхня висока біологічна активність [9]. Був синтезований єнамін із дімедону та гліцину за схемою (1):

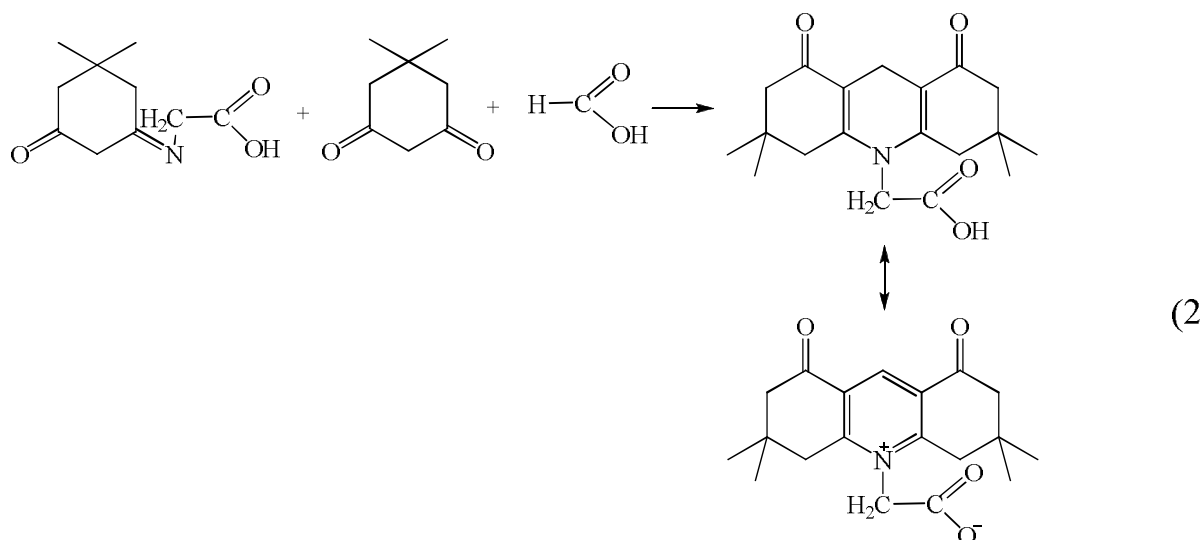


1 – дімедон; 2 – гліцин; 3 – єнамін.

Отриманий єнамін (1) у водному розчині може існувати у двох таутомерних формах: кетонній та енольній. Це речовина світло-коричневого кольору, добре розчинна у воді, її структура підтвер-

джена методами хромато-мас та ПМР-спектроскопії.

Для порівняння її активності було використано продукт подальшої взаємодії єнаміну з дімедоном в реакції з формальдегідом за схемою (2):



Речовини подібного типу були отримані китайськими вченими [10] і виявлена їх висока біологічна активність [9]. Отриманий діоксодекагідроакредин (2) є речовиною світло-коричневого кольору, гірше розчиняється у воді та проявляє високу люмінесценцію під УФ-випромінюванням.

Матеріали і методи дослідження. З метою встановлення цитотоксичності синтезованих речовин використано рослини *Allium* сера з однаковим генотипом. Їх пророщували в розчинах досліджуваних речовин різних концентрацій (10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М).

Цибулини розміщували в розчині на 3 дні. Контролем слугувала дистильована вода. На третій день виміряли середню довжину корінців, які потім зафіксували в оцтовому алкоголі (20 мл оцтової кислоти та 60 мл спирту). При вимірюванні довжини корінців звертали увагу на: довжину, колір, тургесценцію (твердість) та форму коренів (набрякання, вигини). Для визначення мітотичної активності та мутагенної дії використали цитогенетичний метод. Далі проводили мікроскопічні дослідження. Як показник мітотичної активності [11] визначали мітотичний індекс (МІ) за формулою:

$$MI = \frac{P+M+A+T}{I+P+M+A+T} \times 100\%, \quad (3)$$

де P – кількість клітин у профазі;
 M – кількість клітин у метафазі;
 A – кількість клітин в анафазі;
 T – кількість клітин у телофазі;
 I – кількість клітин в інтерфазі.

Індекси кожної з фаз мітозу визначали за формулою:

$$IX = \frac{X}{P+M+A+T} \times 100\%, \quad (4)$$

де X – кількість клітин у певній фазі.

Хромосомні аберації вивчали в анафазах і телофазах. Відсоток аберацій визначали за формулою:

$$Ab = \frac{n_{Ab}}{A+T} \times 100\%, \quad (5)$$

де n_{Ab} – кількість аберацій.

II. Результати та обговорення

Визначення впливу енаміну та діоксодекагідроакридину на проліферативну здатність клітин та їх мутагенну активність.

Для дослідження проліферативної здатності клітин первинної меристеми корінців *Allium* сера, вирощених у розчинах досліджуваних речовин різних концентрацій, проведено дослідження довжини корінців у розчині енаміну. Результати досліджень наведені на рис. 1.

У контрольних цибулин середня довжина корінців становила 25 мм. Найдовшими були корінці у рослини, вирощеної в розчині з концентрацією 10^{-6} М, що на 2,45 мм (9,8 %) перевищувало контроль. Найменшими корінці виростили у розчині з концентрацією 10^{-3} М, їхня довжина становила 17,1 мм, що на 7,9 мм менше (31,16 %), ніж у контролі. Корінці, що вирощувались у розчині з концентрацією 10^{-5} М, мали майже таку саму довжину, яка була у контролі. А у розчині з концентрацією 10^{-4} М довжина корінців складала 20,46 мм, що на 4,54 мм менше (2,27 %), ніж у контролі.

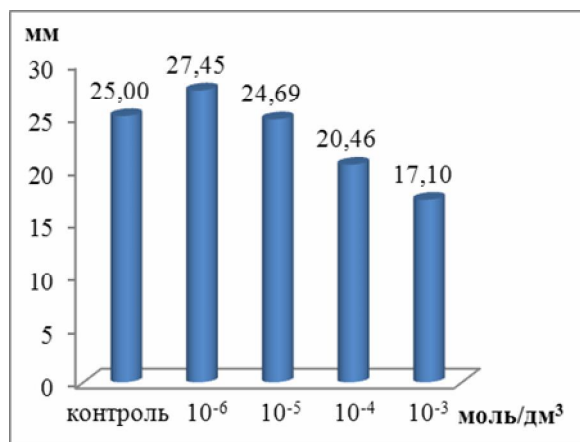


Рис. 1. Довжина корінців (мм) *Allium* сера, вирощених у розчинах енаміну з різною концентрацією.

Отже, з першого дослідження можна зробити висновки, що рослина, вирощена у розчині енаміну з концентрацією 10^{-6} М, проявила каталітичну реакцію, а рослина вирощена у такому ж розчині з концентрацією 10^{-3} М – інгібуючу.

Деяка інша картина виявилась у випадку з розчином діоксодекагідроакридину (рис. 2). У контрольних цибулин середня довжина корінців становила 18,15 мм. Найдовші корінці виявилися у цибулин вирощених у розчині з концентрацією 10^{-5} М – 23,5 мм, що на 5,35 мм (29,47%) більше, ніж у контролі. Найменшими – у розчині з концентрацією 10^{-6} М, їх довжина становила 15,2 мм, що на 2,95 мм менше (16,25%), ніж у контролі. Отже, розчин з концентрацією 10^{-5} М проявив каталітичну реакцію, а розчин з концентрацією 10^{-6} М – інгібуючу.

У розчині за концентрації 10^{-3} М корінці *Allium* сера взагалі не проросли, що свідчить про фітотоксичну активність речовини.

При порівнянні результатів довжин корінців, які проросли в розчинах різних концентрацій новосинтезованих речовин, можна зробити висновки, що рістстимулюючу дію проявила перша речовина – (енамін). Найбільш інгібуючі ефекти зафіксовані у діоксодекагідроакридині концентрацією 10^{-6} М. Досліджувані речовини різних концентрацій проявили як стимулюючу, так і інгібуючу реакції.

Оскільки ріст корінців визначається поділом клітин первинної меристеми, то наступним етапом дослідження було вивчення мітотичної активності.

Більшість показників МІ корелюють із значенням довжин корінців. З отриманих результатів (рис. 3) видно, що у контрольних рослин мітотичний індекс (МІ) клітин первинної меристеми становив 7,65 %. Найменшим МІ був у корінцях під впливом енаміну концентрацією 10^{-3} М, що відповідає найменшій довжині корінців, МІ становив 5,4 %, що на 2,25 % менше, ніж у контрольному розчині.

В усіх інших випадках МІ клітин перевищував контрольні значення. Найбільшим МІ виявився у розчині з концентрацією 10^{-5} М – 14,1%, що вдвічі перевищував контрольний розчин та корелював з довжиною корінців.

Для порівняння визначали МІ корінців *Allium* сера, культивованих у розчинах діоксодекагідроакридину різних концентрацій (рис. 4).

Після статистичної обробки результатів МІ у контрольних рослин складав 7,6 %, і виявився найбільшим. У рослин вирощених у розчині діоксодекагідроакридину з концентрацією 10^{-4} М мітотичний індекс становив тільки 4 %, що майже вдвічі менше, ніж у контрольному розчині. Результати МІ істотно відрізняються від довжини корінців.

Відсутність кореляції між довжиною корінців та МІ пов'язана з особливостями перебігу мітозу.

Під мікроскопом можна побачити збільшене зображення фаз мітозу та порахувати їх кількість (рис. 5).

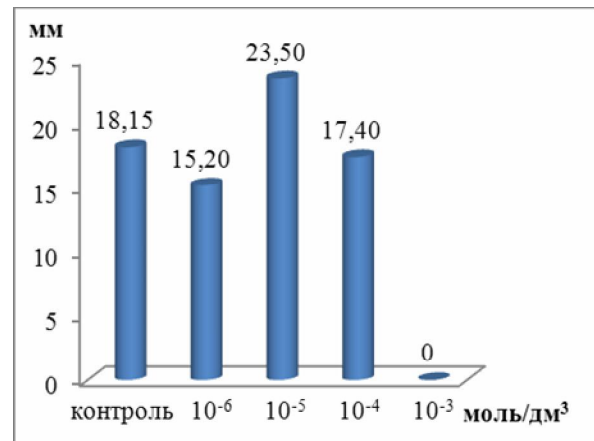


Рис. 2. Довжина корінців (мм) *Allium* сера, вирощених у розчинах діоксодекагідроакридину з різною концентрацією.

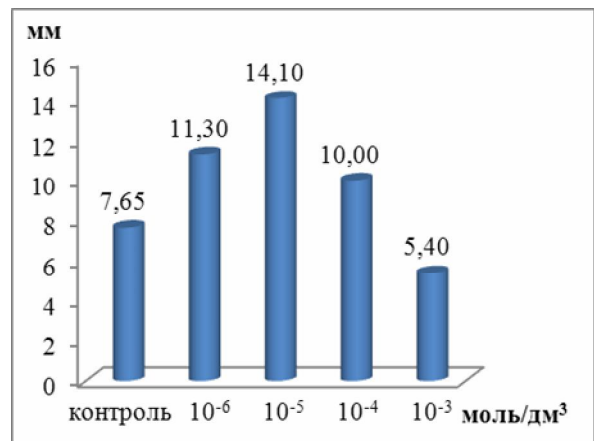


Рис. 3. Мітотичний індекс первинної меристеми корінців *Allium* сера, вирощених у розчинах енаміну з різною концентрацією.

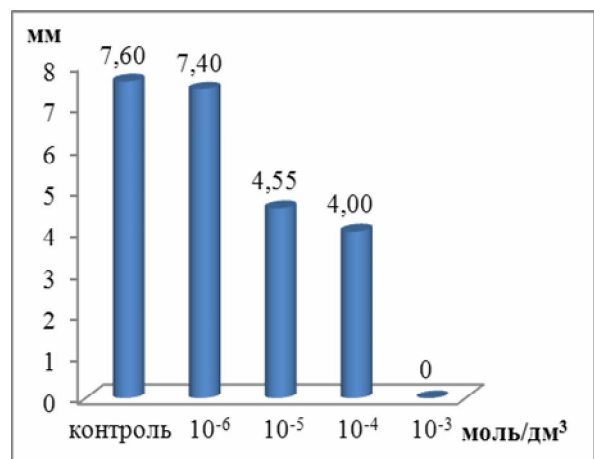


Рис. 4. Мітотичний індекс первинної меристеми корінців *Allium* сера, вирощених у розчинах діоксодекагідроакридину з різною концентрацією.

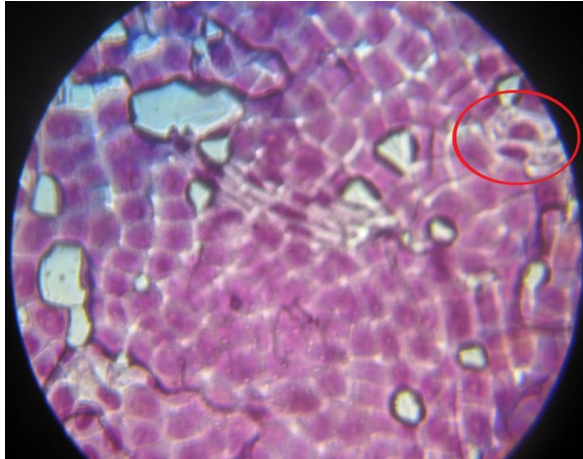


Рис. 5. Збільшене зображення корінця *Allium* сера та однієї із стадій мітозу – профазі.

Вивчення динаміки індексів кожної з фаз мітозу показує, що чисельні значення даних розчинів переплітаються. Найвищий профазний індекс, зафіксований у розчині енаміну з концентрацією 10^{-6} М, складає 29 % (рис. 6).

Метафазний індекс найбільший у розчині з концентрацією 10^{-6} М – 26,6 %, що на 2,6 % більше, ніж у контролю. Найменший в 10^{-5} М – 19 %. Ана – телофазні індекси майже не відрізняються один від одного та близькі до контролю. У рослин, вирощених у розчинах досліджуваних речовин різних концентрацій, під час зменшення концентрації розчину перебіг мітозу ставав більш наближеним до контрольних значень.

Статистична обробка перебігу мітозу проводилася із розчинами діоксодекагідроакридину (рис. 7).

У розчині з концентрацією 10^{-4} М відсоток профазного індексу найбільший і складав 32 %, що порівнюючи з контролем на 6 % більше. Контроль у профазному та метафазному індексах становив 26 %. У розчині з концентрацією 10^{-6} М профазний і телофазний індекси були нижчими від контрольних значень, а анафазний індекс більший, тобто це вказує на можливий вплив речовини у вказаній концентрації на веретено поділу клітин.

Значно нижчий профазний, але вищий анафазний індекси впливають на веретено поділу клітин. У рослин, вирощених у розчинах досліджуваних речовин різних концентрацій, показники розчинів енаміну були схожі між собою, і тому зі зменшенням концентрації інтенсивність перебігу мітозу збільшувалась. У розчині діоксодекагідроакридину під час зменшення концентрації інтенсивність перебігу мітозу в ана-телофазі зменшувалась.

Цікаво було дослідити кількість і спектр аберрацій у первинній меристемі корінців *Allium* сера, вирощених у розчинах досліджуваних речовин. На мікропрепаратах фіксувались хромосомні мости (рис. 8) і фрагменти.

У контрольних рослин відсоток хромосомних мостів становив 2,5, що відповідає фоновому значенню (рис. 9). При концентрації енаміну 10^{-3} М спостерігався дуже малий відсоток (0,3 %) хромосомних мостів, при цій концентрації спостерігався малий відсоток мітотичного індексу та мала довжина корінців, тому було неможливо виявити вірогідні аберрації.

Найбільший відсоток хромосомних мостів спостерігався у корінцях, вирощених у розчині з концентрацією 10^{-5} М (6 %), який підтверджує вплив речовини на розходження хромосом, що корелює з високим МІ розчину тієї ж концентрації. За концентрації 10^{-4} М мала кількість аберрацій спостерігалась разом з високим мітотичним індексом та довжиною корінців. У дослідях з розчином кон-

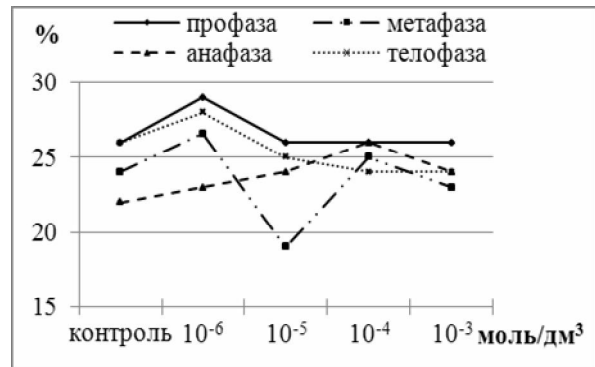


Рис. 6. Перебіг мітозу в первинній меристемі корінців *Allium* сера в розчині енаміну.

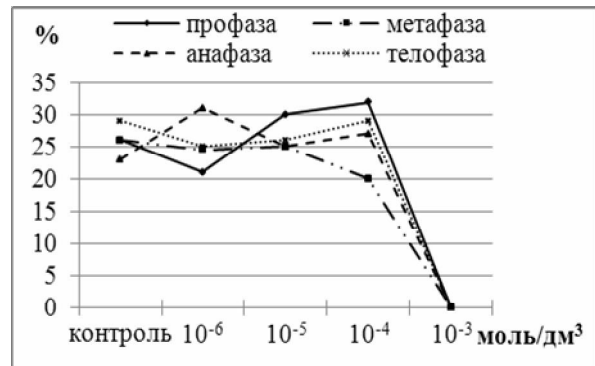


Рис. 7. Перебіг мітозу в первинній меристемі корінців *Allium* сера в розчині діоксодекагідроакридину.

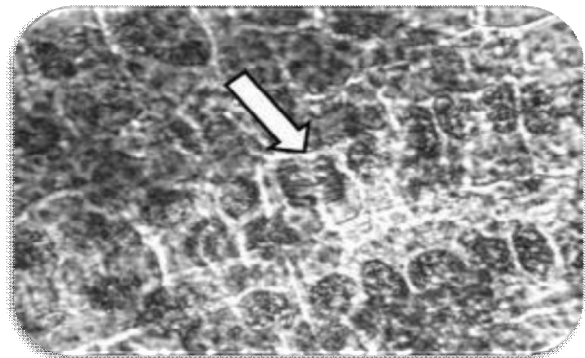


Рис. 8. Хромосомні мости.

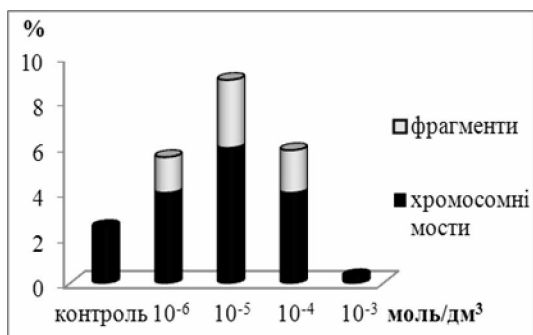


Рис. 9. Кількість і спектр аберацій у клітинах первинної меристеми корінців, вирощених у розчинах різних концентрацій енаміну.

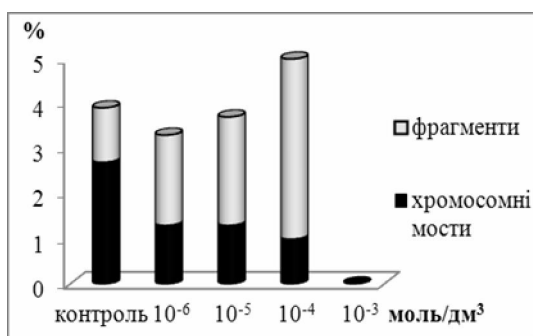


Рис. 10. Кількість і спектр аберацій у клітинах первинної меристеми корінців, вирощених у розчинах різних концентрацій діоксодекагідроакредину.

центрацією 10^{-5} М фрагментація хромосом складає найбільші відсотки з усіх наведених даних (3 %).

Дослідження з діоксодекагідроакрединою показали, що у контрольному розчині хромосомні мости становили 2,7 %, найбільший відсоток фрагментів зафіксовано у розчині з концентрацією 10^{-4} М – 4 %, причиною чого може бути вплив речовини у вказаній концентрації на спіралізацію хромосом (рис. 10).

Висновки

1. Встановлено, що енамін на основі дімедону і гліцину проявляє рістстимулюючу активність на корінці Allium сера в концентрації 10^{-6} М. Найбільшу стимулюючу дію проявляє діоксодекагідроакредин у розчині з концентрацією 10^{-5} М, але за інших концентрацій проявляє інгібуючу дію; так, в концентрації 10^{-3} М корені Allium сера взагалі не проросли.

2. Найвищі показники мітотичного індексу (МІ) первинної меристеми корінців Allium сера були виявлені в речовині 1 (енамін) з концентрацією 10^{-5} М (14,1 %), 10^{-6} М (11,3 %). Найбільш інгібуючу дію проявив розчин речовини діоксодекагідроакридину з концентрацією 10^{-4} М (4 %).

3. Найбільший профазний показник в перебігу мітозу зафіксований у розчині з концентрацією 10^{-6} М (29 %) енаміну, а найменший – 10^{-5} М (19 %).

4. Профазний і телофазний індекси в дослідках з діоксодекагідроакридином були нижчими від контрольних значень, а анафазний індекс більший, тобто це вказує на можливий вплив речовини у вказаній концентрації на веретено поділу клітин.

5. Хромосомні аберації становили незначні відсотки, та найбільший відсоток хромосомних мостів було виявлено у дослідках з енаміном концентрацією 10^{-5} М (6 %), який підтверджує вплив речовини на розходження хромосом, що корелює з високим МІ розчину цієї ж концентрації.

6. Розчин енаміну у концентрації 10^{-6} М може бути стимулятором росту та може викликати підвищення мітотичного індексу (МІ). Розчини діоксодекагідроакридину викликають зниження МІ попри те, що довжина корінців була досить високою. Це робить можливим використання цієї речовини як антимікробного засобу в еукаріотів.

Література

1. И.А. Рапопорт, Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Фармакология и токсикология, 10, 3 (1966).
2. С.М. Гершензон, Мутации (Наукова думка, Київ, 1991).
3. И.М. Прохорова, М.И. Комарова, А.Н. Фомичева, Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды. Методические указания. (Яросл. гос.ун-т, Ярославль, 2003).
4. И.М. Прохорова, Растительные тест-системы для оценки мутагенов (ЯрГУ, Ярославль, 1988).
5. ВОЗ. Руководство по изучению генетических эффектов в популяции человека // Международная программа по химической безопасности. / Гигиенические критерии состояния окружающей среды 46 (Всемирная Организация Здравоохранения, Женева, 1989).
6. А.И. Довгалюк, Т.Б. Рамняк, Я.Б. Блюм, Цитология и генетика, 1, 3 (2001).
7. О.Я. Нейланд, Известия АН Латвийской ССР, серия «Химия», 62 (10348b), 577 (1964).
8. В. Halpern, Australian Journal of Chemistry, 18 (3), 417 (1965).
9. I. Osama, M.R. Hanaa, European Journal of Medicinal Chemistry, 44 (9), 3683 (2009).
10. T. Shujiang; W. Qian, Z. Yan, X. Jianing [and others], Journal of Heterocyclic Chemistry, 43 (6), 1647(2006).
11. G. Fiskesjo, Hereditas, 102, 99 (1985).

Мельник Оксана Ярославівна – асистент кафедри хімії фармацевтичного факультету.

Ястребова Ольга Станіславівна – асистент кафедри медичної біології і генетики.

Мельник Дмитро Олександрович – кандидат хімічних наук, доцент кафедри хімії фармацевтичного факультету.

Стецьків Андрій Остапович – кандидат хімічних наук, доцент, завідувач кафедри хімії фармацевтичного факультету.