

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«Запорізький національний університет»
Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України

Заснований
у 1997 р.

Свідоцтво про державну реєстрацію
друкованого засобу масової інформації
Серія КВ № 15436-4008 ПР,
22 червня 2009 р.

Адреса редакції:
Україна, 69600,
м. Запоріжжя, МСП-41,
вул. Жуковського, 66

В і с н и к

Запорізького національного університету

Телефони

для довідок:

(061) 289-12-26

(061) 289-12-53

• Біологічні науки

№ 1, 2012

Запоріжжя 2012

РОЗДІЛ 5. БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ

УДК 575.224+576.356

ТОКСИЧНІСТЬ ПОХІДНИХ 4-АМІНО-3,5-ДИМЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛІУ ЩОДО ЦИБУЛІ РІПЧАСТОЇ (*ALLIUM CEPA* L.)

Ткачук Н.В., к.б.н., доцент, Янченко В.О., к.фарм.н., доцент,
Демченко А.М., д.фарм.н., професор

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка

Досліджено токсичність четвертинних похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію щодо цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.). Відмічено найбільшу пригнічуючу дію на довжину корінців проростків для похідного з атомом хлору в мета-положенні та похідного з 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильним залишком. Виявлено зміни мітотичного циклу клітин кореневої меристеми цибулі, хромосомних аберацій не знайдено.

Ключові слова: біотестування, *Allium cepa* L., похідні 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію, мітотичний індекс, довжина фаз мітозу, ана-телофазний метод

Ткачук Н.В., Янченко В.А., Демченко А.М. ТОКСИЧНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 4-АМИНО-3,5-ДИМЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛИЯ К ЛУКУ РЕПЧАТОМУ (*ALLIUM CEPA* L.) / Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко, Украина

Исследована токсичность четвертичных производных 4-амино-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолия к луку репчатому (*Allium cepa* L.). Отмечено наибольшее угнетающее действие на длину корней проростков для производного с атомом хлора в мета-положении и производного с 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагидро-6-нафтенил)-этильным фрагментом. Показаны изменения митотического цикла клеток корневой меристемы лука, хромосомных aberrаций не обнаружено.

Ключевые слова: биотестирование, *Allium cepa* L., производные 4-амино-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолия, митотический индекс, длина фаз митоза, ана-телофазный метод

Tkachuk N.B., Yanchenko V.A., Demchenko A.M. THE TOXICITY OF DERIVATIVES OF 4-AMINO-3,5-DIMETHYL-4H-1,2,4-TRIAZOLIA TO *ALLIUM CEPA* L. / Chernihiv National Pedagogical University Named By T.G.Shevchenko, Ukraine

We investigated the toxicity of quaternary derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolia to *Allium cepa* L. Observed the most depressing effect on the length of the sprout derivative with chlorine in the meta-position and derivative with 2-oxo-2-(1,2,3,4-tetragidro-6-naftenil)-ethyl substance. Showing changes in mitotic cell cycle in meristem of root *Allium cepa* L., chromosomal aberrations not found.

Key words: biotest, *Allium cepa* L., derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolia, mitotic index, length phases of mitosis, ana-telophase assay

ВСТУП

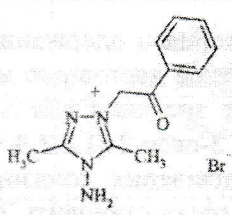
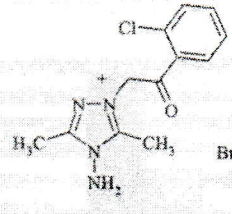
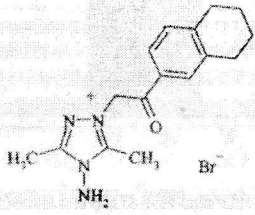
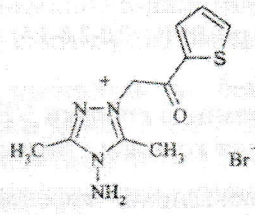
На сьогодні синтезується величезна кількість нових сполук із широким спектром властивостей для подальшого використання в промисловості, медицині, побуті. Нашими попередніми дослідженнями показано антимікробні властивості четвертинних солей 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію [1]. Можливе практичне застосування цих похідних потребує дослідження їх токсико-мутагенних властивостей. Так, значної уваги набули дослідження токсикантів методами біотестування з використанням різноманітних тест-рослин [2-7]. Вивчення нами токсичних властивостей похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію за тест-рослиною крес-салатом показало неоднозначність впливу похідних на біометричні показники паростків [8]. Як стандартний тест-об'єкт для визначення токсикантів розглядають цибулю ріпчасту

(*Allium cepa* L.) [9-11]. Зокрема є дані щодо застосування *Allium cepa* L. як індикаторного організму для визначення токсичних властивостей синтетичних органічних сполук: похідних 2,4- та 2,6-динітроанілінів [12], фенольних похідних бензimidазолу [13], N-нітрозодіетиламіну [14], лікарських препаратів [15], пестицидів [11, 16]. При цьому вимірюють довжину корінця паростків цибулі (ростовий тест), оцінюють мітотичний індекс та хромосомні аберації в клітинах кореневої меристеми паростків (*Allium*-тест). Тому метою даної роботи було дослідити фітотоксичні властивості похідних 4-аміно-3,5-диметил-4H-1,2,4-триазолію щодо цибулі ріпчастої.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували фітотоксичність четвертинних похідних 4-аміно-3,5-диметил-4H-1,2,4-триазолію (табл.1), які синтезовано на кафедрі хімії Чернігівського національного педагогічного університету імені Т.Г.Шевченка під керівництвом д.фарм.н. Демченка А.М. [1].

Таблиця 1 – Формули похідних 4-аміно-3,5-диметил-4H-1,2,4-триазолію

Умовне позначення	Формула	Назва
I		4-аміно-3,5-диметил-1-(2-оксо-2-фенілетил)-4H-1,2,4-триазол-1-й бромід
IV		4-аміно-1-[2-(2-хлорфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил-4H-1,2,4-триазол-1-й бромід
VII		4-аміно-3,5-диметил-1-[2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафталеніл)етил]-4H-1,2,4-триазол-1-й бромід
VIII		4-аміно-1-[2-(2-тієніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил-4H-1,2,4-триазол-1-й бромід

Як тест-рослину використали цибулю ріпчасту (*Allium cepa* L.) сорту Хашедон. Насіння цибулі розміщували в чашках Петрі по 50 штук на фільтрувальному папері, який змочували дистильованою водою з додаванням етилового спирту (контроль (К) або водно-спиртовим розчином відповідної сполуки з концентрацією 100 мкг/мл (дослід). Чашки з насінням розміщували в термостаті при температурі 24-25°C і

щодобово зволожували однаковою кількістю розчинів. Повторність досліду трикратна. На 4-ту добу визначали довжину корінців та розраховували фітотоксичний ефект [7].

З кореневої меристеми проростків виготовляли тимчасові давлені препарати за загальноприйнятою методикою та розраховували мітотичний індекс (у %), відносну довжину кожної фази мітозу (у %) [17]. Вивчення генотоксичності похідних проводили ана-телофазним методом [17].

При обробці експериментальних даних визначали середнє квадратичне відхилення [18]. Як критерій оцінки достовірності змін, що спостерігали, використали t-критерій Ст'юдента. Статистичну обробку результатів дослідження проводили для рівня значимості 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження чутливості проростків цибулі ріпчастої до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію наведено на рисунку 1 та в таблиці 2.

Встановлено, що проростки тест-рослини достовірно пригнічувались похідним, яке не містить замісників у 2-оксо-2-фенілетильному залишку (сполука I). Так, зафіксовано погіршення росту корінців у 1,2 раза порівняно з контролем (рис.1). При цьому фітотоксичний ефект становить 17,7% (табл.1).

Введення в сполуку I Cl-атому в мета-положення з одержанням сполуки IV значно підвищило токсичні властивості: довжина корінців достовірно менше, ніж у контролі в 1,7 раза, а фітотоксичний ефект має найвище значення для досліджених похідних - 42,4%. При дії похідного VII, яке містить 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильний залишок, відмічено достовірне пригнічення довжини корінців у 1,6 раза порівняно з контролем (рис.1). Фітотоксичний ефект становить 38,6% (табл.2).

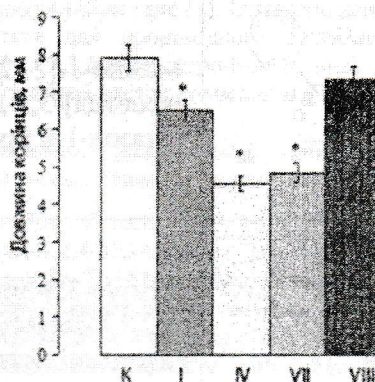


Рис. 1. Довжина корінців цибулі ріпчастої під впливом похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію

Примітка: Відмінності від контролю достовірні при * $p \leq 0,05$ ($t_{05} = 2,0-2,6-3,4$)

Проростки тест-рослини виявились нечутливими до сполуки VIII, яка містить 2-тієніл-2-оксоетил, оскільки зафіксовані зміни довжини корінців є недостовірними (рис.1).

Результати дослідження цитогенетичних показників кореневої меристеми цибулі ріпчастої під впливом похідних наведено на в табл. 3 та на рис.2.

Результати дослідження показали, що значення мітотичного індексу в контролі та в присутності сполуки VIII наближається до показника, що відповідає нормативним нормальним та комфортним умовам для рослини ($113,0 \pm 11,3\%$ та 140% відповідно [19]) і становить $127,1 \pm 14,5\%$ та $124,0 \pm 14,2\%$ відповідно (табл. 3).

Таблиця 2 – Фітотоксичний ефект похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію щодо цибулі ріпчастої

Варіант досліду	Фітотоксичний ефект, %
Контроль	—
I	17,7
IV	42,4
VII	38,6
VIII	—

Таблиця 3 – Цитогенетичні показники кореневої меристеми *Allium cepa* L. під впливом похідних

Варіант досліду	Мітотичний індекс, ‰	Частота аберантних хромосом, %
Контроль	127,1±14,5	0
Сполука I	224,3±17,7	0
Сполука IV	78,0±11,7	0
Сполука VII	40,9±8,6	0
Сполука VIII	124,0±14,2	0

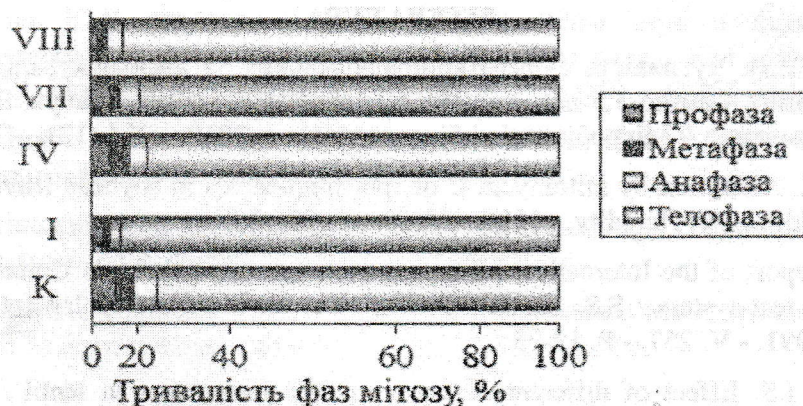


Рис. 2. Вплив похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію на відносну тривалість фаз мітозу в кореневій меристемі цибулі

Для сполуки I (без замісників у бензольному кільці) відмічено достовірне стимулювання мітотичного циклу в 1,8 раза, хоча за ростовим тестом фітотоксичний ефект становив 17,7%. Незважаючи на стимулювання мітотичного циклу, пригнічення росту цибулі, можливо, пов'язано з впливом сполуки I на активність ферментів.

Мітотичний індекс при дії похідного IV (з атомом хлору в мета-положенні фенільного радикалу) становить $78,0 \pm 11,7\%$, а похідного VII (з 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильним залишком) – $40,9 \pm 8,6\%$, що достовірно менше, ніж у контролі в 1,6 раза та 3,1 раза відповідно.

Встановлено, що фенольні похідні 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію відрізняються механізмом дії на мітоз (рис. 2). Сполуки I та VIII зменшують тривалість профазы, метафазы та анафазы, збільшуючи тривалість телофазы. Сполука IV зменшує тривалість профазы, а сполука VII – метафазы.

Сполуки, які здатні змінювати відносну тривалість фаз мітозу, втручаються або в метаболізм пуринів, або в метаболізм речовин, які визначають розвиток і формування клітинного апарату поділу, здатні індукувати мутагенну відповідь [13]. Тому за допомогою ана-телофазного аналізу перевірена здатність сполук індукувати хромосомні аберації в клітинах кореневої меристеми цибулі. Частота абераційних хромосом у контролі та досліді становила 0 % (табл. 3). Отже, сполуки не проявили мутагенної активності.

Перспективою подальшого дослідження є пошук серед нових синтетичних триазолвмістних сполук з 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильним залишком таких, що мають низьку токсичність поряд із високими антибактеріальними властивостями.

ВИСНОВКИ

1. Досліджені похідні 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію проявили пригнічуючу дію на ріст корінців проростків цибулі ріпчастої, крім сполуки з 2-тієніл-2-оксоетильним залишком (сполука VIII), для якої довжина корінців була в межах контролю. Найбільшу пригнічуючу дію мали похідні IV (з атомом хлору в мета-положенні) та VII (з 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильним залишком).
2. У кореневій меристемі цибулі при дії досліджених сполук виявлено зміни мітотичного циклу, але хромосомних аберацій не виявлено. Це вказує на те, що сполуки мають цитотоксичні властивості, але не мають генотоксичних.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ткачук Н.В. Чутливість сульфатвідновлювальних та амоніфікувальних бактерій до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію / Н.В. Ткачук, В.О. Янченко, А.М. Демченко // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – №4 (12). – С.72-79.
2. Vig B.K. Alteration by mitomycin C of spot frequencies in soybean leaves / B.K. Vig, E.F. Paddock // J. Heredity. - 1986. - V. 59. - P. 225-229.
3. Status report of the International Programm on Chemical Safety's Collaborative study of plant test-system / S.S. Sandhu, F.G. De Serres, H.N.B. Gopalan [et al.] // Mutat. Res. - 1991. - V. 257. - P. 19-25.
4. Solanki I.S. Effect of different mutagen on M1 parameters in lentil / I.S. Solanki, B. Sharma // Lens Newsletter. - 1992. – V.19, № 2. - P. 9-11.
5. Цой Р.М. Эффективность различных тест-систем в оценке мутагенной активности загрязненных вод / Р.М. Цой, И.В. Пак // Экология. - 1996. - № 3. - С. 194-197.
6. Grant W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens / W.F. Grant // Mutat. Res. - 1994. – V. 310. – P. 175–185.
7. Багдасарян А.С. Биотестирование почв техногенных зон городских территорий с использованием растительных организмов: дис. ...канд.биол.наук: 03.00.16 / Багдасарян Александр Сергеевич. – Ставрополь, 2005. – 159 с.
8. Ткачук Н.В. Фітотоксичність деяких похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію / Н.В. Ткачук, В.О. Янченко, А.М. Демченко // Збірник статей за матеріалами Міжнар. наук. конф. «Фіторізоманіття прикордонних територій

- України, Росії, Білорусі у постчорнобильський період» (17-18 грудня 2010 р., м. Чернігів). – С.237-243.
9. Constantin M.J. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay. A report of US EPA Gene-Tox programme / M.J. Constantin, E.T. Owen // Mutation Research. - 1982. - V. 99. - P.1-12.
 10. Cauhan L.K.S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa* / L.K.S. Cauhan, P.N. Saxena, S.K. Gupta // Environ. Exp. Bot. - 1999. - V. 42. - P.181-189.
 11. Nilüfer A. Evaluation of clastogenicity of 4,6-Dinitro-*o*-cresol (DNOC) in *Allium* root tip test / A. Nilüfer, C. Serap, S. Senay, Y. Dilek, Ö. Özelm // J. Biol. Environ. SCL. - 2008. - №2. - P.59-63.
 12. Скрининг новых производных 2,4- и 2,6-динитроанилинов на фитотоксичность и антимиотическую активность / [С.П. Ожередов, А.И. Емец, В.Н. Брыцун, И.П. Ожередова и др.] // Цитология и генетика. – 2009. – Т.43, № 5. – С.3-13.
 13. Селезнева Е.С. Генотоксичность синтетических фенольных производных бензимидазола / Е.С. Селезнева, З.П. Белоусова, Л.М. Моисеева // Вестник ОГУ. – 2010. - №5 (111) / май. – С.111-114.
 14. De Rainho C.R. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in *N*-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation / C.R. De Rainho, A. Kaezer, C.A.F. Aiub, I. Felzenszwalb // Annals of the Brazilian Academy of Sciences. – 2010. – V.82 (4). – P.925-932.
 15. Abu Ngozi E. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems / Abu Ngozi E., Mba K.C. // Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. - February 2011. - V. 3 (2). – P.44-51.
 16. Шутова Ю.Г. Оценка чувствительности *Allium cepa* и *Lepidium sativum* с использованием ксенобиотиков адамантанового ряда / Ю.Г. Шутова // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2010. - №6 (80). – С.253-259.
 17. Практикум по цитогенетике / [Гостимский С.А., Дьяков М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А.] – М.: МГУ, 1974. – 275 с.
 18. Плохинский Н.А. Биометрия / Николай Александрович Плохинский. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1970. – 368 с.
 19. Моніторинг довкілля / [Боголюбов В.М., Клименко М.О., Мокін В.Б. та ін.]; за ред. В.М.Боголюбова. – Вінниця: ВНТУ, 2010. – 232 с.