УДК 575.224.46

Селезнева Е.С., Белоусова З.П., Моисеева Л.М.
Самарский государственный университет
E-mail: catana7@yandex.ru

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЕНОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

Изучена генотоксичность для *Allium cepa* бензимидазолилметилфенолов и 2-метил бензимидазолилметилфенолов. Показано, что она зависит от положения ОН-группы в бензольном кольце, в частности 4-замещенные фенолы генотоксичнее 2-замещенных. Обсуждаются возможные механизмы действия этих соединений.

Ключевые слова: бензимидазол, фенолы, генотоксичность, митотический индекс, хромосомные аберрации, *Allium cepa*.

Биологическая активность широко распространенных в природе различных органических фенолов часто проявляется в токсичности для растений [3, 4, 5, 8]. Это привело к необходимости изучения механизмов их действия [12].

Многие из них являются регуляторами процессов роста и развития и участвуют в разнообразных окислительно-восстановительных процессах растительных клеток. Характер действия этих соединений на растения определяется расположением гидроксильных групп в бензольном кольце относительно заместителя [6, 10].

Несмотря на многочисленные исследования, вопросы, связанные с ролью строения фенольных производных в развитии мутагенного ответа, остаются открытыми. Полученная информация позволит оценить и вред, наносимый антропогенными фенолами, и процессы, протекающие в популяциях растений, подвергнутых интенсивному антропогенному воздействию.

Целью данного исследования является анализ цитогенетической активности фенольных производных бензимидазола.

Материал и методы

Синтез соединений, использованных в работе, осуществлен по методике, описанной в [9]. Их общая формула представлена на рисунке 1.

Семена *Allium cepa*, рекомендованного ВОЗ в качестве тест-объекта для анализа мутагенности ксенобиотиков, проращивали в термостате при температуре +22 °С в течение 5 суток. Для этого в чашки Петри, содержащие растворы соединений I-IV в концентрациях 0,001 и 0,01 мг/мл. Данные концентрации не вызывали плазмолиз в клетках эпидермиса лука в течение 30 минут. Контролем служили семена, пророщенные в растворителе. В качестве растворителя использовали 5% изопропиловый спирт.

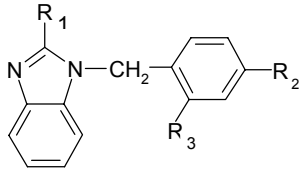
Исследовали влияние фенольных соединений (I-IV) на всхожесть семян *Allium cepa* и на рост корней относительно контроля путем подсчета отношения длины корней на 5-й день роста проростков в опыте к длине корней в контроле за это же период.

По стандартной методике готовили давленные и окрашенные ацетокармином препараты меристемы корней [2]. Для подсчета митотического индекса анализировали 1000 клеток для каждого опыта, для оценки способности индуцировать хромосомные аберрации анализировали 900 ана-телофаз [2].

Достоверность различий между действием соединений оценивали с помощью полного двухфакторного дисперсионного анализа. Для выявления связей между физико-химическими параметрами соединений, их токсичностью и мутагенностью был применен корреляционный анализ [7].

Результаты и обсуждения

Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что фенольные производные бензимидазола ингибируют всхожесть семян *Allium cepa* (рис. 2). С увеличением концентрации растет их токсичность ($p<0,001$),



(I) – 4- [(1*H*-бензимидазол-1-ил)метил]фенол (R_1 – H, R_2 – OH, R_3 – H), (II) – 2- [(1*H*-бензимидазол-1-ил)метил]-фенол (R_1 – H, R_2 – H, R_3 – OH), (III) – 4- [(2метил-1*H*-бензимидазол-1-ил)метил]фенол (R_1 – CH_3, R_2 – OH, R_3 – H), (IV) –2-[(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-ил) метил]-фенол (R_1 – CH_3, R_2 – H, R_3 – OH).

Рисунок 1. Общая формула 2- и 4-(1*H*-азол-1-илметил)фенолов I-IV

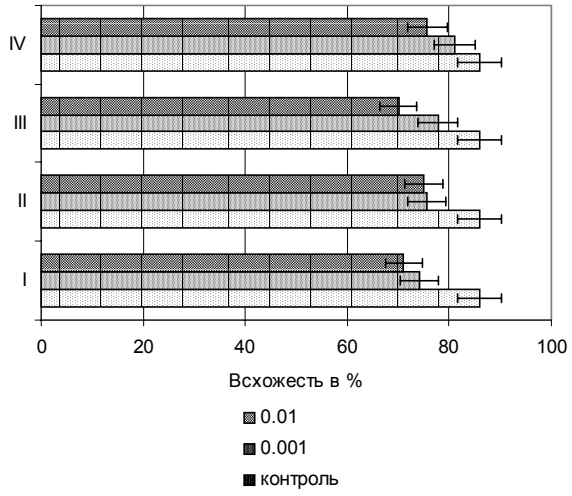


Рисунок 2. Влияние фенольных производных бензимидазола (I-IV) на всхожесть семян *Allium cepa*

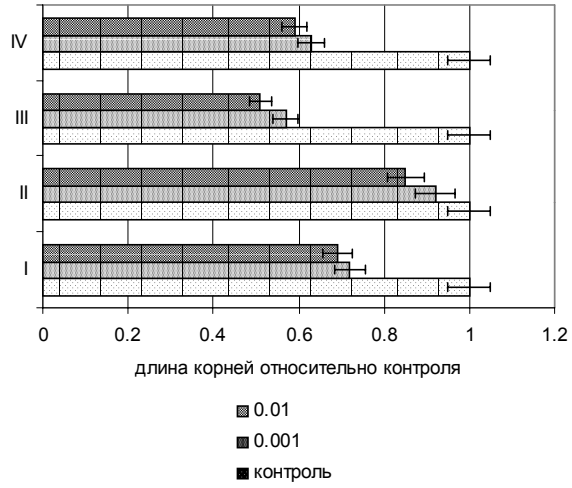


Рисунок 3. Влияние фенольных производных бензимидазола (I-IV) на относительную длину корней *Allium cepa*

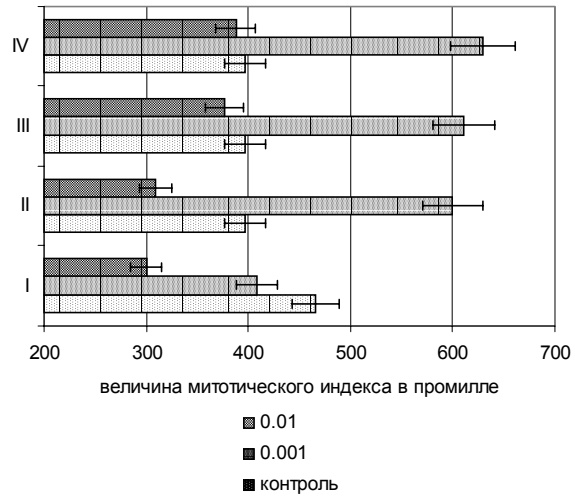


Рисунок 4. Влияние фенольных производных бензимидазола (I-IV) на величину митотического индекса корневой меристемы *Allium cepa*

однако они достоверно не различаются по данному типу биологической активности.

Исследуемые фенольные соединения подавляли рост корней лука (рис. 3). Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что с увеличением концентрации растет токсичность растворов ($p<0,001$), соединения достоверно различаются по токсичности ($p<0,001$), производные 2-метилбензимидазола (III-IV) токсичнее своих аналогов производных бензимидазола (I-II). Соединения I и III, содержащие ОН-группу в *napa*-положении, достоверно токсичнее соединений II и IV, с ОН-группой в *opmo*-положении.

Ростовые процессы зависят и определяются пролиферативной активностью меристематической ткани, поэтому мы изучили влияние фенольных производных на величину митотического индекса корневой меристемы *Allium cepa*, который является показателем цитотоксичности. Результаты исследований представлены на рис. 4.

Были выявлены следующие тенденции в действии соединений, в концентрации 0,001 мг/мл воздействие фенолами (II-IV) приводит к увеличению величины митотического индекса, при увеличении концентрации наблюдается тенденция подавления пролиферативной активности, что выражается в уменьшении митотического индекса по сравнению с контролем ($p<0,01$).

Это обстоятельство привело к необходимости исследования относительной продолжительности фаз митоза в меристемах, подвергнутых воздействию исследованными соединениями (рис. 5).

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

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

где *tFM* – относительная длительность исследуемой фазы митозы,

$\sum FM$ – число клеток исследуемой фазы митоза,

$\sum N$ – сумма всех делящихся клеток.

Как видно из представленных результатов, фенольные производные бензимидазола и 2-метилбензимидазола отличаются механизмом действия. Фенольное производное бензимидазола, имеющее ОН-группу в *napa*-положе-

нии, вызывает один блок на стадии анафазы, его аналог с ОН-группой в *орто*-положении – вызывает блоки как на стадии анафазы в низкой концентрации, так и на стадии метафазы и анафазы в более высокой концентрации. Фенольные производные 2-метилбензимидазола независимо от концентрации индуцируют блоки на стадии метафазы и телофазы.

Соединения, способные изменять относительную продолжительность фаз митоза, вмешиваются либо в метаболизм пуринов, либо в метаболизм веществ, определяющих развитие и формирование клеточного аппарата деления, так или иначе способны индуцировать мутагенный ответ. Поэтому с помощью метода ана-телофазного анализа мы проверили способность соединений индуцировать хромосомные аберрации в клетках корневой меристемы лука. Результаты суммированы на рис. 6.

Как видно из представленных результатов, все соединения проявили мутагенную активность, вызывая различного рода хромосомные аберрации, выражающиеся в появлении аберраций типа «мосты» простые и двойные, «обломки» и «отставания». Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что соединения, содержащие ОН-группу в *пара*-положении, достоверно мутагеннее своих аналогов с ОН-группой в *орто*-положении ($p<0,01$). С ростом концентрации достоверно растет количество индуцированных аберрантных ана-телофаз ($p<0,01$).

Полученные результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями, которые показали, что воздействие экзогенными фенолами усиливает цитоплазматическую активность фенолоксидаз [12], что приводит к окислению фенолов, превращая их в токсиканты. Проведенные нами исследования позволяют утверждать, что экзогенные синтезированные фенолы превращаются в генотоксиканты.

Анализируя полученные результаты, можно отметить следующее: если роль природных фенолов многопланова и незаменима [1, 4, 5], то экзогенные фенолы, вмешиваясь в метаболизм, нарушают сложную регуляцию растущего организма растений и способны выступать и как клеточные яды, и как мутагены, снижая механизмы адаптациогенеза растений, подвергнутых их воздействию.

Проведенные нами исследования не позволяют определить механизмы вмешательства синтезированных нами фенолов в клеточный метаболизм, но можно предположить, что они могут активно взаимодействовать с ауксиноксидазами и цитокининоксидазами. В пользу этого свидетельствует тот факт, что фенольные соединения, имеющие ОН-группу в *пара*-положении, проявляют более сильную цитогенетическую активность, чем их аналоги с ОН-группой в *орто*-по-

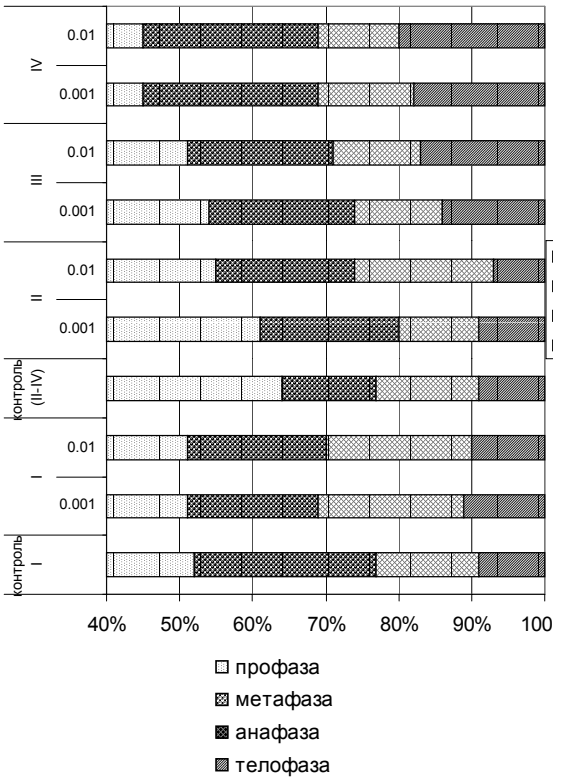


Рисунок 5. Влияние растворов фенольных производных бензимидазола (I-IV) разных концентраций на относительную продолжительность фаз митоза

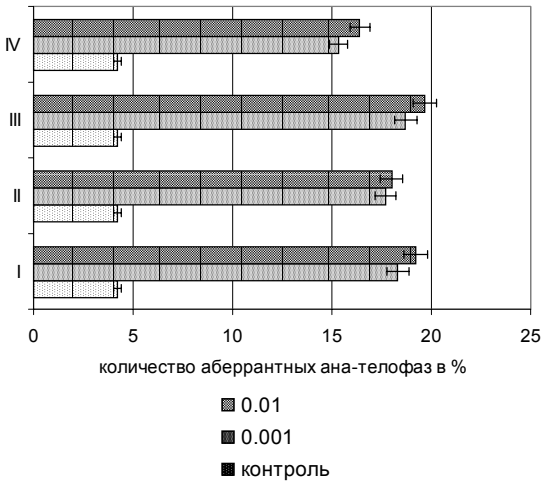


Рисунок 6. Мутагенность фенольных производных бензимидазола (I-IV)

ложении. Это совпадает с данными других авторов, показавших, что введение ОН-группы в *пара*-положение придает фенольному соединению свойства антагониста в-индолилуксусной кислоты [6]. Антагонизм проявляется за счет повышения активности оксидаз, разрушающих в-индолилуксусную кислоту. Если ОН-группа находится в *орто*- или *мета*- положении, активность фенола резко снижается или исчезает [14].

Также было показано, что в некоторых тканях активность цитокинин оксидазы фермента, участвующего в катаболизме цитокининов, определяющих пролиферативную активность тканей, может регулироваться посредством ауксинов [13]. Некоторые природные производные фенола повышают активность цитокининоксидазы, так Wang и Letham обнаружили, что кофейная кислота (3,4-дигидрокси-транс-коричная кислота) стимулирует активность цитокининоксидазы [15]. Ванилиновая и синаповая кислоты при этом были менее эффективны. Другие же фенольные кислоты, такие как *пара*-кумариновая, 3,4-дигидроксибензойная и феруловая кислоты, не оказывали стимулирующего действия на цитокининоксидазы. Синтетическое соединение 2,6-диметоксифенол повышает активность фермента в 50 раз [11].

Таким образом, можно утверждать, что все фенольные соединения взаимодействуют с ферментами, участвующими в метаболизме фитогормонов, и именно структура фенола обеспечивает эффективное взаимодействие активных центров ферментов с субстратами – фенолами.

Поскольку многие фитогормоны способны воздействовать на активность генетического аппарата растений, то неудивительно, что фенольные соединения, взаимодействующие с ними, проявляют мутагенную активность.

Список использованной литературы:

1. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир, 1977. 239 с.
2. Гостимский С.А., Дьяков М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике / С.А. Гостимский., М.И. Дьяков, Е.В. Ивановская, М.А. Монахова. М.: МГУ, 1974. 275 с.
3. Гродзинский А.М. Аллелопатия растений и почвоутомление. К.: Наукова думка, 1991. 294 с.
4. Запрометов М. Н. Фенольные соединения растений и их биогенез // Итоги науки и техники. Сер. биол. химия. М., 1988. Т. 27. 188 с.
5. Запрометов М.Н. О функциональной роли фенольных соединений в растениях // Физиология растений, 1992. Т. 39. №6. С. 1197-1207.
6. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста // Физиология растений, 1997. Т. 44. №3. С. 471-480.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
8. Мороз П.А., Комиссарченко Н.Ф. Аллелопатическая активность некоторых фенольных соединений // Роль токсинов растительного и микробиального происхождения в аллелопатии. К.: Наукова думка, 1983. С. 118-122.
9. Осянин В.А., Пурыгин П.П., Белоусова З.П. Синтез и гликозилирование 4-(1*H*-азол-1-илметил)фенолов // Известия вузов. Сер. химия и химическая технология. 2003. – Т. 46, вып. 1.– С. 138-141.
10. Рощина В.Д., Рощин В.В. Выделительная функция высших растений./ В.Д.Рощина, В.В. Рощин. М.: Наука, 1989. 173 с.
11. Armstrong D.J. Cytokinin oxidase and regulation of cytokinin degradation// D.W.S.Mok and M.C. Mok (eds.). Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. P. 139-154.
12. Blum U., Shafer S.R., Lehman M.E. Evidence for inhibitory allelopathic interactions envolving phenolic acids in field soils: Concepts vs. experimental model // Crit. Rev. Plant., 1999. Vol. 18. P. 637 –693.
13. Burch L.R., Horgan R. The purification of cytokinin oxiadse from Zea mays kernels. // Phytochemistry. 1989. 28(5). P. 1313-1319.
14. Gaspar Th., Pennel C., Thorpe I., Greppin H. Peroxidases. / Th. Gaspar, C. Pennel, I. Thorpe, H. Greppin. Geneve: Univ. of Genev. 1982. 324 p.
15. Wang J., Letham D.S. Cytokinin oxidase-purification by affinity chromatography and activation by caffeic acid. // Plant Science, 1995. V. 112. P. 161-166.

Сведения об авторах: Селезнева Екатерина Сергеевна, доцент кафедры зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета, канд. биол. наук, e-mail: catana7@yandex.ru
Белоусова Зоя Петровна, доцент кафедры органической, биоорганической и медицинской химии Самарского государственного университета, канд. хим. наук, e-mail: zbelousova@mail.ru
Моисеева Людмила Михайловна, студентка 6 курса вечернего отделения кафедры органической, биоорганической и медицинской химии Самарского государственного университета

Selezneva E.S., Belousova Z.P., Moiseeva L.M.
Genotoxicity of synthetic phenolic derivatives of benzimidazole
We studied genotoxicity for Allium sulfur benzimidazolilmethylphenol and 2-methyl benzimidazolilmethylphenols. It is shown that it depends on the position of the OH group in the benzene ring, in particular, 4-substituted phenols are more genotoxic than 2-substituted ones. Possible mechanisms of action of these compounds are discussed.
Keywords: benzimidazole, phenols, genotoxicity, mitotic index, chromosomal aberrations, Allium sulfur