

УДК 615.015.44

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА НА ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ БЕНЗОТРИАЗОЛА

М. С. Земскова

В статье обсуждаются результаты однофакторного дисперсионного анализа, полученные в результате проведения экспериментов с использованием растительной тест-системы *Allium-test* на корневой меристеме семян лука батуна. В ходе эксперимента были обнаружены токсичность и цитотоксичность спиртовых растворов бензотриазола. Проведённые эксперименты с веществом в разных концентрациях показали, что бензотриазол снижает митотическую активность в корневой меристеме в обеих исследуемых концентрациях. Выявлены мутагенные свойства бензотриазола в зависимости от того, каким образом воздействовали на исследуемый объект. Было получено, что на количество хромосомных aberrаций влияют исследуемые способы воздействия генотоксиканта.

Ключевые слова: мутагенность, хромосомные aberrации, цитотоксичность, митоз, азол.

Многие соединения антропогенной природы обладают ярко выраженным генотоксичным эффектом, который проявляется двояко: на уровне хранения генетической информации, вызывая мутации самого различного типа, и на уровне экспрессии генов, изменяя время и место работы гена, а также модифицируя продукты их работы.

Как правило, все исследования ведутся в лабораторных условиях, используя стандартный набор скрининг-тестов, которые позволяют выявить генотоксичность, влияющую только на хранение генетического материала и не позволяющие понять сопряжённый ответ нескольких факторов, которые, возможно, имеют эпигенетические проявления. Именно поэтому исследования, позволяющие выявить не только мутагенный ответ, но и обнаружить факторы, вызывающие эпигенетический ответ, приводящие как к появлению фенкопий различных мутаций, так и к увеличению числа мутаций, становятся всё более актуальными. Особый интерес в этом отношении вызывает время и продолжительность воздействия генотоксикантом, приводящим к появлению мутаций.

Бензотриазол (азимидобензол) относится к классу гетероароматических соединений, в молекуле которых конденсированы бензольный и азольный циклы, относится к девятичленному гетероциклическому азолу, имеющему три атома азота в пятичленном сопряжённом кольце.

Многие производные бензотриазола способны влиять на рост растений, так как бензотриазол и его производные имеют структурное сходство с цитокинами. Цитокины принимают участие в регуляции деления клеток, действуя на их переход из стадии G1 в митоз и уменьшают проницаемость мембран [1]. Выявлена связь между биологической активностью (токсичность, цитотоксичность и мутагенность) и липофильностью, величинами энергии гидратации и дипольного момента бензотриазолов для *Allium cepa* [2].

Целью нашего исследования было выявление токсичности, цитотоксичности, мутагенности спиртовых растворов бензотриазола разных концентраций на *Allium fistulosum*, а также выявление влияния бензотриазола в концентрации 0,001 мг/мл при разных режимах воздействия на исследуемый объект.

Условия и методы исследования

1. Методика анализа генотоксичности бензотриазола при его прямом воздействии на *Allium fistulosum*.

© Земскова М. С., 2016.
Земскова Мария Сергеевна,
(agneshka-kowalski@yandex.ru),
магистрант биологического факультета
Самарского университета,
443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, 34.

Тест-объектом для изучения цитогенетической активности бензотриазола являлась меристема корней *Allium fistulosum*.

В эксперименте использовали семена *Allium fistulosum* сорта «Нежность».

Семена помещали в чашки Петри на 5 суток на фильтровальную бумагу, пропитанную спиртовыми растворами бензотриазола в концентрации 0,001 и 0,0001 мг/мл. В качестве растворителя использовали 5 % изопропиловый спирт. Контролем служили семена, пророщенные в растворителе.

Анализировали влияние бензотриазола на всхожесть, длину корней на пятый день роста, на величину митотического индекса в клетках корневой меристемы, на относительную продолжительность фаз митоза, а также на способность индуцировать хромосомные аберрации.

Достоверность различий между опытом и контролем оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа [3]. Результаты считали достоверными при $P < 0,05$.

2. Методика выявления генотоксичности бензотриазола при разных режимах воздействия.

Были проведены две серии экспериментов.

1 серия. Семена *A. fistulosum* были помещены на трое суток в чашки Петри на фильтровальную бумагу, пропитанную раствором, затем семена переносились в чашки Петри на двое суток, фильтровальная бумага в которых была пропитана спиртовым раствором бензотриазола в концентрации 0,001 мг/мл.

2 серия. Семена *A. fistulosum* были помещены на трое суток в чашки Петри на фильтровальную бумагу, пропитанную спиртовым раствором бензотриазола в концентрации 0,001 мг/мл, после чего переносились в чашки Петри на фильтровальную бумагу с растворителем на двое суток.

Контролем в обеих сериях служили семена, которые в течение пяти суток проращивали в растворителе.

Длину корешков и в опыте, и в контроле измеряли каждый день в течение пяти суток. Срезание корешков с дальнейшим микроскопированием, как в опыте, так и в контроле проводили на пятые сутки.

Токсичность оценивали по всхожести семян в опыте и контроле, длине корней на пятый день роста.

Цитотоксичность оценивалась по способности влиять на величину митотического индекса и на относительную продолжительность фаз митоза.

Мутагенность оценивали с помощью ана-телофазного анализа.

Достоверность различий между результатами различного режима воздействия бензотриазола на исследуемый тест-объект оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа [3], а также с помощью критерия хи-квадрат [4]. Результаты считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведённые исследования показали, что бензотриазол в концентрациях 0,0001 и 0,001 мг/мл оказывает ингибирующее действие на всхожесть семян и рост корней проростков *A. fistulosum*. Наблюдалось снижение всхожести семян на 5,5 % в растворе с концентрацией 0,0001 мг/мл и на 7,0 % в растворе концентрацией 0,001 мг/мл. Происходило уменьшение длины корней на пятый день роста корешков на 28,8 % в растворе с концентрацией 0,0001 мг/мл и на 12,2 % с концентрацией 0,001 мг/мл. Проведённый однофакторный дисперсионный анализ позволил определить коэффициенты дисперсии 6,8 и 0,11, что показывает достоверность результатов отличий на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно.

Ингибирование ростового процесса спиртовыми растворами бензотриазола 0,001 и 0,0001 мг/мл отразилось в его влиянии на пролиферативную активность клеток меристемы (рис. 1).

С ростом концентрации растёт цитотоксичность бензотриазола, что выражается в снижении величины митотического индекса (рис. 1).

В обеих концентрациях бензотриазол вызывает остановку митоза на стадии метафазы и анафазы (рис. 2).

По мнению Алова и др. [5], вещества, действующие подобным образом, способны влиять на метаболизм пуринов и белков-предшественников нитей веретена деления.

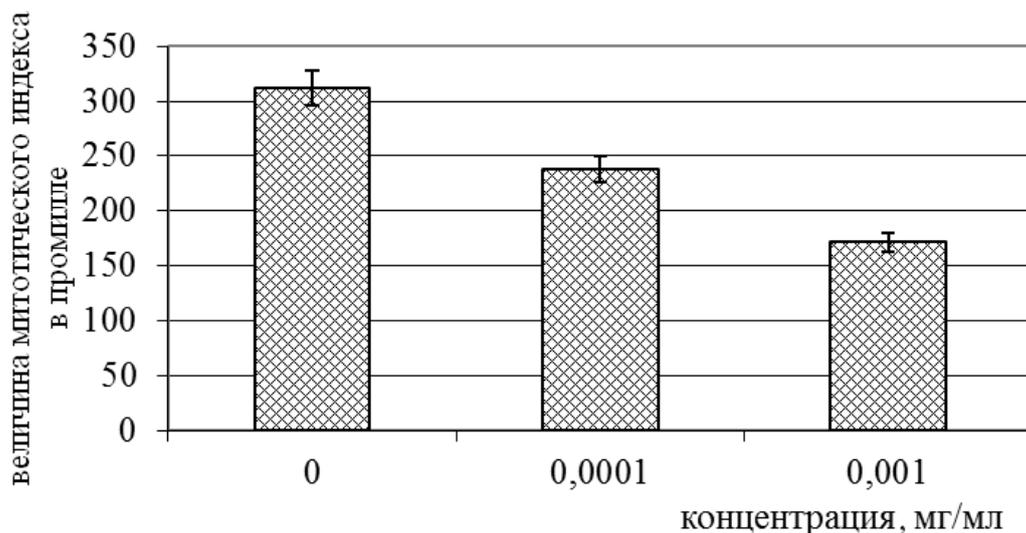


Рис. 1. Влияние спиртовых растворов бензотриазола на величину митотического индекса в клетках меристемы *A. fistulosum*

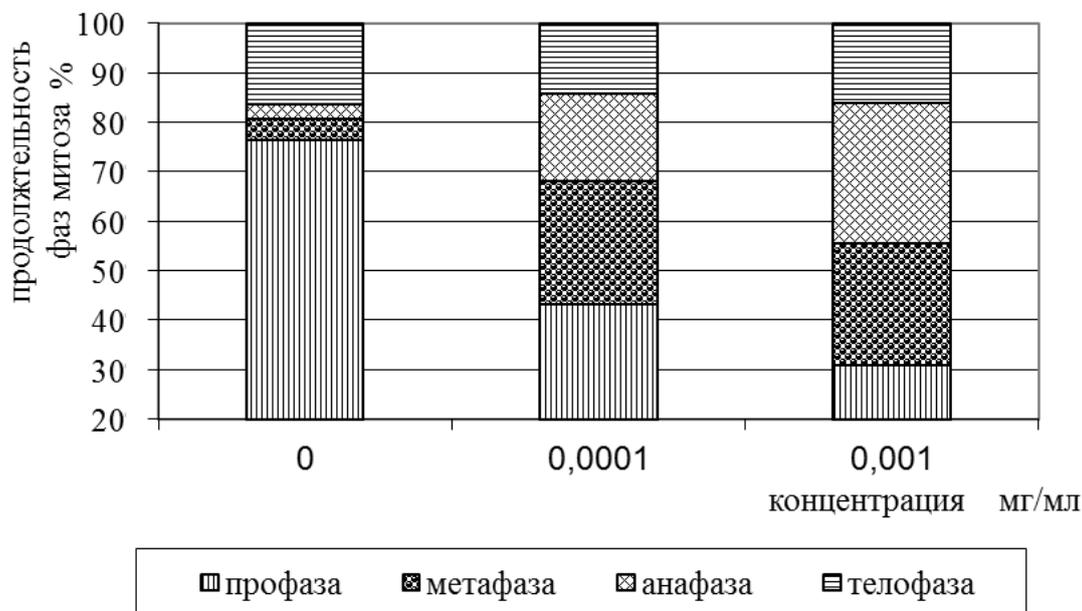


Рис. 2. Влияние бензотриазола на относительную продолжительность фаз митоза в клетках меристемы *A. fistulosum*

Известно, что точки контроля клеточного цикла (checkpoints) способны задерживать клетку до завершения митоза в зависимости от того, что воздействует на конкретную точку контроля. Переход из одной стадии митоза в другую регулируется циклинами. В зависимости от того, как циклины связываются с протеин-зависимыми киназами, выделяют точки управления – checkpoints. В этих точках белки-регуляторы – CDK – связываются с предшественниками нитей веретена деления, задерживая последние стадии митоза [6; 7].

Ранее было показано, что пурины способны связываться с кислыми белками, а к таковым относятся и белки, контролирующие целостность веретена деления [8].

Можно предположить, что бензотриазол, выступая структурным аналогом пуринов, также способен связываться с белками-регуляторами клеточного цикла.

Рассмотрим влияние различных режимов воздействия бензотриазола на его токсичность (рис. 3, 4).

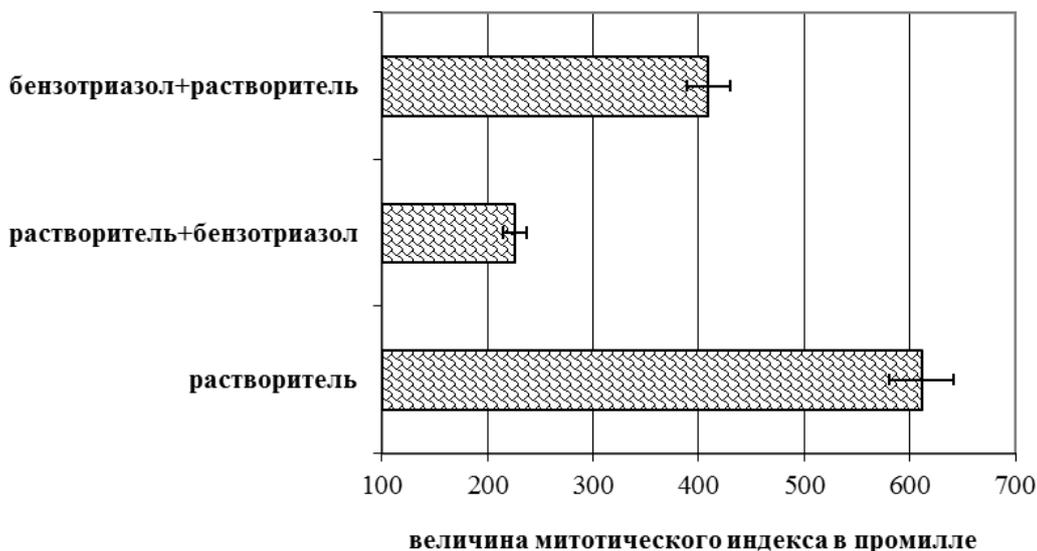


Рис. 3. Влияние разных типов воздействия бензотриазола на пролиферативную активность корневой меристемы *A. fistulosum*

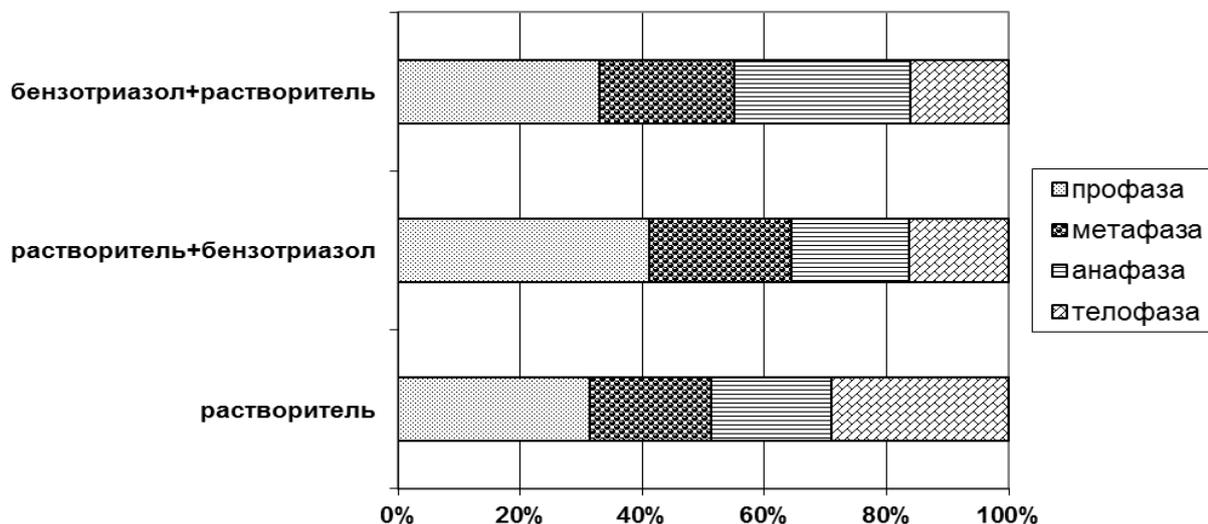


Рис. 4. Влияние разных способов воздействия бензотриазола на относительную продолжительность фаз митоза корневой меристемы *A. fistulosum*

Анализ данных показал, что бензотриазол достоверно ингибирует пролиферативную активность ($p < 0,05$) (рис.3).

Воздействие бензотриазолом после роста лука в растворителе, вызывает более сильный токсический ответ. Скорее всего, это связано с большим количеством делящихся клеток, готовых к воздействию генотоксикантом.

Если семена проращивали в бензотриазоле, а потом переносили в растворитель, то блок был обнаружен на стадии анафазы. Если же семена проращивали сначала в растворителе, а потом переноси-

ли в бензотриазол, то блоки возникали на стадии профазы (рис. 4).

Различия в митотических блоках при различных режимах воздействия бензотриазола говорит о том, что цитотоксичность бензотриазола сильно зависит от того, на какой стадии роста корня *A.fistulosum* происходит это воздействие. Возможно, митотическая активность корневой меристемы лука имеет волновую зависимость, как это описано для некоторых типов тканей животных, и воздействие бензотриазолом после двух суток проращивания семян в растворителе попало на пик митотической активности [5].

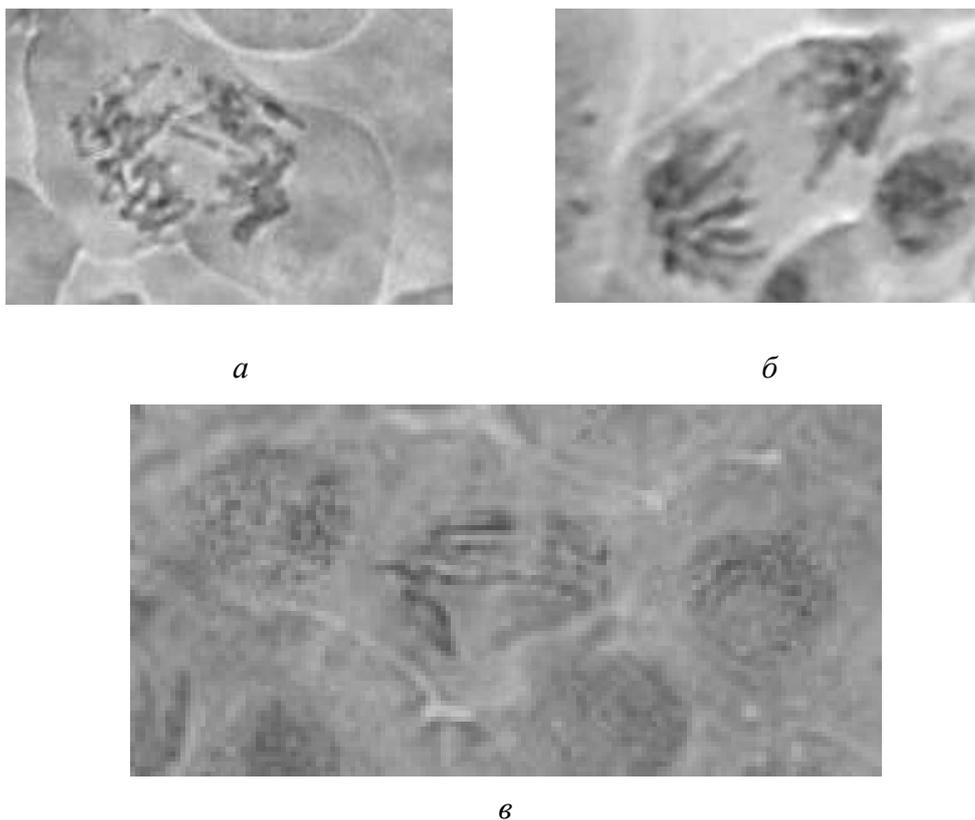


Рис. 5. Хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы *A. fistulosum* после воздействия бензотриазолом: а – отставание хромосом, б – обломки хромосом, в – простой мост

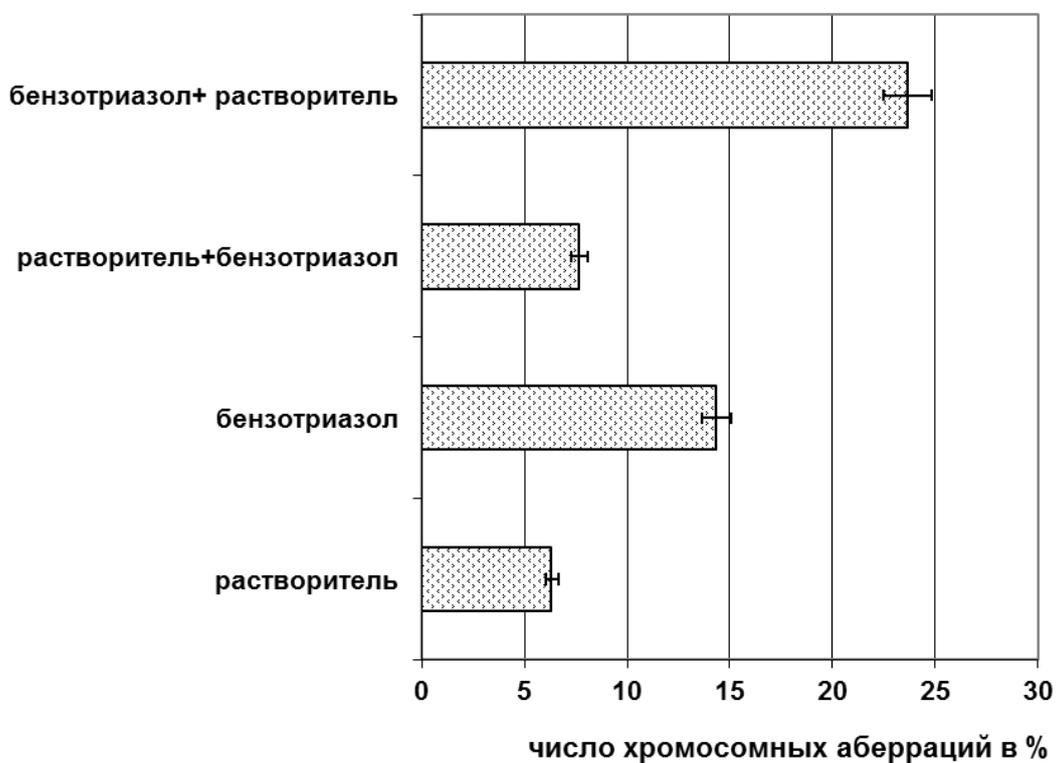


Рис. 6. Мутагенная активность бензотриазола при его различных способах воздействия на клетки корневой меристемы *A. fistulosum*

Биологический ответ, вызванный различными способами воздействия бензотриазола, отражается в его способности индуцировать хромосомные aberrации. В опыте и контроле обнаруживаются различия в хромосомных aberrациях. Если в опыте обнаруживается «отставание хромосом» и «мосты», то в контроле мы выявили все типы хромосомных aberrаций: «мосты» простые и двойные, «обломки» и «фрагментации» хромосом. Наиболее часто встречающиеся aberrации представлены на рис. 5.

Сравнение разных условий влияния бензотриазола на процессы прорастания и развития корневой меристемы *A. fistulosum* показало, что число хромосомных aberrаций зависит от стадии развития данного растения и времени действия токсиканта.

На количество хромосомных aberrаций влияют способы воздействия генотоксикантов. Так, воздействие бензотриазола в течение пяти суток вызывает только 14,3 % хромосомных aberrаций. Когда бензотриазолом воздействовали двое суток после проращивания семян в растворе число хромосомных aberrаций было достоверно меньше – 7,7 %. При воздействии бензотриазолом в первые трое суток, а потом прекращение этого воздействия приводило к максимальному индуцированию патологий митоза, в результате мы зафиксировали 23,7 % хромосомных aberrаций. Интересно отметить, что именно при таком сочетании было обнаружено увеличение митотического индекса.

Заключение

Бензотриазол в изученных концентрациях 0,001 и 0,0001 мг/л выступает как генотоксикант, снижая митотическую активность в корневой меристеме *A. fistulosum*, вызывая блоки митоза на стадии метафазы и анафазы, что выражается в ингибировании процессов роста и всхожести семян лука. Чем выше концентрация бензотриазола, тем более выражен биологический ответ. Бензотриазол в концентрации 0,001 мг/мл снижает всхожесть семян и уменьшает рост корней лука в обеих сери-

ях эксперимента на 5,5 %. Воздействие бензотриазолом после роста лука в растворе вызывает более сильный токсический ответ.

Влияние способа воздействия бензотриазолом наиболее заметно проявляется на клеточном уровне, вызывая ингибирование пролиферативной активности, индуцируя блоки митоза либо на стадии профазы (растворитель + бензотриазол), либо на стадии анафазы (бензотриазол + растворитель).

Бензотриазол достоверно индуцирует хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы *A. fistulosum*. Число хромосомных aberrаций зависит от экспериментального способа воздействия бензотриазолом на семена *A. fistulosum*.

Литература

1. Кулаева О. Н. Цитокины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 264 с.
2. Селезнёва Е. С., Теньгаев Е. И. К вопросу об использовании в мониторинге окружающей среды анализа физико-химических параметров ксенобиотиков // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1 (4). С. 1149–1152.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
4. Практикум по цитогенетике / С. А. Гостимский, М. И. Дьякова, Е. В. Ивановская [и др.]. М.: МГУ, 1974. 275 с.
5. Алов И. А., Брауде А. И. Основы функциональной морфологии клетки. М.; Прага: Медицина, 1969. 343 с.
6. Adraham T. M. Cell cycle checkpoint through the ATM and ATR kinases // Genes and Dev. 2001. Vol. 15. P. 2177–2196.
7. The p12 Cipl and p27 Kipl CDK «Inhibitors» are activators of cyclin D dependent kinases in murine fibroblasts / M. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl [et al.] // EMBO. 1999. Vol. 18. P. 1571–1583.
8. Антитела к белкам клеточного цикла. URL: <http://www.ld.ru/antibodies/ilist-3577.html?page=4> (дата обращения: 1.06.2015).

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL CONDITIONS ON GENOTOXICITY BENZOTRIAZOLE

M. S. Zemskova

The article discusses the results of ANOVA obtained from experiments using plant test systems *Allium test*, the root meristem Welsh onion seeds. During the experiment it was found toxicity, cytotoxicity benzotriazole alcoholic solutions. The experiments with substance at different concentrations demonstrated that benzotriazole reduced mitotic activity in root meristem at both concentrations studied. Revealed mutagenic properties benzotriazole depending on how exposed the object under study. It was found that the number of chromosomal aberrations affect the investigated ways of influencing genotoxicants.

Key words: mutagenicity, chromosomal aberrations, cytotoxicity, mitosis,azole.

Статья поступила в редакцию 15.11.2016 г.