

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛА¹

© 2004 З.П. Белоусова,² Е.С. Селезнева³

Исследовали генотоксичность индола и некоторых его производных (*N*-метилиндола, *N*-индолида бензолсульфокислоты, *N*-индолида толуолсульфокислоты), а также природных индолидов (индолилуксусной кислоты, β -индолилмасляной кислоты) в тестах на *Allium* сера. Обнаружили, что индол и его синтетические производные слабо ингибировали прорастание семян, но стимулировали рост корешков лука, исключение составил *N*-метилиндол, проявивший токсичность в отношении этих параметров. Все исследованные соединения индуцировали хромосомные aberrации различного типа в клетках корневой меристемы *Allium* сера и, за исключением индола, стимулировали пролиферативную активность в клетках корневой меристемы *Allium* сера.

Введение

Фитогормоны широко используются в сельском хозяйстве для ускорения созревания плодов, повышения урожая, уменьшения предуборочного опадания плодов, "залечивания" ранок растений, ускорения ростовых процессов молодых саженцев, задержки прорастания клубней, луковиц и семян, уничтожения сорных растений, повышения всхожести у самых различных семян, ослабленной в процессе их длительного хранения и т.д. [7, 9, 10]. Это стало причиной поиска новых простых в применении и изготовлении, но высокоэффективных препаратов — аналогов природных гормонов роста. Оказалось, что некоторые из ранее синтезированных соединений данного класса способны накапливаться в результате миграционных процессов [2].

В последние годы интерес физиологов переместился в область молекулярной генетики. Это связано с появлением огромного количества работ, посвященных поиску механизмов влияния фитогормонов на экспрессию генов, так как именно они вызывают включение и переключение клеточных

¹Представлена доктором биологических наук профессором В.Г. Подковкиным.

²Белоусова Зоя Петровна, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

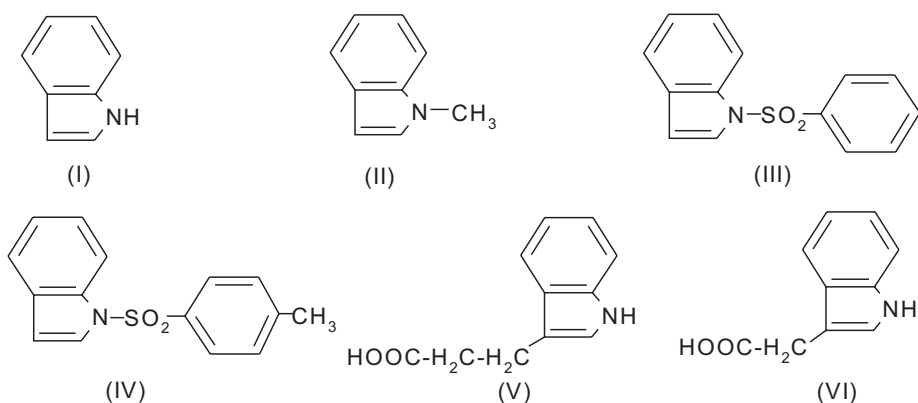
³Селезнева Екатерина Сергеевна, кафедра зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

программ. Несмотря на повсеместное применение в течение ряда поколений препаратов такого рода, мы не обнаружили в литературе результатов исследований, посвященных отдаленным последствиям действия гормоноподобных соединений на генофонд культурных растений. Поэтому нашим следующим шагом на пути исследования действия гормонов роста растений явилось изучение их влияния на хромосомный аппарат клетки.

Целью данного исследования явился анализ способности индола и его производных индуцировать хромосомные aberrации у *Allium* сера.

Материал и методики

В качестве объектов исследования были выбраны индол (I), *N*-метил-индол (II), *N*-индолид бензолсульфокислоты (III), *N*-индолид толуолсульфокислоты (IV), β -индолилмасляная кислота (V) и индолилуксусная кислота (VI).



Синтез *N*-метилиндола(II) осуществлялся методом, описанным в [12]. Выход полученного продукта составил 89%. Физико-химические параметры, подтверждающие его структуру, представлены в таблице.

Синтез *N* индолида бензолсульфокислоты(III). Смесь 2 г (0,017 моль) (I) в 17 мл дихлорэтана и 0,8 г (0,020 моль) гидрида натрия перемешивали в течение 20 мин на магнитной мешалке. Затем добавили 4,47 мл хлорангидрида бензолсульфокислоты и продолжили перемешивание реакционной смеси до тех пор, пока индол не перестанет обнаруживаться по данным ТСХ. После чего реакционную смесь тщательно промыли водой и высушили над сульфатом натрия. Раствор упарили в вакууме, выпавшие кристаллы отфильтровали и высушили. Структуру полученного соединения доказали по температуре плавления, хроматографической подвижности, данным ИК-спектров (см. таблицу).

Синтез *N* индолида толуолсульфокислоты(IV) осуществляли по аналогии с (III). Структуру полученного соединения доказали по темпера-

туре плавления, хроматографической подвижности, данным ИК-спектров (см. таблицу).

Для проведения биологического эксперимента были выбраны семена лука *Allium* сера, которые проращивали в чашках Петри в водных растворах соединений I–VI (концентрация 0,001 мг/мл). Исследовали по 30 семян в трех повторях для каждого соединения. На 5 день роста подсчитывали среднюю длину корешков и процент проросших семян [1].

Корни обрезали и фиксировали в смеси этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 1:3, затем через 10 час их переносили в 75° спирт. Давленные препараты, окрашенные ацетокармином, готовили стандартным методом [4].

Таблица

Физико-химические характеристики индола и его производных

Соединение	Температура плавления, °C	Данные ИК-спектра, ν , см^{-1}	R_f (бензол-ацетон-метанол в соотношении 6:1:0,1)
I	51	3490 (N-H)	0,58
II	–	2940 (N-CH ₃)	0,97
III	73–74	180 (бензол) 3060 (бензол) 1360 (R-S O ₂ -N<)	0,92
IV	77–78	3180 (бензол) 3060 (бензол) 2900 (-CH ₃) 1360 (R-S O ₂ -N<)	0,55

Пролиферативную активность в корневой меристеме корешков, выросших в исследованных растворах, находят по формуле: $OMI = \frac{MIO}{MIk}$, где OMI — относительный митотический индекс, MIO — митотический индекс в опыте, MIk — митотический индекс в контроле. Митотический индекс подсчитывали следующим образом:

$$MI = \frac{\sum(P + M + A + T)}{\sum(P + M + A + T + I)} 1000,$$

где в числителе — сумма профаз, метафаз, анафаз и телофаз (число делящихся клеток), в знаменателе — сумма делящихся и не делящихся клеток (I — число клеток находящихся в стадии интерфазы), для каждого соединения анализировали не менее 1000 клеток [4]. Способность индуцировать хромосомные aberrации оценивали с помощью анателофазного анализа [13]. Для оценки мутагенности каждого соединения анализировали не менее 500–700 анателофаз.

Результаты и обсуждение

Регуляция основных звеньев метаболизма в растении происходит при помощи нескольких типов гормонов: ауксинов, гиббереллинов, цитокининов, жасмонатов, брассиностероидов, абсцизовой кислоты, этилена [3, 5, 10]. Скорость ответа растительных клеток на воздействие гормона определяется способностью последнего связываться с рецепторами клеток растений. Существуют данные, на основании которых можно предположить, что рецепторы фитогормонов локализованы на поверхности мембран клеток. В результате взаимодействия с гормонами рецептор изменяет свое конформационное состояние, это изменение передается через специальные белки ферментам-эффекторам, участвующим в синтезе вторичных посредников. Посредники усиливают сигнал и передают его к специфическим компонентам клетки, которые способны влиять на генетический аппарат.

Природный фитогормон ауксин (VI) является производным индола. Мы предположили, что индол и синтезированные нами его производные способны воспользоваться рецепторами ауксина и вмешиваться в ростовые процессы. Из литературных данных известно, что оптимальной концентрацией ауксина для участия в регуляции процессов метаболизма является 2 мг/л (0,002 мг/мл) [11]. Мы использовали концентрацию того же порядка, но в два раза меньше — 0,001 мг/мл.

Растительные гормоны регулируют такие процессы, как рост, дифференциацию, переход из вегетативной в репродуктивную фазу и другие моменты развития [6, 9]. Поэтому первым этапом нашего исследования явился анализ способности индола и его производных влиять на прорастание семян *Allium* сера (рис. 1).

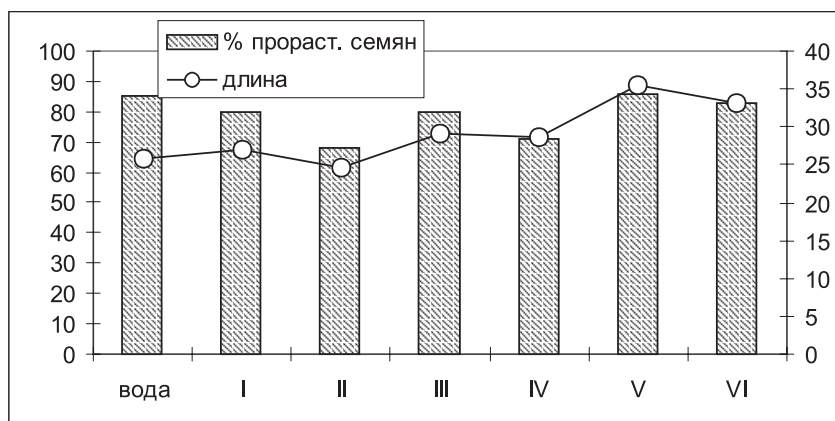


Рис. 1. Влияние I–VI на прорастание семян и длину корешков *Allium* сера

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал, что строение индола влияет на его ингибирующее действие, которое возрастает в

ряду: $VI < III = I < IV < II$. Таким образом, (II) обладал максимально ингибирующим действием по сравнению с другими производными индола, VI — не ингибировал, но и не стимулировал прорастание семян ($p < 0,01$).

Результаты исследования влияния I–VI на длину корешков лука показали, что все исследованные соединения достоверно ($p < 0,01$) стимулируют ростовые процессы. Эта способность увеличивается в следующем ряду: $II < I < IV < III < V < VI$. Таким образом, самыми эффективными стимуляторами ростовых процессов являлись V и VI — природные стимуляторы ростовых процессов корневой системы (индолилмасляная и индолилуксусная кислоты) [6, 11].

Ростовые процессы включают в себя большое количество клеточных метаболизмов: это деление клеток корневой меристемы, растяжение клеток и пр. Мы исследовали способность индолов влиять на пролиферативную активность клеток корневой меристемы лука. Пролиферативную активность оценивали по величине митотического индекса, подсчитанного относительно контроля. Результаты исследований суммированы на рис. 2.



Рис. 2. Влияние I–VI на митотическую активность в клетках корневой меристемы лука

Из представленных результатов видно, что (I) и его синтетические и природные производные (II–IV) стимулируют пролиферативную активность в клетках корневой меристемы лука. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал достоверность стимуляции митотической активности в клетках меристемы корешков лука, проросших в растворах исследуемых индолов ($p < 0,01$), за исключением (I), который слабо ингибировал пролиферативную активность.

Исследуя влияние индолов на протекание митоза с помощью анализа относительной продолжительности фаз митоза, мы не выявили достовер-

ных различий в действии анализируемых соединений и контролем за исключением III, который вызывал задержку клеточного деления на стадии анафазы и телофазы.

Известно, что многие соединения, стимулирующие или ингибирующие митотическую активность, часто индуцировали мутации в анализируемых тест-системах.

Мы проанализировали способность индолов индуцировать хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы лука. Результаты анализа показали, что индолы способны индуцировать все описанные в литературе типы хромосомных aberrаций: простые и двойные мосты, отставания хромосом, обломки хромосом, число обнаруженных в контроле хромосомных aberrаций незначительно и совпадает с литературными данными [4].

Мутагенность по способности индуцировать все типы хромосомных aberrаций убывает в следующем ряду: II > I > III > IV > V ($p > 0,01$), природные фитогормоны V и VI по мутагенности достоверно не отличаются от контроля. Для того чтобы сравнить по мутагенности исследованные индолы, мы построили график, где были суммированы все хромосомные aberrации (рис. 3).

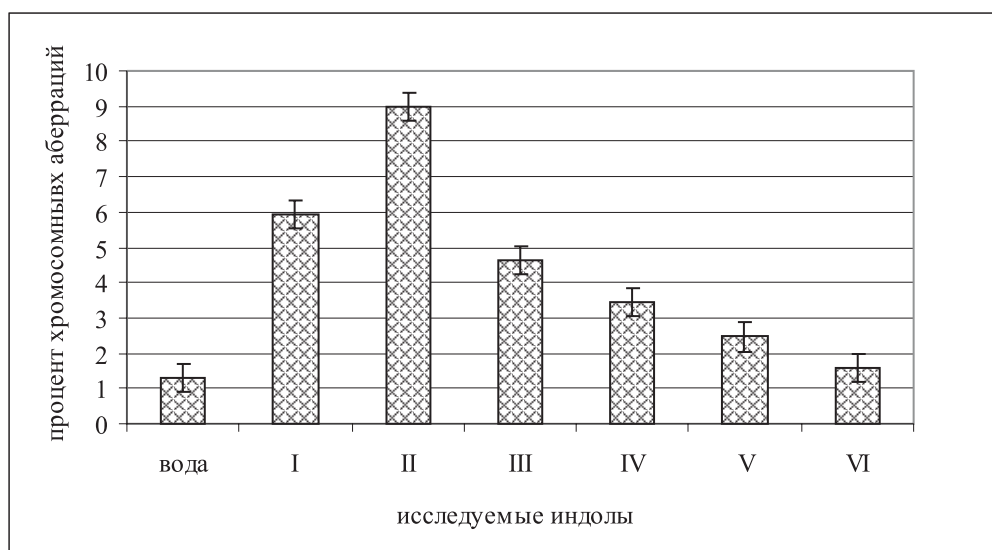


Рис. 3. Мутагенность I–VI

Способность фитогормонов вмешиваться в процессы, определяющие реализацию генетической информации в клетках, по-видимому, служит причиной индукции индольными производными хромосомных aberrаций в растительных клетках, однако проведенные исследования пока не позволяют предположить механизм этого вмешательства.

Тем не менее проведенные исследования позволяют утверждать, что синтезированные нами индольные производные способны взаимодей-

вать с мембранными рецепторами, и определяющим во взаимодействии с рецепторным белком является наличие "индольного ядра". Известно, что выделенные из мембран многих растительных тест-объектов белки-рецепторы ауксина различаются по молекулярной массе в диапазоне от 40000 до 300000 дальтон [8]. Возможно, поэтому у белков-рецепторов появляется способность воспринимать не только сигнальную информацию ауксина, но и других сходных с ним по химическому строению индолов.

Растения в отличие от животных не в состоянии покинуть некомфортные условия существования. Естественный отбор благоприятствовал физиологической пластичности растений, действуя на них различными по структуре химическими соединениями, однако плата за воздействие на ткани синтетическими гормоноподобными веществами выразилась в развитии мутагенного ответа. Это необходимо учитывать при использовании искусственных регуляторов роста.

Литература

- [1] Викторов Д.П. Практикум по физиологии растений. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1991. 352 с.
- [2] Врочинский К.К., Телитченко М.М., Мережко А.Н. Гидробиологическая миграция пестицидов / Под ред. В.Н. Масимова. М.: Изд-во МГУ, 1980. 120 с.
- [3] Геринг Х. Фитохромная и гормональная регуляция морфогенеза // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 117–127.
- [4] Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В. и др. Практикум по цитогенетике. М.: Изд-во МГУ, 1974. 274 с.
- [5] Каравайко Н.Н., Оман Э., Кулаева О.Н. Влияние цитокининов на активность ряда ферментов в изолированных семядолях тыквы // Физиология растений, 1975. Т. 22. Вып. 5. С. 1031–1039.
- [6] Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М.: Наука, 1974. 253 с.
- [7] Кириллова Г.А., Перунова А.А., Гуре Л.А. и др. Изменение изменчивости сортов ячменя после однократной и многократной обработки их гербицидами // Исследования по генетике. 1981. №9. С. 129–138.
- [8] Кулаева О.Н. Гормональная регуляция биологических процессов у растений на уровне РНК и белка. М.: Наука, 1982. 84 с.
- [9] Кулаева О.Н. О механизме действия цитокининов // Рост растений и природные регуляторы. М.: Наука, 1977. С. 216–234.
- [10] Ракитин Ю.В. Химические регуляторы жизнедеятельности растений: Избранные труды. М.: Наука, 1983. 264 с.
- [11] Регуляторы роста растений / Под ред. Г.С. Муромцева. М.: Колос, 1979. 246 с.

- [12] Рожинский Ю.И., Любенская А.Н., Баранов С.Н. и др. Физиологически активные соединения. Киев: Наукова думка, 1979. Вып. 2. 91 с.
- [13] Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. ВОЗ. Женева, 1989. С. 86–96.

Поступила в редакцию 9/XII/2004;
в окончательном варианте — 9/XII/2004.

ON THE IMIDAZOLE DERIVATES GENOTOXICITY⁴

© 2004 Z.P. Belousova,⁵ E.S. Selezneva⁶

The genotoxicity of indole and some of its derivatives such as *N*-methylindole, *N*-indolide bensolsulphuric acid, *N*-indolide toluolsulphyric acid, indolylacetic acid and β -indolyltyrosine acid that may be considered as native plant hormones analogs, for *Allium cepa* seeds and root meristems is investigated. It is shown that indole and its synthetic derivatives weakly inhibited seed germination but stimulate the root growth whereas *N*-methylindole shows toxic effect on both parameters. All the tested substances induce different types of chromosome aberrations in root meristem cells of *Allium cepa* and, except indole, stimulate the proliferative activity in them.

Paper received 9/XII/2004.

Paper accepted 9/XII/2004.

⁴Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. V.G. Podkovkin.

⁵Belousova Zoya Petrovna, Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶Selezneva Ekaterina Sergeevna, Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.