

Эколого-генетический анализ негативного воздействия сложных углеводов в модельных экспериментах

© 2011. Ю. Г. Шутова, ассистент,
Самарский государственный университет,
e-mail: shutova79@yandex.ru

Изучали мутагенную активность адамантана и семи его производных в модельных экспериментах на растениях (*Allium cepa*) и животных (*Drosophila melanogaster*). Показано, что все исследованные адамантаны оказывали митозмодифицирующее и мутагенное воздействие на *A. cepa*. В тестах на *D. melanogaster* проанализированные адамантаны приводили к снижению плодовитости и возникновению доминантных летальных мутаций у самок и самцов.

Mutagen activity of some adamantan derivatives in modeling experiments with plants *Allium cepa* and animals *Drosophila melanogaster* was studied. The results obtained show that all the investigated adamantans render a mitosis-modifying and mutagen influence on *A. cepa*. In tests on *D. melanogaster* adamantans lead to decrease in fruitfulness and occurrence of prepotent lethal mutations of male and female.

Ключевые слова: адамантаны, доминантные летальные мутации, мутагенность, *Allium cepa*, *Drosophila melanogaster*

Key words: adamantanes, prepotent lethal mutations, mutagen activity, *Allium cepa*, *Drosophila melanogaster*

Введение

Среди многих проблем, с которыми столкнулась современная экотоксикология, одной из самых острых является анализ воздействия на природные экосистемы антропогенных органических соединений, имеющих сложное строение и слабую растворимость в воде. Способны ли такие соединения, наряду с углеводами, хорошо растворимыми в воде, оказывать комплексные негативные воздействия, выражающиеся в индукции мутаций, снижении продолжительности жизни, выживаемости и плодовитости, оставалось до сих пор неизвестным. Для того чтобы иметь представление о возможностях поражающего действия таких соединений, необходимы модельные эксперименты с использованием хорошо изученных тест-объектов, представляющих разные трофические уровни в экосистемах. Продуцент *Allium cepa* хорошо изучен цитогенетически и широко используется для анализа загрязнителей различного типа [1, 2]. Консумент *Drosophila melanogaster* также является одним из наиболее изученных в генетическом отношении организмов и применяется для выяснения отдельных проблем генетического мониторинга [3, 4].

В качестве модельных токсикантов-мутagens были выбраны соединения, широко используемые в хозяйственной деятельности,

обладающие сложной структурой и высокой мембранотропностью, – адамантаны. Адамантан ($C_{10}H_{16}$) – представитель класса предельных каркасных углеводов, состоит из трёх циклогексановых колец. Перспективность применения производных адамантана обусловлена набором специфических свойств: большой размер адамантильного радикала, конформационная жёсткость, высокая липофильность, что свидетельствует о его высокой способности взаимодействовать с различными биологическими структурами и, в первую очередь, с биомембранами [5]. На основе адамантана выпускаются лекарственные препараты, используемые в медицине в качестве антивирусных, антибактериальных, ноотропных, нейролептических, противопаркинсонических, спазмолитических, противогрибковых, противорвотных, противоопухолевых средств [6, 7]. Единственным природным продуктом, содержащим адамантан и его гомологи, является нефть [5].

Целью данного исследования был анализ воздействия адамантанов различного строения на организмы, представляющие трофические уровни продуцентов и консументов.

Материалы и методы

В качестве модельных ксенобиотиков использовали адамантан и его производ-

дные: адамантан (I), аминоксантадантан (II), 6-[3-адамантиламино]-1,2,3,4-ди-О-изопропилиден- α -D-галактопираноза (III), 3-[3-адамантиламино]-1,2,5,6-ди-О-изопропилиден- α -D-ксилофураноза (IV), 3-(N-адамантиламино)-3-дезоксид-1,2,5,6-ди-О-изопропилиденаллофураноза (V), метиладамантан (VI), этиладамантан (VII), 2-дезоксид-2-амино-(N-адамантил)-глюкопираноза (VIII).

В проведённых ранее исследованиях мы обнаружили, что некоторые адамантаны в высокой концентрации были настолько токсичны, что ингибировали процессы пролиферативной активности клеток, что не позволяло выявить механизм токсического действия соединения. Поэтому в модельном эксперименте все адамантаны использовали в концентрации 0,005 мг/мл.

На стандартно приготовленных давленных препаратах корневой меристемы *A. cepa* исследовали цитотоксичность соединений по способности ингибировать процессы пролиферации, оцениваемой величиной митотического индекса и продолжительностью фаз митоза. С помощью метода ана-телофазного анализа [4] оценивали способность адамантанов индуцировать хромосомные аберрации. Анализировали 900 ана-телофаз для каждого варианта опыта.

Негативное воздействие на *D. melanogaster* оценивали по способности адамантанов ингибировать плодовитость и индуцировать доминантные летальные мутации у имаго разных полов по методу Белоконов [4].

Достоверность различий между параметрами оценивали с помощью полного двухфакторного дисперсионного анализа [8].

Результаты и их обсуждение

Проведённые эксперименты показали, что растворы адамантана и его исследованные производные даже в концентрации 0,005 мг/мл достоверно ($p < 0,01$) ингибируют деление клеток (табл. 1).

Мы выяснили, что все производные адамантана менее токсичны, чем он сам, за исключением соединения VIII. Способность ингибировать митотическую активность растёт в следующем ряду: V>III>IV>VII>II>VI>I>VIII.

Изменение митотического индекса связано в первую очередь с нарушением нормального прохождения митотического цикла. В процессе формирования митотического аппарата под воздействием ксенобиотиков могут возникать различные патологии, которые исправляются системой checkpoints [9]. Активация этой системы блокирует переход клеток из одной фазы митоза в другую, поэтому изменение продолжительности фаз митоза позволяет понять механизмы патологического действия ксенобиотиков.

Проведённый двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия ($p < 0,01$) между продолжительностью фаз митоза и строением веществ.

Все проанализированные нами адамантаны приводили к возникновению митотических блоков. Вещества II, V и VII вызывали задержку клеточного деления на стадии *профазы*. Данный вид нарушений относится к патологиям, связанным с повреждением хромосом и свидетельствует о нарушениях процессов их редупликации. Подобные изменения в делении клетки обычно наблюдаются при нарушении синтеза ДНК [10]. Вещества VI и III

Таблица 1

Влияние адамантанов на пролиферативную активность клеток корневой меристемы *Allium cepa*

Соединения	Митотический индекс*	Фаза митоза, на которой возникают митотические блоки	Количество хромосомных аберраций, %
Контроль	365±1,9	–	2,4±0,48
I	194±3,3	Телофаза	7,7±0,84
II	324±2,1	Профаза	7,6±0,83
III	355±1,9	Метафаза	9,3±0,92
IV	350±1,9	Анафаза	16,4±1,17
V	362±1,7	Профаза	18,9±1,24
VI	237±2,8	Метафаза	4,2±0,63
VII	328±2,1	Профаза	11,4±1,00
VIII	119±3,7	Телофаза	10,0±0,94

Примечание: «–» блоков не выявлено; * – количество делящихся клеток, приходящихся на каждые 1000 клеток ткани.

приводили к образованию блока на стадии *метафазы*, что является свидетельством повреждения митотического аппарата клетки – центриолей, веретена деления и кинетохоров. При действии высоких доз исследованных адамантанов подобные нарушения приводят либо к гибели клетки, либо к полиплоидизации клетки. Соединение IV – вызывает блок на стадии *анафазы*; адамантаны I и VIII – на стадии *телофазы*, что свидетельствует о нарушении цитотомии. Такое изменение митотической активности приводит к возникновению двухъядерных клеток или одноядерной полиплоидной клетки. Подобные нарушения ведут к изменениям кариотипа, являются причиной возникновения других патологий митотического процесса и могут стать началом цепной реакции, приводящей к ненормальному течению митоза в ряду следующих поколений клеток.

Мы выявили слабую положительную корреляцию ($r=0,5$) между степенью ингибирования пролиферативной активности и индукцией хромосомных aberrаций. При анализе способности соединений индуцировать хромосомные aberrации установлено, что максимальной мутагенностью обладает производное V, минимальной – VI. В целом можно отметить, что максимальную мутагенность проявляли гликозилированные адамантаны. Минимальную активность проявлял метилированный адамантан. Мутагенность адамантилсахаров (IV и V) объясняется высокой скоростью проникновения данных ксенобиотиков в клетки корневой меристемы лука, но, безусловно, огромную роль в развитии мутагенного ответа играет и топология молекулы.

Результаты анализа типов aberrаций, индуцируемых адамантаном и его производными, представлены в таблице 2.

Было обнаружено, что изучаемые адамантаны индуцируют все типы хромосомных aberrаций: хромосомные и хроматидные «мосты», хромосомные «разрывы», отставания хромосом.

Полученные в ходе проведенного эксперимента данные согласуются с результатами, полученными при анализе продолжительности фаз митоза. В корневой меристеме происходило нарушение формирования веретена деления и задержка цитотомии. Это является патологическим процессом. Задержка митоза в профазе свидетельствует о нарушениях процессов редупликации хромосом. Появление aberrаций типа «отставание» и «мост» является фактором, вызывающим удлинение или остановку клеточного деления на стадии анафазы и телофазы. Это указывает на способность адамантанов специфически поражать микротрубочки и актиновые филаменты клеток, а следовательно, и повреждать веретена деления. В ответ на ошибки в сборке веретена деления активируется checkpoint перехода метафаза–анафаза в анафазу [10]. Aberrации типа «мост» длительно сохраняются в ряду клеточных поколений и приводят не только к генотипической разнородности дочерних ядер, но и углубляют патологию митоза, нарушая течение завершающих стадий деления. Образование моста задерживает завершение цитотомии, а иногда может сохраняться и в интерфазе. Отставание хромосом может приводить к образованию микроядер. Мы предполагаем, что задержка клеток на стадии метафазы и цитотомии позволяет синтезировать недостающие вещества для нормального протекания митоза и не допустить потери клеткой части хромосомного материала в результате неправильного прохождения митоза. Такой механизм предохраняет делящиеся клетки от ле-

Таблица 2

Типы хромосомных aberrаций в корневой меристеме *Allium cepa*, в % от общего количества проанализированных клеток

Соединения	Типы хромосомных aberrаций			
	«отставания»	«разрывы»	«простые мосты»	«двойные мосты»
Контроль	1,76	0,9	0,3	0,03
I	5,8	1,71	0,23	0
II	2,7	2,43	2,43	0
III	1,3	7,19	0,52	0,33
IV	8,36	2,16	5,12	0,8
V	5,97	5,66	7,23	0
VI	2,09	1,26	0,84	0
VII	4,32	0,62	6,48	0
VIII	3,53	0	5,88	0,59

Таблица 3

Мутагенная активность адамантанов для самок и самцов дрозофилы

Соединения	Доминантные летальные мутации, %		Плодовитость, шт.	
	самки	самцы	самки	самцы
Контроль	2,5	2,2	442	455
I	4,3	3,7	303	542
II	29,73	24	88	97
III	5,14	4,31	136	326
IV	8,06	1,07	264	287
V	19,39	16,85	198	449
VI	33,27	29,44	388	400
VII	18,06	27,47	227	326
VIII	20,35	23,8	520	544

тального митоза, останавливая деление и давая время системе репарации для восстановления повреждений ДНК.

Таким образом, мы выявили, что адамантаны обладают генотоксическими свойствами.

Иерархическая структурно-функциональная организация живого предполагает многоуровневую систему ответных реакций тест-организмов на внешнее воздействие. При этом вещества, обнаружившие цитотоксическое действие *in vivo*, на организменном уровне, претерпевая ряд метаболических превращений, могут как нивелировать своё действие, так и усиливать. С целью исследования влияния адамантанов на организм в целом [3, 4] мы использовали в качестве тест-объекта *D. melanogaster*, которая обладает микросомальной системой, сходной с таковой в печени млекопитающих.

Мы проанализировали способность адамантанов индуцировать доминантные летальные мутации у самок и самцов дрозофилы. Поскольку доминантные летальные мутации не передаются следующим поколениям, по их уровню можно судить о количестве вновь возникающих мутаций, что, в свою очередь, может являться критерием оценки мутагенного действия того или иного соединения и генетическим показателем загрязнённости им среды. Результаты экспериментов суммированы в табл. 3.

Проведённые исследования показали, что все адамантаны индуцировали доминантные летали как у самцов, так и у самок дрозофилы. Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных не выявил полоспецифического мутагенного действия адамантанов, но выявил достоверные различия в действии веществ на использованные тест-объекты. Если минимальной мутагенностью для растений обладало производное VI, то для *D. melanogaster* это соединение обладало максимальной мутагенностью

В целом можно отметить, что аминоксидантан (II) и его алкильные производные (VI, VII) проявили наиболее сильную мутагенную активность.

Особый интерес представляют собой гликозилированные адамантаны (IV и V), являющиеся трансизомерами. Если вещество IV по мутагенности слабо отличалось от алкильных производных, то V обладало самой слабой мутагенной активностью. Анализируя мутагенность соединений и их способность влиять на плодовитость *D. melanogaster*, можно отметить, что все соединения достоверно различаются по влиянию на плодовитость ($p < 0,003$), кроме того, мы обнаружили, что прямое воздействие на самок растворами исследуемых соединений вызывает у них достоверно более сильное снижение плодовитости, чем при воздействии этих же соединений на самцов ($p < 0,02$). Таким образом, можно предположить, что адамантаны «вмешиваются» в различные процессы гаметогенеза у особей разных полов.

Проведённый модельный эксперимент показал, что адамантаны обладают способностью негативно воздействовать на представителей различных трофических блоков экосистем: продуцентов и консументов. Они индуцируют у них различного рода мутации, а также нарушают процессы гаметогенеза и пролиферации в соматических тканях. Использование тест-объектов позволило оценить потенциальную опасность многих генотоксикантов, и чем больше различных видов используется в «батареях» тестов, тем точнее можно оценить потенциальный негативный ответ. Многие авторы [11 – 14], использовавшие в своих исследованиях *A. cerea* и *D. melanogaster*, показали, что данные, полученные в модельных экспериментах, сопоставимы с результатами, наблюдаемыми в природных экосистемах.

Можно с уверенностью сказать, что адамантаны различного строения различаются по механизмам своего токсичного воздействия на высшие организмы. Даже микровоздействия соединениями адамантанов в условиях природных экосистем будут приводить как к прямому негативному ответу, выражающемуся в снижении выживаемости, о чём свидетельствует ингибирование пролиферативных процессов в клетках корневой меристемы *A. sepa*, и, следовательно, снижению тканевой репарации, так и к косвенному. Косвенный ответ выражается в снижении численности организмов, подвергнутых воздействию исследуемых веществ за счёт уменьшения их плодovitости, как это показано нами на примере *D. melanogaster*. Кроме того, все протестированные нами соединения влияют на генофонд популяции и, таким образом, приводят к росту генетического груза и снижению эволюционной пластичности видов.

Литература

1. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. 1985. V. 102. P. 99–112.
2. Гостимский С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике. М.: МГУ, 1974. 275 с.
3. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды № 51. Женева: ВОЗ, 1989. 212 с.
4. Белоконь Е.М. Методические указания к определению мутагенной активности химических препаратов на дрозофиле. Львов: ЛГУ, 1984. 260 с.
5. Багрий Е. И. Адамантаны. М.: Наука, 1989. 264 с.
6. Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. Фармакология адамантанов. Волгоград: Волгоградская мед. академия, 2001.
7. Козелецкая К.Н. Ремантадин как химиопрепарат для экстренной профилактики и лечения гриппа А // *Consilium medicum*. 2004. № 6. С. 35–39.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
9. Омелянчук Л.В., Трунова С.А., Лебедева Л.И. Федорова С.А., 2004. Основные события клеточного цикла, их регуляция и организация // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 3. С. 293–310.
10. Смирнова Е.А. Организация митотического веретена в клетках высших растений // *Физиология растений*. 1998. Т. 45. № 2. С. 198–207.
11. Дружинин В.Г. Хромосомные нарушения у населения крупного промышленного региона: странственно-временной цитогенетический мониторинг. Дисс. докт. биол. наук. М. 2003. 206 с.
12. Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды с использованием растительных тест-объектов. Дисс. канд. биол. наук. Воронеж. 2003. 245 с.
13. Буторина А.К., Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетические нарушения в соматических клетках человека и берёзы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения // *Экология*. 2002. № 6. С. 438–441.
14. Graf U., Van Schaik N., Wugler F.E. *Drosophila genetics. A practical course*. Berlin: Springer-Verlag, 2000. 240 p.