



Math-Net.Ru

All Russian mathematical portal

E. S. Selezneva, E. I. Ten'gaev, Peculiarities of *Drosophila melanogaster* adaptive reaction to a benzazolidine genotoxicity of various molecular structure, *Vestnik Samarskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Estestvenno-Nauchnaya Seriya*, 2010, Issue 4, 200–207

Use of the all-Russian mathematical portal Math-Net.Ru implies that you have read and agreed to these terms of use

<http://www.mathnet.ru/eng/agreement>

Download details:

IP: 18.119.162.17

November 15, 2024, 01:00:47



ОСОБЕННОСТИ АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* К ГЕНОТОКСИЧНОСТИ БЕНЗАЗОЛИДОВ РАЗЛИЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ

© 2010 Е.С. Селезнева, Е.И. Теньгаев¹

Обнаружили, что бензимидазол и его производные достоверно различаются по способности индуцировать доминантные летальные мутации у *Drosophila melanogaster* как в полuletальной, так и в нетоксичной дозах. Самцы дрозофилы более чувствительны к мутагенному действию бензимидазолов, чем самки. Мутагенность отрицательно коррелировала с величинами молекулярной массы и молекулярного объема и положительно — с величиной энергии гидратации.

Кратковременное и долговременное воздействие нетоксичной дозой анализируемых веществ создавало преадаптацию к последующему генотоксическому действию соединений в дозе LD₅₀. Выявили возможность преадаптации нетоксичной дозой бензимидазола к генотоксичности его производных.

Ключевые слова: доминантные летальные мутации, *Drosophila melanogaster*, производные бензимидазола, адаптации.

Введение

Адаптивные проявления на фенотипическом уровне являются отражением событий, происходящих на генотипическом уровне: изменение генной экспрессии, появление мутаций. Сами мутации могут быть различными, однако появление рецессивных и доминантных летальных мутаций является характеристикой действующего ксенобиотика.

Воздействие ксенобиотиков в течение длительного времени может привести к появлению резистентности к ним. Резистентные к ксенобиотикам организмы возникают либо в результате появления мутаций устойчивости к данному виду химических веществ, либо в результате селекции по генам резистентности. Конкретные механизмы резистентности могут быть самыми различными, но особый интерес вызывает факт, что к одним соединениям возникает устойчивость в течение одного–двух поколений, а к их аналогам никогда. Именно поэтому в последние годы ведутся интенсивные исследования, посвященные вопросам выяснения механизмов резистентности.

¹Селезнева Екатерина Сергеевна (catana7@yandex.ru), Теньгаев Евгений Иванович (tenev@ssu.samara.ru), кафедра зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Бензазолы широко распространены как природные соединения с высокой биологической активностью [9], они также широко используются в качестве лекарственных препаратов [7] и пестицидов [3, 8, 12].

Многие бензимидазолы обладают мутагенной активностью [10], следовательно, представляют собой опасность для природных экосистем. В последние годы появились сведения о возникновении резистентности к действию пестицидов, производных бензимидазола [2, 13]: это активировало исследователей по поиску связей между строением соединений и способностью организмов адаптироваться к негативному воздействию.

Целью данного исследования явился анализ генотоксичности бензимидазолов и способности *Drosophila melanogaster* адаптироваться к ним.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили 7–10-дневные имаго *Drosophila melanogaster* дикой линии Canton-S.

В двух дозах — LD₅₀ и нетоксичной дозе для всех исследуемых веществ (0,001 мг/мл) исследовали мутагенность бензимидазола и его производных. В табл. 1 приведены дозы LD₅₀, условные обозначения и названия исследуемых веществ.

Таблица 1
Концентрации бензимидазолов (в мг/мл), вызывающих 50 % гибель в течение суток имаго *Drosophila melanogaster*

Названия соединений	Условные обозначения соединений	Доза LD ₅₀	
		самки	самцы
Бензимидазол	1	14,5±0,1	13,3±0,1
N-метилбензимидазол	2	24,1±0,3	18,4±0,3
2-метилбензимидазол	3	26,2±0,1	22,1±0,1
N- бензимидазолид метансульфокислоты	4	10,9±0,4	8,1±0,2
N- бензимидазолид бензолсульфокислоты	5	8,3±0,2	7,1±0,2
N- бензимидазолид толуолсульфокислоты	6	6,1±0,1	7,5±0,1
N-бензилбензимидазол	7	19,1±0,3	14,0±0,3
2-бензилбензимидазол	8	33,4±0,4	29,2±0,12
5,6-диметилбензимидазол	9	20,0±0,1	19,0±0,1
N-5,6-диметилбензимидазолид метансульфокислоты	10	25,3±0,3	22,1±0,3

Было проведено несколько серий экспериментов.

1 серия. Анализ способности бензимидазолов в нетоксичной (0,001 мг/мл) и полуметальной дозе (LD₅₀) индуцировать доминантные летальные мутации у имаго дрозофилы по методу предложенному Е.М. Белоконов [1].

Мутагенность анализировали отдельно для самок и самцов.

*2 серия. Исследование способности бензимидазолов в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у имаго *Drosophila melanogaster* к последующему генотоксичному действию этими же соединениями в дозе LD₅₀. Преадаптация 1 типа (кратковременная).*

Девственные имаго самки и самцы раздельно по 900 штук содержались в популяционных ящиках, в которые помещались чашки Петри с нанесенными растворами бензимидазолов в концентрации 0,001 мг/мл. Через сутки чашки удалялись, и на их место помещались новые с растворами исследуемых соединений в дозе LD₅₀, и воздействие продолжалось еще сутки. Затем чашки из популяционных ящиков удалялись, а имаго скрещивались с интактными особями противоположного пола по 500 интактных самцов к самкам и 500 интактных девственных самок к самцам. В течение следующих 12 часов производили сбор яиц на чашки Петри с кормом для анализа индуцированных доминантных леталей.

*3 серия. Анализ способности бензимидазолов в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у личинок *Drosophila melanogaster* к последующему генотоксичному действию исследуемых бензимидазолов в дозе LD₅₀. Преадаптация 2 типа (долговременная).*

Девственных самок и самцов имаго, личиночный период жизни которых, начиная с вылупления из яйца, прошел на среде, содержащей бензимидазолы в концентрации 0,001 мг/мл, подвергали воздействию этими же бензимидазолами в дозе LD₅₀, затем анализировали число индуцированных доминантных летальных мутаций (ДЛМ).

*4 серия. Исследование способности бензимидазола в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у имаго *Drosophila melanogaster* к последующему генотоксичному действию исследуемыми соединениями в дозе LD₅₀. Преадаптация 3 типа.*

Девственных имаго разного пола первоначально подвергали воздействию бензимидазолом в дозе 0,001 мг/мл, а затем исследуемыми бензимидазолами в дозе LD₅₀, потом анализировали число индуцированных доминантных леталей

*5 серия. Исследование способности бензимидазола в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у личинок *Drosophila melanogaster* к последующему генотоксичному действию исследуемых бензимидазолов в дозе LD₅₀. Преадаптация 4 типа.*

Девственных самок и самцов имаго, личиночный период жизни которых, начиная с вылупления из яйца, прошел на среде, содержащей бензимидазол в концентрации 0,001 мг/мл, подвергали воздействию исследуемыми же бензимидазолами в дозе LD₅₀, затем анализировали число индуцированных ДЛМ.

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Оценка связи между генотоксичностью соединений, их способность развивать у *Drosophila melanogaster* преадаптацию и физико-химическими параметрами исследуемых бензимидазолов проводилась с помощью корреляционного анализа [4].

Результаты и их обсуждение

Ранее проведенные, а также повторные исследования показали, что все представленные вещества индуцируют доминантные летальные мутации у самок и самцов *Drosophila melanogaster* (табл. 2).

Таблица 2
Количество ДЛМ, индуцированных бензимидазолидами у имаго
Drosophila melanogaster

Вещества	ДЛМ в % (доза LD ₅₀)		ДЛМ в % (нетоксичная доза)	
	у самок	у самцов	у самок	у самцов
1	9,7±1,0	10,6±1,0	2,6±0,5	3,8±0,6
2	18,7±1,3	24,2±1,4	7,2±0,9	8,7±0,9
3	22,6±1,4	28,9±1,5	8,2±0,9	14,6±1,2
4	12,5±1,1	18,2±1,3	3,4±0,6	5,7±0,8
5	9,1±1,0	9,9±1,0	1,4±0,4	2,4±0,5
6	11,1±1,0	13,2±1,1	1,6±0,4	2,8±0,5
7	7,5±0,9	9,7±1,0	2,2±0,5	2,9±0,6
8	5,1±0,7	6,0±0,8	1,6±0,4	1,8±0,4
9	18,8±1,3	22,1±1,4	2,8±0,5	3,3±0,6
10	18,9±1,3	19,3±1,3	3,1±0,6	3,9±0,6
Контроль	0,22±0,16	0,34±0,19	0,21±0,16	0,31±0,19

Все соединения достоверно различались по мутагенности, самцы более чувствительны к мутагенному действию, чем самки *Drosophila melanogaster* ($p < 0,001$).

Соединения в нетоксичной дозе индуцируют достоверно меньше мутаций у особей обоих полов, чем в дозе LD₅₀ ($p < 0,001$).

Метильные и сульфурильные производные бензимидазола более мутагенны, бензильные — менее мутагенны, чем бензимидазол, однако в нетоксичной дозе различия в мутагенности выражены слабее.

Обнаруженная связь между мутагенной активностью соединения и наличием в бензимидазолиде метильной и сульфурильной группы совпадает с полученными нами ранее результатами по анализу цитогенетической активности бензимидазолов при действии ими на лимфоциты периферической крови человека [10]. Однако в данном исследовании зависимости мутагенности от количества метильных групп мы не обнаружили. Мутационный процесс, индуцированный химическими мутагенами, зависит от особенностей метаболизма тест-объекта. Именно поэтому чрезвычайно важно строение вещества, которое позволяет эффективно взаимодействовать с молекулами мишенями. Возможно, анализируемые нами соединения подвергались метаболической трансформации в пищеварительных путях самок и самцов, что изменяет "картину", наблюдаемую при прямом действии этих соединений на лимфоциты человека.

Обнаруженная нами зависимость мутагенности от строения соединения совпадает с результатами других исследователей, работавших с другими веществами [5, 6, 11].

Известно, что существует возможность активации репаративных систем предварительным воздействием нетоксичной дозой яда.

Мы проанализировали способность нетоксичных доз исследуемых веществ развигать преадаптацию к действию соединениями в дозе LD₅₀. Результаты проведенных экспериментов суммированы в табл. 3.

Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что после кратковременной преадаптации нетоксичной дозой исследуемых бензимидазолов разница в чувствительности к мутагенному действию соединений у имаго разных полов сохранилась ($p < 0,05$). Можно предположить, что механизмы воз-

действия на системы резистентности различны, так как сохраняются достоверные различия в числе индуцированных доминантных летелей разными бензимидазолидами ($p < 0,02$).

Таблица 3
Число доминантных летелей в % индуцированных бензимидазолидами в дозе LD₅₀ после преадаптации различного типа нетоксичной дозой исследуемых веществ

Исследуемое соединение	Преадаптация 1 типа, кратковременная преадаптация 0,001 мг/мл + LD ₅₀		Преадаптация 2 типа, долговременная преадаптация 0,001 мг/мл + LD ₅₀	
	самки	самцы	самки	самцы
1	2,7±0,5	3,2 ±0,6	6,6±0,8	8,7±0,9
2	6,9±0,8	10,3±1,0	8,68±0,9	7,93±0,9
3	7,5±0,9	9,9±1,0	6,4±0,8	11,1±1,0
4	8,2±0,9	6,5±0,8	6,4±0,8	9,9±1,0
5	5,2±0,7	6,1±0,8	1,6±0,4	2,8±0,5
6	5,8±0,8	6,4±0,8	3,2±0,6	4,6±0,7
7	2,6±0,5	3,4±0,6	1,9±0,5	2,8±0,5
8	2,0±0,5	2,3±0,5	1,2±0,4	1,6±0,4
9	7,9±0,9	16,3±1,2	7,8±0,9	8,3±0,9
10	9,1 ±0,96	18,1±1,3	6,9±0,8	7,2±0,9

После кратковременного воздействия нетоксичной дозой и последующим воздействием дозой LD₅₀ число доминантных летелей достоверно уменьшалось у имаго обоих полов по сравнению с прямым действием дозой LD₅₀ ($p < 0,01$). Необходимо отметить, что число индуцированных ДЛМ после преадаптации достоверно отличалось от числа ДЛМ, индуцированных нетоксичной дозой ($p < 0,01$) у самок, и не отличалось от таковой у самцов.

Число доминантных летелей индуцированных дозой LD₅₀ после долговременной преадаптации и числом ДЛМ достоверно уменьшилось ($p < 0,001$) у имаго обоих полов по сравнению с числом ДЛМ индуцированных прямым действием бензимидазолидов в дозе LD₅₀. Таким образом можно утверждать, что предварительное воздействие нетоксичной дозой исследуемыми соединениями вызывает развитие состояния преадаптированности к генотоксичности этих веществ.

Чтобы понять, что в строении бензимидазолидов влияет на активацию репаративных процессов при преадаптации, мы провели еще одну серию экспериментов (табл. 4).

Как показали проведенные эксперименты, кратковременная преадаптация нетоксичной дозой бензимидазола имаго дрозофилы к последующему воздействию бензимидазолидами в дозе LD₅₀ достоверно уменьшила количество индуцированных ДЛМ по сравнению с прямым действием этих соединений в дозе LD₅₀ ($p < 0,01$). Число ДЛМ после преадаптации бензимидазолом было достоверно выше, чем при прямом воздействии этими веществами в нетоксичной дозе ($p < 0,01$).

Количество индуцированных ДЛМ дозой LD₅₀ после преадаптации 3 типа у особей разных полов достоверно различалось ($p < 0,01$).

Долговременная преадаптация личинок нетоксичной дозой бензимидазола показала, что последующее воздействие на имаго бензимидазолидами в дозе LD₅₀ индуцирует достоверно различное число ДЛМ у имаго разных полов ($p < 0,001$).

Количество индуцированных ДЛМ при этом достоверно выше, чем число ДЛМ, индуцированных прямым действием нетоксичной дозой бензимидазолов, однако достоверно меньше, чем при прямом действии этими соединениями в дозе LD₅₀ ($p < 0,001$).

Мы сравнили эффективность кратковременной преадаптации бензимидазолидами с такой же, создаваемой бензимидазолом, а также долговременной преадаптацией веществ самих к себе с таковой, создаваемой бензимидазолом, и обнаружили, что преадаптация, создаваемая бензимидазолом, менее эффективна ($p < 0,01$), при этом различия в количестве индуцированных ДЛМ бензимидазолидами при всех типах преадаптации достоверны ($p < 0,01$). Это обстоятельство позволяет предположить, что преадаптация создается не только селекцией особей к генотоксичности веществ (долговременная преадаптация), но и активацией различных репаративных систем.

Таблица 4

Число доминантных леталей в % индуцированных бензимидазолидами в дозе LD₅₀ после преадаптации различного типа нетоксичной дозой бензимидазола (1)

Исследуемое соединение	Преадаптация 3 типа, кратковременная преадаптация 0,001 мг/мл (1) + LD ₅₀ бензимидазолиды		Преадаптация 4 типа, долговременная преадаптация 0,001 мг/мл(1) + LD ₅₀ бензимидазолиды	
	самки	самцы	самки	самцы
1	2,7±0,5	3,2±0,6	6,6±0,8	8,7±0,9
2	6,9±0,8	10,9±1,0	7,6±0,9	8,8±0,9
3	7,8±0,9	11,9±1,1	7,9±0,9	8,9±0,9
4	6,9±0,8	8,9±0,9	7,2±0,9	9,9±1,0
5	7,1±0,9	9,1±1,0	6,7±0,8	8,8±0,9
6	7,5±0,9	9,9±1,0	3,9±0,6	6,7±0,8
7	7,9±0,9	4,5±0,7	2,4±0,5	4,9±0,4
8	2,8±0,5	3,9±0,6	2,3±0,5	3,1±0,6
9	8,1±0,9	16,3±1,2	7,1±0,9	8,7±0,9
10	9,2±1,0	18,0±1,3	7,2±0,9	7,8±0,9

Возможно, различия связаны с механизмами, определяющими скорость поступления веществ к мишеням. По-видимому, анализируемые бензимидазолиды проникают в клетки, используя различные рецепторы, например имидазолиновые [14] или другие, которые существуют в силу того, что известны многие природные высокоактивные производные бензимидазола — пурины, витамины, гормоны, поступающие экзогенно, поэтому в процессе эволюции возникли многочисленные шунты, способные уменьшить негативное воздействие экзогенных бензимидазолидов.

Мы проанализировали, какие из физико-химических параметров являются определяющими в развитии генотоксичности и резистентности к генотоксичности исследуемых бензимидазолидов.

Для данной группы соединений способность в нетоксичной дозе индуцировать ДЛМ высоко отрицательно коррелировала с величинами молекулярной массы и молекулярного объема ($r = -0,7$), в дозе LD₅₀ — отрицательно коррелировала с величиной молекулярной массы ($r = -0,6$) и положительно коррелировала с величиной энергии гидратации ($r = 0,7$).

Способность соединений вызывать адаптивный ответ при кратковременной преадаптации коррелировала с теми же физико-химическими параметрами, с которыми коррелировал мутагенный ответ. Способность развивать резистентность при долговременной преадаптации положительно коррелировала только с величиной энергии гидратации ($r = 0,7$).

Таким образом, можно утверждать, что механизмы адаптации к ксенобиотикам в личиночный период жизни отличаются от таковых на имагинальной стадии, в развитии адаптивного ответа огромная роль принадлежит способности специальных шунтов отличать ксенобиотик от их природных аналогов, используемых дрозофилой в собственном метаболизме.

Отсутствие значительной корреляции между числом индуцированных доминантных леталей, возникающих после действия бензимидазолидами на имаго дрозофилы, и величиной липофильности, показывающей способность веществ растворяться в мембранах и таким образом проникать внутрь клеток, косвенно подтверждает наличие на поверхности клеток-мишеней рецепторов, отсутствие корреляций с величиной дипольного момента говорит о большом полиморфизме как рецепторных систем, так и систем резистентности.

Подводя итог проведенным экспериментам, можно отметить, что длительное воздействие бензимидазолом и его производными способно развить адаптивный ответ к их генотоксичности. Степень и скорость развития адаптивного ответа определяются строением вещества и его способностью взаимодействовать с мембранными рецепторами клеток мишеней, о чем говорит корреляция с некоторыми физико-химическими параметрами, влияющими на проникновение веществ в клетки.

Литература

- [1] Белоконь Е.М. Методические указания к определению мутационной активности химических препаратов на дрозофиле. Львов: Изд-во Львовского гос. ун-та, 1984. 26 с.
- [2] Жуковский А.Г., Буга С.Ф. Чувствительность популяций гриба *F. nivale*, паразитирующего на озимой тритикале к фундазолу // Защита растений: сб. научн. тр. Минск, 2003. Вып. 27. С. 84–89.
- [3] Кадыров Г.Ш. Химия и пестицидная активность бензимидазолидов // Регуляторы роста растений и гербициды. Ташкент: ФАН, 1978. С. 65–123.
- [4] Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- [5] Любимова И.К., Абилов С.К., Мигачев Г.И. Влияние некоторых структурных особенностей в молекулах производных пирена и его гетероциклических аналогов на мутагенную активность // Генетика. 1995. Т. 31. № 1. С. 128–132.
- [6] Любимова И.К., Абилов С.К., Мигачев Г.И. Взаимосвязь между мутагенной активностью и химической структурой в ряду производных бифенила // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 268–272.
- [7] Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. М.: Медицина, 1993. Т. 2. 736 с.
- [8] Мельников И.Н. Пестициды, химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. 721 с.
- [9] Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
- [10] Селезнева Е.С. Изменение цитогенетической активности гетероциклических азолов при введении в их строение метильных групп // Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики. Сер.: Актуальные проблемы

- экологии и охраны окружающей среды: материалы 5 юбилейной междунар. конф. Тольятти: Изд-во "Татищевский университет", 2008. С. 21–217.
- [11] Синтез и исследование мутагенной активности ди(индено/2,1-б/индолил)-, ди(индено/2,1-б/пироллил)метанов и диметилсиланов / И.Э. Нифантьев [и др.] // Известия РАН. Сер.: Химическая. 2001. № 5. С. 1369–1375.
- [12] Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола / А.А. Спасов [и др.] // Химико-фармацевтический журн. 1999. № 5. С. 6–17.
- [13] Analysis of variation within *Microdochium nivale* from wheat: evidence for a distinct sub-group / A.K. Lees [et al.] // Mycol. Res. 1995. V. 99. P. 103–109.
- [14] П-imidazoline receptors. Definition, characterisation, distribution and transmembrane signalling / P. Ernsberger [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1995. Jul 12. V. 763. P. 22–42.

Поступила в редакцию 20/IV/2010;
в окончательном варианте — 20/IV/2010.

**PECULIARITIES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*
ADAPTIVE REACTION TO A BENZAZOLIDE
GENOTOXICITY OF VARIOUS MOLECULAR
STRUCTURE**

© 2010 E.S. Selezneva, E.I. Tengaev²

It was found out that benzimidazole and its derivatives authentically differ in their ability to induce dominant lethal mutations at *Drosophila melanogaster* both in semilethal, and in nontoxic doses as well. *Drosophila* fly males are more sensitive to a mutagen benzimidazole action, than females. Mutagenicity correlated negatively with values of the molecular weight and molecular volume, and positively - with value of the hydration energy. Short-term and long-term influence by a nontoxic dose of substances are analyzed, a preadaptation to the subsequent genotoxic action of substances in dose LD50 is created. A preadaptation possibility by a benzimidazole nontoxic dose to its derivatives genotoxicity have been revealed.

Key words: dominant lethal mutations, *Drosophila melanogaster*, benzimidazole derivatives, adaptations.

Paper received 20/IV/2010.
Paper accepted 20/IV/2010.

²Selezneva Ekaterina Sergeevna (catana7@yandex.ru), Tengaev Yevgeniy Ivanovich (tenev@ssu.samara.ru), Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.