

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИМИДАЗОЛИДОВ, ИХ МУТАГЕННОСТЬ, И СПОСОБНОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER* АДАПТИРОВАТЬСЯ К НИМ

© 2009 Е.С. Селезнева, Е.И. Теньгаев, А.В. Шпилько

Самарский государственный университет, г Самара

Поступила 27.03.2009

Показали, что имидазол и его метильные и сульфурильные производные различаются по способности индуцировать доминантные летальные мутации у имаго *Drosophila melanogaster* как в нетоксичной, так и полулетальной дозах. Мутагенность соединения отрицательно коррелировала с молекулярной массой, молекулярным объемом и величиной суммарного дипольного момента исследуемых соединений. Кратковременное воздействие нетоксичной дозой имидазолидов на имаго не способно развить у *Drosophila melanogaster* адаптаций, снижающих мутагенность соединений. Долговременное воздействие нетоксичной дозой (личиночный период жизни) вызывает у имаго развитие адаптивного ответа, выражающегося в достоверном уменьшении числа доминантных леталей индуцированных полулетальной дозой этих соединений, по сравнению с числом мутаций индуцированных прямым действием соединений. Предварительное воздействие имидазолом в нетоксичной дозе ни кратковременное, ни долговременное не вызывает у *Drosophila melanogaster* адаптивного ответа к воздействию имидазолидами в полулетальной дозе. Обсуждается роль физико-химических параметров имидазолидов в развитии адаптивного ответа.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, адаптации, преадаптации, имидазолиды, доминантные летальные мутации, корреляция, физико-химические параметры веществ

Обилие и разнообразие большого числа пестицидов привело к тому, что они стали важнейшим компонентом среды обитания. Не смотря на попытки создания пестицидов с избирательной токсичностью, все исследования показали, что они действуют на все компоненты биоты экосистем. В результате этого многие виды погибают, а у некоторых возникает устойчивость. Развитие устойчивости не обязательно ведет к увеличению общей приспособленности. Так в популяциях *Blattella germanica*, подвергнутых периодическому воздействию пиретроидов обнаружена кариотипическая нестабильность [12].

Применение одних и тех же пестицидов приводит к селекции по генам устойчивости к данному ксенобиотику, что побуждает искать новые эффективные пестициды.

Особый интерес представляют собой вещества, которые являются аналогами природных биологически активных веществ, так как они выступают как их конкуренты. К таким соединениям относятся различные производные имидазола.

Биологическая активность производных имидазола чрезвычайно высока. Наиболее распространенным производным имидазола является гистидин, и гистамин; аденин и гуанин состоят из двух конденсированных колец пиримидина и имидазола; имидазольное кольцо входит в состав витамина B<sub>12</sub> [8]. Выявленные в мускулатуре позвоночных животных эрготонин и карнозин и другие соединения имидазола участвуют в восстановлении активности многих ферментов [9].

Возможно, поэтому многие синтетические биологически активные соединения являются имидазолидами [1, 6, 7].

Целью данного исследования явился анализ генотоксичности некоторых производных имидазола и поиск корреляций между их биологической активностью и физико-химическими параметрами, а так же выяснения роли физико-химических параметров в развитии адаптивного ответа. Это позволит в дальнейшем синтезировать высокоэффективные пестициды с избирательной токсичностью.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В табл. 1 приведены физико-химические параметры и названия исследуемых имидазолидов и их краткое обозначение.

Для анализа генотоксичности имидазолидов использовали водные растворы в двух дозах: нетоксичной - это концентрация не вызывающая гемолиз эритроцитов человека (0,001 мг/мл) и LD50 (концентрации представлены в табл.2).

Генотоксичность оценивали по способности индуцировать доминантные летальные мутации. Учет доминантных летальных мутаций у имаго *Drosophila melanogaster* проводили по методу Белоконов (1984).

Объектом исследования служили имаго дикой линии Canton-S.

Девственные самки и самцы содержались на стандартном корме, состоящем из 60 г дрожжей, 60 г бананов, 20 г изюма, 60 г манной крупы, 60 г сахара, 8 г агар-агара, 3 мл уксусной кислоты на 1 л воды.

Было проведено несколько серий эксперимента.

*1 Серия. Анализ способности имидазолидов индуцировать доминантные летальные мутации.*

Для анализа способности соединения индуцировать доминантные летали, соединения использовали в двух концентрациях - 0,001 мг/мл и доза LD50, растворителем служила кипяченая вода.

Для анализа мутагенности соединения для самцов, их в течение 24 часов содержали в популяционных

---

Селезнева Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии, генетики и общей экологии. E-mail: catana7@yandex.ru. Теньгаев Евгений Иванович, кандидат биологических наук, доцент той же кафедры. Шпилько Александр Владимирович, студент.

ящиках, куда были внесены чашки Петри с исследуемым соединением. Затем 900 самцов скрещивали с 600 интактными девственными самками.

Для анализа способности соединения индуцировать доминантные летали у самок их подвергали тем же воздействиям, что и самцов, затем 900 девственных, обработанных исследуемым имидазолом, са-

мок скрещивали с девственными интактными самцами (600 самцов).

После скрещивания, в течение 12 часов через каждые 2 часа в популяционные ящики, где происходило скрещивание, вносили чашки Петри с кормом для сбора кладки яиц.

**Таблица 1.** Физико-химические параметры исследуемых соединений

Название соединения	Молекулярная масса (г/моль)	Молекулярный объем (Å <sup>3</sup> )	Энергия гидратации (ккал/моль)	LogP	Суммарный дипольный момент (дебай)
Имидазол (Im)	68.08	274.26	-8.5	-0.97	3.599
N-метилимидазол (NmeIm)	82.11	330.93	-3.89	-0.73	3.927
2-метилимидазол (CmeIm)	82.11	330.01	-6.4	-0.94	3.699
N-имидазолид-метансульфокислоты (ImSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	146.16	419.83	-6.55	-1.53	3.53
N-имидазолид-бензолсульфокислоты (ImSO <sub>2</sub> Phe)	208.23	575.41	-7.49	-1.04	5.1
N-имидазолид-тозилсульфокислоты (ImSO <sub>2</sub> Tol)	222.26	629.06	-6.28	-0.88	5.62

**Таблица 2.** Концентрация водных растворов (в мг/мл) имидазолоидов вызывающих в течение суток 50% гибель имаго *Drosophila melanogaster*

Название соединения	Самки	Самцы
Im	5,0	3,2
NmeIm	6,1	7,2
CmeIm	50,0	47,0
ImSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	27,0	16,0
ImSO <sub>2</sub> Phe	24,0	37,6
ImSO <sub>2</sub> Tol	10,4	16,7

После первичного подсчета яиц (под биноклярной лупой МБС-9), чашки помещали в термостат при +22°C на 30 часов для развития яиц. После этого подсчет проводился вторично с учетом развившихся яиц. Подсчет ДЛМ ведется по формуле:

$$\% \text{ ДЛМ} = \frac{A - B}{A} * 100\% ,$$

где А- общее количество яиц за сутки, В- количество личинок через сутки и плюс неоплодотворенные яйца.

*2 Серия. Исследование способности имидазолоидов в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у имаго Drosophila melanogaster к последующему генотоксичному действию этими же соединениями в дозе LD<sub>50</sub>. Преадаптация 1 типа (кратковременная).*

Экспериментальные имаго самки и самцы раздельно по 900 штук содержались в популяционных ящиках, в которые помещались чашки Петри с нанесёнными растворами имидазолоидов в концентрации 0,001 мг/мл. Через сутки чашки удалялись, и на их место помещались новые с растворами исследуемых соединений в дозе LD<sub>50</sub>, и воздействие продолжалось ещё сутки. Затем, чашки из популяционных ящиков удалялись, а имаго скрещивались с интактными особями противоположного пола, и производился анализ индуцированных доминантных леталей как описано в 1 серии.

*3 Серия. Исследование способности имидазолоидов в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у личинок Drosophila melanogaster к последующему генотоксичному действию исследуемых имидазолоидов в дозе LD<sub>50</sub>. Преадаптация 2 типа (долговременная)*

Личинок *Drosophila melanogaster*, синхронизированных по вылуплению из яйца, рассаживали в сахарные стаканчики, в которых корм содержал имидазолы в концентрации 0,001 мг/мл. Таким образом, личинки проводили весь личиночный период жизни и стадию куколки на этой среде. Далее отбирали девственных самцов и самок, на которых воздействовали исследуемыми имидазолами в дозе LD<sub>50</sub> по схеме эксперимента для анализа прямого мутагенного действия.

*4 Серия. Исследование способности имидазола в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у имаго Drosophila melanogaster к последующему генотоксичному действию исследуемых имидазолами в дозе LD<sub>50</sub>. Преадаптация 3 (кратковременная).*

Экспериментальные имаго самки и самцы раздельно по 900 штук содержались в популяционных ящиках, в которые помещались чашки Петри с нанесёнными растворами имидазола в концентрации 0,001 мг/мл. Через сутки чашки удалялись, и на их место помещались новые с растворами исследуемых соединений в дозе LD<sub>50</sub>, и воздействие продолжалось ещё сутки. Затем, чашки из популяционных ящиков удалялись, а имаго скрещивались с интактными особями противоположного пола, и анализировали число доминантных леталей, как это делалось в серии 1.

*5 Серия. Исследование способности имидазола в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у личинок Drosophila melanogaster к последующему генотоксичному действию исследуемыми имидазолами в дозе LD<sub>50</sub>. Преадаптация 4 типа (долговременная).*

Личинок *Drosophila melanogaster*, синхронизированных по вылуплению из яйца, рассаживали в сахарные стаканчики, в которых корм содержал имидазол в концентрации 0,001 мг/мл. Таким образом, личинки проводили весь личиночный период жизни и стадию куколки на этой среде. Далее отбирали виргильных самцов и самок, на которых воздействовали исследуемыми имидазолидами в дозе LD<sub>50</sub> по схеме эксперимента для анализа прямого мутагенного действия и оценивали число доминантных леталей.

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Оценка связи между генотоксично-

стью соединений и физико-химическими параметрами исследуемых имидазолидов проводилась с помощью корреляционного анализа (Лакин, 1990)

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 3 представлены результаты прямого действия исследуемых соединений на имаго дрозофилы. Как видно из представленных экспериментов все анализируемые производные имидазола и сам имидазол и в нетоксичной дозе, и в дозе LD<sub>50</sub> индуцируют доминантные летальные мутации как у самок, так и самцов *Drosophila melanogaster*.

**Таблица 3.** Способность имидазолидов индуцировать доминантные летальные мутации у имаго *Drosophila melanogaster*

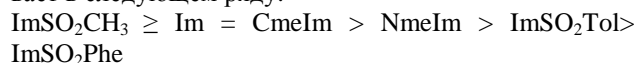
Название соединений	Доминантные летали в % индуцированные у			
	самок		самцов	
	0,001мг/мл	LD <sub>50</sub>	0,001мг/мл	LD <sub>50</sub>
Im	18,3±0,2	21,8±0,2	16,0±0,1	19,6±0,1
NmeIm	16,8±0,2	18,3±0,2	12,8±0,3	13,4±0,3
CmeIm	18,8±0,1	21,1±0,1	15,8±0,1	20,2±0,1
ImSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	26,9±0,3	24,1±0,3	16,0±0,4	19,8±0,4
ImSO <sub>2</sub> Phe	6,0±0,1	8,36±0,1	5,1±0,3	7,4±0,3
ImSO <sub>2</sub> Tol	9,0±0,2	10,46±0,2	5,8±0,2	6,74±0,2

**Таблица 4.** Величины коэффициентов корреляций между исследуемыми параметрами

Физико-химические параметры	Индукцированные доминантные летали в % у самок		Индукцированные доминантные летали в % у самцов	
	0,001мг/мл	LD <sub>50</sub>	0,001мг/мл	LD <sub>50</sub>
	Молекулярная масса	-0,61	-0,79	-0,86*
Молекулярный объем	-0,68*	-0,84*	-0,90*	-0,85*
Суммарный дипольный момент	-0,88*	-0,95*	-0,97*	-0,92*

Примечание: звездочкой отмечены коэффициенты корреляции значимые для  $p < 0,05$ .

Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что все соединения достоверно для  $p < 0,05$  различаются по мутагенности, и в нетоксичной дозе и полулетальной дозе соединения достоверно больше индуцируют мутации у самок, чем у самцов. Кроме того анализ показал, что в полулетальной дозе имидазол и его производные достоверно больше индуцируют доминантных леталей, чем в нетоксичной дозе ( $p < 0,05$ ). Мутагенная активность убывает в следующем ряду:



Мы провели корреляционный анализ между физико-химическими свойствами исследуемых веществ и их мутагенность. Результаты корреляционного анализа суммированы в таблице 4.

Проведенные исследования показали, не зависимо от дозы способность индуцировать доминантные летали у имаго дрозофилы высоко отрицательно коррелировала с величинами молекулярного объема и суммарного дипольного момента, и не коррелировала с лиофильностью и величиной энергии гидратации. По нашему мнению это является показателем того, что данные соединения попадают в клетки мишени, используя специальные рецепторы, а не с помощью диффузии через мембраны, что согласуется с данными ряда авторов о наличии у многих клеток имидазолиновых рецепторов [10, 11].

Важность данных физико-химических параметров для развития мутагенного ответа были получены и для других классов органических веществ [1, 4].

Анализируя возможность развития адаптивного ответа к мутагенному действию исследуемых соединений, мы провели две серии экспериментов. В одной серии (см. Материалы и методы *Серия 2. Преадаптация 1*) создавалась кратковременным (в течение суток) воздействием на имаго соединениями в нетоксичной дозе и с последующим воздействием этими же веществами в дозе LD<sub>50</sub>. В другой серии эксперимента (*Серия 3. Долговременная преадаптация 2*) исследуемые имидазолиды воздействовали на дрозофилу в течение всего личиночного периода жизни, и имаго, подвергнутых такому воздействию подвергались точному воздействию этими же соединениями в дозе LD<sub>50</sub>. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 5.

При кратковременной преадаптации с последующим воздействием на имаго дозой LD 50 (Преадаптация 1 типа) число индуцированных доминантных леталей у самок и самцов достоверно не отличается, однако, как показал проведенный двухфакторный дисперсионный анализ, соединения после преадаптации сохранили достоверные различия в способности индуцировать доминантные летальные мутации ( $p < 0,05$ ). Сравнение числа индуцированных доминантных леталей у самок и самцов после преадаптации с числом доминантных леталей индуцированных

прямым воздействием дозой LD50 показало, что эти величины достоверно не отличаются для  $p < 0,05$ .

**Таблица 5.** Число индуцированных имидазолидами в дозе LD<sub>50</sub> доминантных летальных мутаций, после преадаптаций различного типа дрозофилы нетоксичной дозой этих соединений

Исследуемое соединение	Преадаптация 1 типа, кратковременная преадаптация 0,001 мг/мл + LD <sub>50</sub>		Преадаптация 2 типа, долговременная преадаптация 0,001 мг/мл + LD <sub>50</sub>	
	самки	самцы	самки	самцы
Im	19,4±0,09	16,0±0,03	13,9±0,1	11,0±0,04
NmeIm	13,5±0,1	9,9±0,02	7,5±0,1	6,3±0,1
CmeIm	17,1±0,2	16,1±0,1	9,2±0,2	7,1±0,1
ImSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	14,8±0,1	20,0±0,06	11,1±0,05	10,1±0,1
ImSO <sub>2</sub> Phe	7,1±0,08	6,0±0,04	7,2±0,1	6,1±0,03
ImSO <sub>2</sub> Tol	11,43±0,11	9,13±0,1	6,9±0,06	6,1±0,04

Долговременная преадаптация (преадаптация 2 типа) нетоксичной дозой в течение всего личиночного периода жизни, выявило адаптивный ответ, то есть число индуцированных доминантных леталей у самок и самцов после преадаптации достоверно ( $p < 0,01$ ) меньше, чем при прямом воздействии полулетальной дозой. Кроме того, число индуцированных доминантных леталей у самок и самцов после преадаптации достоверно различалось ( $p < 0,01$ ).

Мы проанализировали, какие из физико-химических параметров являются определяющими в развитии адаптивного ответа. Для этого мы высчитали разницу между числом доминантных леталей при прямом действии и числом доминантных леталей после долговременной преадаптации имидазолидами к самим себе. Затем провели корреляционный анализ между полученной разницей и исследованными физико-химическими параметрами. Обнаружили высокую (достоверно для  $p < 0,05$ ) отрицательную корреляцию с величинами молекулярной массы ( $r_{\text{♀}} = -0,72$ ,  $r_{\text{♂}} = -0,83$ ), молекулярного объема ( $r_{\text{♀}} = -0,77$ ,  $r_{\text{♂}} = -0,85$ ), суммарного дипольного момента ( $r_{\text{♀}} = -0,87$ ,  $r_{\text{♂}} = -0,92$ ). Можно предположить, чем эффективнее соединение взаимодействует с рецепторами на поверхности клеток, тем быстрее развивается адаптивный ответ. В пользу этого говорит, отрицательная корреляция между проанализированными физико-химическими параметрами соединений и адаптивным ответом к ним.

Для того чтобы доказать это предположение и выяснить роль функциональных групп исследуемых имидазолидов в развитии адаптивного ответа, мы провели еще две серии экспериментов, в которых кратковременная и долговременная преадаптации осуществлялись нетоксичной (0,001 мг/мл) дозой имидазола к последующему воздействию имидазолидами в дозе LD50. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 6.

Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что ни кратковременное, ни долговременное предварительное воздействие имидазолом не создает преадаптацию к мутагенному действию имидазолидами, у имаго дрозофилы. Предварительное воздействие нетоксичной дозой имидазола, не только не ослабляли мутагенное действие производных имидазола в дозе LD50, но усиливали его, что говорит по нашему мнению о том, что у *Drosophila melanogaster* существуют несколько отличные механизмы адаптации к мутагенному действию имидазола и его производных. Усиление мутагенного ответа особенно ярко выражено для имидазолидов, содержащих бензольное кольцо - ImSO<sub>2</sub>Phe и ImSO<sub>2</sub>Tol, которые при прямом действии демонстрировали самую слабую мутагенность. Это свидетельствует, по нашему мнению о независимом действии этих имидазолидов и имидазола, поэтому наблюдается суммированное действие исследуемых веществ, кроме того, это говорит о возможном существовании различных типов имидазолиновых рецепторов.

Подводя итоги проведенным экспериментам можно сказать, что для имидазола и исследованных нами его производных определяющим в развитии мутагенного ответа являются такие параметры как молекулярная масса, молекулярный объем и суммарный дипольный момент, что свидетельствует в пользу предположения, что на поверхности клеток-мишеней существуют специфические рецепторы для имидазолидов, и что их несколько типов. Репаративные механизмы к специфическому действию конкретного вещества активируются и запускаются в момент взаимодействия ксенобиотика и мембранного рецептора. По-видимому, косвенным доказательством этого является обнаруженная корреляция между теми же физико-химическими параметрами и адаптивным ответом к генотоксическому действию исследуемых соединений.

**Таблица 6.** Число индуцированных имидазолидами в дозе LD<sub>50</sub> доминантных летальных мутаций, после преадаптаций различного типа дрозофилы нетоксичной дозой имидазола

Исследуемое соединение	Преадаптация 3 типа, кратковременная преадаптация Im 0,001 мг/мл + имидазолиды LD <sub>50</sub>		Преадаптация 4 типа, долговременная преадаптация Im 0,001 мг/мл + имидазолиды LD <sub>50</sub>	
	самки	самцы	самки	самцы
Im	19,4±0,1	16,0±0,3	13,9±0,1	11,0±0,04
NmeIm	14,8±0,2	13,8±0,1	14,99±0,2	8,99±0,2
CmeIm	16,6±0,1	15,7±0,3	16,2±0,1	13,4±0,5

ImSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	20,2±0,2	18,7±0,6	17,76±0,8	14,5±0,6
ImSO <sub>2</sub> Phe	21,1±0,1	19,5±0,1	19,5±0,1	18,8±0,1
ImSO <sub>2</sub> Tol	23,6±0,2	20,0±0,4	28,4±0,2	10,8±0,1

Кроме того огромную роль в развитии адаптивного ответа играет время воздействия нетоксичной дозой перед последующим воздействием дозой LD50. Кратковременная преадаптация веществ самих к себе не способна индуцировать репаративные системы, долговременная преадаптация напротив развивает адаптивный ответ, выражающийся в том, что число доминантных леталей снижается.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абилев С.И.* Выявление и прогнозирование мутационной активности химических соединений окружающей среды: Автореф. Дис. док. биол. наук. М., 2003 47 с.
2. *Альберт А.* Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. М.: Медицина, 1989. Т. 1. 400 с.
3. *Белоконь Е.М.* Методические указания к определению мутагенной активности химических препаратов на дрозофиле. Львов: ЛГУ, 1984. 26с.
4. *Дурнев А.Д., Середенин С.Б.* Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. М.: Медицина 1998 327с.
5. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990 351 с.

6. *Маиковский М.Д.* Лекарственные средства. Вильнюс: Изд-во ЗАО «Гамта» 1994а Т.1 543 с.
7. *Маиковский М.Д.* Лекарственные средства. - Вильнюс: Изд-во ЗАО «Гамта» 1994б Т.2 527 с.
8. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987 815 с.
9. *Северин С. Е.* Проблема биологической активности природных соединений имидазола. // Успехи современной биологии. 1965 Т. 59. С. 165-186.
10. *Цырлин В.А., Кузьменко Н.В., Плисе М.Г.* Роль имидазолиновых рецепторов в центральной регуляции кровообращения (история и современное состояние вопроса). // Вестник аритмологии, 2001 №21. С.18-23.
11. *Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, Collins LA, Westbrooks KL, Johnson GG.* II-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling //Ann N Y Acad. Sci., 1995 - 763 - p.22-42.
12. *Ross M.H.* Cytogenetics of *Blatella germanica*: comparison of an insecticide-resistant and insecticide-susceptible field strain // Can. J. Genet. and Cytol. 1986. V. 28, №5. 835-843 pp.

#### THE PHYSICO-CHEMICAL FEATURES OF IMIDAZOLIDES, THEIR MUTAGENIC ACTIVITY AND DROSOPHILA MELANOGASTER ABILITY TO ADAPT TO THEM

© 2009 E.S. Selezneva, E.I. Tenjgayev, A.V. Shpilko

Samara State University

It was shown that imidazole and its methyl and sulphuril derivatives differ on their ability to induce dominant lethal mutations in *Drosophila melanogaster* imago both in toxic and sub-lethal doses. The mutagenic activity correlated with molecular mass, volume and sum dipole moment of tested substances. The short action of non-toxic imidazolides on *Drosophila melanogaster* imago did not develop the adaptations decreasing the mutagenic effects of substances. The long-term action of non-toxic doses in larval period of *Drosophila melanogaster* led to development of adaptive answer expressed in valuable decrease of dominant lethal mutations induced by sub-lethal doses of these substances in comparing with the number of mutations induced by right substances action. The preliminary short or long-term action of non-toxic imidazole doses did not develop the adaptive answer in *Drosophila melanogaster* in the case of sub-lethal dose. The role of physico-chemical parameters of imidazolides in adaptive answer development.

Key words: *Drosophila melanogaster*, adaptations, preadaptations, imidazolides, dominant lethal mutations, correlations, physico-chemical parameters