

УДК 615.099

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НОВЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ПИРИДО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛОВ С ПОМОЩЬЮ ALLIUM ТЕСТА

Р.С. Бегунов, А.А. Соколов,
Т.В. Шебунина, С. А. Калина,
А.А. Башкирова

«Ярославский государственный
университет им. П.Г. Демидова»,
150000, г. Ярославль, Российская
Федерация

Изучено мутагенное и митозмодифицирующее действие (*Allium test*) новых полициклических конденсированных производных имидазола, обладающих высокой способностью встраиваться в молекулы ДНК: 7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазола, 7-нитропиридо[1,2-а]бензимидазола, 7-аминопиридо[1,2-а]бензимидазола, 8-нитро-7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазола, 8-амино-7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазола. Оценка цитотоксического эффекта исследуемых соединений проводилась путем сравнения с токсикологическими характеристиками широко используемого ДНК-интеркалятора 9-аминоакридина. Все азаетероциклы вызывали снижение профазного индекса, что свидетельствовало об их воздействии на процесс репликации ДНК. Наиболее распространенными мутациями являлись патологии типа «мост» - результат объединения хромосом разных дочерних клеток, а также разрушение и потери целых хромосом при делении клеток. Все моно- и дизамещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы оказывали меньшее митозугнетающее и мутагенное действие, чем 9-аминоакридин. Меньшими цитотоксичностью и мутагенностью для тест-системы *A.сера* обладали монозамещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы.

Ключевые слова: цитотоксичность, мутагенность, митозмодифицирующий эффект, *Allium test*, пиридо[1,2-а]бензимидазолы, ДНК-интеркаляторы.

Введение. Интерес ко многим гетероциклическим соединениям обусловлен их высокой биологической активностью. При этом среди всего многообразия таких веществ большой интерес вызывают полициклические конденсированные производные имидазола, содержащие узловой атом азота, например моно- и дизамещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы. Это объясняется тем, что некоторые из них являются биоизостерными аналогами азотистых оснований нуклеиновых кислот и поэтому обладают сродством к ДНК, часто выступая в качестве интеркаляторов [1-2].

Эти вещества, находясь в микроколичествах в клетке, вызывают одно- и двунитевые разрывы молекул нуклеиновых кислот, нарушая тем самым процессы передачи генетической информации (репликацию, транскрипцию), а также

блокируют синтез белка. Поэтому такие органические соединения могут быть использованы для создания новых противоопухолевых лекарственных препаратов, механизм действия которых заключается в избирательном связывании с ДНК и как следствие подавление нерегулируемого деления раковых клеток [3-4].

Помимо высокой фармакологической активности, одним из основных требований, предъявляемым к соединениям, которые планируется использовать в качестве лекарств, является их низкая токсичность и отсутствие отрицательного влияния на наследственный материал. Поэтому в настоящей работе исследовались цитотоксические и мутагенные свойства ряда моно- и дизамещенных пиридо[1,2-а]бензимидазолов, обладающих высо-

Бегунов Роман Сергеевич (Begunov Roman Sergeevich), кандидат химических наук, доцент, кафедра органической и биологической химии факультета биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», г. Ярославль, begunov@bio.uniyar.ac.ru

Соколов Александр Андреевич (Sokolov Alexander Andreevich), аспирант второго года обучения, специальности 02.00.03, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», г. Ярославль, morose@mail.ru

Шебунина Татьяна Викторовна (Shebunina Tatyana Viktorovna), магистрант первого года обучения, специальность Химия, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», г. Ярославль, tan4ik2107@mail.ru

Калина Светлана Александровна (Kalina Svetlana Alexandrovna), студентка 3 курса, специальность Химия, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», г. Ярославль, svetlana_kalina1993@mail.ru

Башкирова Александра Александровна (Bashkirova Alexandra Alexandrovna), студентка 3 курса, специальность Химия, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», г. Ярославль, yarchemlab@gmail.com

кой интеркалирующей активностью в молекулы ДНК [5].

Материалы и методы исследования. Материалом для генотоксикологического теста стали несколько гетероциклических веществ, полученных по разработанной нами методике [6]: 7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазол (1), 7-нитропиридо[1,2-а]бензимидазол (2), 7-аминопиридо[1,2-а]бензимидазол (3), 8-нитро-7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазол (4), 8-амино-7-трифторметилпиридо[1,2-а]бензимидазол (5) в трех концентрациях: 0,1; 0,01; 0,001 мг/мл. Для оценки величины цитотоксического и мутагенного эффектов новых ДНК-интеркаляторов изучались аналогичные характеристики 9-аминоакридина (6), который часто используется при проведении генетических исследований.

Биотестирование исследуемого материала проводилось методом оценки токсикогенетического действия химических соединений на *Allium cepa* (сорт Штутгартен) [7-8]. Выбор данного тест-объекта обусловлен тем, что, во-первых, он прост в обращении и не требует сложных методик культивирования, во-вторых, позволяет характеризовать изучаемое вещество по нескольким параметрам: мутагенному (учет хромосомных aberrаций) и митотоксическому действию (число делящихся клеток). В-третьих, методики исследования мутагенных факторов с использованием *A. cepa* хорошо отработаны для первичного скрининга потенциальных фармакологически активных препаратов.

Для опыта отбирались одинаковые по размеру и форме луковицы. Предварительно луковицы проращивались на фильтрованной водопроводной воде в течение 1 дня. Затем в опытном варианте луковицы помещались в растворы исследованных соединений с концентрациями 0,1; 0,01; 0,001 мг/мл на трое суток. Для лучшего растворения исследуемых веществ добавляли 0,5 мл ДМСО. Опыт ставился в трех повторностях и сопровождался интактным контролем. Срезанные корешки помещали на 72 часа в фиксатор Клар-

ка (96 % этиловый спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Окраска корешков производилась 2 % ацетоорсеином. Окрашенные корешки отмывали от красителя в 45 % уксусной кислоте. Лезвием отрезали кончик корешка длиной 2-3 мм, помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты, накрывали покровным стеклом и с помощью спички раздавливали до получения монослоя клеток.

При исследовании мутагенной активности учитывалось: общее количество клеток (около 600); общее число делящихся клеток на стадии ана - телофазы; число клеток с хромосомными aberrациями.

Оценку митотоксического действия и митозомодифицирующей активности проводили на тех же временных препаратах, что и ана-телофазный анализ. Показателем уровня митотической активности являлся митотический индекс (MI, %) - соотношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных на препарате клеток.

Для установления причин изменений MI подсчитывали фазные индексы (ПИ, % - профазный индекс; МИ, % - метафазный индекс; А-ТИ, % - ана-телофазный индекс) - процент клеток в различных стадиях митоза от общего количества делящихся клеток.

Достоверность различий между опытом и контролем оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Стьюдента [30]. Отклонение считалось достоверным при $p < 0,05$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Excel 2007 и STATISTICA 8.0.

Результаты и обсуждение. В ходе работы было установлено (рис. 2), что соединения 1 - 6 во всех исследуемых концентрациях (кроме 5 при $C = 0,001$ мг/мл) изменяли митотический индекс (MI) по сравнению с контролем (6,3 %). Наибольшее влияние на пролиферацию клеток оказывало вещество 6, которое статистически достоверно сни-

жало MI меристемы при 0,01 и 0,001 мг/мл, а при $C = 0,1$ мг/мл полностью останавливало процессы деления в ткани. Таким образом, 9-аминоакридин обладал более выраженным цитотоксическим действием в диапазоне исследуемых концентраций.

Митотоксический эффект также проявляли структуры: 4, 3, 2, 1, (расположены в порядке уменьшения воздействия на делящиеся клетки).

Наименьшее влияние из

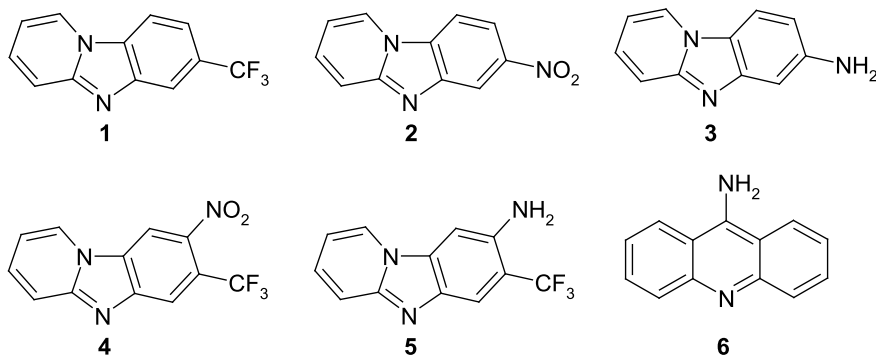


Рис. 1. Структура исследуемых соединений

всех исследованных соединений на меристему корешков *Allium cepa* оказывало 5. Для данного вещества митотический индекс при концентрации 0,001 мг/мл статистически достоверно не отличался от контроля (6,3 %). При концентрациях 0,1 мг/мл и 0,01 мг/мл происходило небольшое уменьшение *MI*.

Для выяснения причин подавления процесса деления клеток тест-системы *Allium cepa*, была проведена оценка продолжительности отдельных фаз митоза – по доли делящихся клеток на каждой стадии. Значения фазных индексов в контроле и в опытных вариантах сведены в таблице 1.

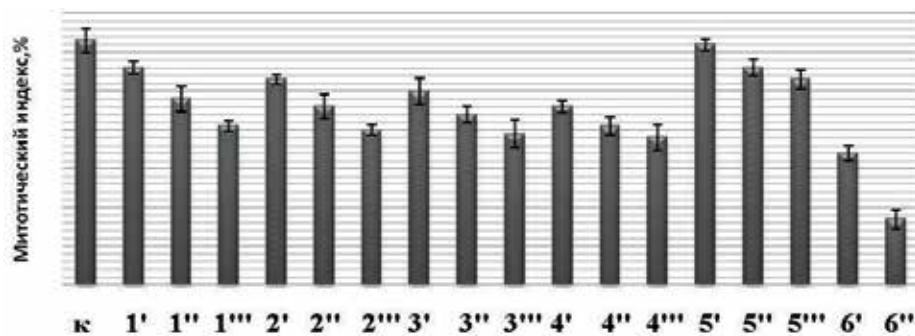


Рис. 2. Митотический индекс в меристеме *Allium cepa* при действии разных концентраций веществ 1-6, где ' – концентрация 0,001 мг/мл, '' – 0,01 мг/мл, ''' – 0,1 мг/мл

Из данных таблицы следует, что все исследуемые вещества в той или иной степени изменяли длительность фаз митоза по сравнению с контролем, причем наблюдалась общая тенденция – уменьшение количества клеток на стадии профа-

Таблица 1

Фазные индексы в меристеме проростков корешков *Allium cepa*, обработанных соединениями 1-6

Соединение	Концентрация, мг/мл	Фазные индексы		
		Профазный индекс, %±m	Митофазный индекс, %±m	Анотелофазный индекс, %±m
Контроль	-	56,75±2,5	19,85±1,96	23,39±2,39
1	0,1	48,5±2,1*	34,1±2,82*	17,4±1,2*
	0,01	53,1±2,33	26,3±2,43*	20,6±2,01
	0,001	54,5±1,56	21,8±2,43	23,7±2,44
2	0,1	47,1±1,5*	34,1±1,71*	18,8±1,3*
	0,01	51,4±2,12*	29,3±1,1*	19,3±1,5*
	0,001	53,2±0,92*	24,6±1,4*	22,2±0,74
3	0,1	52,2±0,3*	28,5±1,2*	19,3±1,31*
	0,01	54,8±0,9	24,6±0,9*	20,6±0,93
	0,001	55,5±1,2	21,2±1,4	23,3±0,89
4	0,1	44,3±0,9*	39,6±2,82*	16,1±1,1*
	0,01	48,2±1,2*	33,1±2,1*	18,7±0,9*
	0,001	52,7±1,5*	26,6±1,2*	20,7±1,45
5	0,1	32,3±0,9*	54,8±0,9*	12,9±1,2*
	0,01	45,9±1,2*	36,9±2*	17,2±1,3*
	0,001	47,5±2,1*	32,9±1,2*	19,6±1,21*
6	0,1	0	0	0
	0,01	45,3±1,4*	39,4±0,9*	15,3±1,11*
	0,001	47,1±2,01*	33,8±0,84*	19,1±1,3*

* - достоверно отличается от контроля, $p < 0.05$

зы и ана-телофазы и увеличение числа клеток на стадии метафазы.

Монозамещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы 2 и 3 незначительно влияли на фазные индексы по сравнению с контролем, наибольший же эффект оказывали 5 и 6. При концентрации 0,01 мг/мл происходило уменьшение профазного и ана-телофазного индексов в 1,2 и 1,4 раз для 5 и в 1,2 и 1,5 раза для 6.

Снижение профазного индекса говорит о том, что исследуемое соединение воздействует на процессы, происходящие в интерфазу, нарушая процессы подготовки клеток к делению.

Химические вещества, изменяющие относительную продолжительность фаз митоза, могут оказывать мутагенное действие. Поэтому с помощью метода ана-телофазного анализа была установлена способность соединений 1-6 индуцировать хромосомные aberrации в корневой меристеме лука.

Все исследованные концентрации веществ вызывали генетические нарушения в клет-

ках *A. sepa* (табл. 2). Наиболее распространенными оказались патологии типа «мост» - результат объединения хромосом разных дочерних клеток, а также нарушение целостности хромосом (что было зафиксировано по появлению их фрагментов), и потери целых хромосом при делении клеток. Самое большое число хромосомных aberrаций по сравнению с контролем индуцировало 6, увеличивая количество генетических нарушений в 6,4 и 5,2 раз при концентрациях 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл соответственно. Остальные исследованные вещества не оказывали столь сильного мутагенного действия. При этом монозамещенные структуры 1-3 вызывали относительно малое количество генетических нарушений при делении клеток. Соединения 4-5, обладающие двумя функциональными группами, способными образовывать большее количество связей с азотистыми основаниями ДНК, проявляли более сильный мутагенный эффект.

Таблица 2

Частота хромосомных мутаций в клетках корневой меристемы *A. sepa* при воздействии веществ 1-6 (количество учтенных ана-телофаз 200)

Соединение	Концентрация	Хромосомные aberrации, %±m	Хромосомные aberrации+отставания, %±m
Контроль	-	0,7±0,11	1,23±0,23
1	0,1	3,4±0,21*	3,9±0,31*
	0,01	2,1±0,12*	2,9±0,21*
	0,001	1,21±0,31*	2,1±0,24*
2	0,1	3,6±0,11*	4,1±,09*
	0,01	2,4±0,2*	3,1±0,12*
	0,001	1,21±0,21*	2,3±0,13*
3	0,1	3,8±0,16*	4,4±0,09*
	0,01	2,6±0,11*	3,5±0,11*
	0,001	1,34±0,21*	2,7±0,17*
4	0,1	3,4±0,12*	4,7±0,11*
	0,01	2,8±0,11*	3,5±0,09*
	0,01	1,3±0,1*	2,5±0,07*
5	0,1	3,9±0,21*	5,1±0,12*
	0,01	2,9±0,25*	3,8±0,14*
	0,001	1,5±0,12*	2,7±0,21*
6	0,1	0	0
	0,01	4,5±0,12*	7,9±0,15*
	0,001	3,5±0,2*	5,9±0,16*

* - достоверно отличается от контроля, $p < 0.05$

Заключение. По результатам работы был сделан вывод, что замещенные пиридо[1,2-а]бензимидазолы **1-5** оказывают меньшее митотоксическое и мутагенное действие, чем 9-аминоакридин. Поэтому они являются перспективными кандидатами для разработки новых фармакологических

препаратов или химических материалов для проведения тонких генетических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 178 в рамках базовой части государственного задания на НИР ЯрГУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Favier, M. Blackledge, J.P. Simorre, S. Crouzy, V. Dabouis, A. Gueiffier et al. Solution Structure of 2-(Pyrido[1,2-e] purin-4-yl)amino-ethanol Intercalated in the DNA Duplex d(CGATCG)₂. *Biochemistry*. 2001, 40: 8717-26.

2. M. Sedic, M. Poznic, P. Gehrüg, M. Scott, R. Schlapbach, M. Hranjec et al. Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2-a]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status. *Mol Cancer Ther.*

2008, 7: 2121-32.

3. M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. Pascual-Teresa, A. Ramos. Intercalators as anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7(17): 1745-80.

4. N.J. Wheate, J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, C.R. Brodie. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007, 7 (6): 627-48.

5. О. А. Рачинская, К. В. Попов, Г. А. Рызванович, Н. Л. Большева, Р. С. Бегунов, О. Ю. Юркевич, А. В. Зеленин, О. В. Муравенко. Повышение разрешающей способности хромосомного анализа с помощью пиридо[1,2-а]бензимидазолов. *Генетика*. 2012, 10: 1228-36.

6. Г. А. Рызванович, Р. С. Бегунов, О. А. Рачинская, О. В. Муравенко, А. А. Соколов. Синтез и интеркалирующая активность новых пиридо[1,2-а]бензимидазолов. *Химиико-фармацевтический*

журнал. 2011, 3: 13-15.

7. M. Cabaravdic. Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. *Med.Arh.* 2010, 64(4): 215-8.

8. K.Y. Ping, I. Darah, U. K. Yusuf, C. Yeng, S. Sasidharan. Genotoxicity of Euphorbia hirta: An Allium cepa Assay. *Molecules*. 2012, 17: 7782-91.

REFERENCES

1. A. Favier, M. Blackledge, J.P. Simorre, S. Crouzy, V. Dabouis, A. Gueiffier et al. Solution Structure of 2-(Pyrido[1,2-e] purin-4-yl)amino-ethanol Intercalated in the DNA Duplex d(CGATCG)₂. *Biochemistry*. 2001, 40: 8717-26.

2. M. Sedic, M. Poznic, P. Gehrüg, M. Scott, R. Schlapbach, M. Hranjec et al. Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2-a]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status. *Mol Cancer Ther.*

2008, 7: 2121-32.

3. M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. Pascual-Teresa, A. Ramos. Intercalators as anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7(17): 1745-80.

4. N.J. Wheate, J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, C.R. Brodie. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007, 7 (6): 627-48.

5. O.A. Rachinskaya, K.V. Popov, G.A. Ryzvanovich, N.L. Bol'sheva, R.S. Begunov, O.Yu. Yurkevich et al. Increasing the resolution of chromosome analysis using pyrido[1,2-a]benzimidazoles. *Russian Journal of Genetics*. 2012, 10: 1055-62. (in Russian)

6. G.A. Ryzvanovich, R.S. Begunov, O.A. Rachinskaya, O.V. Muravenko, A.A. Sokolov. Synthesis and intercalation ability of new pyrido[1,2-a]benzimidazoles. *Pharm. Chem. J.* 2011,

45: 141-43. (in Russian)

7. M. Cabaravdic. Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. *Med.Arh.* 2010, 64(4): 215-8.

8. K.Y. Ping, I. Darah, U. K. Yusuf, C. Yeng, S. Sasidharan. Genotoxicity of Euphorbia hirta: An Allium cepa Assay. *Molecules*. 2012, 17: 7782-91.

R.S. Begunov, A.A. Sokolov, T.V. Shebunina, S.A. Kalina, A.A. Bashkirova

EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF NEW SUBSTITUTED PIRYDO [1,2-A] BENZIMIDAZOLES USING THE ALLIUM TEST

Federal State Budgetary Educational Institution of Additional Higher Education «P.G.Demidov Yaroslavl State University», 150000, Yaroslavl, Russian Federation

Investigations were carried out into mutagenic and mitosis modifying action (Allium test) of imidazole new polycyclic condensed derivatives having a high ability to embed into DNA molecules: 7-trifluor methyl pyrido [1,2-a] benzimidazole, 7- nitropyrido[1,2-a] benzimidazole, 7- amino pyrido [1,2- a] benzimidazole, 8-nitro- 7-trifluor methyl pyrido[1,2-a]benzimidazole, 8-amino- 7-trifluor methyl pyrido[1,2-a] benzimidazole. The evaluation of cytotoxic effect of compounds under investigation was performed by comparing with toxicological characteristics of a widely used DNA –intercalator 9-amino acridine. All azagetero cycles induced reduction of the prophase index evidencing their impact on the process of DNA replication. The most wide spread mutations were “bridge” type pathologies as a result of reunion of different daughter cells chromosomes and obliteration and losses of entire chromosomes at cells division. All mono- and di-substituted pirido[1,2-a] benzimidazoles produced a lesser mitodepressive and mutagenic action than 9-amino acridine. Monosubstituted pirido[1,2-a]benzimidazoles had lesser cytotoxicity and mutagenicity in the A cepa test-system.

Keywords: cytotoxicity, mutagenicity, mito modifying effect, the Allium test, pirido[1,2-a] benzimidazoles, DNA-intercalators.

Переработанный материал поступил в редакцию 26.01.2015 г.