

ГЕНОТОКСИЧНОСТ И ЦИТОТОКСИЧНОСТ НА 4-BROMO-N,N-DIETHYL-5,5-DIMETHYL-2,5-DIHYDRO-1,2-OXAPHOSPHOL-2-AMINE 2-OXIDE В КОНЦЕНТРАЦИЯ 10^{-3} М ВЪРХУ МЕРИСТЕМНИ КЛЕТКИ ОТ КОРЕН НА *ALLIUM CEPA* L. СЛЕД 24 ЧАСА И 48 ЧАСА ВЪЗДЕЙСТВИЕ

Ваня Колева

*ШУ "Епископ Константин Преславски", Факултет по природни науки,
ул. Университетска 115, 9712, гр. Шумен, България
E-mail: vanyakolleva@gmail.com*

ABSTRACT

Few investigations on biological activities of oxaphospholes showed that they may influence proliferating cells and cause disturbances of the genetic material. The objective of this study was to determine the genotoxicity and cytotoxicity of 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide at concentration of 10^{-3} M in *Allium cepa* L. root tip cells. Treatment with Br-oxph for 24 h and 48 h decreased the mitotic index and induced chromosome aberrations in *Allium cepa* cells. The data from the study showed the existence of genotoxic and cytotoxic effects at concentration 10^{-3} M in *Allium cepa* L. root tip cells.

Key words: *Allium cepa* L., root tip cells, Br-containing oxaphosphole derivative, genotoxicity, cytotoxicity.

Въведение

Към групата на органофосфатите спадат две съединения с изключително значение за живите организми – ДНК и РНК. Интерес представлява разработването на аналози на техните бази. Установено е, че аналозите на природните нуклеотиди и нуклеозиди с модифициран пентозен остатък проявяват антивирусно и антитуморно действие (Brel, 2008; Rad *et al.*, 2010). Оксафосфолното съединение 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide (Br-oxph) е хетероциклено съединение с кислороден атом в петчленен пръстен и се явява структурен аналог на фуранозите, към чиято група се причисляват пентозите рибоза и дезоксирибоза.

Оксафосфолите са съединения, които все още не са намерили приложение в практиката. Малкото изследвания относно биологичната им активност показват антимикробна (Naranath *et al.*, 2005), антивирусна (Каменова и съавт., 1996), генотоксична активност (Енчев и съавт., 2006) и способност да повлияват растежа на някои културни растения (Enchev *et al.*, 1986; Калчев и съавт., 2005). Резултатите относно биологична активност на оксафосфолите показват, че тази група съединения притежават потенциал да влияят върху процесите на клетъчно делене и да индуцират промени в генетичния материал на клетката. Това налага първата стъпка в изследването на Br-oxph да бъде оценка на въздействието му върху процеса на митотично делене и целостта на хромозомите на митотичните клетки. Необходимо е генотоксичното действие на химичните съединения да се разглежда на клетъчно ниво, защото клетката е най-малката структурна и функционална единица на живите организми (Драгоева, Димитров, 2005) и основен център, чрез който организъмът осъществява връзката си с околната среда.

Целта на нашето изследване беше да установим генотоксичния и цитотоксичен потенциал на 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide (Br-oxph) в концентрация 10^{-3} М върху меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L. след 24 ч. и 48 ч.

Материали и методи

Изследваното съединение (*4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide*), беше синтезирано в Лабораторията по Органична химия при Шу “Еп. К. Преславски” (Angelov, Enchev, 1987).

За оценяване на генотоксичната и цитотоксична активност на Вг-охрх проведохме *Allium cepa* – тест. Като тест-обект бяха използвани меристемни клетки на корен от семена. Продължителността на третиране беше 24 часа и 48 часа, включващи съответно един и два клетъчни цикъла (Rank, 2003; Sarhan, 2010). И в двата периода на третиране проведохме *Allium cepa* -теста в концентрация 10^{-3} М. Третирането на корените на *Allium cepa*, приготвянето на микроскопските препарати и цитогенетичния анализ бяха проведени съгласно Kalcheva *et al.*, (2009 a,b).

Резултати и дискусия

В Таблица 1 са представени резултатите относно влиянието на Вг-охрх върху митотичния индекс и честотата на митотичните фази. Стойността на митотичния индекс след 24 часов период на третиране е с около 8 % по-нисък от този на контролата. Процентът на

Таблица 1

Ефект от 24 ч. и 48 ч. период на третиране с Вг-охрх в концентрация 10^{-3} М върху темпа на клетъчно делене на меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L., изразен чрез митотичен индекс и фазовите индекси

Проба	Анализирани клетки (n)	МИ, % ($\bar{X} \pm \delta$)	Профаза,	Метафаза,	Анафаза,	Телофаза,
			ФИ%	ФИ%	ФИ%	ФИ%
<hr/>						
Време на третиране - 24 ч.						
ОК	3842	5.14 ± 1.37	35.14	22.18	11.88	30.80
10^{-3} М	3878	4.71 ± 0.90	33.89	24.84	11.69	29.58
ПК	4012	3.86 ± 1.49	27.64	29.72	19.74 *	22.90
Време на третиране - 48 ч.						
ОК	3816	4.68 ± 1.43	29.40	31.67	18.95	20.43
10^{-3} М	3855	3.66 ± 0.81	25.86	34.79	12.63	26.72

МИ – митотичен индекс, ФИ – фазов индекс, n – брой, ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода), ПК – положителна контрола (Methyl methanesulfonate, 10^{-4} М), *P \leq 0.05.

клетките в профаза, анафаза и телофаза също е по-нисък от този в контролната група. Единствено клетките в метафаза са по-висок процент от същите в контролната група. След 48 ч. период на въздействие с Вг-охрх митотичният индекс е с 22 % по-нисък в сравнение с контролата. Фазовите индекси на профаза и на анафаза също имат по-ниски стойности, а на метафаза и телофаза са по-високи от тези в контролата. Подтискането на митотичната активност в сравнение с отрицателната контрола се разглежда като надежден и чувствителен показател за установяване на цитотоксичност на изследвания фактор (Dragoeva *et al.*, 2008; Dragoeva *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2010). По-ниската стойност на МИ може да е сигнал за неблагоприятно влияние върху растежа и развитието на третирания организъм (Dimitrov *et al.*, 2006), водещо до намаляване на свежото тегло и продукцията на семена и плодове (Swiatek *et al.*, 2003). Редукцията на МИ може да е причинена от инхибиране на клетъчния цикъл в резултат от задържане на клетките в интерфаза и непреминаването им през митоза (Kwankua *et al.*, 2010). Получените от нас резултати показват, че Вг-охрх проявява митодепресивен ефект. Този ефект нараства с увеличаване на продължителността на третиране.

Данните, представени в Таблица 2 показват, че в концентрация 10^{-3} M Вг-охрh оказва негативно влияние върху митотичните клетки. Най-често срещаните нарушения са анафазните и телофазни клетки с изоставащи хромозоми и с хромозомен мост. И в двете експериментални групи установихме увеличен процент на митотични клетки с нарушения. След 24 часовия период на третиране тези клетки са около три пъти повече, а след 48 часовия - около два пъти в сравнение със съответната контрола. Наблюдаваните разлики са статистически значими при 24 часовия период на третиране ($P \leq 0.05$). Анализът на данните показва, че в концентрация 10^{-3} M Вг-охрh има ясно изразен генотоксичен ефект. Установените от нас нарушения в активно делящите се митотични клетки са показател за

Таблица 2

Ефект от 24 ч. и 48 ч. период на третиране с Вг-охрh в концентрация 10^{-3} M върху честотата на клетките с хромозомни аберации в коренова меристема на *Allium cepa* L.

Проба	Анализирани клетки, (n)	МП (n)	ИХ (n)	КМ (n)	АМ (n)	ХФ (n)	Общ % ($\bar{X} \pm \delta$)
Време на третиране - 24 ч.							
ОК	196	0	1	0	2	1	2.40 ± 3.85
10^{-3} M	183	0	5	3	4	2	$8.26 \pm 4.26^*$
ПК	156	10	16	0	6	1	$20.30 \pm 11.27^{**}$
Време на третиране - 48 ч.							
ОК	178	0	3	0	2	0	2.70 ± 2.96
10^{-3} M	141	0	6	0	2	0	5.23 ± 5.40

ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода), ПК – положителна контрола (Methyl methanesulfonate, 10^{-4} M), n – брой, МП – многополюсна анафаза/телофаза, ИХ – изоставащи хромозоми, КМ – К-митоза, АМ – анафазен мост, ХФ – хромозомен фрагмент, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

генотоксичния потенциал на изследваното съединение (Rank, 2003; Santos *et al.*, 2009; Dragoeva *et al.*, 2010). Изоставащите хромозоми се наблюдават, когато не е осъществена връзка между кинетохората на хромозомата и нишката на делителното вретено (Michel *et al.*, 2001; Silkworth *et al.*, 2009). Анафазен/телофазен мост се образува, когато се залепят две хромозоми с липсващи теломерни участъци (McClintock, 1984). В резултат от разкъсването на такъв мост между полюсите на митотичното вретено могат да останат хромозомни фрагменти. Тези нарушения обикновено са свързани със загуба на генетичен материал (Ivanova *et al.*, 2005) и апоптоза ((Драгоева, 2006).

Таблица 3

Ефект от 24 ч. и 48 ч. период на третиране с Вг-охрh в концентрация 10^{-3} М върху честотата на срещане на аномални интерфазни меристемни клетки от корен на *Allium cepa*L.

Проба	Анализирани клетки (n)	ДЯ (n)	МЯ (n)	Общ % ($\bar{X} \pm \delta$)
Време на третиране - 24 ч.				
ОК	3645	1	7	0.19 ± 0.13
10^{-3} М	3695	38	9	1.28 ± 1.35
ПК	3856	18	21	$1.11 \pm 0.73^{**}$
Време на третиране - 48 ч.				
ОК	3638	1	2	0.08 ± 0.14
10^{-3} М	3714	14	6	$0.55 \pm 0.36^*$

ОК – отрицателна контрола (дестилирана вода); ПК – положителна контрола (Methyl methanesulfonate, 10^{-4} М); n – брой; ДЯ – двуядрени клетки; МЯ – клетки с микроядра; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

След 24 часов и 48 часов период на третиране с Вг-охрh установихме наличие на интерфазни клетки с нарушения (Таблица 3). Процентът на тези клетки е около седем пъти повече в сравнение с контролните. Преобладават клетките с две ядра. Те възникват когато не протича цитокинеза и наличието им е признак за цитотоксичност (Li, 2007; Chakraborty *et al.*, 2008; Sarhan, 2010). При цитогенетичните тестове наличието на двуядрени клетки е сигнал за нарушаване на процеса цитокинеза (Chakraborty *et al.*, 2008) или за процес водещ до клетъчна смърт (Leme *et al.*, 2009). След 24 часов и 48 часов период на третиране с Вг-охрh установихме наличие и на интерфазни клетки с микроядра (Таблица 3). Микроядрата са лесно установим показател за генотоксично влияние (Farghaly *et al.*, 2010).

Извод

В обобщение, нашите изследвания показват, че след 24 ч. и 48 ч. въздействие в концентрация 10^{-3} М, Вг-охрh проявява генотоксичен и цитотоксичен ефект спрямо меристемни клетки от корен на *Allium cepa* L.

Благодарности

Изследванията, отразени в представения доклад, са финансирани от Националния Фонд за научни изследвания по договор DO 02-86/13.12.2008.

ЛИТЕРАТУРА

1. Драгоева, А., О. Димитров, 2005. Структура и функции на клетките. Изд. Светлина, Шумен. 150 стр.
2. Драгоева, А., 2006. Апоптозата – генетично програмирана клетъчна смърт. Екология, Биология, Биотехнология, 2, 1-10
3. Енчев, Д., В. Калчева, К. Калчев, 2006. Биологична активност и генотоксичност на N,N-диетил-5,5-диметил-4-фенилселенил-2,5-дихидро-1,2-оксафосфол-2-амин 2-оксид, Годишник на ШУ"Епископ Константин Преславски", т.16В4, 18-30
4. Калчев, К., Д. Енчев, С. Станколов, 2005. Влияние на 2,5-дихидро-1,2-оксафосфол-2-оксиду върху *Triticum vulgare* L., *Cucumis Sativus* L., *Lycopersicon esculentum* Mill, Научни трудове РУ"Ангел Кънчев" – филиал Силистра, Силистра, т.44 7.1, 235-239
5. Каменова, Е., В. Христов, В. Иванов, 1996. Действие некоторые диалкиловых тиозифиров и диоксафосфоланов на вирус табачны мозайки *in vitro*, Сборник доклади,

Юбилейна научна конференция. “25 години ШУ “Епископ К. Преславски”, секция “Биология и география”, Шумен, 30.X – 1.XI.1996, 3-5

6. Angelov, С.М., D.D. Enchev, 1987. 1,2-alkadienephosphonic amidoesters and their cyclization with electrophilic reagents, Phosphorus Sulfur. Relat. Elem., 34, 163-168

7. Brel, V.K., 2008. Novel nucleotide phosphonate analogues with 1,2-oxaphosphol-3-ene ring skeleton, Nucleic Acids Symposium, 52, 589-590

8. Chakraborty, R., A.K. Mukherjee, A. Mukherjee, 2008. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium test*, Environ. Monit. Assess, 153(1-4), 351-357

9. Dimitrov, B.D., P.G. Gadeva, D.K. Benova, M.V. Bineva, 2006. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. Mutagenesis. 21(6), 375-382.

10. Dragoeva, A. P., Zh. D. Nanova, V. K. Kalcheva, 2008. Allelopathic activity of micropropagated *Origanum vulgare* ssp. hirtum and its effect on mitotic activity, Allelopathy Journal, 22 (1), 131-142

11. Dragoeva, A.P., Z.D. Nanova, V.P. Kalcheva, 2010. Allelopathic activity of micropropagated *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, water infusions, Braz. J. Pharmacogn, 20(4), 513-518

12. Enchev, D., N. Nicolov, C. Angelov, 1986. Growth-regulating activity of 2-N,N-dialkylamino-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphole 2-oxides, In: Proceedings of the IV international symposium on plant growth regulators, Pamporovo, Bulgaria, I, 365-368

13. Farghaly, A., K. Mahmoud, Y. Ghazi, 2010. Genotoxicity of Dioxin and its Effect on the Immune Response of Goats Vaccinated with Brucella Melitensis Vaccine, Researcher, 2(1), 1-7

14. Haranath, P., U. Anasuyamma, C.N. Raju, C.D. Reddy, C.S. Reddy, 2005. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(N-arylamino)-2-phenylnaphtho[1,3-d]-1,2-oxaphosphole 2-oxides, J Heterocycl Chem, 42(5), 775-779

15. Ivanova, E., T. Staikova, I. Velcheva, 2005. Cytogenetic testing of heavy metal and cyanide contaminated river waters in a mining region of Southwest Bulgaria, J Cell Mol Biol, 4, 99-106

16. Kalcheva V., A. Dragoeva, K. Kalchev, D. Enchev, 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells, Genetics and Molecular Biology, 32(2), 389-393

17. Kalcheva, V.P., A.P. Dragoeva, K.N. Kalchev, D.D. Enchev, 2009. Low dose genotoxicity of 4-bromo-n,n-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide in mice bone marrow cells and *Allium cepa* L. root tip cells, GENETIKA, 41(2), 179-188

18. Kwankua, W., S. Sengsai, C. Kuleung, N. Euawong, 2010. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 949-954

19. Leme, D.M., M.A. Marin-Morales, 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, Mutat Res, 682(1), 71-81

20. Li, R., 2007. Cytokinesis in development and disease: variations on a common theme, Cell Mol Life Sci, 64(23), 3044-3058

21. McClintock, B., 1984. Nobel Prize lecture "The significance of responses of the genome to challenge", Science, 226, 792-801

22. Michel, L.S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, M. Dobles, P.K. Sorger, V.V.V.S. Murty, R. Benezra, 2001. *MAD2* haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells, Nature, 409, 355-359

23. Rad, M.N.S., A. Khalafi-Nezhad, S. Behrouz, 2010. Synthesis of some novel hydrazono acyclic nucleoside analogues, Beilstein J. Org. Chem, 6(49), 1-8

24. Rank, J., 2003. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, Ekologija (Vilnius), 1, 38-42

25. Santos, T.C.O., L.F. Maciel, K.S. Leal, A.E.N. Bender, T.S. Paiva, G.L. Garcias, M.G. Martino-Roth, 2009. Mutagenic potential of water from Pelotas Creek in Rio Grande do Sul, Brazil *Genet Mol Res*, 8(3), 1057-1066
26. Sarhan, M.A.A., 2010. Cytotoxicity and Genotoxicity Potential of Thiocyclam in Root-Tip Cells of *Allium cepa*, *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(4), 601-608
27. Silkworth, W.T., I.K. Nardi, L.M. Scholl, D. Cimini, 2009. Multipolar Spindle Pole Coalescence Is a Major Source of Kinetochore Mis-Attachment and Chromosome Mis-Segregation in Cancer Cells, *PLoS ONE*, 4(8), 6564-6572
28. Swiatek, A., A. Azmi, E. Witters, H. Van Onckelen, 2003. Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle bulg, *J. Plant Physiol.*, 172-178