

Вісник Запорізького національного університету: Збірник наукових праць. Біологічні науки. - Запоріжжя: Запорізький національний університет, 2013. – 144 с.

Затверджено постановою президія ВАК України від 01.07.2010 р. №1-05/5 як наукове фахове видання в галузі «Біологічні науки», у якому можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук.

Затверджено вченою радою ЗНУ (протокол засідання № 6 від 26.02.2013 р.)

№1, 2013р.

РЕДАКЦІЙНА РАДА

Головний редактор – Омелянчик Л.О., доктор фармацевтичних наук, професор

Відповідальний редактор – Задорожня В.Ю., кандидат біологічних наук, ст. викладач

Редакційна колегія:

- | | |
|----------------|--|
| Лях В.О. | – заступник головного редактора,
доктор біологічних наук, професор, |
| Бессонова В.П. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Бовт В.Д. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Брашко О.А. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Долгова Л.Г. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Єщенко В.А. | – доктор медичних наук, професор, |
| Колісник Н.В. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Маліков М.В. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Мицик Л.П. | – доктор біологічних наук, професор, |
| Фролов О.К. | – доктор медичних наук, професор. |

ЦИТОТОКСИЧНА ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ 5-ЗАМІЩЕНИХ 4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІОЛІВ

Ткачук Н.В., к.б.н., доцент, Янченко В.О., к.фарм.н., доцент,
Демченко А.М., д.фарм.н., професор

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка

Досліджено цитотоксичну та антибактеріальну активність 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів. Виявлено, що зміни мітотичного циклу та частота хромосомних аберацій у клітинних кореневій меристемі цибулі ріпчастої знаходяться в межах нормативного значення. Встановлено, що досліджені сполуки не мають антибактеріальних властивостей щодо корозійно небезпечних сульфатвідновлювальних та амоніфікуювальних бактерій.

Ключові слова: біотестування, Allium cepa L., 5-заміщені 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіоли, мітотичний індекс, довжина фаз мітозу, ана-телофазний метод, сульфатвідновлювальні бактерії, амоніфікуювальні бактерії

Ткачук Н.В., Янченко В.О., Демченко А.М. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ 5-ЗАМЕЩЕННЫХ 4-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОЛОВ / Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко, Украина

Исследована цитотоксическая и антибактериальная активность 5-замещенных 4-амино-1,2,4-триазол-3-тиолов. Выявлено, что изменения митотического цикла и частота хромосомных аббераций в клетках корневой меристемы лука репчатого находятся в пределах нормативного значения. Установлено, что исследованные соединения не имеют антибактериальных свойств в отношении коррозионно опасных сульфатвосстанавливающих и аммонифицирующих бактерий.

Ключевые слова: биотестирование, Allium cepa L., 5-замещенные 4-амино-1,2,4-триазол-3-тиоли, митотический индекс, длина фаз митоза, ана-телофазный метод, сульфатвосстанавливающие бактерии, аммонифицирующие бактерии

Ткачук Н.В., Янченко В.О., Демченко А.М. THE CYTOTOXICITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 5-SUBSTITUTED 4-AMINO-1,2,4-TRIAZOL-3-THIOLS / Chernihiv National Pedagogical University Named By T.G.Shevchenko, Ukraine

We investigated cytotoxicity and antibacterial activity of 5-substituted 4-amino-1,2,4-triazol-3-thiols. It was discovered that changes in mitotic cycle and the frequency of chromosomal aberrations in cells of the root meristem of *Allium cepa* L. are within a normative value. It was established that investigated compounds are not having antibacterial properties to corrosion dangerous sulphate-reducing bacteria and ammonifying bacteria.

Key words: biotest, Allium cepa L., 5-substituted 4-amino-1,2,4-triazol-3-thiols, mitotic index, length phases of mitosis, ana-telophase assay, sulphate-reducing bacteria, ammonifying bacteria

ВСТУП

N-аризаміщені похідні триазолу привертають увагу своїм високим біологічним потенціалом, оскільки серед них є сполуки з важливим значенням для біохімії, фармакології, промисловості та сільського господарства [1-2]. Зокрема в практичну діяльність впроваджено ряд сполук 1,2,4-триазолу з антибактеріальними та протигрибковими властивостями [2]. Триазолам притаманні й високі протикорозійні властивості [3-8] і в умовах мікробної корозії [3, 6, 9-10]. Є повідомлення про антибактеріальні властивості похідних 4-аміно-5-феніл-1,2,4-триазол-3-тіолу [11]. У той же час відомості про чутливість корозійно небезпечних бактерій до 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів у доступній нам літературі відсутні.

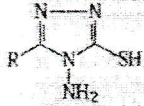
Похідні триазолу є гетероциклічними сполуками і належать до ксенобіотиків, що зумовлює потребу оперативної та економічної системи тестування їх потенційної небезпеки. Значної уваги набули дослідження токсикантів методами біотестування з використанням різноманітних тест-рослин [12-17]. Стандарним тест-об'єктом для визначення токсикантів є цибуля ріпчаста (*Allium cepa* L.) [18-20]. При цьому

вимірюють довжину корінця паростків цибулі (ростовий тест), оцінюють мітотичний індекс та хромосомні аберації в клітинах кореневої меристеми паростків (*Allium*-тест).

Тому метою даної роботи було дослідження цитотоксичних та антибактеріальних (щодо корозійно небезпечних бактерій) властивостей 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджували 5-заміщені 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіоли (рис.1), які синтезовані на кафедрі хімії Чернівецького національного педагогічного університету імені Т.Г.Шевченка під керівництвом д.фарм.н. Демченка А.М.



Умовне позначення	R	Назва
I	H-	4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіол
II	CH ₃ -	4-аміно-5-метил-1,2,4-триазол-3-тіол
III	C ₂ H ₅ -	4-аміно-5-етил-1,2,4-триазол-3-тіол
IV	C ₆ H ₅ -	4-аміно-5-феніл-1,2,4-триазол-3-тіол

Рис. 1. Формули 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів

Як тест-рослину використали вибуваю ріпчасту (*Alliaria L.*) сорту Ханцедоя. Насіння цибулі розміщували в чашках Петрі по 50 штук на фільтрувальному папері, який змочували дистильованою водою з додаванням етилового спирту (контроль) або водно-спиртовим розчином відповідної сполуки з концентрацією 100 мкг/мл (дослід). Чашки з насінням розміщували в термостаті при температурі 24-25°C і щодобово зволожували однаковою кількістю розчину. Повторність досліду триразова. На 3-ю добу визначали довжину корінців та розраховували фітотоксичний ефект [17].

З кореневої меристеми паростків виготовляли тимчасові давлені препарати за загально прийнятою методикою та розраховували мітотичний індекс (МІ, %), відносну довжину кожної фази мітозу (профази – П, метафази – М, анафази – А, телофази – Т, %) [21]. Вивчення генотоксичності похідних проводили ана-телофазним методом, визначаючи частоту аберантних хромосом (ЧА, %) [21].

Для оцінки антибактеріальних властивостей сполук як тест-культури використали 5-добові накопичувальні культури корозійно-активних бактерій – сульфатвідновлювальних (СВВ) та азотфіксувальних (АМБ). Культури отримано нами з ґрунту феросфери сталіної труби, що кородувала, після п'яти пасажів на середовищах Постгейта "В" та м'ясо-пептонному бульйоні відповідно за умов періодичного культивування [22]. Титр бактерій складав 10⁵ клітин у 1 мл селективних середовищ. Чисельність мікроорганізмів визначали за допомогою таблиць Мак-Креді [22].

Чутливість культур мікроорганізмів до похідних визначали методом дифузії в агар із використанням стерильних паперових дисків [23], змочених 1,0% (60 мкг/диск) та 2,0% (120 мкг/диск) розчинами відповідних речовин. Для вирощування СВВ використовували метод Л.Д.Штурми у модифікації В.І. Дули [24]. За діаметром зони пригнічення росту мікроорганізмів визначали їх чутливість до речовин [23].

При обробці експериментальних даних визначали середні квадратичні відхилення [25]. Як критерій оцінки достовірності змін, що спостерігали, використали t-критерій Стьюдента. Статистичну обробку результатів дослідження проводили для рівня значимості 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження токсичності похідних за ростовим тестом щодо *A. cepa* L. наведено на рис. 2.

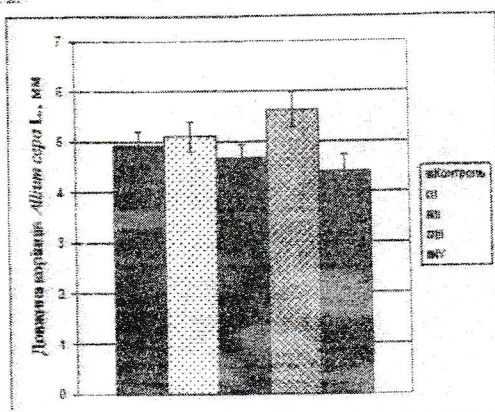


Рис. 2. Довжина корінців цибулі ріпчастої під впливом похідних

Встановлено відсутність фітотоксичної активності досліджених сполук щодо довжини корінців тест-рослини – зафіксовані зміни знаходилися в межах контролю (рис.2).

Результати дослідження цитогенетичних показників кореневої меристеми цибулі ріпчастої під впливом похідних наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Цитогенетичні показники клітин кореневої меристеми *A. cepa* L. під впливом похідних

Сполука	Відносна тривалість фаз мітозу, %				M1, %	ЧА, %
	П	М	А	Т		
Контроль	23,4±3,6	23,1±4,6	28,4±2,9	27,7±6,5	96,1±11,2	1,9
I	22,5±1,2	21,3±2,1	24,8±3,6	31,4±3,8	74,7±4,3	1,2
II	22,8±3,6	21,7±3,8	26,7±2,7	28,8±2,0	84,6±1,7	2,9
III	26,5±4,3	24,0±3,8	24,5±4,5	25,0±2,3	87,1±3,5	1,7
IV	16,0±1,6	26,0±2,5	21,0±6,1	37,0±7,9	60,7±9,3	12,7

Встановлено, що похідні не вплинули на мітогичний індекс, тривалість фаз мітозу, оскільки зафіксовані відмінності від контролю статистично недостовірні.

Відмічені частоти аберантних хромосом знаходяться в межах контрольного значення (за виключенням сполуки IV) і, крім того, відповідають нормативному значенню ЧА за нормальних та комфортних умов для *A. cepa* L. [26]. Отже, сполуки I, II та III не мають мутагенних властивостей щодо цибулі ріпчастої. За присутності сполуки IV частота клітин з аберантними хромосомами зростає в 63.5 разу порівняно з контролем, хоча її значення і не дорівнює показнику за критичних умов (20,0%) для тест-рослини [26].

Біологічні науки

Результати дослідження чутливості бактерій до похідного I представлено на рис. 3. Встановлено, що за присутності похідних у концентраціях 60-120 мкг/диск СВБ та АМБ розвивалися, оскільки зони пригнічення росту бактерій відсутні (рис. 3). Результати дії сполук II-IV на ріст бактерій тест-культур аналогічні. Отже, асоціативні культури корозійно небезпечних СВБ та АМБ виявились нечутливими до похідних у досліджених концентраціях, що робить похідні неперспективними сполуками для захисту від мікробної корозії, індукованої сульфатвідновлювальними бактеріями.

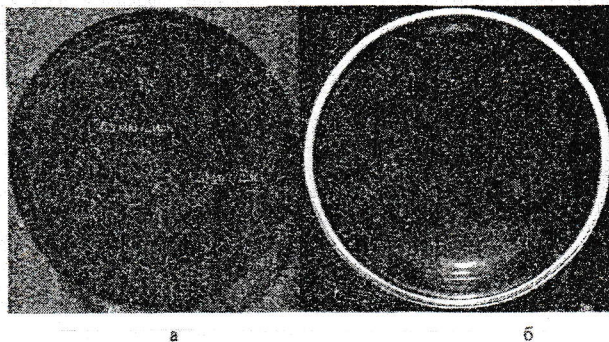


Рис. 3. Чутливість асоціативних культур корозійно небезпечних бактерій до сполуки I: а – СВБ; б – АМБ

У перспективі планується синтезувати похідні 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів як по аміногрупі, так і по атому Сульфуру в третьому положенні гетероциклическої системи з метою вивчення їх цитотоксичної та антибактеріальної активності.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено відсутність антибактеріальних властивостей щодо асоціативних культур корозійно небезпечних сульфатвідновлювальних та амоніфікувальних бактерій у досліджених 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів, що робить ці похідні неперспективними сполуками для захисту від мікробної корозії, індукованої сульфатвідновлювальними бактеріями.
2. Встановлено відсутність цитотоксичних та генотоксичних властивостей у досліджених 5-заміщених 4-аміно-1,2,4-триазол-3-тіолів, що відкриває перспективи пошуку в похідних інших біологічних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение // Николай Николаевич Мельников. – М.: Химия, 1987. – 712 с.
2. Negwer M. Organic chemical drugs and their synonyms / Martin Negwer. – [7-th revised]. - Berlin: Acad. Verlag., 1994. – P.4284.
3. Царенко И.В. Ингибирование коррозии пятичленными полиазотистыми гетероциклами. II. 1,2,4-триазолы / И.В.Царенко, А.В.Макаревич, Т.П.Кофман // Защита металлов. – 1997. – Т.33, № 4. – С. 415-417.
4. A benzotriazole derivative as a pretreatment corrosion inhibitor for copper / [Notoya T., Satake M., Yashiro H. et al.] // 15th International Corrosion Congress, Frontiers in Corrosion Science and Technology, September 22 to 27, 2002; Abstracts. - Granada (Spain), 2002. – P. 290.

5. El Hajjaji S. Synthesis and evaluation of the inhibitor effect of a new class of triazole compounds / S. El Hajjaji, A. Lganri, D. Aziane et al. // *Progress In Organic Coatings*. - 2000. - Vol.38, № 3-4. - P. 207-212.
6. Tsarenko I.V. Microbicidal properties of polymer films modified by 5-membered polynitrogen heterocycles / Tsarenko I.V., Makarevich A.V., Orekhov D.A. // *Bioprocess Engineering*. - 1998. - Vol.19, № 6. - P. 469-473.
7. Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18. Corrosion inhibition of oxidant-based anti-microbial compositions: Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18/ Green Bruce Philip. - № 9417241.8; Заявл. 26.8.94; Оpubл. 06.03.96; НКИ А5Е. - 7 с.
8. Пат. 5968408 США, МПК С 07 D 249/18, С 09 К 3/00. Methods of inhibiting corrosion using isomers of chloromethylbenzotriazole: Пат. 5968408 США, МПК С 07 D 249/18, С 09 К 3/00/ Anderson Sydia B., Cheng Longchun, Cady Michael A. (США); BetzDearborn Inc. - № 09/103493; Заявл. 24.06.98; Оpubл. 19.10.99; НПК 282/180. - 9 с.
9. Герасименко А.А. Защита машин от биовреждений / Анатолий Андреевич Герасименко. - М.: Машиностроение, 1984. - 112 с.
10. Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18. Corrosion inhibition of oxidant-based anti-microbial compositions: Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18/ Green Bruce Philip. - № 9417241.8; Заявл. 26.8.94; Оpubл. 06.03.96; НКИ А5Е. - 7 с.
11. Sahoo P.K. Synthesis and evaluation of 4-amino-5-phenyl-4H-[1,2,4]-triazole-3-thiol derivatives as antimicrobial agents / Prasanta K. Sahoo, Rajesh Sharma, Priyabrata Pattanayak // *Medicinal Chemistry Research*. - 2010. - vol. 19, n 2. - P. 127-135.
12. Vig B.K. Alteration by mitomycin C of spot frequencies in soybean leaves / B.K. Vig, E.F. Paddock // *Journal of Heredity*. - 1986. - Vol. 59. - P. 225-229.
13. Sandhu S.S. Status report of the International Programm on Chemical Safety's Collaborative study of plant test-system / S.S. Sandhu, F.G. De Serres, H.N.B. Gopalan et al. // *Mutation Research*. - 1991. - Vol. 257. - P. 19-25.
14. Solanki L.S. Effect of different mutagen on MI parameters in lentil / L.S. Solanki, B. Sharma // *Lens Newsletter*. - 1992. - Vol.19, № 2. - P. 9-11.
15. Цой Р.М. Эффективность различных тест-систем в оценке мутагенной активности загрязненных вод / Р.М. Цой, И.В. Пак // *Экология*. - 1996. - № 3. - С. 194-197.
16. Grant W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens / W.F. Grant // *Mutation Research*. - 1994. - Vol. 310. - P. 175-185.
17. Багдасарян А.С. Биотестирование почв техногенных зон городских территорий с использованием растительных организмов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Багдасарян Александр Сергеевич. - Ставрополь, 2005. - 159 с.
18. Constantin M.J. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay. A report of US EPA Gene-Tox programme / M.J. Constantin, E.T. Owen // *Mutation Research*. - 1982. - Vol. 99. - P.1-12.
19. Cauhan L.K.S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa* / L.K.S. Cauhan, P.N. Saxena, S.K. Gupta // *Environmental and Experimental Botany*. - 1999. - Vol. 42. - P.181-189.

20. Niliifer A. Evaluation of clastogenicity of 4,6-Dinitro-*o*-cresol (DNOC) in *Allium* root tip test / A. Niliifer, C. Serap, S. Senay, Y. Dilek, Ö. Özelm // *Journal of Biological and Environmental Sciences*. – 2008. – №2. – P.59–63.
21. Практикум по цитогенетиці / [Гостинский С.А., Дьяков М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А.] – М.: МГУ, 1974. – 275 с.
22. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов: лабораторное руководство. / В.И. Романенко, С.И. Кузнецов. – Л.: Наука, 1974. – 194 с.
23. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Николай Сергеевич Егоров. – М.: Высш. шк., 1969. – 479 с.
24. Бабьева И.П. Биология почвы: учебник [для студ. высш. уч. завед.] / И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 336 с.
25. Плохинский Н.А. Биометрия / Николай Александрович Плохинский. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1970. – 368 с.
26. Моніторинг довкілля / [Боголюбов В.М., Клименко М.О., Мокін В.Б. та ін.]; під ред. В.М.Боголюбова. – [2-е вид., перероб. і доп.]. - Вінниця: ВНТУ, 2010. – 232 с.