

УДК: 575.224.46

**Изучение мутагенной и модифицирующей активности новых биологически активных веществ амниоцена и его аналога в микробных тестах  
Н.Г.Стрижельчик**

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Исследовали потенциальную мутагенную и модифицирующую активность новых биологически активных веществ: амниоцена и его аналога, полученных из амниотической ткани человека и обладающих противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами. Исследования проводили в тесте Эймса-Salmonella/микросомы млекопитающих в системе *in vitro*. Установлено, что новые препараты и их метаболиты не индуцируют His<sup>+</sup>-ревертанты в условиях как с метаболической активацией, так и без нее, и не проявляют комутагенной активности в отношении стандартного мутагена 2-нитрофлуорена. Полученные результаты обсуждаются в отношении возможности использования изучаемых веществ в медицинской практике.

Ключевые слова: *индуцированный мутагенез, биологически активные вещества, мутагенная и модифицирующая активность, генные мутации.*

**Введение**

Проблема генетических последствий химического мутагенеза имеет множество аспектов, одним из которых является лекарственный мутагенез (Рапопорт, 1970; Бочков, 1997; Дубинин, 1999). Интенсивное развитие фармацевтической промышленности ведет к тому, что практически каждый человек становится объектом воздействия лекарственных препаратов (Фонштейн и др., 1988). Многочисленные исследования показали, что большинство из них обладают мутагенной активностью (Johnston, Jasirson, 1992; Дурнев, Середенин, 1998; Ревазова, Журков, 2001).

В то же время известным фактом является то, что здоровье будущего поколения людей в значительной степени зависит от того, какой генетический груз они накопили в виде мутаций. Поражение генома человека ведет к появлению различных патологий: злокачественным новообразованиям, спонтанным абортam, множественным порокам развития у детей, преждевременному старению и многим другим (Бочков, Катосова, 1992; Бочков и др., 1996; Барилляк, 2003).

Основным принципом тестирования лекарственных препаратов на мутагенность является этапность, включающая этап выявления мутагенов с помощью краткосрочных тестов и этап количественной оценки мутагенности веществ в опытах на млекопитающих (Журков, 1988). Наиболее полно требованиям, предъявляемым к экспресс-методам тестирования генных мутаций, отвечают микробные тест-системы, основанные на использовании специально сконструированных штаммов бактерий.

Для мутагенов/канцерогенов важными являются реакции биотрансформации, которые приводят к метаболической активации исходных соединений (Белицкий, Худолей, 1998; Абилев, 1988). Возможности применения микробных тест-систем значительно расширились с созданием методов, позволяющих регистрировать на микроорганизмах мутагенность не только самих препаратов, а и их метаболитов, формирующихся в результате процесса метаболической активации под влиянием ферментных систем млекопитающих в условиях *in vitro* и *in vivo* (IARC, 1993). Более 76% канцерогенов обнаруживают мутагенную активность в тесте Эймса (Дуган и др., 1990; Дуган, 1998).

Целью данной работы является изучение в микробных тестах в системе *in vitro* потенциальной мутагенной и модифицирующей активности новых биологически активных веществ – амниоцена и его аналога, полученных из амниотической ткани человека.

**Объекты и методы исследования**

Исследования проводили на микроорганизмах. В качестве индикаторных микроорганизмов, согласно методическим рекомендациям Фармкомитета МОЗ Украины, использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. Использовали метод учета генных мутаций – тест Эймса-Salmonella/микросомы млекопитающих в системе метаболической активации *in vitro*. Наличие мутагенного действия регистрировали на основании индукции реверсии от ауксотрофности по гистидину к прототрофности (Ames et al., 1975). Набор выбранных штаммов позволяет зарегистрировать действие мутагенов, вызывающих мутации замены оснований (TA 100) или сдвиг рамки (TA 98) (Ames, 1989). Помимо мутации, обуславливающей ауксотрофность по гистидину, в геном индикаторных микроорганизмов внесены дополнительные мутации, ведущие к повышению

чувствительности к ряду химических мутагенов: *rfa*-мутация, вызывающая дефективность липополисахаридного комплекса клеточной стенки, и мутация в гене *utr-B*, ведущая к нарушению функционирования системы эксцизионной репарации бактериальной клетки. Кроме этого, в штаммы TA 98 и TA 100 введен фактор лекарственной резистентности, плаزمида pKM 101. Это еще больше повышает чувствительность индикаторных бактерий к мутагенному действию ряда химических веществ.

Исследования проводили в вариантах с полной (ПМАС) и неполной (НМАС) системой метаболической активации постмитохондриальной фракцией гомогената печени крыс (фракция S-9) с кофакторами. Для получения фракции S-9 использовали самцов крыс линии Вистар массой 150–170 г, которым с целью индукции микросомальных ферментов вводили фенобарбитал в дозе 80 мг/кг в течение трех дней (Бариляк та ін., 2000; Дуган, 1994). Полная микросомальная смесь включала фракцию S-9 гомогената печени крыс и кофакторы (НАДФ и глюкозо-6-фосфат). В вариантах с неполной активирующей смесью вместо кофакторов вносили соответствующий объем растворителя (H<sub>2</sub>O). Препараты растворяли *ex tempore* в стерильной дистиллированной воде.

Исследования проводили в нескольких сериях опытов. В первой серии опытов оценивали потенциальную мутагенную активность биологически активных веществ амниоцена и его аналога, полученных в ВНИИХТЛС и предложенных в качестве лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами. Исследовали дозы препаратов: 0,1; 1,0; 10,0; 100,0; 1000,0 мкл/чашку. В качестве позитивного контроля использовали стандартные мутагены: в вариантах НМАС – 2-нитрофлуорен (20 мкг/чашку) для штамма TA 98 и нитрозометилмочевину (100 мкг/чашку) для штамма TA 100, в вариантах ПМАС – 2-аминонитрофлуорен (40 мкг/чашку). В контрольных вариантах вносили соответствующий объем растворителя (H<sub>2</sub>O).

Статистическую обработку данных проводили по методу множественных сравнений Даннетта (Дуган, 1994). Согласно методическим рекомендациям, если «критерий Даннетта» меньше 0 (отрицательная величина), различия между опытными и контрольными вариантами статистически незначимы.

Во второй серии опытов оценивали потенциальную комутагенную активность амниоцена и его аналога. При этом оба препарата (в концентрации 100,0 мкл/чашку) вводили в слой полужидкого агара вместе с тест-культурой *Salmonella typhimurium*, штамм TA 98, и стандартным мутагеном 2-нитрофлуореном (в концентрации 20 мкг/чашку) – позитивный контроль (ПК). Для оценки статистической значимости сравниваемых значений использовали критерий Стьюдента *t* (Гублер, Генкин, 1973).

### Результаты и обсуждение

Задачей первой серии исследований являлось исследование частоты генных мутаций в тесте Эймса-*Salmonella*/микросомы млекопитающих при воздействии различных концентраций новых биологически активных веществ и/или их метаболитов в системе метаболической активации *in vitro*. Полученные результаты исследований отражены в таблице.

Под влиянием ферментов микросомального окисления, содержащихся во фракции S-9, исследуемые вещества подвергаются биотрансформации. Как исходные вещества, так и их метаболиты, если они обладают мутагенными свойствами, индуцируют мутации у соответствующих штаммов. Согласно полученным нами данным, новые препараты и их метаболиты не индуцируют мутации к прототрофности у используемых штаммов TA 100 и TA 98.

Как видно из таблицы, стандартные мутагены – 2-нитрофлуорен в концентрации 20 мкг/чашку, нитрозометилмочевина в концентрации 100 мкг/чашку и 2-аминонитрофлуорен в концентрации 40 мкг/чашку, используемые в этих опытах в качестве позитивного контроля, эффективно индуцировали обратные мутации типа замены пар оснований на штамме TA 100 и мутации сдвига рамки на штамме TA 98 при наличии или отсутствии метаболической активации. Реальных же различий по частоте His<sup>+</sup>-ревертантов на опытных чашках (при введении амниоцена) и чашках с чистым контролем получено не было. Аналогичные данные отмечены в опытах по изучению потенциальной мутагенной активности аналога.

Статистический анализ полученных данных, проведенный при помощи метода множественных сравнений Даннетта, выявил отсутствие достоверных различий между частотой His<sup>+</sup>-ревертантов в опытных и контрольных вариантах (табл.).

Следует отметить, что некоторые соединения, не будучи мутагенами, способны проявлять комутагенный эффект – усиливать или ускорять мутагенез. В связи с этим с целью выявления возможной комутагенной активности новых биологически активных веществ проведена вторая серия экспериментов в условиях химически индуцированного мутагенеза.

В качестве индуктора химического мутагенеза использован стандартный мутаген 2-нитрофлуорен. При этом амниоцен и его аналог (в концентрации 100,0 мкл/чашку) вводили в слой

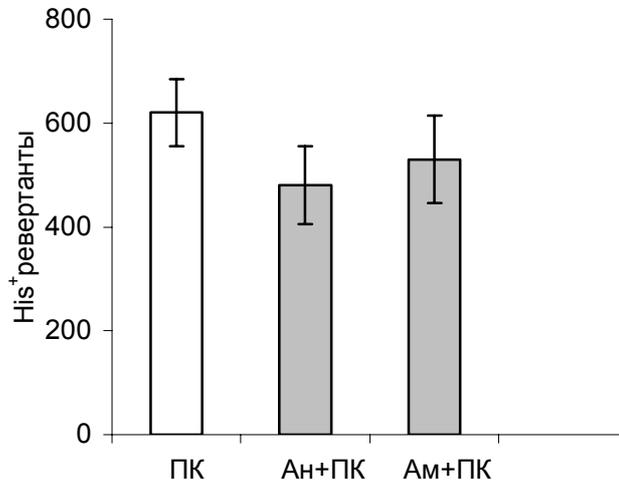
Таблица

Частота генных мутаций, индуцированных у *Salmonella typhimurium* новым биологически активным веществом амниоценом и его аналогом

Доза препарата в мкл/чашку	Штамм ТА 98						Штамм ТА 100					
	НМАС			ПМАС			НМАС			ПМАС		
	His <sup>+</sup> -ревертантов	критер. Дан-нетта	кратность	His <sup>+</sup> -ревертантов	критер. Дан-нетта	кратность	His <sup>+</sup> -ревертантов	критер. Дан-нетта	кратность	His <sup>+</sup> -ревертантов	критер. Дан-нетта	кратность
Контроль												
-	13,5±4	-	-	26,8±5	-	-	60,0±12	-	-	83,9±24	-	-
Амниоцен												
0,1	20,6±6	- 0,32	1,52	35,3±6	- 0,33	1,31	86,6±15	- 0,52	1,44	110,6±10	- 0,22	1,31
1,0	22,6±8	- 0,27	1,67	28,6±3	- 0,54	1,06	79,8±11	- 0,60	1,33	118,0±9	- 0,15	1,40
10,0	26,0±4	- 0,16	1,92	34,3±6	- 0,36	1,27	80,0±15	- 0,68	1,33	115,3±19	- 0,17	1,37
100,0	22,3±6	- 0,33	1,65	24,3±3	- 0,20	0,9	112,0±20	- 0,28	1,86	121,0±23	- 0,13	1,44
1000,0	27,0±6	- 0,09	2,00	22,3±5	- 0,70	0,83	88,6±22	- 0,50	1,47	126,0±14	- 0,09	1,50
Аналог												
0,1	26,3±5	- 0,82	1,94	26,0±6	- 0,38	0,97	81,4±15	- 0,51	1,35	98,4±10	- 0,15	1,17
1,0	25,2±7	- 0,12	1,86	29,6±8	- 0,30	1,10	75,9±11	- 0,58	1,26	103,5±9	- 0,14	1,23
10,0	20,3±4	- 0,34	1,50	38,8±5	- 0,04	1,44	80,6±15	- 0,52	1,34	101,4±12	- 0,16	1,20
100,0	27,9±6	- 0,02	2,06	35,5±3	- 0,13	1,32	107,7±25	- 0,23	1,79	103,5±24	- 0,14	1,23
1000,0	19,2±5	- 0,59	1,42	38,4±6	- 0,05	1,43	78,2±22	- 0,55	1,30	112,1±15	- 0,06	1,33
2-нитрофлуорен												
20	640±64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нитрозометилмочевина												
100	-	-	-	-	-	-	920±87	-	-	-	-	-
2-аминонитрофлуорен												
40	-	-	-	560±48	-	-	-	-	-	680±56	-	-

полужидкого агара вместе с тест-культурой *Salmonella typhimurium*, штамм TA 98, и 2-нитрофлуореном (в концентрации 20 мкг/чашку) (ПК) (рис.).

В этой серии опытов 2-нитрофлуорен индуцировал  $620 \pm 64$  His<sup>+</sup>-ревертантов на чашку. При совместном введении 2-нитрофлуорена с амниоценом (Ам+ПК) или его аналогом (Ан+ПК) частота His<sup>+</sup>-ревертантов не превышала уровня позитивного контроля и составляла  $480 \pm 75$  и  $530 \pm 84$ , соответственно.



**Рис. Влияние амниоцена и его аналога на частоту генных мутаций, индуцированных 2-нитрофлуореном в клетках *Salmonella typhimurium***

По оси ординат: частота His<sup>+</sup>-ревертантов. По оси абсцисс: ПК – позитивный контроль (2-нитрофлуорен); Ан+ПК – аналог+2-нитрофлуорен; Ам+ПК – амниоцен+2-нитрофлуорен.

Статистический анализ полученных данных не выявил достоверного влияния как амниоцена, так и его аналога на частоту His<sup>+</sup>-ревертантов, индуцированных 2-нитрофлуореном ( $t_1=1,41$ ;  $t_2=0,81$ ;  $P>0,05$ ).

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований по оценке потенциальной мутагенной активности новых биологически активных веществ амниоцена и его аналога установлено, что изучаемые вещества и их метаболиты не вызывают индукции His<sup>+</sup>-ревертантов у *Salmonella typhimurium*, штаммах TA 100 и TA 98, как в условиях с метаболической активацией фракцией S-9 гомогената печени крыс, так и без нее, и не проявляют комутагенной активности в отношении стандартного мутагена – 2-нитрофлуорена.

#### Список литературы

- Абилев С.К. Основные классы химических соединений, мутагенное действие которых связано с активностью их метаболитов // Итоги науки и техники. Серия общая генетика. – М.: ВИНТИ, 1988. – Вып.9. – 197с.
- Барияк І.Р. Актуальні питання профілактики спадкової патології // Український конгрес з клінічної генетики з міжнародною участю «Метаболічні спадкові захворювання». – Харків, 2003. – С.10.
- Барияк І.Р., Неумержицька Л.В., Дуган О.М. та ін. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів // Доклінічні іспити лікарських засобів (методичні рекомендації). – К: ФК МЗ України, 2000. – С. 166–186.
- Белицкий Г.А., Худoley В.В. Краткосрочные тесты в системе выявления канцерогенных для человека химических соединений // Вопросы онкологии. – М., 1998. – Т.32, №4. – С. 1–3.
- Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: Медицина, 1997. – 180с.
- Бочков Н.П., Жученко Е.А., Кириллова Е.А. и др. Мониторинг врожденных пороков развития // Российский вестник перинатал. и педиатр. – М.,1996. – №2. – С. 20–26.
- Бочков Н.П., Катосова Л.Д. Генетический мониторинг популяции человека при реальных химических и радиационных нагрузках // Вестник РАМН. – 1992. – №4. – С. 10–14.
- Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – М.: Медицина, 1973. – С. 21–25, 53–56.
- Дубинин Н.П. Некоторые проблемы современной генетики. – М.: Наука, 1999. – 222с.
- Дуган А.М. *Salmonella typhimurium* как тест-система для выявления мутагенной активности загрязнителей окружающей среды // Цитология и генетика. – 1994. – Т.28, №3. – С. 37–41.

- Дуган О.М. Сумарна мутагенна активність як інтегральний показник оцінки еколого-генетичного стану довкілля. Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.15 / Укр. наук. гігієніч. центр. – К., 1998. – 39с.
- Дуган А.М., Журков В.С., Абишев С.К. Критерии оценки мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. – 1990. – Т.25, №4. – С. 41–45.
- Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены – скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. – М.: Медицина, 1998. – 397с.
- Журков В.С. Методические основы и принципы оценки мутагенных эффектов факторов окружающей среды. Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук: 03.00.15 / НИИ общей и коммунальной гигиены имени А.Н.Сысина АМН СССР. – М., 1988. – 36с.
- Рапопорт И.А. Химические мутагены, опасные для человека // Проблемы медицинской генетики. – М.: Медицина, 1970. – С. 249–287.
- Ревазова Ю.А., Журков В.С. Генетические подходы к оценке безопасности факторов среды обитания человека // Вестник РАМН. – 2001. – №10. – С. 77–79.
- Фонштейн Л.М., Абишев С.К., Бобринев Е.Н. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические рекомендации. – М., 1988. – 34с.
- Ames B.N. Mutagenesis and carcinogens endogenous exogenous factor // Environ. Mol. Mutagen. – 1989. – Vol.14, Suppl.16. – P. 66–77.
- Ames B.N., Mc Cann J., Vamasaki E. Methods for detection carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test // Mutat. Res. – 1975. – Vol.31. – P. 347–364.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. – Lyon: IARC, 1993. – Vol.57. – 457p.
- Johnston J.D., Jasirson G.G. Reproductive and developmental hazards and employment policies // Brit. J. Ind. Med. – 1992. – Vol.49. – P. 85–94.

**Вивчення мутагенної і модифікуючої активності нових біологічно активних речовин амніоцену та його аналогу у мікробних тестах**  
**Н.Г.Стрижельчик**

Вивчали потенційну мутагенну та модифікуючу активність нових біологічно активних речовин амніоцену та його аналогу, здобутих із амніотичної тканини людини, які мають протизапальні властивості. Дослідження проводили в тесті Еймса-Salmonella/мікросоми ссавців у системі *in vitro*. Установлено, що нові препарати та їхні метаболіти не індукують His<sup>+</sup>-ревертанти як в умовах з метаболічною активацією, так і без неї, й не виявляють комутагенну активність відносно стандартного мутагену 2-нітрофлуорену. Отримані результати обговорюються щодо можливості використання нових препаратів у медичній практиці.

Ключові слова: *індукований мутагенез, біологічно активні речовини, мутагенна та модифікуюча активність, генні мутації.*

**Study of mutagenic and modifying effects of new bioactive substances amniocen and its analogue in microbial tests**  
**N.G.Strygelchik**

The potential mutagenic and modifying effects of new bioactive substances amniocen and its analogue derived from human amniotic tissue and possessing anti-inflammatory and healing effects have been investigated. The Ames test-Salmonella/mammal microsomes *in vitro* has been used. It was shown that the new substances amniocen and its analogue as well as their metabolites did not induce His<sup>+</sup>-mutations both under the metabolic activation and without it. They also did not possess comutagenic effect to the standard mutagene 2-nitrofluorene. The obtained results have been discussed in terms of possible usage of the studied substances in the medical practice.

Key words: *induced mutagenesis, bioactive substances, mutagenic and modifying effects, gene mutations.*

---

Представлено С.В.Малишкіною  
Рекомендовано до друку А.В.Некрасовою