

Г.П.Погосян, К.А.Жумашева, А.А.Коновалова

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: zkkbg@mail.ru)

Определение мутагенной активности производных тиазола и бензотиазола

В статье представлены данные об изучении потенциальных лекарственных препаратов. Проведен анализ 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола на предмет обнаружения мутагенной активности с применением теста Эймса. Для выявления мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания использовались штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. В ходе эксперимента не выявлено мутагенной активности исследуемых веществ при использовании обоих штаммов.

Ключевые слова: тиазол, бензотиазол, фосфорилирование, биологическая активность, мутагенез, мутации, тест Эймса, генотоксичность, *Salmonella typhimurium*, штамм, тест-система, сдвиг рамки считывания, вставка-выпадение нуклеотида, мутагенная активность, гистидиновый оперон, прототрофность, ауксотрофность.

Появление новых химических соединений требует проведения исследований для определения свойств, с целью дальнейшего их использования в качестве фармацевтических препаратов. В связи с быстрыми темпами развития фармакологической науки во всем мире значительно увеличился интерес к органической химии как основному источнику биологически активных веществ. Значительный интерес представляет химия гетероциклических соединений. Это связано с целым рядом особых свойств, проявляющихся у подобных веществ. К данным свойствам можно отнести различные виды фунгицидной, акарицидной, фармакологической активности, новые оптические свойства получаемых органических соединений, возможность их применения во многих отраслях человеческой деятельности. Изучение мутагенной активности вновь синтезированных химических соединений необходимо для возможного их применения в качестве лекарственных препаратов.

Для определения мутагенного действия новых веществ в настоящее время используются методы, позволяющие определить возникновение генных и хромосомных мутаций. Тест, выявляющий наличие генных мутаций, разработан в лаборатории доктора Эймса. Он основан на определении ревертантных колоний штаммов *S.typhimurium*, ауксотрофных по гистидину, к прототрофности. В работе использованы два штамма *S.typhimurium* TA 98 и TA 100, позволяющие определить мутации двух типов: замены пар оснований и сдвига рамки считывания. Тестирование с применением этих двух штаммов позволяет всесторонне анализировать возможное мутагенное действие исследуемых веществ. В настоящее время в цитогенетических лабораториях также используется микроядерный тест, позволяющий без больших материальных и временных затрат определить хромосомные мутации в мазках крови лабораторных животных в качестве модельных объектов [1, 2].

С целью выявления возможного мутагенного влияния веществ, синтезированных учеными химического факультета КарГУ имени Е.А.Букетова, использовали методики, позволяющие оценить мутагенную активность. На сегодняшний день известны экспресс-методы для определения генных и хромосомных мутаций. Эти методы позволяют в короткие сроки, без больших материальных и временных затрат и в то же время с высокой степенью достоверности определить мутагенную активность испытуемых веществ.

В лаборатории молекулярной генетики исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга биолого-географического факультета КарГУ имени Е.А.Букетова имеются штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. Штаммы приобретены из Республиканской коллекции микроорганизмов. Из-за специально вызванных мутаций в гистидиновом опероне эти штаммы являются ауксотрофами по гистидину. Но под влиянием мутагена происходит реверсия к прототрофности, и штаммы обретают способность синтезировать гистидин. Используемые в настоящей работе культуры характеризуются наличием плазмиды рКМ 101, которая увеличивает вклад ошибочной репарации ДНК в общий процесс восстановления после мутагенного воздействия, тем самым значительно повышает чувствительность метода. Кроме того, эта плазида придает штаммам устойчивость к ампициллину, что облегчает их хранение на чашках с питательными средами. Причем штамм TA 98 ревертирует к прототрофности путем сдвига рамки считывания, а штамм TA 100 — путем замены пар оснований [3].

В ходе эксперимента тестировали производные тиазола и бензотиазола, а именно 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола. Следуя рекомендациям методики, вещества испытывали в концентрациях 0,1000 мг/мл, 0,0100 мг/мл, 0,0010 мг/мл. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфан (500 мг/чашку) для штамма ТА 100 и бромистый этидий (10 мг/мл) для штамма ТА 98. В качестве негативного контроля применяли стерильную дистиллированную воду, а также диметилсульфоксид, который являлся растворителем исследуемых соединений.

Для проведения эксперимента первоначально определяли соответствие штаммов генотипам. Для этого высевали их на чашки Петри с эндо агаром, способствующим росту микроорганизмов группы энтеробактерий, к которым относятся и штаммы *Salmonella typhimurium*. В среду добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для определения ауксотрофности по гистидину выращивали ночную культуру, высевали на чашки Петри с минимальной средой с целью получения газона бактериальной культуры. Затем наносили гистидин и стерильную воду на стерильный диск фильтровальной бумаги, помещенный в середину чашки [4].

После определения генотипов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили исследования на определение генных мутаций испытуемых веществ.

С каждым штаммом проводили эксперимент по 10 раз. Каждый раз определяли титр бактериальной культуры. Для этого ночную культуру подращивали в 100 мл питательной среды (мясопептонном бульоне) при непрерывном покачивании в шейкере. Для определения титра культуры проводили серию десятикратных разведений в стерильной дистиллированной воде. Затем шпателированием высевали культуру на чашки со средой эндо с 6 и 7 разведениями. Выращивали штаммы в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов. Затем подсчитывали количество выросших колоний на чашках с соответствующим разведением культуры. Титр культуры *Salmonella typhimurium* ТА 98 составлял $2,2\text{--}2,7 \times 10^9$, *Salmonella typhimurium* ТА 100 — $2,5\text{--}3,1 \times 10^9$.

Фотография одного из экспериментов представлена на рисунке.

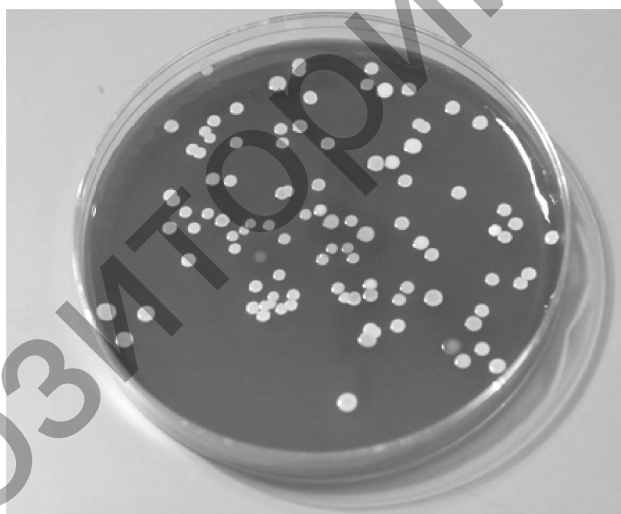


Рисунок. Рост колоний *Salmonella typhimurium* ТА 98 из седьмого разведения

Рисунок демонстрирует количество колоний, выросших после серий десятикратных разведений. Процедура необходима для определения титра бактериальной культуры с целью анализа данных, полученных в результате эксперимента.

Большое количество бактериальных клеток, составляющее в наших экспериментах 10^9 , необходимо для определения возможной мутагенной активности тестируемых веществ. Учитывая, что спонтанные мутации возникают с частотой 1 на $10^6\text{--}10^7$ клеток, нам удалось вырастить индикаторные штаммы до нужной степени.

С полученной суспензией штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили последующие манипуляции. Для этого вносили в пробирки с верхним полужидким агаром последовательно тестируемое вещество, биотин, гистидин и один из используемых штаммов. Чтобы не застыл агар и в то же время не погибла культура микроорганизмов, поддерживали температуру среды 45 °С. После наложения верхнего агара на нижний минимальный 1,5 %-ный агар чашки подсушивали в течение

30–40 минут, ставили в термостат на 37 °С. Количество колоний-ревертантов подсчитывали через 48 часов.

В экспериментах со штаммами *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 использовали по 3 чашки для каждой концентрации тестируемого вещества.

Для оценки степени мутагенности использовали шкалу, предложенную Эймсом, Фонштейном. Согласно ей возможны результаты, приведенные ниже:

1. Количество колоний на опытных и контрольных чашках различается более чем в 2,5 раза. Следовательно, в данном эксперименте мутагенной активности не выявлено. Индекс мутагенности (–).

2. Число колоний на опытных чашках превышает контрольное в 2,5–10 раз. Выявлена слабая степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (+).

3. Число ревертантных колоний на опытных чашках на один-два порядка превышает контрольное. Выявлена средняя степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (++).

4. Число колоний на опытных чашках более чем в 100 раз превышает показатель числа колоний на чашках с чистым контролем. Выявлена сильная степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (+++) [5].

Результаты анализа мутагенной активности 2-амино-4-фенилтиазола приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Уровень колоний-ревертантов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100, выросших под действием 2-амино-4-фенилтиазола

Штамм	Количество колоний						
	2-Амино-4-фенилтиазол			Контроль положительный		Контроль отрицательный	
	0,1000 мкг/мл	0,0100 мкг/мл	0,0010 мкг/мл	Бромистый этидий	Цикло-фосфан	Стерильная вода	ДМСО
ТА 98	55	78	65	$2,5 \times 10^4$	–	23	68
ТА 100	175	190	180	–	$3,4 \times 10^4$	154	200

Как видно из таблицы 1, количество колоний-ревертантов на чашках с 2-амино-4-фенилтиазолом соизмеримо с уровнем бактерий на среде с добавлением отрицательных контрольных образцов: стерильной воды и диметилсульфоксида. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения. Не обнаружено увеличения количества ревертантных колоний *Salmonella typhimurium* ни в случае со штаммом ТА 98, ни при использовании штамма ТА 100. Следовательно, 2-амино-4-фенилтиазол не вызывает генных мутаций ни с заменой пар оснований, ни со сдвигом рамки считывания.

С целью определения мутагенной активности 7-бром-2-аминобензотиазола проводили исследования, аналогичные описанным выше при тестировании 2-амино-4-фенилтиазола. Определяли мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания. Выращивали культуры штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 до плотности 10^6 – 10^7 . Освежали их, помещая в колбы с мясопептонным бульоном и продолжали выращивать при температуре 37 °С с покачиванием. После центрифугирования и промывания в фосфатном буфере ресуспендировали клетки, доводя плотность культуры до 10^9 . Для определения титра бактериальных культур *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили серию десятикратных разведений в стерильной воде. С целью определения титра бактериальной культуры высевали на чашки с 6 и 7 разведениями. Количество бактериальных клеток в 1 мл в среднем составляло: для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 98 — 10^9 , для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 100 — 10^9 .

Как и в случае с тестированием 2-амино-4-фенилтиазола, в экспериментах со штаммами *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 использовали по 3 чашки для каждой концентрации тестируемого вещества. Каждый эксперимент выполняли в десяти повторностях. Подсчитывали количество колоний с обратными мутациями от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Средние данные по количеству колоний-ревертантов, выросших при тестировании 7-бром-2-аминобензотиазола, положительных и отрицательных контрольных образцов, представлены в таблице 2.

Уровень колоний-ревертантов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100, выросших под действием 7-бром-2-аминобензотиазола

Штамм	Количество колоний						
	7-Бром-2-аминобензотиазол			Контроль положительный		Контроль отрицательный	
	0,1000 мкг/мл	0,0100 мкг/мл	0,0010 мкг/мл	Бромистый этидий	Цикло- фосфан	Стерильная вода	ДМСО
ТА 98	30	27	43	2500	–	23	35
ТА 100	220	180	200	–	3400	150	190

Данные таблицы 2 демонстрируют отсутствие мутагенной активности 7-бром-2-аминобензотиазола, поскольку количество ревертантных колоний, выросших на минимальной среде при добавлении тестируемого вещества, а также отрицательных контрольных образцов стерильной воды и диметилсульфоксида оказалось приблизительно одинаковым при использовании обоих штаммов — как *Salmonella typhimurium* ТА 98, так и *Salmonella typhimurium* ТА 100. Этот факт доказывает, что 7-бром-2-аминобензотиазол не вызывает ни мутации типа сдвига рамки считывания, ни замены пар оснований.

В среднем титр бактериальной культуры составил у штамма *Salmonella typhimurium* ТА 98 — $2,2 \times 10^9$. В 6-м разведении — от 118 колоний до 270, в 7-м — от 13 до 36 колоний. Для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 100 — $2,7 \times 10^9$. В 6-м разведении — от 170 колоний до 310, в 7-м — от 26 до 35 колоний.

Дальнейшие исследования предполагают расширение спектра тестируемых соединений с потенциальной фармацевтической активностью, а также продолжение тестирования 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола в микробиологическом тесте Эймса с метаболической активацией *in vivo / in vitro*.

Список литературы

- 1 Харбиев Р.В. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
- 2 Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
- 3 Оценка мутагенности новых лекарственных средств: Метод. рекомендации. — М., 1994. — 20 с.
- 4 Bahrami K., Khodae M.M., Naali F. Mild and Highly Efficient Method for the Synthesis of 2-Arylbenzimidazoles and 2-Arylbenzothiazoles // J. Org. Chem. — 2008. — Vol. 73. — P. 6835–6837.
- 5 Гуськова Т.Д. Оценка безопасности лекарственных средств на стадии доклинического изучения // Хим.-фарм. журн. — 1990. — № 7. — С. 10–15.

Г.П.Погосян, К.А.Жумашева, А.А.Коновалова

Тиазол мен бензотиазол туындыларының мутагенді белсенділігін анықтау

Мақалада 2-амино-4-фенилтиазол мен 7-бром-2-аминобензотиазол потенциалдық дәрілік құралдарының мутагенді белсенділігін зерттеу бойынша мәліметтер ұсынылды. Сыналып жатқан заттар Эймс тестісін пайдалану арқылы жүзеге асты. Негіздер жұптарының алмасуы және оқу жиіктемелерінің жылжып кетуі сияқты мутацияларды анықтау үшін *Salmonella typhimurium* ТА 98 бен ТА 100 штамдары қолданылды. Осы екі штамның пайдалануымен өткізілген сынақ-тәжірибелердің нәтижелері бойынша зерттелінген заттардың мутагенді белсенділігі анықталған жоқ.

G.P.Pogosyan, K.A.Zhumasheva, A.A.Konovalova

Determination of mutagenic activity of thiazole and benzothiazole derivatives

This article contains research data about the potential drugs of 2-amino-4-phenyl-thiazole and 7-bromo-2-aminobenzothiazole for mutagenic activity detection. The tested compounds were studied using the Ames test. The strain *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 were used for detecting a mutation base pair substitutions and frame shift. The experiments showed no mutagenic activity of test substances using both strains.

References

- 1 Kharbiev R.U. *Guidelines for experimental (preclinical) studies of new pharmacological agents*, Moscow: Meditsina, 2005, 832 p.
- 2 Durnev A.D., Seredenin S. *Mutagens (screening and pharmacological prevention interventions)*, Moscow: Meditsina, 1998, 328 p.
- 3 *Evaluation of mutagenicity of new drugs: Guidelines*, Moscow, 1994, 20 p.
- 4 Bahrami K., Khodae M.M., Naali F. *J. Org. Chem.*, 2008, 73, p. 6835–6837.
- 5 Gus'kova T.D. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1990, 7, p. 10–15.