

Pine plantations mesofauna of the region Karaganda town

The article presents the information of soil invertebrates in pine forest cultures of different ages from the region of Karaganda town. The total number of pedobionts, the dominant trophic groups and the background species are determined. The dynamics of soil moisture is shown. The temperature conditions of the soil horizons are revealed. The interrelation of soil and vegetation conditions and environmental preferences of soil animals are educed. Recommendations for pine cultivation in the district of the town are proposed.

УДК 613:577. 616.02

К.А.Жумашева, Г.П.Погосян, Л.К.Салькеева, А.А.Жортарова,
Ш.К.Елеупаева, А.Ж.Шайбек, С.С.Тыржанова

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

Применение микробиологического теста Эймса для определения мутагенных свойств производных тиазола и бензотиазола

Отмечено, что современная наука формирует условия для поиска и создания новых фармакологических веществ, способных стать лекарственными препаратами, в связи с чем особый интерес представляют различные производные тиазола и аминотиазола как вещества, обладающие широким спектром биологической активности. Показано, что химические вещества индуцируют мутации всех трех типов: генные, хромосомные и геномные; универсального метода для их обнаружения не существует. В этой связи определено, что для изучения мутагенности используют несколько методов, позволяющих регистрировать индукцию различных категорий мутаций. Доказано, что тест Эймса является скрининговым методом, в котором в качестве индикатора мутагенности используются микроорганизмы; он позволяет быстро и недорого отобрать возможные мутагены.

Ключевые слова: лекарственные средства, фармакотерапия, заболевания человека, генетические мутации, индикаторные штаммы, *Salmonella typhimurium*, тест Эймса, экспериментальные исследования, структурные модификации.

Стремительное развитие фундаментальных наук формирует условия для создания новых фармакологических веществ, способных стать лекарственными препаратами. Новые источники получения потенциальных лекарственных средств значительно расширяют принципиальные возможности фармакотерапии основных заболеваний человека. Между тем внедрение современных препаратов в клиническую практику осуществимо лишь при условии детального изучения их специфической фармакологической активности и безопасности на этапе экспериментальных исследований.

Исследование мутагенности новых фармакологических средств и вспомогательных компонентов лекарственных форм проводится на этапе доклинического изучения безопасности их применения. Эта работа предусматривает оценку способности лекарственных средств к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках и делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств лекарств комплекса методов, выполняемых на различных тест-объектах [1].

Химические вещества индуцируют мутации всех трех типов: генные, хромосомные и геномные. Универсального метода для обнаружения всех типов мутаций не существует. В этой связи для изучения мутагенности используют несколько методов, позволяющих регистрировать индукцию различных категорий мутаций. К тому же изучение мутагенности на млекопитающих требует больших усилий, затрат и времени. Применение таких методов оправдано только при избирательном тестировании, т.е. при установлении очередности.

Один из подходов к установлению этой очередности заключается в ступенчатой системе испытаний, которая основывается на том, что фактически все генетически опасные вещества можно выявить с помощью простых или быстрых методов скрининга (просеивания). К скрининговым тест-

системам относятся методы, в которых в качестве индикатора мутагенности используются микроорганизмы. Мутагены, обнаруженные при скрининге, подвергаются всестороннему исследованию на тест-системах, позволяющих учитывать индукцию генетических нарушений в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*.

В настоящее время разработано несколько тестов для определения мутагенной активности различных веществ. Наиболее оптимальным из них является тест Эймса, не требующий больших материальных и временных затрат. Это — генетический тест с использованием бактерий *Salmonella Typhimurium* в качестве тест-объекта [1], предназначенный для оценки мутагенного потенциала химических соединений. Положительный результат в тесте означает, что химическое вещество может обладать канцерогенными свойствами. Так как малигнизация часто связана с повреждением ДНК, тест также используется как экспрессный метод оценки канцерогенного потенциала различных химических соединений и как дополнение другого аналогичного метода — стандартного теста на грызунах [1]. Методика была описана в ряде работ в начале 1970-х Брюсом Эймсом и его группой в Калифорнийском университете Беркли.

Тест Эймса является одним из основных методов в скрининговых программах различных стран, когда нужно сравнительно быстро проанализировать большое число соединений и отобрать среди них те, которые потенциально могут явиться мутагенами для человека. Такое широкое применение этого метода связано с высокой корреляцией между канцерогенной и мутагенной активностями химических веществ [1, 2].

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* является бактериальной тест-системой для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений и/или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.

Мутагены, индуцирующие замены пар оснований, — агенты, вызывающие мутации типа замены пар оснований в молекуле ДНК. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации или в другом сайте хромосомы.

Мутагены, индуцирующие мутации типа сдвига рамки считывания, — агенты, вызывающие вставку или делецию одной или нескольких пар оснований в молекуле ДНК.

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*.

Фармакологические средства с выраженной антибактериальной активностью изучать в тесте Эймса нецелесообразно, так как это приведет к гибели тест-объектов.

Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без нее. После инкубации в течение определенного периода времени подсчитывается количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативного контроля (необработанные культуры или культуры, обработанные растворителем).

Если тестируемое соединение и/или его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксо-трофности к прототрофности по гистидину у гистидинзависимых штаммов *Salmonella typhimurium* [1]. Схема постановки эксперимента приведена на рисунке.

В расплавленный полужидкий голодный агар вносят при 43–45° 0,1 мл суспензии бактерий индикаторного штамма (2·10⁸ клеток), 0,1 мл раствора испытуемого вещества в необходимой концентрации и 0,5 мл активирующей смеси. Содержимое пробирки перемешивают и быстро наслаивают на нижний селективный агар. Чашки инкубируют при 37° в течение 48 часов и учитывают количество колоний-ревертантов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Если вещество проявляет мутагенную активность, то количество ревертантов на опытных чашках превышает количество ревертантов в контроле [1–3].

В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*. Минимальный набор состоит из штаммов ТА 97, ТА 98 и ТА 100. При необходимости могут использоваться и другие виды и штаммы микроорганизмов.

Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину, поскольку эти штаммы содержат плазмиду ркМ101, кодирующую устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.

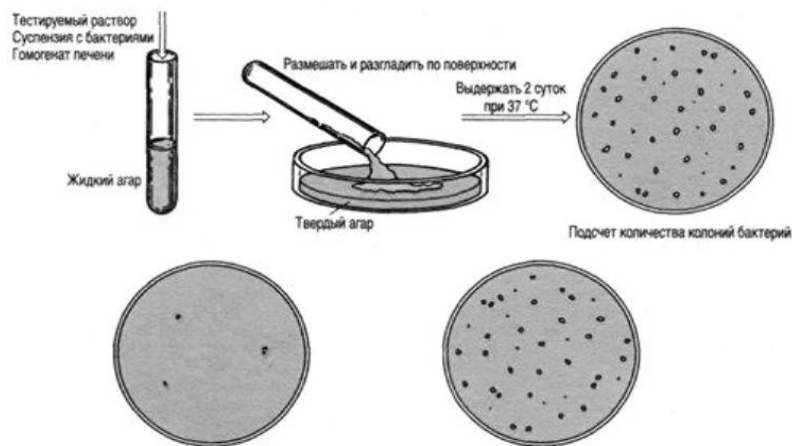


Рисунок. Схема постановки теста Эймса

Характеристика индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* приведена в таблице. Все штаммы являются производными лабораторного штамма *Salmonella typhimurium* LT-2, от которого под действием различных мутагенных агентов были получены ауксотрофные по гистидину мутанты G-46, C-207, C-3076 и D-3052. Первый мутант имеет мутацию замены оснований в С-гене гистидинового оперона и ревертирует к прототрофности под действием мутагенов, вызывающих соответственно мутации замены пар оснований. Остальные мутанты несут мутации типа сдвига считывания в С (C-207 и C-3076) и D (D-3952)-генах и ревертируют только под действием мутагенов, вызывающих этот тип мутаций [1–4].

Т а б л и ц а

Характеристика тест-штаммов *Salmonella typhimurium*

Штаммы	Мутации			Плазмида рКМ 101	Тип регистрируемых мутаций
	Ауксотрофность по гистидину	gfa	uvrB		
G-45	G-46	-	-	-	Замена оснований
ТА 1950	G-46	-	+	-	—>—
ТА 1534	D-3052	-	+	-	Сдвиг считывания
ТА 1535	G-46	+	+	-	Замена оснований
ТА 1536	C-207	+	+	-	Сдвиг считывания
ТА 1537	C-3076	+	+	-	—>—
ТА 1538	D-3052	+	+	-	—>—
ТА 100	G-46	+	+	+	Замена оснований
ТА 98	D-3552	+	+	+	Сдвиг считывания

Таблица демонстрирует тип мутаций в штаммах, а также их отношение к ауксотрофности по гистидину. Для повышения чувствительности этих мутантов к действию мутагенов в геном индикаторных бактерий были внесены дополнительные мутации, которые позволили получить широко используемые в настоящее время штаммы. Делеция galbiouvrB захватывает биотиновый оперон, часть галактозного оперона и ген uvrB. Последний дефект вызывает нарушение системы эксцизионной репарации, что еще более повышает чувствительность тестерных штаммов к действию ряда мутагенов. Мутация gfa увеличивает проницаемость клеточной стенки вследствие дефектов в полисахаридном слое.

Широкое применение нашли штаммы, несущие плазмиду рКМ 101. Новые штаммы ТА 100 и ТА 98, полученные путем передачи этой плазмиды соответственно в штаммы ТА 1535 и ТА 1538, оказались более чувствительными к действию ряда веществ, чем исходные бесплазмидные штаммы.

Для составления активирующей смеси обычно берут S-9 фракцию, НАДФ и глюкозо-6-фосфат. Последние представляют собой НАДФН-генерирующую систему: НАДФН служит в качестве донора электронов, который переносится на цитохром P-450.

В работе используют S-9 печени крыс, которым предварительно вводили индукторы микросом. В качестве индукторов применяют фенобарбитал, 3-метилхолантрен, полихлорированные бифенилы арохлор 1254 или совол [5].

Дальнейшее повышение чувствительности теста Эймса идет за счет конструирования новых штаммов. Известно, что тестерные штаммы *S.typhimurium* позволяют обнаружить не только мутагенную активность, но и устанавливать вероятные механизмы мутагенного действия, изучать зависимость активности от их химической структуры и метаболизм определенных групп соединений в бактериальной клетке. Все стало возможным в результате постоянного совершенствования тестерных штаммов путем введения новых мутаций, выгодно отличающих их от исходных. В настоящее время используют штаммы TA 1535, TA 100, TA 102, регистрирующие мутации типа замены пар оснований, TA 1538, TA 97 и TA 98 — мутации типа сдвига рамки считывания.

В отличие от других тестерных штаммов штаммы TA 102, TA 104 и TA 96 содержат в сайте мутации пары А-Т. Первые 2 штамма имеют охра-мутацию hisG 428 и регистрируют мутации типа замены пар оснований (ТА → ЦГ).

При создании штамма TA 102 использован новый подход [1–3]. Часть гистидинового оперона, содержащего аллель hisG 428, была введена в мультикопийную плазмиду pBR322. Полученная таким образом плаزمида pG1 была перенесена в бактерии с делецией гена hisG. В клетках штамма TA 102 содержится до 30 копий pAQ1 и 7–8 копий плазмиды pKM101. Увеличение дозы гена-мишени привело к увеличению чувствительности данного штамма в среднем в 5–12 раз по сравнению с изогенным штаммом, содержащим одну копию аллеля hisG 428 в хромосоме. Использование штамма TA 102 позволяет выявлять мутагенную активность гидроперекисей, перекиси водорода, хинонов, фенилгидразина, различных альдегидов и агентов, индуцирующих повреждение тимина (УФ, блеомицин).

Имеются попытки совмещения в одном тестерном штамме способности регистрировать как мутации сдвига рамки считывания, так и мутации типа замены пар оснований. Так, например, путем скрещивания штамма *S.typhimurium* TA 1535 со штаммом *E.coli* AG 249 сконструирован новый штамм *E.coli* AQ 262, содержащий в своем геноме 2 ауксотрофные мутации — hisG 46 и arg-2 [8]. Первая из них позволяет тестировать вещества, индуцирующие мутации в результате замены пар оснований, вторая — выявлять способность к индукции мутаций типа сдвига рамки считывания [4–8].

Фармацевтический рынок Казахстана, по некоторым данным, насчитывает более 7000 наименований лекарственных средств. Однако только около 10 % от этого числа составляют препараты отечественного происхождения. В последнее время казахстанцы все чаще критикуют качество продаваемых в стране лекарственных препаратов. Некоторые из лекарств вообще не помогают улучшить состояние, но при этом стоят очень дорого. Кроме того, многие медикаменты имеют массу побочных эффектов, небезопасных для здоровья. Улучшения качества, а также снижение стоимости разрабатываемых и производимых лекарственных препаратов, предлагаемых населению, — сегодня важнейшие задачи для Республики Казахстан [9].

В связи с быстрыми темпами развития фармакологической науки во всем мире значительно увеличился интерес к органической химии как основному источнику биологически активных веществ, так как не все необходимые потенциальные лекарственные формы можно извлечь из природного сырья. Практически можно сказать, что человека на протяжении всей его жизни окружает химия в своих различных проявлениях, причем все процессы в его организме протекают по законам органической и биорганической химии.

Особый интерес представляет химия гетероциклических соединений, т.е. имеющих в своем составе кроме атома углерода другие атомы периодической системы Менделеева. 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. 2-Аминобензотиазолы и продукты их превращений обладают широким спектром биологической активности. Синтезу, исследованиям реакционной способности и фармакологических свойств этого класса веществ посвящено большое количество публикаций. В последнее время их число значительно возросло, так как среди 2-аминобензотиазолов и продуктов их химических превращений выявлены перспективные лекарственные субстанции, некоторые из которых внедрены в медицинскую практику [10].

Гетероциклические ароматические амины играют важную роль в живой и неживой природе. Они участвуют в процессах жизнедеятельности как активные фрагменты природных соединений, находят

широкое применение в производстве синтетических лекарственных препаратов, искусственных красителей, пластических масс, гербицидов, ядохимикатов.

Химическая активность гетероциклических ароматических аминов существенно зависит от природы, положения и числа гетероатомов в ароматическом кольце. Межмолекулярные взаимодействия ароматических аминов во многом определяются механизмом водородной связи, поэтому исследование особенностей этого механизма представляется актуальным.

Создание и химическая модификация новых производных тиазола и 2-аминобензотиазола фосфорорганическими соединениями является оправданным в прикладном и теоретическом плане научным исследованием. Введение в молекулу гетероциклического амина атома фосфора делает эти соединения уникальными синтонами для получения разнообразных классов ФОС с практически полезными свойствами. Не менее интересно и введение фосфорнокислого остатка, так как последний обуславливает наличие у соединений комплексообразующих свойств и возможность проявления значительных фармакологических эффектов, например: противовоспалительного, жаропонижающего, анальгетического, противоартритного и мн. др. [11, 12].

Интерес к фосфорорганическим соединениям определился их многообразием и уникальным набором свойств, делающих эти вещества ценными объектами теоретических исследований и придающих им большую практическую значимость. Наиболее известной сферой использования фосфорорганических соединений является защита сельскохозяйственных растений и животных от вредителей и болезней.

Среди приемов структурной модификации 2-аминобензотиазольного фармакофора особое место занимает получение разнообразных производных по аминогруппе. В случае введения в молекулу 2-аминобензотиазола остатка дикарбоновых кислот, входящих в цикл Кребса и являющихся естественными метаболитами, удастся существенно понизить токсичность соединений и, как правило, увеличить величину биоэффектов. Другим методом конструирования биологически активных соединений на основе 2-аминобензотиазола является синтез гетероаннелированных производных, в которых остаток указанного гетероцикла включен в структуру конденсированной гетероциклической системы [13].

Значительные успехи в практическом использовании и важная роль, которую выполняют фосфорилированные производные 2-аминотиазола и 2-аминобензотиазола в процессах жизнедеятельности, являются основой большого и неугасающего интереса к химии этих соединений. С целью оценки современного состояния данного направления исследования нами проведен информационный поиск. Так, сведения о синтезе строения и биологической активности фосфорилированных тиазолов широко представлены в работах отечественных и зарубежных авторов [10–13].

Тестирование на мутагенность указанных химических веществ, обладающих потенциальными биологически активными свойствами, необходимо для выявления возможных негативных последствий. Метод Эймса является наиболее подходящим для определения мутагенной активности производных тиазола и бензотиазола.

References

- 1 *Harbiyev R.U.* Guide to experimental (prior clinical) studying of new pharmacological substances. — Moscow: JSC Meditsina Publishing House, 2005. — 832 p.
- 2 *Guskova T.A.* An assessment of safety of medicines at the stage of prior clinical studying // the Chemical and pharmaceutical magazine. — 1990. — № 7. — P. 10–15.
- 3 Assessment of a mutagenicity of new medicines: Methodical recommendations. — Moscow, 1994. — 20 p.
- 4 *Mortelmans K., Zeiger E.* The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.*, 2000. — Vol. 455. — P. 29–60.
- 5 *Belitsky G.A., Fonstein L.M., Hudoley V.V. et al.* Sovol as inductor of microsoma enzymes, activating pro-carcinogens // *Experimental oncology*. — 1987. — Vol. 9. — № of Zy. — P. 20–23.
- 6 Methods of primary detection of the genetic activity of pollutants of the environment by means of bacterial test systems: Methodical instructions. — Moscow, 1985. — 34 p.
- 7 The guide to short-term tests for identification of mutagen and cancerogenic chemicals. Hygienic criteria of a state of environment 51. — Geneva: WHO, 1989. — 212 p.
- 8 *Maron D.M., Ames B.N.* Revised methods for the Salmonella mutagenicity test//*Mutat. Res.* — 1983. — Vol. 113. — № 3–4. — P. 173–215.
- 9 *Dzhilkrist T.* Chemistry of heterocyclic connections. — Moscow: Mir, 1996. — 464 p.
- 10 *Ivansky V.I.* Chemistry of heterocyclic connections. — Moscow: Vysshaya shkola, 1978. — 560 p.

11 *Drach B.C., Lobanov O.P.* New synthesis of phosphorilized thiazoles. — *General Chemistry Journal*. — 1978. — Vol. 48. — № 9. — P. 1994–1997.

12 *Grapov A.F., Aripov A., Galushina B.B., Supin G.S.* Chemistry of organic elements connections. — Leningrad: Nauka, 1976. — 105 p.

13 *Turan-Zitouni G., Demirayak S., Ozdemir A., Kaplancikli Z.A., Yildiz M.T.* Synthesis of some 2- (Benzazole — 2-yl) thioacetyl amino thiazole derivatives and their antimicrobial activity and toxicity // *Eur. J.Med. Chem.* 2004. — Vol. 39. — P. 267–272.

Қ.А.Жұмашева, Г.П.Погосян, Л.Қ.Сәлкеева, А.А.Жортарова,
Ш.К.Елеупаева, А.Ж.Шайбек, С.С.Тыржанова

Тиазол және бензотиазол туындыларының мутагендік қасиеттерін анықтау үшін Эймс микробиологиялық тестін қолдану

Қазіргі кезде ғылыми ізденістердің нәтижесінде дәрілік препараттар болатын жаңа фармакологиялық заттарды алу жолдарына жақсы жағдай қалыптасқан. Осыған байланысты тиазол және аминотиазол өнімдері кең қолданыстағы жоғары белсенді зат ретінде қызуғушылық тудырады. Химиялық заттар гендік, хромосомалық және геномдық мутацияларды туындатады. Мутацияның барлық түрлерін анықтаудың әмбебап әдісі жоқ. Сондықтан мутациялық өзгерістерді зерттеу үшін әр түрлі мутация категорияларын тіркейтін бірнеше әдістер бар. Эймс тестілік скрининг әдісінде мутагенділіктің индикаторы ретінде микроорганизмдер пайдаланылады, себебі олар тез және тиімді барлық мутагендерді тартып алады.

K.A.Zhumasheva, G.P.Pogosyan, L.K.Salkeeva, A.A.Zhortarova,
Sh.K.Eleupayeva, A.Zh.Shaybek, S.S.Tyrzhanova

The use of Ames's microbiological test for the determination of mutagen properties of derivatives of thiazol and aminatiazol

The modern science forms conditions for search and creation of the new pharmacological substances, capable to become medicines. In this regard the derivatives of thiazol and aminatiazol represent the particular interests, as substances possessing a wide range of biological activity. Chemicals induce mutations of all three types: gene, chromosomal and genomic. The universal method for detection of all types of mutations doesn't exist. In this regard some methods for studying the mutagenicity are being used, which allow to register an induction of various categories of mutations. Ames's test is a screening method in which as the indicator of a mutagenicity microorganisms are used, it allows quickly and cheaply select possible mutagens.