

УДК 547.426.2.057
© Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ АЛКИЛЬНЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ

С.Г. Романова^{1}, Г.А. Белицкий², И.А. Хитрово², Г.А. Серебrenникова¹, А.А. Штиль²*

¹Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова, 117571 Москва, просп. Вернадского, 86;
эл. почта: gomfill@mail.ru

²ГУ Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Исследовали потенциальную мутагенную активность представителя класса бесфосфорных катионных алкильных глицеролипидов - *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил] оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)аммонийиодида. В рамках исследований установлено, что соединение не обладает мутагенными свойствами.

Ключевые слова: катионные глицеролипиды, липиды с простой эфирной связью, эдельфозин, противоопухолевая активность, мутагенность, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ. За последние десятилетия исследования в области химического мутагенеза получили большое развитие. С одной стороны, это связано с внедрением огромного количества различных химических веществ во все сферы жизнедеятельности человека, требующих генетического контроля, с другой, - научными достижениями, связанными с созданием и использованием новых тест-систем, позволяющих провести более полную оценку как самих мутагенов, так и их метаболитов [1, 2].

Особое место в жизнедеятельности человека занимают такие широко распространенные вещества, как лекарственные препараты, число которых постоянно увеличивается. Мутагенность многих из них установлена на разных генетических объектах [3, 4].

Принятые сокращения: ААФ – ацетиламинофлуорен; БП – бензапирен; ДДТДП – 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирен; ДМСО – диметилсульфоксид; НГ – нитрозогуанидин; Эдельфозин – (1-О-октадецил-2-О-метил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин, Edelfosine, ET-18-OMe).

* - адресат для переписки

МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ АЛКИЛЬНЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ

В широком ассортименте лекарственных средств значительное место занимают потенциальные противоопухолевые агенты. Тенденция к увеличению их количества связана с поиском более эффективных препаратов, обладающих низкой токсичностью по отношению к нормальным клеткам и высоким цитотоксическим действием в отношении неопластических клеток. Данный подход был реализован в синтезе эдельфозина (ЕТ-18-ОСН₃) – высокоактивного противоопухолевого препарата, имеющего в настоящее время коммерческую доступность [5]. Действие данного соединения сводится к селективной индукции апоптоза, инициируемой преимущественно в опухолевых клетках, не повреждая при этом нормальные клетки. В отличие от многих других химиотерапевтических агентов, используемых в настоящее время, ЕТ-18-ОСН₃ не взаимодействует с ДНК, но активно воздействует на клеточную мембрану, то есть его действие не зависит от пролиферативного состояния клетки-мишени [5, 6].

Каждая часть молекулярной структуры ЕТ-18-ОСН₃ важна для оптимального проапоптотического действия и потому может быть подвергнута модификации с целью поиска “активного сайта” соединения. В последние годы предметом интенсивных исследований стали катионные бесфосфорные глицеролипиды алкильного типа – потенциальные противоопухолевые агенты – одно из направлений модификации высокоактивного фосфорсодержащего глицеролипида эдельфозина.

Целью данной работы являлось изучение мутагенной активности бесфосфорного катионного алкильного глицеролипида - *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил) аммонийиодида (рисунок) [7].

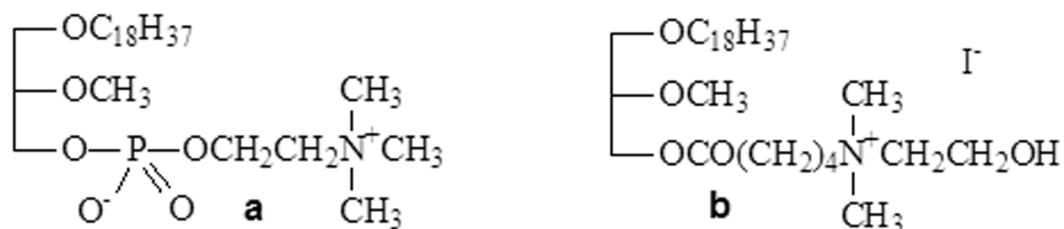


Рисунок.

Структурные формулы Эдельфозина и исследуемого соединения.

МЕТОДИКА. Оценка мутагенных свойств проводили по стандартным методикам, предусмотренным в тесте Эймса [8]. В работе использовали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 и TA98 [9]. Наличие мутагенного эффекта у исследуемых препаратов учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Индукцию ферментов микросомального окисления осуществляли с помощью предварительного введения крысам линии Вистар смеси полихлорированных бифенилов отечественного производства “Совол” однократно, в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя [8]. Микросомальную смесь готовили таким образом, что в смеси содержалось 6 мг/мл белка фракции S9, 4 мМ NADP, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 33 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂ и 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4. Получение фракции S9 выполняли в соответствии с “Методическими рекомендациями” [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Навески *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил) аммонийиодида растворяли в ДМСО. Дозы вещества составляли 0,25 мкг; 2,5 мкг; 25 мкг и 250 мкг на чашку. Селективный полуобогащённый агар (0,7%) плавил на водяной бане при 100°C, разливали по 2 мл в пробирки и помещали в термостатируемую водяную баню с температурой 45-46°C. Вначале в пробирки с 0,7% агаром вносили 0,1 мл препарата в необходимых концентрациях, затем 0,1 мл суспензии бактерий. После этого вносили 0,5 мл микросомальной активирующей смеси, либо соответствующий объём буфера. Все добавки делались вне бани, затем содержимое пробирки быстро перемешивали и наносили на слой нижнего минимального агара на чашки Петри. Продолжительность времени внесения всех компонентов и разлива полужидкого агара на чашку не превышала 10-15 с. Чашки оставляли при комнатной температуре на 30-40 минут и после полного застывания агара переносили в термостат на 37°C. Учёт результатов проводили через 48-72 часа инкубации. Параллельно в опыт включали варианты с микросомальной активирующей смесью (S9-mix) и без неё.

В вариантах без активации может быть зарегистрировано действие прямых мутагенов, то есть препаратов, проявляющих мутагенный эффект за счёт активности исходной структуры вещества. Действие же промутагенов, то есть соединений, эффект которых связан с образованием мутагенных метаболитов, может быть учтено при сравнении результатов, полученных при анализе данных испытаний препарата в вариантах с S9-mix и без неё.

В контрольном фоновом варианте в слой верхнего полужидкого агара вместе с суспензией бактерий вносили S9-mix или буфер и соответствующий объём растворителя препарата. Эксперимент также сопровождали положительными контролями, в качестве которых использовали вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или отсутствии условий активации. Для вариантов без активирующей смеси был использован нитрозогуанидин (НГ) и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирен (ДДТДП), активность фракции S9 контролировали мутагенами – бензапиреном (БП) и ацетиламинофлуореном (ААФ) для обоих штаммов – TA98 и TA100. В каждом контрольном и опытном варианте использовали по 3 чашки на дозу. Эксперимент повторяли дважды. Результаты учитывали при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах позитивного контроля и при нормальном фоновом уровне.

Таблица 1 содержит данные, полученные при испытании *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил) аммонийиодида на штамме *Salmonella typhimurium* TA98, чувствительном к мутагенам, индуцирующим мутации типа сдвига рамки считывания. Приведены результаты двух повторных опытов. В каждом опыте представлен фоновый вариант, позитивные контроли, с использованием стандартных мутагенов и результаты исследований в вариантах с микросомальной активирующей смесью (+S9) и без неё (-S9). Таблица 2 содержит результаты аналогичных испытаний, но со штаммом *Salmonella typhimurium* TA100, чувствительным к мутагенам, индуцирующим мутации типа замены пар оснований. В обеих таблицах активность каждой дозы представлена в виде средних значений (три чашки на дозу). Обработка результатов проводилась с использованием метода множественных сравнений Даннета [11]. Как показывают результаты экспериментов, в контрольном (фоновом) варианте частота индуцируемых мутаций не превышала стандартного уровня, соответствующего генетическим особенностям каждого тестерного штамма [12]. Варианты позитивного контроля показали хорошую активность фракции S9: промутагены ААФ и БП индуцировали высокий уровень реверсий. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП (индуктор мутаций сдвига рамки считывания) и штамма TA100 с мутагеном НГ (индуктор

МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ АЛКИЛЬНЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ

мутаций замены пар оснований). Исследования мутагенной активности образца *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)аммонийиодида показали, что в пределах чувствительности данного метода, растворы не содержат мутагенов прямого или непрямого действия, которые индуцировали бы мутации типа сдвига рамки считывания генетической информации. Эффект не прямых мутагенов, индуцирующих мутации типа замены пар оснований также не обнаруживался ни при одной из использованных концентраций экстракта. Эффект не прямых мутагенов этого типа отсутствует в диапазоне доз, эквивалентных 0,25–250 мкг на чашку.

Таблица 1. Действие *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)аммонийиодида на индикаторный штамм бактерий TA98 в тесте Эймса (*Salmonella*/микросомы).

Исследуемое вещество	Доза мкг/чашка	Штамм ТА 98					
		-S9			+S9		
			M _t /M ₀	МА		M _t /M ₀	МА
ОПЫТ 1							
Контроль фона	0	38 ± 4,4	1,0	-	52 ± 4,7	1,0	-
БП	10				189 ± 14,2	3,6	+
ААФ	50				853 ± 84,4	16,4	+
ДДДГДП	20	530 ± 33,3	13,9	+			
Испытуемое соединение	0,25	35 ± 3,3	0,9	-	45 ± 4,9	0,9	-
	2,5	37 ± 2,2	1,0	-	46 ± 4,4	0,9	-
	25	45 ± 0,9	1,2	-	51 ± 2,2	1,0	-
	250	47 ± 4,0	1,2	-	49 ± 1,6	0,9	-
ОПЫТ 2							
Контроль фона	0	35 ± 3,1	1,0	-	57 ± 3,8	1,0	-
БП	10				186 ± 10,4	3,3	+
ААФ	50				763 ± 91,1	13,4	+
ДДДГДП	20	453 ± 31,1	12,9	+			
Испытуемое соединение	0,25	30 ± 1,1	0,9	-	55 ± 3,6	1,0	-
	2,5	35 ± 4,7	1,0	-	51 ± 4,9	0,9	-
	25	35 ± 2,0	1,0	-	58 ± 1,3	1,0	-
	250	30 ± 0,9	0,9	-	51 ± 5,3	0,9	-

Примечание: Здесь и в таблице 2 результаты приведены в виде средней ± ошибки средней. M_t/M₀ - отношение числа реверантов в опыте к числу реверантов в контроле; МА - мутагенная активность препарата; "+" - означает наличие, а "-" - отсутствие мутагенной активности.

Таблица 2. Действие *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)аммонийиодида на индикаторный штамм бактерий ТА100 в тесте Эймса (*Salmonella*/микросомы).

Исследуемое вещество	Доза мкг/чашка	Штамм ТА 100					
		-S9			+S9		
			M ₁ /M ₀	MA		M ₁ /M ₀	MA
ОПЫТ 1							
Контроль фона	0	82 ± 6,0	1,0	-	93 ± 4,2	1,0	-
БП	10				321 ± 21,8	3,5	+
ААФ	50				1370 ± 113,3	14,7	+
ДДТ/ДП	20	1807 ± 62,2	22,0	+			
Испытуемое соединение	0,25	82 ± 7,1	1,0	-	74 ± 9,3	0,8	-
	2,5	74 ± 9,1	0,9	-	82 ± 6,9	0,9	-
	25	75 ± 0,9	0,9	-	93 ± 4,7	1,0	-
	250	95 ± 5,6	1,2	-	96 ± 3,1	1,0	-
ОПЫТ 2							
Контроль фона	0	95 ± 5,8	1,0	-	121 ± 7,8	1,0	-
БП	10				510 ± 40,0	4,2	+
ААФ	50				1230 ± 50,0	10,2	+
ДДТ/ДП	20	1950 ± 100,0	20,5	+			
Испытуемое соединение	0,25	92 ± 3,6	1,0	-	114 ± 4,2	0,9	-
	2,5	87 ± 4,0	0,9	-	100 ± 3,1	0,8	-
	25	88 ± 6,0	0,9	-	112 ± 9,8	0,9	-
	250	96 ± 6,0	1,0	-	124 ± 6,0	1,0	-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. По исследованным параметрам (определение мутагенной активности в тесте Эймса) и в пределах чувствительности использованного метода, изученный материал – соединение *rac-N*-{4-[(2-метокси-3-октадецилокси)пропил]оксикарбонилбутил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)аммонийиодид не обладает мутагенными свойствами. В связи с этим наличие у него канцерогенных свойств, связанных с геннотоксичностью, маловероятно.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 07-03-00632-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Худолей В.В. (1986) (Первичная профилактика рака (под ред. Н.Н. Блохина), М.: Медицина, с. 41-47.
2. Журков В.С. (1975) Генетика, **11**, 146-149.
3. Рапопорт И.А., Филиппова Л.М., Журков В.С. (1971) Генетика, **7**(7), 8-12.
4. Бочков Н.П., Шрам Р.Н., Кулешов Н.П. (1975) Генетика, **11**(10), 156-172.
5. Hye-Kyung Na, Young-Joon Surh (2008) J. Clin. Nutr., **17**(1), 204-207.
6. Jendrossek V., Handrick R. (2003) Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, **3**, 343-353.
7. Романова С.Г., Штиль А.А., Серебренникова Г.А. (2008) Биоорганическая химия, **34**(6), 827-830.
8. Белицкий Г.А., Фоништейн Л.М., Худолей В.В. (1987) Экспериментальная онкология, **9**(3), 20-24.
9. Maron D.M., Ames B.N. (1983) Mutat. Res., **113**, 173-215.
10. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств фармакологических средств. М., МЗ РФ, 1994.
11. Белицкий Г.А., Ревазова Ю.А., Абилев С.К., Арзамасцев Е.В. (1999) Ведомости Фармакологического Комитета, **1**, 19-31.
12. Стрижельчик Н.Г., Кульшин В.Е. (1994) Цитология и генетика, **2**, 91-93.

Поступила: 26. 03. 2009.

STUDIES OF MUTAGENIC ACTIVITY OF POSITIVELY CHARGED
ALKYL GLYCEROLIPIDS IN AMES TEST

S.G. Romanova¹, G.A. Belickii², I.A. Hitrovo², G.A. Serebrennikova¹, A.A. Shtil'¹

¹Department of Chemical Technology of Biologically Active Compounds, M.V. Lomonosov Moscow Academy of Fine Chemical Technology, Pr. Vernadskogo, 86, Moscow, 117571 Russia;
e-mail: romfill@mail.ru

²Blokhin Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh., 24, Moscow, 115478 Russia

Mutagenic activity of non-phosphorous cationic alkyl glycerolipid *rac-N*-{4-[(2-Methoxy-3-octadecyloxy)propyl]oxycarbonylbutyl}-*N,N*-dimethyl-*N*-(2-hydroxyethyl) ammonium iodide was evaluated. According performed Ames assay results indicated on non-mutagenic properties tested compound.

Resulting data open the possibility to carry out biological study *in vivo* for class of ether cationic glycerolipids and further applications as a potential agent of anticancer therapy.

Key words: cationic glycerolipids; ester lipids; edelfosine; antitumor activity; mutagens activity; apoptosis.