

## ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОИЗВОДНЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ 1H-ИНДОЛ-4-, 6-, 7-ИЛАМИНОВ В ТЕСТЕ ЭЙМСА *SALMONELLA*/МИКРОСОМЫ

Платкова Т.Н.<sup>1</sup>, Кирютина А.И.<sup>1</sup>, Степаненко И.С.<sup>1</sup>, Ямашкин С.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: ymahkina@mail.ru;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева», Саранск, e-mail: yamashk@yandex.ru

Тест Эймса используется во всем мире в качестве начального скрининга для определения мутагенного потенциала новых химических веществ и лекарств. Тест также применяется для подачи данных в регулирующие органы в целях регистрации многих химических веществ, включая лекарственные препараты и биоциды. Целью исследования была оценка безопасности тестируемых соединений нового класса - производных замещенных 1H-индол-4-, 6-, 7-иламинов - с доказанной противомикробной активностью по способности индуцировать мутации индикаторного штамма *S.typhimurium* TA100 (мутации типа замены пар оснований). Статистический анализ результатов проводили методами вариационной статистики, достоверность результатов оценивали с помощью метода определения t-критерия Стьюдента. Средняя выживаемость тест-штамма *S.typhimurium* TA 100 при добавлении исследуемых соединений, циклических амидов 1, 4 и амидов 2, 3, в дозах 50 мкг/мл, 500 мкг/мл и 1000 мкг/мл статистически значимо не изменялась ( $p \leq 0,05$ ), что позволило использовать этот диапазон в тесте Эймса. Во всех экспериментах ( $n=5$ ) полуколичественного метода учета генных мутаций кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в опыте, диапазон 1,23-1,88 (1000 мкг/м) для исследуемых соединений, над таковым в контроле, 6,14 азид натрия (10 мкг/чашка), была менее 2. Статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) отличие от положительного контроля и отсутствие превышения числа колоний индуцированных His<sup>+</sup>-ревертантов над спонтанным фоном мутирования (негативный контроль) более чем в 2-2,5 раза, свидетельствуют об отсутствии мутагенного потенциала у новых производных замещенных 1H-индол-4-, 6-, 7-иламинов.

Ключевые слова: трифторметилированные производные замещенных 1H-индол-4-, 6-, 7-иламинов, противомикробные соединения, генотоксичность, мутагенность, цитотоксичность, острая токсичность.

## RESEARCH OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF SUBSTITUTED 1H-INDOL-4-, 6-, 7-YLAMINE DERIVATIVES IN THE AMES TEST *SALMONELLA*/MICROSOME

Platkova T.N.<sup>1</sup>, Kiryutina A.I.<sup>1</sup>, Stepanenko I.S.<sup>1</sup>, Yamashkin S.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Research Mordovia State University named after N. P. Ogarev, Saransk, e-mail: ymahkina@mail.ru;

<sup>2</sup>Mordovian State Pedagogical University named after M.E. Evseviev, Saransk, e-mail: yamashkin@yandex.ru

The Ames test is used worldwide as an initial screening for the mutagenic potential of new chemicals and drugs. The test is also used to submit data to regulatory authorities for the registration of many chemicals, including drugs and biocides. The aim of the study was to assess the safety of the tested compounds of a new class - derivatives of substituted 1H-indol-4-, 6-, 7-ylamines - with proven antimicrobial activity, according to the ability to induce mutations of the indicator strain *S. typhimurium* TA100 (base pair substitution mutations). Statistical analysis of the results was carried out using the methods of variation statistics, the reliability of the results was assessed using the method for determining the Student's t-test. The average survival of the *S. typhimurium* TA 100 test strain, when the test compounds, cyclic amides 1, 4 and amides 2, 3, were added at doses of 50 µg/ml, 500 µg/ml, and 1000 µg / ml, did not change statistically significantly ( $P \leq 0.05$ ), which allowed this range to be used in the Ames test. In all experiments ( $n=5$ ) of the semiquantitative method of accounting for gene mutations, the multiplicity of the excess of the average number of revertant colonies in the experiment, the range 1.23-1.88 (1000 µg / m) for the compounds under study, over that in the control, 6.14 sodium azide (10 µg / plate), was less than 2. Statistically significant ( $P \leq 0.05$ ) difference from the positive control and the absence of an excess of the number of colonies induced by His<sup>+</sup> revertants over the spontaneous background of mutation (negative control) by more than 2-2,5 times, indicates the absence of mutagenic potential in new derivatives of substituted 1H-indol-4-, 6-, 7-ylamines.

Keywords: trifluoromethylated derivatives of 1H-indol-4-, 6-, 7-ylamines, antimicrobial compounds, genotoxicity, mutagenicity, cytotoxicity, acute toxicity.

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 [1].

В целях научно-практического обоснования безопасного применения данных о противомикробной активности соединений нового класса - производных замещенных 1*H*-индол-4-, 6-, 7-иламинов [2] - возникла необходимость изучить токсические эффекты этих соединений.

Для первичного определения генетической активности биологически активных соединений широкое распространение получил тест Эймса *Salmonella*/микросомы [3, 4]. Данная тест-система была разработана Брюсом Эймсом в 1960-е гг. в результате длительного изучения природы мутационных изменений в генах мутантов *Salmonella typhimurium* [3].

В тесте Эймса используются специфические штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* в качестве инструментов для выявления мутаций. Эти используемые штаммы *S.typhimurium* известны как ауксотрофы. Штамм бактерий определяется как ауксотроф, если он не способен продуцировать необходимое питательное вещество (тестируемый организм в этом эксперименте не может синтезировать аминокислоту гистидин) и, следовательно, не будет расти, если питательное вещество не поступит в питательную среду. Ауксотрофы обычно образуются в результате мутаций (замена пар оснований (*his G46*), делеция по одному из генов репарации (*uvrB-bio*), *rfa*-мутация, введение плазмиды (*pKM 101*)) происходят в прототрофе (бактерии, которая способна синтезировать конкретное питательное вещество) [4, 5].

Люди окружены множеством химических соединений, как природных, так и синтетических, которые могут действовать как мутагены. Некоторые из этих соединений находятся в пище, которую мы едим (например, пищевые консерванты), другие - в воздухе, которым мы дышим, почве, воде (например, пепел сигарет и/или сигаретный дым), а третьи могут всасываться через кожу (например, средства для окрашивания волос) или через другие контакты. Мутагены действуют по-разному, но все они обладают способностью изменять последовательность оснований ДНК (например, вызывать точечные мутации, мутации со сдвигом рамки и т.д.) в геноме. Тест Эймса впервые позволил изучить мутагенный потенциал огромного числа химических соединений [5, 6].

Целью нашего исследования была оценка способности тестируемых соединений нового класса - производных замещенных 1*H*-индол-4-, 6-, 7-иламинов с доказанной противомикробной активностью - индуцировать мутации в штаммах *S.typhimurium TA100*.

**Материалы и методы исследования.** Исследуемые соединения. В работе изучались трифторметилированные производные замещенных 1*H*-индол-4-, 6-, 7-иламинов (рис. 1). Тестерные соединения брали в растворах, растворитель - «Димексид» (основной действующий компонент - диметилсульфоксид (ДМСО), в работе использовали коммерческий концентрат для приготовления растворов для наружного применения (ООО «Биофармакс», Россия).

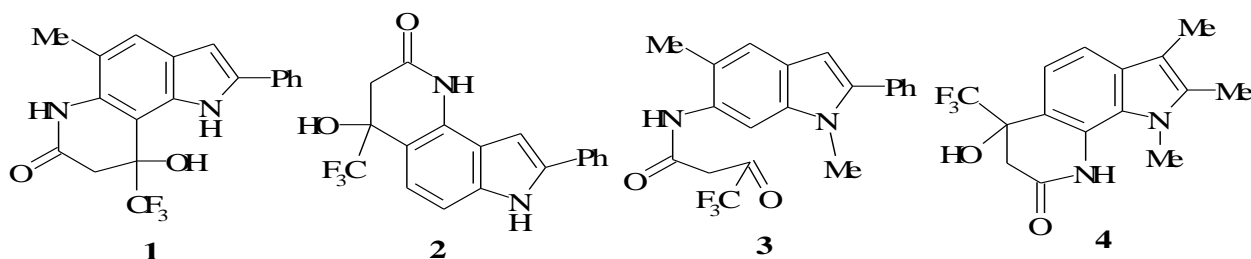


Рис. 1. Соединения нового класса, полученные на основе замещенных 1*H*-индол-4-, 6-, 7-иламинов и этилового эфира 3-оксо-4,4,4-трифторбутановой кислоты: трифторметилпирроло[2,3-*f*]хинолинон (1), трифторметилпирроло[2,3-*h*]-хинолинон (2), трифторметил-1*H*-индол-6-илоксобутанамид (3), трифторметилпирроло[3,2-*h*]хинолинон (4)

Тестерный штамм микроорганизма - *Salmonella typhimurium* TA100 (ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», кафедра генетики). Характеристика генотипа индикаторного штамма микроорганизма: *hisG46*, *rfa*, *uvr*-, *pkm101*, *bio*-, замена пар оснований определяет ревертирование к прототрофности.

Мутантные штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 являются ауксотрофами по гистидину (обозначается как His<sup>-</sup>, чтобы отличить его от исходного штамма His<sup>+</sup>, обладающего прототрофным действием, из которого они были получены) из-за мутации в гене, кодирующем фермент, необходимый для биосинтеза гистидина. Эти штаммы *S.typhimurium* также имеют другие характеристики, которые усиливают их способность обнаруживать мутации. Мутация, отличная от присутствующей в гене биосинтеза гистидина, делает клеточную стенку бактерий более проницаемой для больших молекул, которые обычно не попадают в клетки. Они также обладают мутацией в гене, ответственном за правильное удаление и восстановление повреждений ДНК, что повышает их чувствительность к мутагенам. Эта последняя мутация также нарушает ген биотина, поэтому эти штаммы должны быть снабжены как биотином, так и гистидином. Тест Эймса определяет способность тестируемого вещества вызывать реверсии, также называемые обратной мутацией этих ауксотрофов в исходное прототрофное состояние. Во время теста ауксотрофы выращивают на чашках с агаром с минимальной концентрацией глюкозы, которые содержат все необходимые

питательные вещества, но только следовые количества гистидина (а также биотина). Ауксотрофы способны расти в течение нескольких поколений, пока гистидин в среде не истощится, и в этот момент они прекратят расти, если у них не возникнет обратная мутация, которая восстановит их способность синтезировать гистидин (эти клетки His<sup>+</sup> можно описать как ревертанты) [4].

Способность индуцировать мутации индикаторного штамма *Salmonella typhimurium* TA100 анализировали с помощью полуколичественного метода учета генных мутаций (тест Эймса) [5, 7].

#### *Тест на токсичность по отношению к Salmonella typhimurium*

Бактерии выращивают на культуральной среде (LB-агар) в течение ночи при температуре 37°C, затем переносят в жидкую среду (LB-бульон) и подращивают в течение 12 ч при температуре 37°C. Полученную бактериальную суспензию (0,1 мл) вносят в растопленный 0,6%-ный LB-агар и добавляют исследуемые соединения по 0,1 мл в различных концентрациях. Негативный контроль - 0,1 мл растворителя (ДМСО). Чашки культивируют 24 ч при температуре 37°C.

Для оценки токсичности исследуемых соединений используется критерий «выживаемость», формула (1):

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{Число КОЕ/чашка в опыте}}{\text{Число КОЕ/чашка в контроле}} \times 100, \quad (1)$$

Известно, что исследуемые образцы считаются нетоксичными, если выживаемость бактерий при их воздействии составляет  $\geq 50\%$  [5].

#### *Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)*

Бактерии выращивают на культуральной среде (LB-агаре) в течение ночи при температуре 37°C, затем переносят в жидкую среду (LB-бульон с ампициллином) и культивируют в течение 24 ч при температуре 37°C. Затем 5 мл «ночной культуры» добавляют в жидкую среду (LB-бульон с ампициллином) и подращивают 2-2,5 ч. Полученную бактериальную суспензию центрифугируют 20 мин при 5000 об/мин, полученный осадок ресуспендируют в растворе солевого концентрата, разведенного 1:4. По 3 мл 0,6%-ного верхнего агара с микродобавками биотина и гистидина разливают в пробирки и ставят на водяную баню при температуре 45°C. В стерильные чашки Петри разливают нижний агар. В верхний агар вносят по 0,1 мл бактериальной суспензии и 0,1 мл раствора исследуемого соединения разной концентрации, все перемешивают и наслаивают на нижний избирательный агар. Для негативного контроля в слой верхнего агара добавляют 0,1 мл растворителя (ДМСО). В позитивный контроль вносят 0,1 мл раствора мутагена - азида натрия (10 мкг/чашка). Чашки с посевами после полного застывания агара инкубируют при 37°C в течение 48 ч.

Подсчитывают и сравнивают число колоний (КОЕ His<sup>+</sup>ревертанты/чашка), выросших в присутствии исследуемых соединений и в негативном контроле.

Если в присутствии исследуемого соединения выживаемость тестерного штамма  $\geq 50\%$ , оно считается нетоксичным [7]. Подсчитывали и сравнивали число ревертантных колониеобразующих единиц (КОЕ His<sup>+</sup>ревертанты/чашка), выросших на чашке в присутствии исследуемых соединений и негативного контроля. Увеличение числа ревертантных колоний в чашках, обработанных испытуемым соединением, более чем в 2 раза по сравнению с одновременно не обработанными или контрольными чашками с носителем, является показателем мутагенного потенциала (индекс мутагенности ИМ) тестерного соединения [5, 8]. Концентрация исследуемых соединений 50 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл. Негативный контроль - растворитель ДМСО 10 мкг/чашка, позитивный контроль - мутаген азид натрия 10 мкг/чашка.

Все эксперименты были проанализированы в четырех последовательностях.

Статистическая обработка результатов. Достоверность полученных данных оценивали с помощью метода определения t-критерия Стьюдента и методами вариационной статистики [1, 9]. Статистически достоверными считались результаты, отличающиеся от контроля при  $p \leq 0,05$ . Данные обрабатывали статистически на персональном компьютере с использованием программы Stat 7.0.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Проводили исследование токсических эффектов исследуемых соединений по отношению к *Salmonella typhimurium* TA100. В процессе предварительного теста на токсичность исследуемых соединений **1-4 in vitro** были рассмотрены различные дозы и выбран диапазон концентраций 50 мкг/мл, 500 мкг/мл и 1000 мкг/мл для проверки возможной мутагенной активности на бактериальных штаммах *S.typhimurium TA 100 npi* исключении высоких доз, которые могут оказывать токсическое действие. В таблице 1 показано, что в выбранных концентрациях токсичности не наблюдалось. Никаких существенных различий между показателями роста *S.typhimurium* не установлено. Средняя выживаемость штамма *S.typhimurium TA 100* на чашках с питательной средой при добавлении исследуемого трифторметилпирроло[2,3-*f*]хинолинона **1** в дозах 50 мкг/мл, 500 мкг/мл и 1000 мкг/мл не опускалась ниже 61,45%, при добавлении трифторметилпирроло[2,3-*h*]-хинолинона **2** - ниже 70%. Трифторметил-1*H*-индол-6-илоксобутанамид **3** при добавлении в питательную среду в вышеуказанных дозах определил критерий «выживаемости» исследуемого штамма сальмонеллы в диапазоне 80-95%. При добавлении трифторметилпирроло[3,2-*h*]хинолинона **4** существенных различий между показателями роста *S.typhimurium* не установлено ни в одной из исследуемых концентраций.

Показатели токсического эффекта по отношению  
к штамму *S.typhimurium* TA 100 тестерных соединений

Тестерное соединение	Доза тестерного соединения	Среднее число микроорганизмов, КОЕ/чашка ( $M \pm m$ )	Критерий «выживаемости» штамма, %
Контроль	-	197,7	100
Трифторметилпирроло[2,3- <i>f</i> ]хинолинон <b>1</b>	50 мкг/мл	196,7±2,10	99,33
	500 мкг/мл	196,7±8,47	99,33
	1000 мкг/мл	121,7±4,58	61,45
Трифторметилпирроло[2,3- <i>h</i> ]-хинолинон <b>2</b>	50 мкг/мл	196±7,07	98,99
	500 мкг/мл	180,7±1,54	91,25
	1000 мкг/мл	138,7±1,54	70,03
Трифторметил-1 <i>H</i> -индол-6-илоксобутанамид <b>3</b>	50 мкг/мл	189,3±3,09	95,62
	500 мкг/мл	170±4,63	85,86
	1000 мкг/мл	159±1,52	80,30
Трифторметилпирроло[3,2- <i>h</i> ]хинолинон <b>4</b>	50 мкг/мл	150±3,64	75,76
	500 мкг/мл	140,7±8,16	71,04
	1000 мкг/мл	143±11,44	72,22

Отсутствие статистически значимого изменения критерия «выживаемости» штамма *S.typhimurium* TA 100 свидетельствует об отсутствии токсичности выбранных концентраций 50, 500, 1000 мкг/чашка исследуемых соединений **1-4** и дает возможность использовать этот диапазон в тесте Эймса.

Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса). Мутагенный потенциал исследуемых соединений оценивали по увеличению числа His<sup>+</sup> ревертантов/чашка и по изменению ауксотрофного фона (фонового газона) по сравнению с контрольными чашками (отрицательный контроль), т.е. по показателю мутагенного индекса. Мутагенный потенциал в положительном контроле при добавлении азида натрия (10 мкг/мл) составил 511,3±19,73 КОЕ/чашка, мутагенный индекс - 6,14 (табл. 2). Циклический амид **4** в диапазоне выбранных концентраций не индуцировал статистически значимого увеличения количества ревертантных колоний по сравнению с отрицательным контролем ДМСО (75 мкг/мл), и при добавлении в чашки Петри данного соединения мутагенный индекс был ниже 2 во всех исследуемых концентрациях. Аналогичные дозы амида **2** не демонстрировали статистически значимую индукцию ревертантов у исследуемого штамма *S.typhimurium*. Мутагенный индекс не превышал показатель 1,49 в выбранных концентрациях амида **2**. Прямая мутагенная активность отсутствовала при добавлении к питательной среде амида **3** в диапазоне

выбранных концентраций. Существенных различий между значениями ревертантных колоний и изменениями ауксотрофного фона при использовании циклического амида **1** не было установлено. Сравнение количества спонтанных и индуцированных ревертантов не позволило достичь статистически значимой разницы мутагенного потенциала, и индекс мутагенности не превысил значения 1,88.

Таблица 2

Показатели мутагенности по отношению  
к штамму *S.typhimurium* TA 100 тестерных соединений

Тестерное соединение	Доза тестерного соединения	Количество His+ревертантов (КОЕ/чашка) (M±m)	Превышение над спонтанным фоном мутирования
Контроль негативный	10 мкг/чашка	83,33±5,69	-
Контроль позитивный	10 мкг/чашка	511,3±19,73	6,14
Трифторметилпирроло[2,3- <i>f</i> ]хинолинон <b>1</b>	50 мкг/мл	154,3±2,52	1,85*
	500 мкг/мл	154,7±3,21	1,86*
	1000 мкг/мл	156,7±3,51	1,88*
Трифторметилпирроло[2,3- <i>h</i> ]-хинолинон <b>2</b>	50 мкг/мл	116,3±8,02	1,40*
	500 мкг/мл	122,7±5,51	1,47*
	1000 мкг/мл	124±3,61	1,49*
Трифторметил-1 <i>H</i> -индол-6-илоксобутанамид <b>3</b>	50 мкг/мл	116,7±4,51	1,40*
	500 мкг/мл	139,7±6,66	1,68*
	1000 мкг/мл	156±2,65	1,87*
Трифторметилпирроло[3,2- <i>h</i> ]хинолинон <b>4</b>	50 мкг/мл	73,3±4,73	0,88*
	500 мкг/мл	86,7±5,51	1,04*
	1000 мкг/мл	102,3±3,06	1,23*

Примечание: \* - отличие от контроля (позитивный контроль) статистически значимо при  $p \leq 0,05$ .

### Заклучение

В тесте Эймса применяются специфические штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* в качестве инструментов для выявления мутаций. Эти используемые штаммы *S.typhimurium* известны как ауксотрофы. Штамм бактерий определяется как ауксотроф, если он не способен продуцировать необходимое питательное вещество (тестируемый организм в представленном эксперименте не может синтезировать аминокислоту гистидин) и, следовательно, не способен расти, если питательное вещество не поступит в питательную среду. Ауксотрофы обычно образуются в результате мутаций, например замена пар оснований (*his G46*), *rfa*-мутация, введение плазмиды (*pKM 101*)), делеция по одному из генов репарации, которые происходят в прототрофе (микроорганизме, который способен синтезировать конкретное питательное вещество) [5, 7]. Мутагенный индекс исследуемых соединений не превышал показатели спонтанного фона мутирования более чем в 2-2,5 раза. Это свидетельствует об отсутствии мутагенного воздействия и неспособности исследуемых соединений индуцировать генные

мутации. Цель экспериментального исследования достигнута. Безопасное применение исследуемых соединений в качестве противомикробных средств для химиотерапии возможно после исследования их токсичности *in vivo*.

### Список литературы

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
2. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Kostina Y.A., Batarшева A.A., Mironov M.A. A New Group of Compounds Derived from 4-, 5-, 6- and 7-Aminoindoles with Antimicrobial Activity. *Research Results in Pharmacology*. 2018. vol. 4. no 3. P.17-26.
3. Маргулис А.Б., Карамова Н.С., Ильинская О.Н. Методы генетической токсикологии (учебно-методическое пособие). Казань: КФУ, 2012. 36 с.
4. Gad S.C. Drug safety evaluation. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons. 2016. 918 p.
5. Benigni R., Bossa C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chemical reviews*. 2011. vol. 111. no. 4. P. 2507-2536.
6. Mortelmans K. A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019. vol. 841. P. 14-16.
7. Даев Е.В., Дукельская А.В., Барабанова Л.В. Цитогенетические методы индикации экологической напряженности в водных и наземных биосистемах // *Экологическая генетика*. 2014. № 12 (2). С. 3-12.
8. Ахальцева Л.В., Журков В.С. Генотоксичность наноматериалов в мутационном тесте на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса) // *Современные проблемы оценки, прогноза и управления экологическими рисками здоровью населения и окружающей среды, пути их рационального решения: материалы III Международного форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды (Москва, 13-14 декабря 2018 г.)*. М., 2018.С. 17-20.
9. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. М.: Практическая медицина, 2011. 480 с.