

И. С. Захаров, А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская,
И. С. Низамов, В. Я. Пономарев, А. Б. Маргулис

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НОВЫХ ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Ключевые слова: токсичность, мутагенность, генотоксичность, гиперразветвленные полимеры.

Исследованы токсические и мутагенные свойства соединений нового класса гиперразветвленных полимеров. Показано, что исследуемые соединения не обладают токсичностью в отношении прокариот, но могут проявлять слабые мутагенные эффекты.

Keywords: toxicity, mutagenicity, genotoxicity, hyperbranched polymers.

We investigated the toxic and mutagenic compounds of a new class of hyperbranched polymers. It is shown that the test compounds do not possess toxicity to prokaryotes, but may show weak mutagenic effects.

Введение

Гиперразветвленные полимеры (ГРП) синтезированы 100 лет назад, а спустя полвека разработана теория трехмерной полимеризации (для варианта ступенчатого полиприсоединения), позволившая сформулировать научный базис синтеза ГРП. Недавно открыты уникальные свойства ГРП, отличающие их как от обычных линейных полимеров, так и от сетчатых макромолекулярных структур, типа микрогеля. ГРП проникли в наиболее значимые области науки и техники (полимерное материаловедение, электроника и микроэлектроника, оптика, биология, медицина, экология) с высоким положительным эффектом.

ГРП является макромолекулой, состоящей из прогрессивно разветвляющихся цепей (рис. 1).

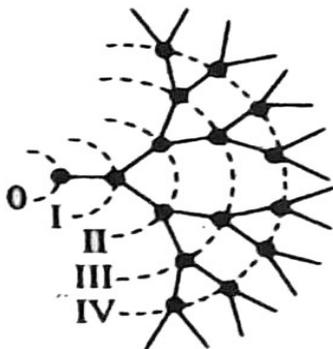


Рис. 1 - Схематическое изображение макромолекулы ГРП четвертого поколения

Точки на рисунке 1 – узлы разветвления, цифрами 0, I, II, III, IV обозначены номера поколений (в данном случае от нулевого поколения до четвертого). Число ветвей в каждом следующем поколении больше, чем в предыдущем в определенное число раз. Это отношение есть коэффициент разветвления. В примере, приведенном на рисунке 1, его величина равна двум. В других случаях она может быть больше двух, в зависимости от функциональности исходного мономера, но в любом случае коэффициент разветвления всегда будет целым числом, поскольку

целым числом выражается функциональность. Дробным числом коэффициент разветвления может быть только в случае сополимеризации, если при этом используется смесь мономеров с разной функциональностью [1,2].

В Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова синтезированы гиперразветвленные полимеры, обладающие уникальными свойствами, отличающими их от других классов полимеров. Важным этапом, предшествующим введению их в эксплуатацию, является исследование на генотоксичность.

Таким образом, целью работы явилось определение генотоксических свойств нового класса гиперразветвленных полимеров.

Материалы и методы исследования

На токсичность и генотоксичность были исследованы диалкилфосфаты олигомерных полиэфиров семейства Болторн Н20, Н30 и Н40 в концентрациях 0.5, 2.5 и 5 мг/мл.

Все сконструированные Эймсом с соавторами [3] тестерные штаммы исходно получены из штамма *Salmonella typhimurium* дикого типа LT2. Для повышения чувствительности этих штаммов к химическим мутагенам и канцерогенам в геном бактерий введены некоторые добавочные маркеры.

Оценку мутагенности проводили в тесте Эймса на мутантном штамме *S. typhimurium TA 100* – *his G46, rfa, uvr-, pkm 101, bio-*. Мутация в гистидиновом опероне (*his-*) вызывает ауксотрофность по этой аминокислоте у мутантов. Штамм *TA 100* регистрирует мутации типа замены пар оснований (*his G46*). Мутация в гене *uvr B* приводит к нарушению процесса эксцизионной репарации, благодаря чему возникшее повреждение ДНК остается неисправленным и, таким образом, увеличивается чувствительность тестерного штамма к некоторым мутагенам. Делеция в гене *uvr B* приводит также и через ген *bio*. При *rfa*-мутации (“шероховатые колонии”) нарушается синтез липополисахаридов, в результате чего клетка теряет патогенность, а также возрастает проницаемость ее клеточной стенки и облегчается проникновение мутагенов в клетку. Штамм *TA 100* несет также

плазмиду устойчивости к ампициллину *pKm 101* и ген *umi C*, что увеличивает вклад ошибочной репарации в процесс мутагенеза, и, следовательно, чувствительность штамма [3,4]. В тесте на токсичность также использовали мутантный штамм *S. typhimurium TA 100*.

Сущность теста заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от аукотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой. Если в среду культивирования ввести химический мутаген, то частота мутаций значительно увеличивается, что регистрируется по числу колоний.

Если число колоний-ревертантов в опыте и контроле достоверно различается менее, чем в 2.5 раза, то делается заключение об отсутствии мутагенной активности. Если фиксируют превышение от 2.5 до 10 раз, то делается заключение о наличии слабой мутагенной активности. Превышение от 10 до 100 раз говорит о средней мутагенной активности исследуемого соединения. Если фиксируют превышение более, чем в 100 раз, - вещество обладает сильной мутагенной активностью.

Проверке на мутагенность всегда предшествовала проверка токсичности препаратов по отношению к тестерным штаммам для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов в испытаниях на мутагенность.

Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в компьютерной программе "Microsoft-Excel".

Оценка токсических и генотоксических эффектов исследуемых соединений

Токсический эффект определяли по выживанию тестерного штамма в опытных вариантах по сравнению с контрольным [5,6]. Тестерным штаммом в опыте служила *Salmonella typhimurium TA 100*. В ходе работы было показано, что диалкилфосфаты олигомерных полиэфиров не обладают токсическими эффектами ни в одной из исследуемых концентраций, за исключением вещества №1, в отношении которого были отмечены незначительные токсические эффекты, не мешающие проверке данных концентраций на мутагенность в последующем тесте Эймса.

Способность исследуемых соединений индуцировать генные мутации в клетках бактерий тестировали в тесте Эймса с использованием тестерного штамма *Salmonella typhimurium TA 100*. Как видно из результатов, представленных на рисунке 2, слабую мутагенную активность проявляют вещества №1, №3 и №4 в концентрации 2.5 мг/мл; остальные вещества не проявили мутагенных эффектов.

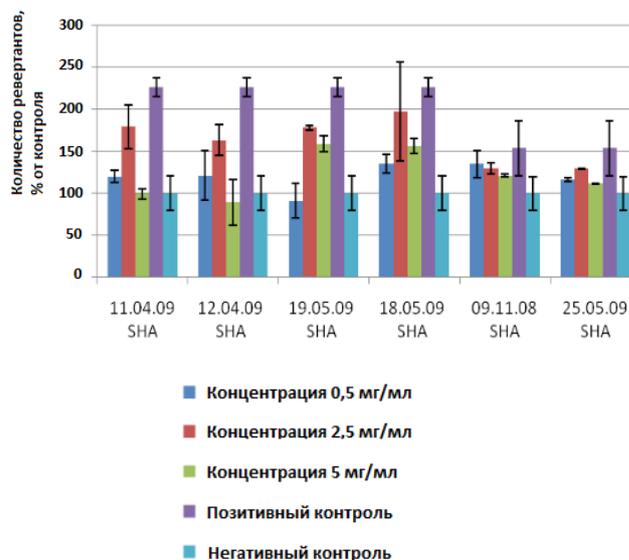


Рис. 2 – Мутагенные эффекты исследуемых соединений

Среди фосфорорганических соединений встречаются пестициды, инсектициды, а также боевые отравляющие вещества (тиофос, хлорофос, карбофос, метафос, пирофос, зарин, зоман, VX и др.). Фосфаты, попадающие в окружающую среду, приводят к эвтрофикации водоемов. В ходе исследования было выявлено, что диалкилфосфаты олигомерных полиэфиров семейства Болторн Н20, Н30 и Н40 практически не проявили токсических эффектов по отношению к микроорганизмам в исследуемых концентрациях (0.5-5 мг/мл).

Среди диалкилфосфатов олигомерных полиэфиров семейства Болторн Н20, Н30 и Н40 встречаются как вещества со слабой мутагенной активностью (№1, №3, №4), так и вещества, ее не проявляющие (№2, №5, №6).

Ранее аналогичные исследования нами были проведены в отношении соединений фуранонового ряда [7]. Все эти соединения представляют собой интерес для дальнейшего исследования их потенциальных лекарственных свойств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-01226-а.

Литература

1. Pettersson, B. Hyperbranched Polymers - unique design tools for multi property control in resins and coatings [Electronic resource]. - Режим доступа : <http://www.perstorp.com> – Дата доступа : 26.03.2010.
2. Luderitz, L. Influence of the structure of hyperbranched polymers on the release kinetics of pharmaceuticals [Text] / L. Luderitz // Master thesis – Technische Universität Berlin, Institut für Verfahrenstechnik: Berlin, 2004.
3. Ames, B. N. An improved bacterial test system for deflection and classification of mutagens and carcinogens [Text] / B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston // Procl. Nac. Akad. Sci.- USA.- 1973.- V.70, N3.- P. 782.
4. Maron, D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test [Text] / D.M. Maron, B.N. Ames // Mutat. Res.- N113.- 1983.- P.174-210.

5. *Фонштейн, Л. М.* Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем [Текст] / Л. М. Фонштейн, С. К. Абилов, Е. В. Бобринев; Методические указания.- Москва, 1985.- 34с.
6. *Маргулис, А.Б.* Методы генетической токсикологии / А.Б. Маргулис, Н.С. Карамова, О.Н. Ильинская // Учебно-методическое пособие.- Казань: КФУ, 2012.- 36 с.
7. *Митько, В.Е.* Токсические и генотоксические эффекты новых синтезированных фуранонов и их галогенированных производных [Текст] / В.Е. Митько, А.Б. Маргулис, В.Я. Пономарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Вестник Казанского технологического университета.- 2013.- Т.16, №11.- С.211-213.

© **И. С. Захаров** - асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, ivanzakharov2011@gmail.com; **А. И. Колпаков** - к.б.н., с.н.с., зав. лаб. НИЛ ББФ Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, alexei.kolpakov@kpfu.ru; **О. Н. Ильинская** - д.б.н., проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@kpfu.ru; **И. С. Низамов** - д.х.н., профессор каф. химического образования Химического института им А.М. Бутлерова К(П)ФУ, isnizamov@mail.ru; **В. Я. Пономарев** - к.т.н., доцент каф. технологии мясных и молочных продуктов КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com; **А. Б. Маргулис** - к.б.н., доцент каф. микробиологии К(П)ФУ, anna.margulis@kpfu.ru.

© **I. S. Zakharov** - - Post-graduate student Department of Microbiology, Kazan Federal University, ivanzakharov2011@gmail.com; **A. I. Kolpakov** - PhD, Senior Scientist, Head of laboratory, Kazan Federal University, alexei.kolpakov@kpfu.ru; **O. N. Ilinskaya** - Ph.D., Professor, Head of Department of Microbiology, Kazan Federal University, olga.ilinskaya@kpfu.ru; **I. S. Nizamov** - Doctor of chemistry, Professor, Department of Chemical Butlerov Institute of Chemistry, Education, Kazan Federal University, isnizamov@mail.ru; **V. Ya. Ponomarev** - Ph.D., assistant professor. Department of meat and dairy products technology of KNRTU, v.y.ponomarev@gmail.com; **A. B. Margulis** - PhD, assistant professor. Department of Microbiology, Kazan Federal University, anna.margulis@kpfu.ru.