

Химико-биологические технологии и экологическая безопасность
(Chemical and biological technologies and environment safety) //
Материалы международной научно-практической конференции. –
г. Минск, 15–17 мая 2001 г. – Минск, 2001. – С. 157–163.

ПРОИЗВОДНЫЕ 1,4-ДИГИДРОИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ПРОТИВ МУТАГЕНОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

*Гончарова Р.И., *Кужир Т.Д., *Савина Н.В., *Даливеля О.В.,
**Дубур Г.Я., **Улдрикис Я. Р.

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Академическая, 27, Минск, 220072
antimut@biobel.bas-net.by

** Латвийский институт органического синтеза
gduburs@osi.lv

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с интенсивным загрязнением биосферы нарушается экологическая стабильность и возникает угроза для биологического разнообразия природы. Многие из химических агентов, поступающих в окружающую среду, обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. В связи с этим особую остроту приобретает проблема защиты живых организмов и, прежде всего, человека от химических загрязнителей среды. Одним из путей решения этой проблемы является подавление спонтанного и индуцированного мутагенеза и нейтрализация или ослабление мутагенного действия факторов среды с помощью антимуагенов. К классу этих веществ относятся как природные, так и синтетические соединения. В данной работе представлены результаты исследования антимуагенной активности производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучена генетическая активность 13 препаратов дигидропиридинового ряда, синтезированных в Латвийском институте органического синтеза. Сотрудниками этого же института определены показатели антиоксидантной, электронодонорной и водорододонорной способности используемых соединений. Среди них следует выделить 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин (дилудин, Д), 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(натрий карбоксилато)-1,4-дигидропиридин (соединение IV или ДГП) и динатриевую соль 2-(2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксамидо) глутаровой кислоты (глутапирон, ГП), которые использованы для модификации спонтанного и химического мутагенеза. В качестве модельного мутагена использован типичный мутаген прямого действия этилметансульфонат (ЭМС). Объектом исследований была *Drosophila melanogaster* и лабораторные мыши (**СВА×С57BL/6_J**).

В половых клетках дрозофилы анализировали частоту рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ), уровень эмбриональной (ЭЛ), поздней эмбриональной (ПЛ), постэмбриональной (ПЭЛ) и суммарной (СЛ) летальности потомков в онтогене-

зе, частоту потерь половых хромосом (ППХ). В костном мозге мышей учитывали частоту полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (МЯ).

Для вычленения "чистого" мутагенного эффекта ЭМС применяли поправку Abbott [1]; эффективность антимуагенного действия определяли по редукционному фактору (РФ), отражающему частоту мутаций, подавляемых антимуагеном.

$$P\Phi = \frac{K - AM}{K} \times 100\%; \quad P\Phi = \frac{M - (AM + M)}{M} \times 100\%,$$

где: K – спонтанный уровень мутаций (контроль);

AM – частота мутаций под влиянием антимуагена;

M – частота мутаций, индуцированных мутагеном;

$AM + M$ – частота мутаций при комбинированном воздействии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние антимуагенов на спонтанный мутагенез

В опытах на дрозофиле оценили генетическую активность 12 производных 1,4-ДГИНК по частоте РСПЛМ в половых клетках самцов дикого типа. Препаратами обрабатывали личиночную стадию развития, которая характеризуется максимальной метаболической активностью. Среди 9 изученных одноядерных соединений 6 снижали уровень спонтанной мутабельности половых клеток (табл.1), тогда как остальные одноядерные и 3 триядерные производные были неэффективными по этому тесту (табл. 1, рис.1) [2, 3].

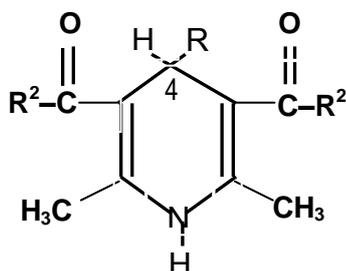


Таблица 1

Антимуагенная активность по сравнению с антиоксидантной и электронодонорной способностью одноядерных производных 1,4-дигидропиридина

№ соединения	R-C(4)	Антиоксидантная способность V_0/V	Потенциалы электроокисления		Антимуагенная активность*	
			$E_n, В$	$E_{1/2}, В$	$P\Phi_{max}, \%$	+ / -
VI	COONa	2,0	0,63	0,60	55,26	+
V	COONH ₄	1,4	0,63	0,60	73,68	+
IV	COONa	1,5	0,72	0,65	82,35	+
II	H	2,7	0,90	0,86	48,15	+
I	H	2,9	0,93	0,90	59,26	+
III	H	3,6	–	0,91	68,42	+
VIII	C ₆ H ₅	1,1	1,07	1,02	–16,00	–
VII	C ₅ H ₄ N	1,0	1,68	1,22	32,00	–
IX	C ₆ H ₅	1,3	1,13	1,06	34,21	–

* Наличие антимуагенной активности (+) или ее отсутствие (–) в соответствии с z-критерием (анализ сопряженных выборок с помощью теста Cochran).

$P\Phi_{max}$ – максимальные значения показателя

Проанализирована зависимость эффективности антимуагенного действия (по показателю РФ) от химической структуры и реактивности этих соединений (табл.1, рис.2).

Показано, что антимуtagenную активность проявляют соединения незамещенные или с карбоксилат-анионом в 4-положении 1,4-ДГП, а эффективность соединений, определяемая по РФ зависит от их антиоксидантной и электронодонорной активности [2].

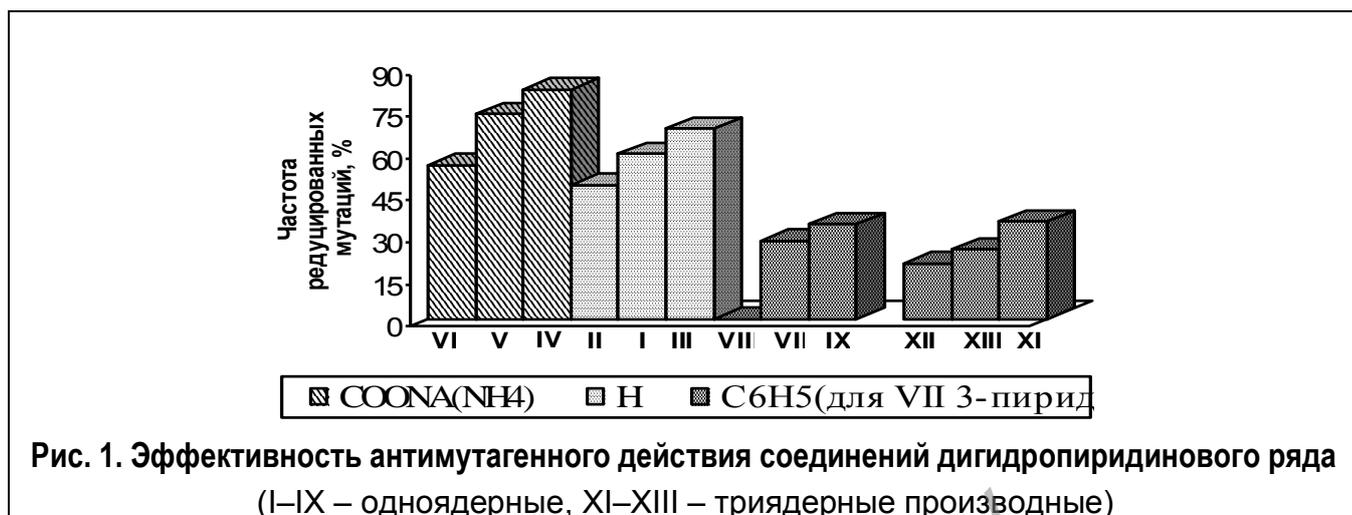


Рис. 1. Эффективность антимуtagenного действия соединений дигидропиридинового ряда (I–IX – одноядерные, XI–XIII – триядерные производные)

На основании этих данных для производных 1,4-ДГИНК можно прогнозировать антимуtagenные свойства при условии, что показатель V_0/V превышает 1.3, а потенциалы электроокисления меньше 1. Следовательно, величины антиоксидантной и электронодонорной способности являются критерием антимуtagenной активности антиоксидантов.

Модификация химического мутагенеза в исследованиях на дрозофиле

При продолжительной обработке личинок (табл. 2, опыты 1–3) производные 1,4-ДГИНК оказывали защитное действие против ЭМС по тесту РСПЛМ. Ингибирующий эффект ДГП проявлялся, начиная с дозы 30 мМ. ГП при концентрации 10–30 мМ проявлял стойкую тенденцию к снижению частоты ЭМС-индуцированных мутаций, достоверность которой доказана с помощью теста Cochran. При обработке отмытых личинок растворами ДГП (опыты 4–7) ингибирующий эффект зарегистрирован в диапазоне доз 30–250 мМ. Анализ влияния модификаторов на кластогенность ЭМС при тех же условиях подтвердил защитный эффект ДГП по тесту ЭЛ, а глутапирона по показателям ПЭЛ, СЛ и ППХ [5]. Таким образом, при воздействии на личинки производные 1,4-ДГИНК существенно снижали уровень ЭМС-индуцированных генных мутаций и хромосомных разрывов в половых клетках взрослых самцов.

При сравнении антимуtagenного действия ряда антиоксидантов (ДГП, ГП, цистеина, цистеамина, ионола, облепихового масла) выявлена большая эффективность производных 1,4-ДГИНК (рис.2). Характерно, что эти соединения активны в широком диапазоне доз (10-250 мМ) и эффективность их действия может достигать 45% [6, 7].

Таблица 2

Влияние производных 1,4-ДГИНК на частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ

№ опыта	Доза ингибитора, М	Обработка имаго ЭМС		Проанализировано		Частота РСПЛМ, %
		доза, М	экспозиция, ч	самцов	хромосом	
Обработка личинок путем добавления препаратов в корм						
1	Контроль	0,025	10	111	1083	14,22
	ДГП 0.01	0,025	10	142	1579	13,62
2	Контроль	0,010	36	45	574	45,30
	ДГП 0.03	0,010	36	53	1061	30,54**
	ДГП 0.10	0,010	36	44	1064	24,81**
3	Контроль	0,010	24	78	785	21,91
	ГП 0.01	0,010	24	88	880	19,43
	ГП 0.03	0,010	24	78	448	19,20
Сочран-тест для ГП: $z = 2.29^*$						
Обработка отмытых личинок 2 ч						
4	Сах. 1%	0,010	30	89	652	34,05
	ДГП 0.25	0,010	30	95	1440	24,10**
5	Сах. 1%	0,025	12	54	584	17,47
	ДГП 0.01	0,025	12	52	450	15,11
	ДГП 0.06	0,025	12	46	333	9,91**
6	Сах. 1%	0,010	18		196	17,35
	ДГП 0.15	0,010	18		165	9,09*
7	Сах. 1%	0,010	36	40	406	50,98
	ДГП 0.03	0,010	36	64	917	24,97**
Сочран-тест для ДГП 10 мМ: $z = 1.08$						

*P < 0.05; **P < 0.01



Модификация химического мутагенеза в исследованиях на мышах

Исследовано влияние ДГП и ГП на ЭМС-кластогенез в клетках костного мозга самцов и беременных самок при дробной фиксации материала (каждые 6 ч в течение 72 ч после инъекции мутагена). ДГП в дозе 1/10 LD₅₀ снижал уровень ЭМС-индуцированных микроядерных клеток, проявляя максимальный защитный эффект на пике образования микроядер (рис.3). Эффективность его действия (в среднем 50%) у беременных самок была значительно больше, чем у самцов, что, возможно, обусловлено различным физиологическим состоянием особей. Аналогичные результаты ранее получены по тесту aberrаций хромосом (рис.4) [7].

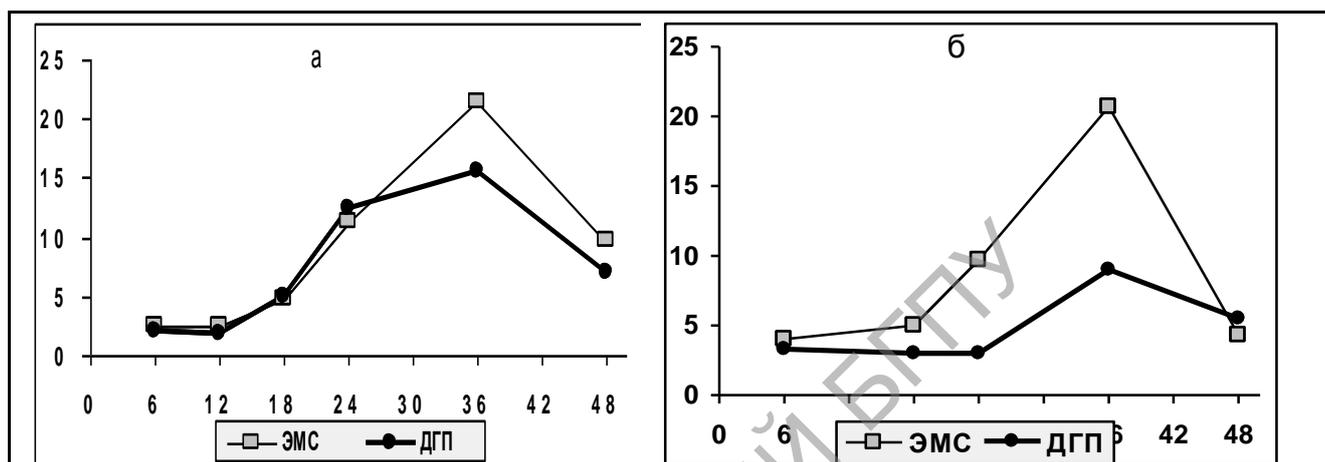


Рис. 3. Ингибирующий эффект ДГП на ЭМС-кластогенез в клетках костного мозга самцов (а) и самок (б) лабораторных мышей

По оси ординат – частота микроядерных клеток (‰)

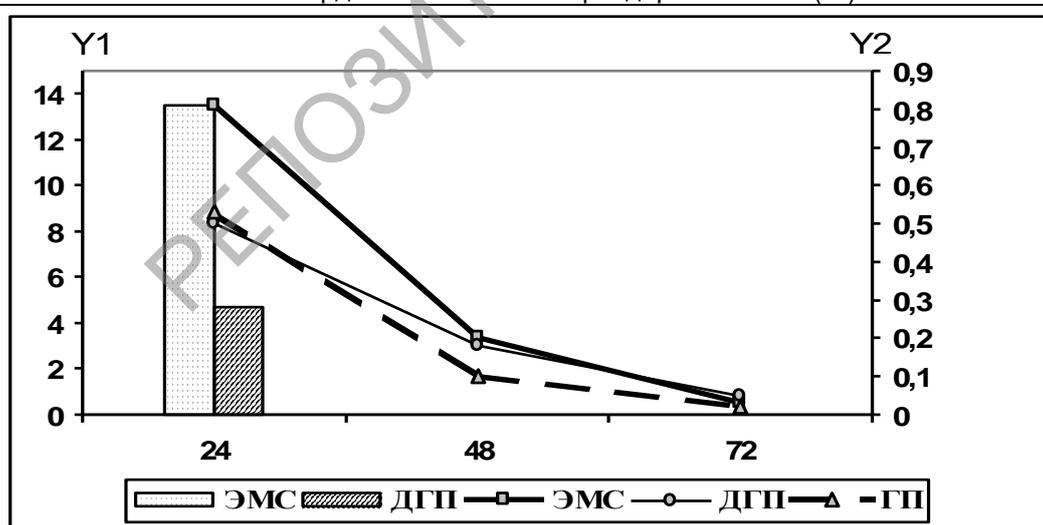


Рис.4. Сравнение действия производных 1,4-ДГИНК по тестам, регистрирующим aberrации хромосом (Y1) и микроядра (Y2).

Ось абсцисс – ч после воздействия мутагена, оси ординат – % клеток с нарушениями хромосомной структуры, столбцы – % клеток с aberrациями, кривые – % микроядерных клеток.

Анализ всех результатов показывает, что антиоксиданты могут быть использованы в качестве защитных средств против действия мутагенов окружающей среды. Среди изученных соединений выделена группа наиболее эффективных антимуагенов (производные 1,4-ДГИНК), которые способны почти вдвое подавлять химический мутагенез в

половых клетках. Эти данные имеют большое теоретическое значение, а также могут быть использованы при скрининге антимуагенов и при разработке способов их применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mendelson D. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of *Drosophila melanogaster*. I // *Mutat. Res.* – 1974. – Vol.22, № 2. – P. 145–156.
2. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Дубур Г.Я., Улдрикис Я.Р. Сравнительное изучение антимуагенного действия соединений дигидропиридинового ряда в связи с их антиоксидантной активностью // Доклады АН СССР.– 1980.– Т. 255, № 6.– С. 1483–1486.
3. Кужир Т.Д. Влияние триядерных производных 1,4-дигидропиридина на спонтанную мутабельность самцов дрозофилы // Вести АН БССР. Сер. биол. наук.– 1982.– С. 105–106.
4. Дубур Г.Я. 1,4-дигидропиридины, их реакционная способность и биологические свойства: Автореф. дис... др-а хим. наук: 02.00.10. – Рига, 1979. – 52 с.
5. Кужир Т.Д. Антимуагены и химический мутагенез в системах высших эукариот.– Минск: Технология, 1999. – 267 с.
6. Goncharova R.I., Kuzhir T.D. The comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster* // *Mutation Res.*– 1989.– Vol. 214, № 2.– P. 257–265.
7. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Даливеля О.В., Дубур Г.Я., Улдрикис Я.Р. Производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) – ингибиторы химического мутагенеза // Вестник РАМН.– 1995.– № 1.– С. 9–20.