

МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ В ТЕСТЕ ЭЙМСА ЧЕТЫРЕХ АМИНОАЗОСОЕДИНЕНИЙ С РАЗЛИЧНОЙ КАНЦЕРОГЕННОСТЬЮ ДЛЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2015 г. Т.С. Фролова* **, О.И. Сеницына***, В.И. Каледин***

*Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

**Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9;

***Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

E-mail: kaledin@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.05.15 г.

Сопоставлена мутагенность в бактериальном тесте Эймса с использованием для активации печеночных ферментов крыс четырех аминокислотосоединений, изученных ранее другими исследователями в отношении канцерогенности для печени крыс. Оказалось, что в условиях теста все они проявляют мутагенную активность, которая, однако, количественно не коррелирует с чувствительностью крыс к их гепатоканцерогенному действию. Так, наиболее активный канцероген 3'-метил-4-диметиламиноазобензол вызывает почти в 2,5 раза меньше мутаций, чем слабоканцерогенный *орто*-аминоазотолуол, и ровно столько же, сколько совсем неканцерогенный N,N-диэтил-4-аминоазобензол.

Ключевые слова: мутагенез, гепатоканцерогенез, аминокислотосоединения, бактериальные тесты.

В теоретической и экспериментальной онкологии вся вторая половина XX века прошла под знаком изучения взаимодействия канцерогенов с клеточной ДНК. Широкая популярность представлений о канцерогенезе как о генотоксическом процессе, обещающих незамедлительную расшифровку его механизма, оправдывалась также заманчивой возможностью ускоренного выявления опасных в канцерогенном отношении веществ в краткосрочных тестах на мутагенность. И хотя между канцерогенной активностью химических соединений и их мутагенностью в этих тестах имеется статистическая корреляция, однозначного соответствия между ними нет. Причиной этого может быть несоответствие между условиями метаболизма соединения в ткани, в которой оно вызывает опухоли, и в тесте на мутагенность, в котором для его активации используются почти исключительно ферменты печени крыс. В предыдущей работе [1] нами было показано, что при однократном введении в подсосном периоде 3'-метил-4-диметиламиноазобензол (3'-Me-ДАБ) индуцирует у мышей значительно больше опухо-

лей и предопухолевых узелков в печени, чем *орто*-аминоазотолуол, тогда как в бактериальном тесте на мутагенность *орто*-аминоазотолуол проявляет более высокую активность по сравнению с 3'-Me-ДАБ. Наши результаты получены, однако, при использовании уникальной модели, а именно подсосных мышат на стадии формирования у них дефинитивной структуры печени, когда однократного воздействия канцерогеном оказывается достаточно для инициации в ней канцерогенного процесса. Между тем для индукции опухолей печени у взрослых особей требуется обычно вводить канцероген хронически (крысам около 3 мес. и более). Поэтому представлялось необходимым выяснить, как соотносятся результаты, получаемые на подсосных мышатах, с соответствующими эффектами канцерогенов при индукции опухолей у взрослых особей. В представленной работе в классическом тесте Эймса с использованием для активации клеточных ферментов печени крыс мы изучили мутагенную активность четырех аминокислотосоединений, изученных ранее другими авторами в отношении канцерогенности для этих животных.

Сокращения: 3'-Me-ДАБ – 3'-метил-4-диметиламиноазобензол, ДАБ – N,N-диметил-4-аминоазобензол, ДЭБ – N,N-диэтил-4-аминоазобензол, 2-ААФ – 2-ацетиламинофлуорен.

Таблица 1. Сравнительная канцерогенность для печени крыс ДАБ, 3'-Ме-ДАБ и *орто*-аминоазотолуола при хроническом скормливания их животным с пищей (по литературным данным [3,4])

Параметр	ДАБ	3'-Ме-ДАБ	<i>орто</i> -аминоазотолуол
Суточная доза, мг	5,0	6,4	10
Время скормливания, сут	90	90	300
Общая доза, г (мМ)	0,45 (2,0)	0,58 (2,3)	3,0 (12,2)
Частота индукции опухолей печени, %	50,0	87,5	24,7

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Почти сразу после открытия канцерогенности аминозокрасителей в середине прошлого века Дж. и Е. Миллеры [2] с помощью разработанной ими методологии количественно оценили ее у целого ряда производных аминозобензола. Все исследования проводили на крысах, которым канцерогены скормливали хронически в течение трех–четырёх месяцев, после чего в течение еще двух месяцев содержали на диете без канцерогенов. Состояние печени у каждой крысы после окончания периода скормливания канцерогена исследовали при помощи лапаротомии, а по окончании опыта – на аутопсии. При определении канцерогенной активности соединения учитывали его разовую дозу, фактическую длительность скормливания и общую дозу, а также процент развившихся опухолей и время их появления. В каждом эксперименте в качестве положительного контроля использовали N,N-диметил-4-аминоазобензол (ДАБ), активность которого принимали равной шести. В сравнении с ним канцерогенная активность 3'-Ме-ДАБ составляла 10–12 единиц, в то время как у N,N-диэтил-4-аминоазобензола (ДЭБ) она была нулевой [2]. Канцерогенность для крыс *орто*-аминоазотолуола Дж. и Е. Миллеры не изучали, но такая работа была проделана независимо от них другими исследователями [3]. В настоящей работе помимо 3'-Ме-ДАБ и *орто*-аминоазотолуола для изучения нами были взяты ДАБ и ДЭБ. Все препараты были получены из Koch-Light Laboratories Ltd (Великобритания) и ICN (США). Литературные данные об их канцерогенной активности для печени крыс суммированы нами в табл. 1. Из этих данных видно, что *орто*-аминоазотолуол является канцерогеном для печени крыс, но значительно уступает в этом отношении не только 3'-Ме-ДАБ, но и ДАБ.

Оценку мутагенной активности указанных соединений мы проводили на бактериях *Salmonella typhimurium* штамма TA98, несущего мутацию в гистидиновом опероне, в стандартном твердофазном варианте теста Эймса [4] с ис-

пользованием для активации фракции S9 печени крыс, индуцированных ароксолом 1254. Препарат (SUPELCO, Sigma-Aldrich, США) вводили самцам Вистар массой 180 г, полученным из вивария Института цитологии и генетики СО РАН, в брюшную полость однократно в дозе 500 мг/кг массы тела. Через пять суток животных умерщвляли декапитацией, печень перфузировали холодным буфером (1,15 М КСl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4) и гомогенизировали в трех объемах этого буфера, после чего гомогенаты центрифугировали при 9000 g в течение 15 мин. Супернатанты (фракцию S9) в стерильных ампулах хранили до использования при температуре -70°C .

Поскольку помимо канцерогенной активности изучаемые нами аминозокрасители могли различаться между собой и по токсичности для бактерий, используемых для тестирования, в предварительных экспериментах мы подобрали такие их концентрации, при которых они проявляют максимальную мутагенную активность. Во всех случаях (за одним исключением) последняя линейно увеличивалась с увеличением дозы препаратов примерно до 15–20 мкг на чашку, а при дальнейшем увеличении снижалась, очевидно, вследствие токсического влияния на бактерии.

До постановки теста Эймса бактерии *Salmonella typhimurium* TA98 хранили в жидком азоте как замороженную культуру с добавлением 10% диметилсульфоксида. Для экспериментов стоки бактерий высевали на чашки с минимальным глюкозным агаром, гистидином и ампициллином (так называемые «мастер»-чашки). Для постановки теста отдельную колонию с «мастер»-чашки инокулировали в 5 мл LB-бульона с 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали при 37°C в течение 15–16 ч. Исходная концентрация бактерий ночной культуры штамма TA98 составляет примерно $(1-2)\cdot 10^8$ клеток/мл. В тест-системе Эймса мы применяли метод двухслойного агара [5]. Нижний слой содержал 1,5% агара на минимальной среде M9, содержащей 20% глюкозы и 50 мг/мл ампициллина. Для верхнего слоя готовили 100 мл 0,6%-го топ-агара в физиологическом растворе

Таблица 2. Мутагенная активность изученных производных 4-аминоазобензола в тесте Эймса с использованием бактерий *S. typhimurium* TA98 без метаболической активации и с активацией ферментами S9-фракции печени крыс, индуцированных ароклором 1254

Соединение	Число ревертантных колоний при дозе препаратов на чашку	
	15 мкг	50 мкг
Без метаболической активации		
ДАБ	20 ± 3	–
ДЭБ	19 ± 3	–
3'-Ме-ДАБ	21 ± 3	–
<i>орто</i> -аминоазотолуол	20 ± 4	–
С метаболической активацией		
ДАБ	44 ± 7	16 ± 3
ДЭБ	54 ± 6	36 ± 5
3'-Ме-ДАБ	53 ± 5	28 ± 5
<i>орто</i> -аминоазотолуол	129 ± 16	160 ± 21

Примечание. В качестве положительных контролей использовали 4-нитрохинолин-1-оксид (в концентрации 0,3 мкг на чашку) и 3,4-бенз(α)пирен (2,5 мкг на чашку). 4-нитрохинолин-1-оксид давал 161 ± 32 колоний, бен(α)пирен в системе без активации – 26 ± 4 колоний, а в системе с активацией – 98 ± 15 колоний на чашку. В негативном контроле (с добавлением диметилсульфоксида) было по (22 ± 2)–(24 ± 3) ревертантных колоний на чашку. На каждую точку использовали шесть чашек.

NaCl, в который добавляли 10 мл 0,5 мМ раствора гистидин-биотина. После расплавления его разливали в пробирки по 2 мл, охлаждали до 45°C и оставляли при этой температуре на водяной бане. При проведении тест-анализа в пробирки добавляли по 100 мкл ночной культуры бактерий и анализируемый мутаген в подобранной ранее концентрации (в контроле – растворитель). Если тест-анализ проводили с метаболической активацией, то добавляли еще 0,5 мл активационной среды, содержащей калий-фосфатный буфер (рН 7,4), MgCl₂, NADP, глюкозо-6-фосфат и S9-фракцию из печени индуцированных ароклором 1254 крыс. Смесь быстро перемешивали и выливали на подготовленные чашки, равномерно распределяя ее по поверхности нижнего слоя агара. Через 48 ч инкубации при 37°C в верхнем слое агара в виде мелкой сеточки были видны колонии бактерий-ауксотрофов, а на их фоне – проросшие в нижний слой агара отдельные колонии ревертантов по гистидиновому локусу. Частота спонтанных ревертантов составляла 20–50 на чашку. В качестве контролей использовали клетки бактерий *Salmonella typhimurium* TA98, не подвергшиеся мутагенному воздействию и подвергшиеся действию прямого мутагена – 4-нитрохинолин-1-оксида и бенз(α)пирена в системе с активацией и без. Все полученные результаты обрабатывали статистически, достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В предварительных экспериментах в тесте Эймса с активацией мы изучили мутагенные потенции исследуемых азосоединений в диапазоне доз от 5 до 50 мкг на чашку. Оказалось, что наибольшую активность в этих условиях проявляет *орто*-аминоазотолуол, причем число индуцированных им мутаций нарастает с увеличением дозы вплоть до максимальной. 3'-Ме-ДАБ и ДЭБ оказывали максимальный эффект при использовании в дозе 15 мкг на чашку, а ДАБ – между 5 и 15 мкг. При более высоких дозах число индуцированных этими соединениями колоний уменьшалось, очевидно, за счет токсического действия на бактерии. В системе без активации все соединения в дозе 15 мкг на чашку не оказывали влияния на число ревертантных колоний (табл. 2), поэтому мутагенную активность в системе с метаболической активацией мы оценивали по числу ревертантных колоний при использовании изученных соединений в дозе 15 мкг на чашку.

Сопоставляя данные, представленные в табл. 2, с данными табл. 1, можно видеть, что никакого соответствия между мутагенной активностью аминозокрасителей в системе, воспроизводящей их метаболическую активацию в печени крыс, и способностью при хроническом применении индуцировать у этих животных опухоли печени нет. Так, самый активный в канцерогенном отношении 3'-Ме-ДАБ оказы-

вается таким же слабым мутагеном, как и совсем неканцерогенный ДЭБ, а слабоканцерогенный для крыс *орто*-аминозотолуол в два–три раза превосходит по мутагенной активности как ДАБ, так и 3'-Ме-ДАБ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Почти сразу после открытия химического канцерогенеза исследователями была отмечена низкая реакционная способность многих канцерогенных соединений при высокой избирательности действия на те или иные ткани животных. До середины прошлого века считалось, что опухоли индуцируют сами применяемые канцерогенные вещества, обладающие извращенной гормональной активностью (*false-hormones*), а роль их метаболизма сводится к детоксикации и выведению из организма. Однако к тому времени авторы работы [3] обнаружили, что гепатоканцерогенные для крыс ДАБ и другие аминоазокрасители связываются у них с белками печени, причем в некотором количестве – ковалентно. Последнее свидетельствовало о том, что в процессе метаболизма канцерогена осуществляется не только его детоксикация, но и образование химически активных производных. Отдавая себе отчет в фундаментальности сделанного наблюдения, авторы сосредоточились на изучении механизма образования таких метаболитов. В процессе этого изучения было установлено, что исходные аминоазосоединения подвергаются в печени С- и N-гидроксилированию, катализируемому NADPH-зависимой системой микросомальных монооксигеназ (получившей название цитохрома P450), и последующей конъюгации в реакциях второй фазы метаболизма ксенобиотиков. При этом если конъюгаты С-гидроксипроизводных неактивны и выводятся из организма, то при сульфоконъюгации N-гидроксипроизводных образуются высокорекреационноспособные электрофильные реактанты, способные неэнзиматически взаимодействовать с нуклеофильными центрами клеточных макромолекул, в том числе ДНК, и вызывать мутации [6]. Эти данные были с энтузиазмом встречены молекулярными биологами, увидевшими в них экспериментальное доказательство до того умозрительных представлений о генотоксическом механизме действия канцерогенов. Поэтому как само собой разумеющимся было воспринято сообщение о том, что ингибирование *in vivo* сульфоконъюгации 4-аминоазобензола подавляет связывание его с ДНК и снижает частоту индукции опухолей печени [7,8]. В опытах с 2-ацетиламинофлуореном (2-ААФ) также было показано, что непосредственно активным канцерогеном для печени крыс явля-

ется обладающий мутагенной активностью серноокислый эфир и его N-гидроксипроизводное [9]. Однако приведенные данные, строго говоря, не являются доказательством того, что активированные метаболиты 4-аминоазобензол и 2-ААФ индуцируют опухоли посредством вызываемых ими мутаций. Возможно, их канцерогенная активность просто совпадает с мутагенной. Об этом свидетельствуют, в частности, полученные нами данные, показывающие, что если ингибирование *in vivo* сульфоконъюгации снижает как мутагенную, так и канцерогенную активность 4-аминоазобензола для печени мышей, то ингибирование сульфоконъюгации *орто*-аминозотолуола снижает его мутагенную активность, но резко повышает канцерогенную [5]. Что касается 2-ААФ, то, помимо печени крыс, где происходит его мутагенная активация, он индуцирует и опухоли молочных желез, в которых отсутствует сульфотрансферазная активность, так же как и 3-ААФ, совсем не способный подвергаться сульфоконъюгации [10,11]. На серии производных N-метил-N'-арил-N-нитрозомочевин авторы работы [12] показали отсутствие корреляции между их канцерогенной и мутагенной активностью. В работе [13] также приведены многочисленные примеры несовпадения канцерогенной и ДНК-повреждающей активности нитрозосоединений. Представленные в настоящей работе и полученные нами ранее [1] данные указывают на то, что химические соединения могут индуцировать опухоли и не через посредство алкилирующих метаболитов (мы не исключаем, однако, возможности наличия канцерогенной активности и у этих последних). Как же можно это себе представить? Рассмотрим вкратце некоторые особенности канцерогенеза.

1. Основным свойством канцерогенов является специфичность их действия – видовая, линейная, органная, тканевая, половая и т. д., что невозможно объяснить особенностями их поступления, или накопления, или инактивации, или активации в тканях-мишенях.

2. Химически активные исходно или активированные в организме соединения не в состоянии сами избирательно поражать определенные гены в силу неспособности опознавать сколько-нибудь протяженные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Поэтому специфичность их действия на те или иные гены, если она имеет место, определяется не ими.

3. На ряде экспериментальных моделей показано, что между сильными и слабыми канцерогенами существует функциональная конкуренция, осуществляющаяся не на метаболическом уровне, что предполагает наличие мишеней их действия, отличных от ДНК [14].

4. Строгая приуроченность действия канцерогенов к определенным стадиям развития органов или животных предполагает их вмешательство в процессы развертывания генетических программ, осуществляющегося в нормальном онтогенезе при клеточной дифференцировке.

5. Ранние изменения, вызываемые канцерогенами, как правило, ненаследственны, и на фенотипическом уровне воспроизводят свойства, которые могут закрепляться в развившейся в последующем опухоли генетически.

Все эти требования удовлетворяются при допущении, что канцерогенность вещества определяется не химическими, а стерическими свойствами, обеспечивающими физико-химическое взаимодействие с клеточными белками, участвующими в передаче сигналов и регуляции, осуществляющейся при нормальном развитии клеточной пролиферации и дифференцировки. Именно случайным сродством к этим белкам, на наш взгляд, объясняется непредсказуемость канцерогенных свойств химических соединений и видовая, тканевая и т.д. специфичность их действия [1,14].

Поэтому нам представляется, что вместо бесплодных, как становится все более ясным, попыток связать канцерогенез с генотоксическими эффектами канцерогенов [15], следует сконцентрировать усилия исследователей на изучении их физико-химического взаимодействия с регуляторными клеточными белками чувствительных органов, находящихся на критических стадиях развития (и чувствительности к индукции опухолей [16]).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. I. Kaledin, S. I. Il'nitskaya, L. P. Ovchinnikova, et al., *Biophysics* **59**, 431 (2014).
2. Дж. Миллер и Е. Миллер, *Успехи в изучении рака* (И. Л., Москва, 1955), pp. 7–71.
3. J. Marhold, M. Matrkka, V. Rambousek and F. Ruffer, *Neoplasma* **16**, 181 (1969).
4. Л. П. Овчинникова, У. Н. Рощкая, Е. А. Васюнина и др., *Биоорганическая химия* **35**, 417 (2009).
5. Л. П. Овчинникова, Л. А. Богданова и В. И. Каледин, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **154**, 623 (2012).
6. E. C. Miller and J. A. Miller, *Cancer* **47**, 2327 (1981).
7. K. B. Delclos, W. G. Tarpley, E. C. Miller, and J. A. Miller, *Cancer Res.* **44**, 2540 (1984).
8. K. B. Delclos, E. C. Miller, J. A. Miller, and A. Liem, *Carcinogenesis* **7**, 277 (1986).
9. J. H. Weisburger, R. S. Yamamoto, C. M. Williams, et al., *Cancer Res.* **32**, 491 (1972).
10. F. J. Zieve and H. R. Gutmann, *Cancer Res.* **31**, 471 (1971).
11. D. Malejka-Giganti, H. R. Gutmann, and R. E. Rydell, *Cancer Res.* **33**, 2489 (1973).
12. K. Yano, H. Katayama, and K. Takemoto, *Cancer Res.* **44**, 1927 (1984).
13. W. Lijinsky, *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds* (Cambridge Univ. Press, 1992).
14. V. I. Kaledin, S. I. Il'nitskaya, N. A. Popova, et al., *Biophysics* **59**, 635 (2014).
15. M. D. Waters, M. Jackson, and I. Lea, *Mutation Res.* **705**, 184 (2010).
16. S. D. Vesselinovitch, K. V. N. Rao, and N. Mihailovich, *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **51**, 239 (1979).

Mutagenic Activity of Four Aminoazo Compounds with Different Carcinogenicity for Rat Liver in the Ames Test

T.S. Frolova* **, O.I. Sinitsyna***, and V.I. Kaledin***

*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

**Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

***Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

In this paper in the bacterial Ames test we compared the mutagenicity of four aminoazo compounds, previously studied by other researchers and used for activation of rat liver enzymes, with the carcinogenicity in the rat liver. It was found that in the Ames test they have mutagenic activity, however, this activity does not correlate quantitatively with rat sensitivity to their hepatocarcinogenic action. Thus, the most active carcinogen 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene causes mutations almost 2.5 times less than weakly carcinogenic *ortho*-aminoazotoluene, and exactly the same number of mutations as non-carcinogenic N,N-diethyl-4-aminoazobenzene.

Key words: mutagenesis, hepatocarcinogenesis, aminoazo compounds, bacterial tests