

**ПРОЦЕНКО О.В.**, **ДУДКА О.А.**, **ДЕМИДОВ С.В.**, **КОЗЕРЕЦЬКА І.А.**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: mizgirevka@rambler.ru*

*✉ mizgirevka@rambler.ru, (066) 600-99-90*

## **ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ТА ГЕНОТОКСИЧНОСТІ 1-(4-ХЛОРБЕНЗИЛ)-3-ХЛОРО-4-(ТРИФТОРМЕТИЛ-ФЕНИЛАМІНО)-1Н-ПІРОЛ-2,5-ДІОНА НА ТЕСТ СИСТЕМИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)**

Проблема онкологічних захворювань надзвичайно актуальна як в світі загалом, так і в Україні зокрема [1]. За даними держстатистики, друге місце серед причин смертності українців припадає саме на онкологічні захворювання [2]. Слід зазначити, що одним з основних засобів лікування на сучасному етапі розвитку онкологічної медицини є призначення цитостатичних препаратів. На жаль, більшість із наявних препаратів мають високу токсичність та генотоксичність [3], тому вкрай актуальним є пошук нових сполук з антипухлинною дією, токсичність та генотоксичність яких буде меншою у порівнянні з існуючими цитостатиками.

Останнім часом увагу медиків-онкологів привертають таргетні інгібітори протеїнкіназ як високоспецифічні та малотоксичні протипухлинні сполуки. Інгібітор тирозинових протеїнкіназ 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон виявляє протипухлинну активність при експериментальному раку товстої кишки та пригнічує поділ трансформованих клітин *in vitro* і при цьому є малотоксичним для гризунів при тривалому введенні [4].

*Drosophila melanogaster* – класичний генетичний об'єкт, вона ефективно використовується для оцінки токсичних, мутагенних, канцерогенних і протекторних властивостей широкого спектра хімічних сполук і фізичних чинників, при скринінгу лікарських засобів і встановленні молекулярних механізмів їх дії [5].

Метою дослідження є вивчення токсичності та генотоксичності 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діона.

### **Матеріали і методи**

*Характеристика ліній, які використовувалися для тестування.*

Лінія 1: *mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>D5</sup> / FM7c; mwh*. Гени *mei-9<sup>a</sup>* та *mei-41<sup>D5</sup>* розташовані в X-хромосомі, мутації в них призводять до дефектів в ексцезійній та постреплікативній репарації відповідно. Ген *mwh* знаходиться в третій хромосомі, мутації в ньому спричиняють формування множинних волосків у клітинах міжжилкового простору крила, (лінія отримана з Kyoto stock center).

Лінія 2: *Oregon R(R)*. Лінія дикого типу, у ній відсутні порушення репарації ДНК та морфології крила.

*Поживне середовище.* До 4 мл стандартного поживного середовища [6] додавали 0,2 мг/мл 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діона. Використана концентрація розраховувалася з урахуванням рекомендованої ефективної дози.

У якості позитивного контролю використовували стандартне поживне середовище, а для негативного контролю до стандартного середовища додавали циклофосфамід у концентрації 0,2 мг/мл.

*Методи.* Для дослідження токсичності препарату визначали його вплив на виживаність, час розвитку та плодючість (кількість отриманих особин імаго в F1) мух лінії *Oregon R(R)*, які виростили на середовищі з додаванням та без додавання 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діона.

Вживаність оцінювали за кількістю мух лінії *Oregon R(R)*, які не загинули на 10-й день після посадки на середовище з додаванням досліджуваної речовини.

Можливий генотоксичний ефект досліджували у тесті на репарацію ДНК (DNA geraretion test) [7]. Для цього схрещували віргінних самок лінії 1 з самцями лінії 2, в кожному пробірку саджали по 3 самки та 2 самці. Схрещування проводили безпосередньо в пробірках з

дослідним середовищем. Отже, весь життєвий цикл отриманого в досліді потомства, проходив на відповідному досліджуваному середовищі. У подальшому проводили аналіз F1, розділяючи мух на такі класи: 1) самки, які мали червоні очі округлої форми або полосковидні (зменшена кількість фасеток ока в результаті мутації *Var*) (f(female)), 2) самці, які характеризуються порушенням системи репарації ДНК, а також жовтими округлими очима (m(male)1), 3) самці з непорушеною системою репарації, з білими полосковидними очима (m2) [7].

Вживання кожного класу мух оцінювалося як відносне число мух у дослідній культурі до показників, отриманих у контрольній культурі. Досліджувана речовина оцінюється як така, якій притаманні мутагенні властивості (позитивні результати), коли відношення виживання особин вказаних класів,  $m1 / f$  і  $m1 / m2$ , становить менше 0,1 і 1, відповідно.

### Результати та обговорення

У результаті аналізу на токсичність не ідентифіковано відповідних ефектів у досліджуваного препарату. Виживаність мух як на середовищі з додаванням 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діона, так і на контрольному середовищі становила 100 %.

Також не було помічено затримок у часі розвитку мух у порівнянні з контролем. Що стосується такого показника, як плодючість, то він у середньому склав 24,1 особини на пробірку для досліду, 27,2 особини на пробірку для позитивного контролю, та 20,5 для негативного контролю, ця різниця не є статистично достовірною, що свідчить про відсутність токсичних ефектів для названих речовин при досліджуваних концентраціях (табл. 1).

В експериментах на генотоксичність не було отримано результатів, які могли б свідчити про мутагенність речовини, яка вивчалася (табл. 2).

Таблиця 1. Показники плодючості *D. melanogaster* в експерименті на токсичність

Варіанти досліду	Усього	Середня кількість особин	t-критерій Стьюдента
1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діона	241	24,1	2,09
Контроль (негативний)	205	20,5	1,26
Контроль(позитивний)	272	27,2	

Примітка. При  $p=0,05$ .

Таблиця 2. Співвідношення фенотипових класів мух експерименті на мутагенність

Варіанти досліду	Середня кількість особин			m1/f	m1/m2
	Самки (f)	Самці (m1)	Самці (m2)		
1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діона	13	3,6	0,4	0,2	9
Контроль (негативний)	17,2	0,6	3	0,03	0,2
Контроль(позитивний)	21,1	9,7	2,3	0,4	3,9

Примітка. Результати вважаються позитивними у випадку, коли  $m1/f \leq 0,1$ , а  $m1/m2 \leq 1$ .

При додаванні до середовища 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діона в середньому було отримано таку кількість особин у відповідних класах: (f) - 13, m1 - 3,6, m2 - 0,4. На стандартному поживному середовищі (позитивний контроль) середня кількість особин у фенотиповому класі становила: (f) - 21,1, m1 - 9,7, m2 - 2,3, а на середовищі з додаванням циклофосфаміду (не-

гативний контроль) в середньому становила: (f) - 17,2, m1 - 0,6, m2 - 3. Отже, отримані співвідношення в досліді склали  $m1/f - 0,2$ , та  $m1/m2 - 9$ , а в позитивному контролі:  $m1/f - 0,4$ , та  $m1/m2 - 3,9$ , що є більше, ніж 0,1 та 1 відповідно для обох варіантів досліду. Такі показники свідчать про відсутність мутагенного ефекту 1-(4-хлорбензил)-3-хлоро-4-(трифторметил-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діона у дрозофіли. В той

же час як для негативного контролю показники склали:  $m1/f - 0,03$ , та  $m1/m2 - 0,2$ , що є менше за 0,1 та 1, це демонструє, що циклофосфамід має підвищену мутагенну активність.

Отже, нами продемонстровано, що  $1-(4\text{-хлорбензил})\text{-}3\text{-хлоро}\text{-}4\text{-}(\text{трифторметил}\text{-}\text{фениламіно})\text{-}1\text{H}\text{-}\text{пірол}\text{-}2,5\text{-}\text{діон}$  у рекомендованій концентрації не проявляє здатності викликати порушення ДНК, в той час як циклофосфамід який на сьогодні використовується в противо-

пухлинній терапії, характеризується мутагенною активністю.

### Висновки

$1-(4\text{-хлорбензил})\text{-}3\text{-хлоро}\text{-}4\text{-}(\text{трифторметил}\text{-}\text{фениламіно})\text{-}1\text{H}\text{-}\text{пірол}\text{-}2,5\text{-}\text{діон}$  не характеризується токсичним та генотоксичним ефектами в експериментах на модельному об'єкті *D. melanogaster*.

### Література

1. Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О., Горох Є.Л., Рижев А.Ю., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. Колеснік О.О. Рак в Україні, 2015–2016 // Бюлетень Національного канцер-реєстру. – К., 2017. – № 18. – 123 с.
2. Тимошенко Г.М. Державна служба статистики України. Населення України за 2014 рік. Демографічний щорічник // Київ «Консультант». – 2015. – С. 117.
3. Zaid M.M. AL-Sharif Studies on the Genotoxic Effects of Anticancer Drug Paclitaxel (Taxol) in Mice // World Applied Sciences Journal. – 2012. – 16 (7). – P. 989–997.
4. Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Данилов М.О., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстого кишечника шурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, № 3. – С. 62–72.
5. Rand M., Montgomery S., Prince L., Vorobjeikina D. Developmental toxicity Assays using the *Drosophila* model // Curr Protoc Toxicol. – 2014. – № 59. – P. 1–27.
6. Ashburner M., Golic K., Hawley R. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. – 1370 p.
7. Fujikawa K. Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test // Mutation Research. – 1993. – № 290. – p. 175–182.
8. Furlanetto M., Sinigaglia M., do Amaral V., Dihl R., de Andrade H. Effect of Vanillin on Toxicant – Induced Lethality in the *Drosophila melanogaster* DNA Repair Test // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2007. – V. 48. – P. 67–70.

### PROTSENKO O.V., DUDKA O.A., DEMIDOV C.V., KOZERETSKA I.A.

Department of general and molecular genetics, Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: mizgirevka@rambler.ru

### TOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF 1-(4-CHLOROBENZYL)-3-CHLORO-4-(TRIFLUOROMETHYL-PHENYLAMINO)-1H-PYROL-2,5-DIONE IN THE TEST SYSTEM *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA: DROSOPHILIDAE)

**Aim.** To date, the problem of cancer treatment is very acute particularly in countries where the population faced significant man-made catastrophes. It was shown that  $1-(4\text{-chlorobenzyl})\text{-}3\text{-chloro}\text{-}4\text{-}(\text{trifluoromethyl}\text{-}\text{phenylamino})\text{-}1\text{H}\text{-}\text{pyrol}\text{-}2,5\text{-}\text{dione}$  can be used as a cure for cancer. Studied compound shows remarkable antiproliferative effect on the culture of transformed and cancer cells. However, as any drug this compound is a potential xenobiotics and requires pre-test for genotoxicity. **Methods.** To study the toxicity of chemical determined it was analyzed survival, development time and fecundity of flies. We evaluated the genotoxicity of the potential drug with the test for DNA damage repair on the model organism – *Drosophila melanogaster*. For study we used the strain *mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>DS</sup> / FM7c; mwh, y* for the detection of repairable DNA damage in somatic cells. The tested compound was added to culture medium in amount of 1 mg per 4 ml of the medium. **Results.** As a result, we did not observe any toxic or genotoxic effects for *D. melanogaster* in concentration 0.2 mg/ml. **Conclusions.** It was shown the absents of the ability compound, cause toxic and genotoxic effects at the model organism *Drosophila melanogaster*.

**Keywords:** genotoxic, anticancer drugs, *Drosophila melanogaster*.