

# GENETIC EFFECTS OF 1-METHYL-2 [BIS (2 CHLOROETHYL) AMINOPHENYL] 3,4- FULLERO [C<sub>60</sub>] PYRROLIDINE AND 1-METHYL-2 [N-METHYL (2 CHLOROETHYL) AMINOPHENYL ] 3,4- FULLERO [C<sub>60</sub>] PYRROLIDINE

Babynin E. V.<sup>(1)</sup>, Mukhitov A. R.<sup>(2)</sup>, Gubskaya V. P.<sup>(3)</sup>, Nuretdinov I. A.<sup>(3)</sup>, Rumyantseva N. I.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Kazan state university, Kremlevskaya str. 18, Kazan, 420008, Russia; <sup>(2)</sup> Kazan institute of biochemistry and biophysics, Kazan Science Centre RAS, P.O. box 30, Kazan, 420111, Russia;

<sup>(3)</sup>A.E.Arbutov Institute of organic and physical chemistry, Arbuzov str. 8, Kazan Science Centre RAS, Kazan, 420088, Russia

## Introduction

The investigations of last years show existence at fullerene and its derivatives of various effects on alive organisms: inhibition of enzyme activity, interaction with DNA etc. [1]. There are bases to assume, that fullerene and its derivatives will find the wide application in biochemistry, medicine, to pharmaceuticals and especially in the field of photodynamic therapy. The ability of fullerene and its derivatives to interact with DNA, which can result in double-strand breaks in DNA [2], assumes the obligatory testing of all newly synthesized fullerene derivatives on gene toxicity. It was shown that various fullerene derivatives differ from each other on the action on biological objects [3]. Therefore at study of action of new fullerene derivatives on alive organisms are desirable to use the various systems for testing.

## Results and discussion

We studied the effect of two new fullerene derivatives, which are: 1-methyl-2 [bis (2 chloroethyl) aminophenyl] 3,4 - fullero [C<sub>60</sub>] pyrrolidine (further Ful1) and 1-methyl-2 [N-methyl (2 chloroethyl) aminophenyl] 3,4- fullero [C<sub>60</sub>] pyrrolidine (further Ful2) on mutation process in bacteria and in plant cell cultures.

The estimation of gene toxicity properties was carried out using His<sup>+</sup> mutations in locus hisG46 of *Salmonella thyphimurium* strain BA13 (Ames test). It was shown, that both fullerene derivatives had weak cyto toxicity effect in all concentrations tested (2-4 µgml<sup>-1</sup>). The cell viability on the medium containing fullerenes was below in comparison with

the control on 13 - 18%. The effect of Ful1 and Ful2 on mutation frequency depended on a way of treatment of bacterial culture. The most influence on the yield of mutants was observed in a case, when bacteria were cultured at the presence of fullerene tested. The excess of mutant number in comparison with the control was 50 %, (for Ful1) and -70 % (for Ful2) at incubation during 3 hours. The received data suggest the low mutagenic activity of derivative tested for bacteria.

When studied of fullerene action on plant cell cultures, we used morphogenic (MC) and non-morphogenic (NC) calli of *Fagopyrum tataricum* which differ on their morphology, types of cells formed, chromosomal numbers and ability to plant regeneration *in vitro*. There were estimated such parameters as a growth of callus fresh weight, mitotic index, chromosomal aberrations (bridges, fragments, chromosome backlogs).

The fullerenes tested were added to culture medium in concentration 4 µgml<sup>-1</sup>. Both control calli and treated calli were cultured on light (intensity 3000 Lx) during 18 days.

It was established that both types of fullerenes in the applied concentration caused the reduction of growth of NC fresh weight. Interestingly that such suppression of callus growth was accompanied by unequal character of mitotic index changes in both variants. The presence of Ful1 raised the mitotic index in NC, while Ful2 reduced it. Ful2 also suppressed a callus growth and mitotic index in MC, while Ful1 did not cause the reliable changes of these parameters. It is possible to assume, that the increase of mitotic index in NC under action of Ful1 is connected to increase of duration of cell cycle as a result of arising of DNA damages, which require the

E-mail: [Edward.Babynin@ksu.ru](mailto:Edward.Babynin@ksu.ru)

time for a reparation. Under action of Ful2, apparently, the more gross breaches arise which complicate the entry of cells into mitosis.

Additionally, Ful1 and Ful2 caused the increase of frequency of chromosomal aberrations such as bridges, fragments and chromosome backlogs in cells of both callus types in comparison with the control. It was supposed that fullerenes and their derivatives can reveal their mutagenic effect due to the ability to generate of singlet oxygen at illumination by light [4]. The active forms of oxygen are capable to cause breaks in DNA and chromosomes. The noticed by us increase of frequency of chromosome aberrations in callus cells can also be a consequence of photodynamic effect.

### **Conclusions**

Thus, our researches have shown that fullerene derivatives tested have mutagenic effect both on bacteria, and on plant cell cultures.

### **References**

1. Nakamura E., Tokuyama H., Yamago S., Shiraki T., Sugiura Y. Biological activity of water-soluble fullerenes. Structural dependence of DNA cleavage, cytotoxicity, and enzyme inhibitory activities including HIV-protease inhibition. // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1996; 69 (8): 2143-2151
2. Takenaka S., Yamashita K., Takagi M., Hatta T., Tsuge O. Photo-induced DNA cleavage by water-soluble cationic fullerene derivatives. // *Chemistry Letters*. 1999; 4: 321-322.
3. Babynin E. V., Nuretdinov I. A., Gubskaja V. P., Barabanshchikov B. I. Study of mutagenic activity of fullerene and some of its derivatives using His<sup>+</sup> reversions of *Salmonella typhimurium* as an example // *Genetika*. 2002; 38(4): 453-457.
4. Sera N., Tokiva H., Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C<sub>60</sub>-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides // *Carcinogenesis*. 1996; 17(10): 2163-2169.

# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ 1-МЕТИЛ-2[БИС(2ХЛОРЕТИЛ)АМИНОФЕНИЛ] 3,4-ФУЛЛЕРО[С<sub>60</sub>] ПИРРОЛИДИНА И 1-МЕТИЛ-2[N-МЕТИЛ (2ХЛОРЕТИЛ) АМИНОФЕНИЛ 3,4-ФУЛЛЕРО [С<sub>60</sub>] ПИРРОЛИДИНА

Бабынин Э. В.<sup>(1)</sup>, Мухитов А. Р.<sup>(2)</sup>, Губская В.П.<sup>(3)</sup>, Нуретдинов И.А.<sup>(3)</sup>, Румянцева Н. И.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Казанский государственный университет, ул. Кремлевская 18, Казань, 420008, Россия;

<sup>(2)</sup>Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, а/я 30, Казань, 420111, Россия;

<sup>(3)</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН, ул. Арбузова 8, Казань, 420088, Россия;

## Введение

Исследования последних лет показывают существование у фуллера и его производных разнообразных эффектов на живые организмы: ингибирование различных ферментов, взаимодействие с ДНК и др. [1]. Имеются основания предполагать, что фуллерен и его производные найдут широкое применение в биохимии, медицине, фармацевтике и особенно в области фотодинамической терапии. Способность фуллера и его производных к взаимодействию с ДНК, которое может приводить к двухцепочечным разрывам в ДНК [2], предполагает обязательное тестирование вновь получаемых соединений на генотоксичность. Показано, что различные производные фуллера отличаются друг от друга по своему действию на биологические объекты [3]. Поэтому для изучения действия новых производных фуллера на живые организмы желательно использовать разнообразные тест- системы.

## Результаты и обсуждение

Изучали влияние двух новых производных фуллера 1-метил-2<sup>2</sup>[бис(2хлорэтил)аминофенил] 3,4- фуллера[С<sub>60</sub>] пирролидина (далее Ф1) и 1-метил-2[N-метил(2хлорэтил)аминофенил 3,4-фуллера [С<sub>60</sub>] пирролидина (далее Ф2) на мутационный процесс у бактерий и в культуре клеток растений.

Оценку генотоксических свойств осуществляли на примере His<sup>+</sup> мутаций в локусе hisG46 штамма ВА13 *Salmonella thyphimurium* (тест Эймса). Показано, что оба соединения обладают слабым цитотоксическим эффектом в исследуемом диапазоне концентраций (2-4 мкг/мл). Снижение выживаемости клеток на среде, содержащей производные составляло 13-18%. Эффект

соединений Ф1 и Ф2 на частоту мутаций зависел от способа обработки бактериальной культуры. Наибольшее влияние на выход мутантов наблюдалось в случае, когда культивирование бактериальной культуры проводили в присутствии тестируемого соединения. Превышение числа мутантов по сравнению с контролем составило для Ф1 - 50%, а для Ф2 -70% при инкубации 3 часа. Полученные показатели свидетельствуют о низкой мутагенной активности тестируемых производных для бактериальных организмов.

При изучении действия фуллеренов на культуру растительных клеток мы использовали морфогенный (МК) и неморфогенный каллусы (НК) *Fagopyrum tataricum*, которые отличаются по морфологии, типам составляющих их клеток, хромосомным числам и способности регенерировать растения *in vitro*. Оценивали такие показатели как прирост биомассы каллуса, митотический индекс, хромосомные aberrации (мосты, фрагменты, отставания хромосом). Тестируемые соединения добавляли в среду культивирования каллусов в концентрации 4 мкг/мл среды. Каллусы в контроле и опыте культивировали на свету (интенсивность 3000 Лк) 18 суток.

Установлено, что оба типа фуллеренов в исследуемой концентрации вызывают снижение прироста биомассы НК. Интересно, что такое подавление роста сопровождалось неодинаковым характером изменения митотического индекса в культуре под действием этих производных фуллера. Присутствие Ф1 повышало митотический индекс, а Ф2 - снижало его. Ф2 также подавлял прирост биомассы и митотический индекс МК, в то время как Ф1 не вызывал достоверного изменения этих показателей. Можно предположить, что увеличение митотического индекса НК под действием Ф1 связано с увеличением продолжительности клеточного

цикла в результате возникающих повреждений ДНК, требующих времени на репарацию. Под действием Ф2, по-видимому, в клетках возникают более серьезные нарушения, затрудняющие само вступление клеток в митоз. Наряду с этим Ф1 и Ф2 вызывали увеличение частоты хромосомных aberrаций типа мостов, фрагментов и отстаиваний хромосом в клетках обоих типов каллуса по сравнению с контролем. Предполагается, что фуллерены и их производные могут проявлять мутагенный эффект благодаря своей способности генерировать синглетный кислород при освещении видимым светом [4]. Активные формы кислорода способны вызывать разрывы ДНК и хромосом. Наблюдаемое нами увеличение частоты хромосомных aberrаций в клетках каллусов также может быть следствием фотодинамического эффекта.

### **Выводы**

Таким образом, наши исследования показали, что протестированные производные фуллерена C<sub>60</sub> оказывают мутагенный эффект, как на бактерии, так и на культивируемые клетки растений.

### **Литература**

1. Nakamura E., Tokuyama H., Yamago S., Shiraki T., Sugiura Y. Biological activity of water-soluble fullerenes. Structural dependence of DNA cleavage, cytotoxicity, and enzyme inhibitory activities including HIV-protease inhibition. // Bulletin of the Chemical Society of Japan. 1996; 69 (8): 2143-2151
2. Takenaka S., Yamashita K., Takagi M., Hatta T., Tsuge O. Photo-induced DNA cleavage by water-soluble cationic fullerene derivatives. // Chemistry Letters. 1999; 4: 321-322.
3. Бабынин Э. В., Нуретдинов И. А., Губская В. П., Барабанщиков Б. И. Изучение мутагенной активности фуллерена и некоторых его производных на примере His<sup>+</sup> реверсий у *Salmonella typhimurium* Генетика 2002; 38 (2): 1-5.
4. Sera N., Tokiva H., Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C<sub>60</sub> -generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides // Carcinogenesis. 1996; 17(10): 2163-2169.