

# ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ДИПЕПТИДА L-ПРОЛИЛ-L-ЛЕЙЦИН В ТЕСТЕ SALMONELLA/МИКРОСОМЫ

Н.В. Дудчик, О.А. Емельянова

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме:** В тесте с использованием S-9 фракции печени крыс и штаммов *Salmonella typhimurium* TA100, *Escherichia coli* B/r WP2, *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 оценен генотоксический потенциал фармакологической субстанции дипептид L-пролил-L-лейцин, обладающей ноотропными эффектами. Было выявлено, что данное вещество не обладает мутагенной активностью.

**Ключевые слова:** генотоксичность, тест Эймса, фармакология.

**Summary:** In the test using the S-9 rat liver fraction and *Salmonella typhimurium* TA100, *Escherichia coli* B/r WP2, *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 strains genotoxic potential of pharmacological substance dipeptide L-prolyl-L-leucine having nootropic effects was estimated. It has been revealed that this substance doesn't possess mutagenic activity.

**Key words:** genotoxicity, Ames test, pharmacology.

**Введение.** В настоящее время в медицине широко используются ноотропные средства. Данные препараты активизируют интегративные функции мозга, стимулируют память и умственную деятельность, повышают устойчивость мозга к повреждающим факторам [1–3]. L-пролил-L-лейцин является новой фармацевтической композицией с ноотропным действием и может быть использован для профилактики и терапии нарушений высших психических функций у человека, а также повышения его умственных способностей. Однако данные о мутагенной активности данной субстанции отсутствуют, что, не дает возможности в полной мере оценить воздействие L-пролил-L-лейцина на организм человека.

Целью работы явилось изучение генотоксического потенциала дипептида L-пролил-L-лейцина в батарее тестов *Salmonella*/микросомы, выполняемых в варианте без метаболической активации, с неполной метаболической активацией и с полной метаболической активацией.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила субстанция дипептид L-пролил-L-лейцин, предоставленная государственным научным

учреждением «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Оценку генотоксичности исследуемой субстанции осуществляли с помощью теста Эймса, при этом использовался ряд тестов с различным уровнем метаболической активации [4–6].

С целью выявления разных типов мутаций использовали пять тестерных штаммов *S. typhimurium*: TA 98, который регистрирует мутации по типу сдвига рамки считывания, и TA 97, TA 100, TA 102, TA 1535, которые регистрируют мутации по типу замены пар оснований в молекуле ДНК. Наличие мутагенного эффекта учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности у используемых штаммов.

В эксперименте использовали полную и неполную микросомальную активирующую смесь (МАС), позволяющую регистрировать мутагенное действие препаратов.

Исследуемую субстанцию разводили в дистиллированной воде до концентрации в агаризованной среде 2,5 мг/1 мл, 0,25 мг/1 мл, 0,025 мг/1 мл, 0,0025 мг/1 мл, 0,00025 мг/1 мл.

В эксперименте к 2 мл полужидкого «верхнего» агара, расплавленного и остуженного до 45<sup>0</sup>С, добавляли 100 мкл бактериальной культуры (2x10<sup>9</sup> кл/мл), 100 мкл тестируемого образца, 500 мкл МАС. Быстро перемешивали содержимое пробирки и выливали его на слой селективного «нижнего» агара в чашки Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки инкубировали в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 48 ч.

В качестве позитивных контролей, индуцирующих мутации у тест-штаммов в условиях наличия метаболической активации, для всех штаммов использовали 2-аминоантрацин (10 мкг/чашку) и бензо(а)перен (100 мкг/чашку). В качестве негативного контроля использовалась дистиллированная вода.

**Результаты и обсуждение.** Учет результатов проводили путем подсчета количества колоний ревертантов, выросших на опытных и контрольных чашках. Степень мутагенного эффекта определялась кратностью превышения числа колоний-ревертантов при данной дозе над таковым в контроле [4]. Результаты оценки мутагенной активности исследуемой субстанции в тесте Эймса в ряду тестов с различным уровнем метаболической активации представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1 – Результаты оценки мутагенной активности исследуемой субстанции Эймса без метаболической активации

Концентрация	$x_0 / x_k$ а)				
	ТА 97	ТА 98	ТА 100	ТА 102	ТА 1535
2,5 мг/1 мл	1,06	0,79	0,86	1,04	1,02
0,25 мг/1 мл	0,84	1,05	0,81	0,95	0,92

0,025 мг/1 мл	0,97	0,97	1,00	0,90	0,71
0,0025 мг/1 мл	1,09	1,13	0,86	1,27	0,86
0,00025 мг/1 мл	0,92	0,84	1,13	1,31	0,94
2-аминоантрацен, 10 мкг/чашку	3,36				
Бензо(а)перен, 10 мкг/чашку	4,13				
H <sub>2</sub> O дист.	0,95	0,92	0,91	0,90	0,89

а)  $x_0/x_k$  – соотношение среднего числа колоний ревертантов на чашке к числу ревертантов в контроле.

Таблица 2 – Результаты оценки мутагенной активности исследуемой субстанции в тесте Эймса с неполной метаболической активацией

Концентрация	$x_0/x_k$ а)				
	ТА 97	ТА 98	ТА 100	ТА 102	ТА 1535
2,5 мг/1 мл	1,12	0,90	0,92	1,01	1,00
0,25 мг/1 мл	0,89	1,06	0,95	0,97	0,99
0,025 мг/1 мл	0,99	0,92	1,00	0,94	0,90
0,0025 мг/1 мл	1,03	1,02	1,06	1,45	0,99
0,00025 мг/1 мл	0,98	0,94	1,12	1,34	0,98
2-аминоантрацен, 10 мкг/чашку	3,93				
Бензо(а)перен, 10 мкг/чашку	4,45				
H <sub>2</sub> O дист.	0,90	0,91	0,91	0,99	0,94

а)  $x_0/x_k$  – соотношение среднего числа колоний ревертантов на чашке к числу ревертантов в контроле.

Таблица 3 – Результаты оценки мутагенной активности исследуемой субстанции в тесте Эймса с полной метаболической активацией

Концентрация	$x_0/x_k$ а)				
	ТА 97	ТА 98	ТА 100	ТА 102	ТА 1535
2,5 мг/1 мл	1,26	1,59	1,43	1,15	1,25
0,25 мг/1 мл	0,99	1,07	0,84	0,93	0,89
0,025 мг/1 мл	0,91	0,98	1,05	1,06	0,91
0,0025 мг/1 мл	1,16	1,14	1,25	1,29	1,44
0,00025 мг/1 мл	0,91	0,90	0,99	0,93	0,94
2-аминоантрацен, 10 мкг/чашку	3,52				

Бензо(а)перен, 10 мкг/чашку	4,60				
H <sub>2</sub> O дист.	0,93	0,97	0,94	0,90	0,99

а)  $x_0/x_k$  – соотношение среднего числа колоний ревертантов на чашке к числу ревертантов в контроле.

Как видно из таблиц 1 –3, препараты, использованные в качестве позитивных контролей, эффективно индуцировали мутации у всех исследуемых штаммов *S. typhimurium*. Ответ штаммов на стандартные мутагены был в пределах обычных уровней. Количество ревертантов в контроле с растворителем (дистиллированная вода) в варианте с метаболической активацией было в пределах колебаний спонтанного уровня для данных штаммов.

Исследование субстанции L-пролил-L-лейцина показало, что данное вещество в испытуемых концентрациях не индуцирует статистически достоверное увеличение количества ревертантных колоний тест-штаммов *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 по сравнению со спонтанными уровнями реверсий (отрицательные контроли) как в присутствии системы полной и неполной метаболической активации, та и без системы активации.

Выявлено, что генотоксический потенциал L-пролил-L-лейцина не усиливается с увеличением его дозы. Также не было зафиксировано дозозависимых эффектов в ряду исследуемых концентраций субстанции L-пролил-L-лейцина в диапазоне 0,00025 мг/ мл – 2,5 мг/ мл на тест-штаммах *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535.

Это свидетельствует об отсутствии мутагенных свойств у исследуемого вещества. В то же время при использовании классических мутагенов (положительные контроли) было получено статистически достоверное увеличение количества ревертантных колоний по сравнению со спонтанными уровнями реверсий.

**Выводы.** Таким образом, исследование генотоксического потенциала L-пролил-L-лейцина в тесте *salmonella*/микросомы показало, что данная субстанция не обладает свойствами как прямого мутагена, так и промутагена.

### Литература

1. Ковалев, Г.В. Ноотропные средства. Волгоград: Ниж.-Волж. кн.изд-во, 1990; 368 с.
2. Effectiveness of nootropic drugs with cholinergic activity in treatment of cognitive deficit: a review / L.Colucci [et al.] // Front Syst Neurosci.– 2012. – V.4. – P. 163-172.
3. SPECT monitoring of improved cerebral blood flow during long-term treatment of elderly patients with nootropic drugs / I.C. Dormehl [et al.] // Clin Nucl Med. – 1999. V. 24, №1.

– P. 29-34.

4. Методические указания по методам первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. — М.: ВИНТИ, 1985. – 34 с.

5. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes/ D.J. Kirkland [et al.] // *Mutat. Res.* – 2005. – V.588, N2. – P. 88-105.

6. Эффективность батарей тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений/В.А. Тарасов // *Генетика.* – 2003. – №.10. – С. 1406-1417.