

УДК 612.014.4.083.36

Д. Н. АРУТЮНЯН

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОБОГАЩЕННОГО ПРОЛИНОМ ПОЛИПЕПТИДА *IN VIVO* МЕТОДОМ КОМЕТ

Изучена потенциальная генотоксичность обогащенного пролином полипептида (PRP-1) методом ДНК-комет *in vivo* в клетках крови мышей. Выявлено небольшое (до 23%) повышение уровней повреждений ДНК в хвосте кометы по сравнению с контролем, а также наблюдается тенденция к снижению уровней повреждений ДНК со временем после введения PRP-1. Можно заключить, что PRP-1 обладает слабой генотоксической активностью. Принимая во внимание то, что большинство повреждений ДНК, обнаруживаемых методом комет, являются реparableными, можно сделать заключение о безопасности данного препарата.

Введение. Биологически активные вещества, изолированные из клеток и тканей растений, животных и человека, рассматриваются как потенциально перспективные фармакологические препараты. Авторами [1–4] показано, что четыре исследованных обогащенных пролином пептида (PRP) *in vivo* и *in vitro* обладают мощным иммуностимулирующим эффектом.

Цитокин (PRP-1) является уникальным регулятором ряда функций организма. Выявлено, что этот полипептид обладает антибактериальным действием [5]. В условиях *in vivo* за счет активации выброса свободных радикалов кислорода из нейтрофилов и макрофагов [6] PRP-1 участвует в регуляции миело- и лимфопоэза [7–11], увеличивает продукцию антител в В-лимфоцитах и является стимулятором стволовых клеток [12]. Из-за его уникальных свойств PRP-1 можно рассматривать как потенциальное лекарственное средство с широким спектром активности.

Известно, что разработка потенциальных фармацевтических препаратов включает в качестве обязательного условия оценку генотоксического риска их применения, т.е. выявление возможных неблагоприятных эффектов на генетический аппарат. В последние годы в генетической токсикологии в качестве высокочувствительного метода широко применяется тест комет [13], который позволяет выявлять одноцепочечные и двухцепочечные разрывы ДНК, перекрестные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, а также репарацию ДНК в популяциях эукариотических клеток.

Для оценки потенциальной мутагенности и антимутагенности PRP-1 нами было проведено исследование *in vitro* на клеточной линии KCL-22 (на клетках хронической миелоидной лейкемии человека) с применением стан-

дартной и неклеточной версий метода ДНК-комет [14]. В результате был выявлен относительно невысокий уровень индуцированных PRP-1 повреждений ДНК в концентрациях, предлагаемых для его применения (1 и 2 мкг/мл).

Целью настоящей работы было изучение потенциальной генотоксичности PRP-1 *in vivo* методом комет в клетках крови мышей.

Материалы и методы. В эксперименте было использовано 12 белых лабораторных мышей (3 самки и 9 самцов) весом 23–27 г (в среднем 25 г) в возрасте 3–4 месяца, которые содержались в соответствующих условиях. Животные были распределены по четырем экспериментальным группам, каждая из которых включала 3 мыши: I – негативный контроль; II – мышисамцы, однократно обработанные PRP-1 в дозе 50 мкг/кг, у которых анализ повреждений ДНК оценивался через 24 ч после обработки; III – мышисамцы, однократно обработанные PRP-1 в дозе 50 мкг/кг, у которых анализ повреждений ДНК оценивался через 5 дней после обработки; IV – мышисамки, однократно обработанные PRP-1 в дозе 50 мкг/кг, у которых анализ повреждений ДНК оценивался через 5 дней после обработки. Препарат вводился мышам внутривентриально.

Обогащенный пролином полипептид PRP-1 (молекулярная масса 1,48 Да), изолированный из секреторных гранул нейрогипофиза крупного рогатого скота, состоит из 15 аминокислот и включает 4 пролиновых остатка:

Ala-Gly- Ala-Pro-Glu-Pro- Ala-Glu-Pro- Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr.

Был применен стандартный метод ДНК-комет с щелочным гелеэлектрофорезом [15]. Кометы анализировались на флуоресцентном микроскопе с применением автоматической системы анализа Comet 4. В качестве критериев уровня повреждений ДНК измерялось процентное содержание ДНК в хвосте кометы и момент хвоста (произведение длины хвоста на процентное содержание ДНК). В каждом варианте анализировалось по 150 клеток. Статистический анализ проводился с помощью пакета STATGRAPHICS Plus, версия 2.1. Значимость различий между контролем и опытом оценивали по критерию Манн-Уитней (U-тест), различия считаются значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Уровни повреждений ДНК в исследуемых группах мышей измерялись тремя параметрами – длиной хвоста, моментом хвоста и процентом ДНК в хвосте. Полученные результаты представлены в таблицах 1–3.

В контрольной группе спонтанный уровень повреждений ДНК составлял $13,35 \pm 1,38$ (%) ДНК в хвосте. Спустя 24 часа после введения PRP-1 у самцов II группы наблюдалось достоверное повышение уровня повреждений ДНК по всем трем параметрам по сравнению с негативным контролем ($p < 0,05$).

У мышей III и IV групп также наблюдалось достоверное повышение уровня повреждений ДНК по всем трем параметрам по сравнению с негативным контролем ($p < 0,05$). Наблюдается тенденция к понижению уровня повреждений ДНК через 5 дней после введения PRP-1 по сравнению с данными, полученными спустя 24 часа после обработки. Можно предположить, что наблюдаемый эффект обусловлен тем, что в клетках происходит репарация повреждений ДНК.

Индукция повреждений ДНК при действии PRP-1 изучалась у самок и самцов мышей для выявления возможных различий, связанных с полом.

Показано, что результат воздействия по основным параметрам (момент хвоста и %ДНК в хвосте) не зависит от половой принадлежности.

Таблица 1

Уровень поврежденных ДНК в клетках крови мышей II группы

Мыши-самцы	Длина хвоста		% ДНК в хвосте		Момент хвоста	
	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана
1	67,70±1,23	67,11	24,11±1,79	20,84	7,44±0,68	5,91
2	69,99±1,19	69,39	22,17±1,74	17,19	7,29±0,80	5,29
3	69,95±1,13	68,49	20,85±1,77	15,75	7,04±0,77	4,85

Таблица 2

Уровень поврежденных ДНК в клетках крови мышей III группы

Мыши-самцы	Длина хвоста		% ДНК в хвосте		Момент хвоста	
	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана
1	61,67±0,96	60,52	20,34±1,48	16,76	6,15±0,59	4,58
2	63,52±0,83	61,58	15,21±1,32	12,29	4,68±0,49	3,44
3	58,00±0,99	56,29	14,29±1,51	10,01	4,69±0,68	2,38

Таблица 3

Уровень поврежденных ДНК в клетках крови мышей IV группы

Мыши-самки	Длина хвоста		% ДНК в хвосте		Момент хвоста	
	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана	среднее±станд. ошибка	медиана
1	66,58±1,32	65,81	19,24±1,70	14,13	6,41±0,82	4,05
2	65,12±1,01	63,61	22,00±1,93	14,89	6,74±0,76	4,30
3	65,95±1,31	63,61	17,42±1,56	11,52	5,82±0,75	3,39

Сравнение данных по генотоксичности PRP-1 *in vitro* [14] и *in vivo* показывает, что в обеих системах наблюдается достоверное, но незначительное (до 23%) повышение уровней поврежденных ДНК по сравнению с контролем, а также наблюдается тенденция к снижению уровней поврежденных со временем.

Таким образом, можно заключить, что PRP-1 вызывает слабые генотоксические эффекты. Принимая во внимание то, что большинство обнаруженных повреждений ДНК являются реparableными, можно сделать заключение о безопасности данного препарата для генома.

Кафедра генетики и цитологии

Поступило 01.02.2011

ЛИТЕРАТУРА

1. Galoyan A.A. Proceedings of the International Scientific Conference Dedicated to the 57th anniversary of YSMU. Yerev., 2005, p. 135–136.
2. Galoyan A.A., Grigoryan S.L. and Badalyan K.V. Neurochemical Research, 2006, v. 31, № 6, p. 795–803.
3. Галоян А.А., Шахламов В.А., Богданова И.М., Малайцев В.В., Михалева Л.М. Нейрохимия, 2002, т. 19, № 1, с. 41.

4. **Галоян А.А.** Нейрохимия, 2001, т. 18, №2, с. 83.
5. **Brossier F., Weber-Levy M., Mock M., Sirard J.C.** Infect. Immun., 2000, v. 68, p. 1781–1786.
6. **Aprikyan V.S., Galoyan A.A.** Proceeding of the International Conference “Biochemical and Molecular-biological Aspects of Brain Immune System”. Yer.: Encyclopedia Armenica, 2001, p. 183–189.
7. **Aprikyan V.S., Galoyan A.A.** Med. Sci. Armenia, 1999, v. 31, № 4, p. 29–36.
8. **Davtyan T.K., Manukyan N.A., Mkrtychyan R., Galoyan A.A.** Neurochem. Res., 2005, v. 3, p. 297–309.
9. **Galoyan A.A., Aprikyan V.S.** Neurochem. Res., 2002, v. 27, p. 305–312.
10. **Aprikyan V.S., Galoyan A.A.** Neurokimiya, 2000, v. 17, p. 60–63.
11. **Galoyan A.A.** Brain Neurosecretory Cytokines; Immune Response and Neuronal Survival. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2004, 188 p.
12. **Galoyan A.A., Korochkin L.I., Rybalkina E.J.** et al. Cell Transplantation. 2008.
13. **Ostling O., Johanson K.J.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984. v. 123, p. 291–298.
14. **Галоян А.А., Маргарян К.С., Оганесян Г.Г., Гаспарян Г.Г., Арутюнян Д.Н., Арутюнян Р.М.** Нейрохимия, 2009, т. 26, № 2, p. 156–160.
15. **Singh P.N., McCoy T.M., Tice R.R., Schneider E.L.** Exp. Cell Res., 1988, v. 175, p. 184–91.

Գ. Ն. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ՊՐՈԼԻՆՈՎ ՀԱՐՈՒՄՏ ՊՈԼԻՊԵՊՏԻԴԻ ԳԵՆԱԹՈՒՆԱՅԻՆ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ *IN VIVO* ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ ԿՈՄԵՏՆԵՐԻ
ՄԵԹՈԴՈՎ

Ամփոփում

Սկների արյան բջիջներում կոմենների մեթոդով գնահատվել է պրոլինոլ հարուստ պոլիպեպտիդի (PRP-1) գենատունայնությունը՝ կախված նրա ազդեցության տևողությունից: Բացահայտվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի աճ ստուգիչ խմբի համեմատ, ինչպես նաև դիտարկվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակի նվազում՝ կախված PRP-1-ի ազդեցության տևողությունից: Այսպիսով, PRP-1-ը դրսևորել է թույլ արտահայտված գենատունային ակտիվություն, ինչը թույլ է տալիս խոսել օգտագործված տեստ – համակարգում պրեպարատի անվտանգության մասին:

D. N. HAROUTOUNYAN

ASSESSMENT OF GENOTOXIC PROPERTIES OF PROLINE-ENRICHED
POLYPEPTIDE *IN VIVO* BY COMET ASSAY

Summary

The genotoxicity of proline enriched polypeptide (PRP-1) was estimated in mice leucocytes depending on its action time *in vivo* by Comet assay. A high level of DNA damages compared with the control variants was revealed. As well as a small amount of DNA damage is revealed in comparison with the control and there is a tendency for decreasing the level of damage in DNA with the lapse of time after the introduction of PRP-1. Taking into consideration the low genotoxicity of PRP-1, we can conclude the safety of this drug demonstrated in the applied test-system.