

М. Я. ГОЛОВЕНКО <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>), академік НАМН України, д-р біол. наук, проф.,

В. Б. ЛАРИОНОВ <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>), д-р біол. наук,

С. С. БАСОК <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6389-5081>), канд. хім. наук, ст. наук. співроб.,

А. С. РЕДЕР <sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1801-8378>), канд. хім. наук

<sup>1</sup> Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

<sup>2</sup> ТДВ «ІНТЕРХІМ», м. Одеса

## **ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕНОЇ АКТИВНОСТІ ГІДРОХЛОРИД N-( $\gamma$ -АМІНОБУТИРИЛ)-1-АЗА-15-КРАУН-5 У МІКРОПЛАНШЕТНИХ ВАРІАНТАХ ТЕСТУ ЕЙМСА**

**Ключові слова:** генні мутації, тест Еймса, N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан гідрохлорид

М. Ya. GOLOVENKO <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>),

V. B. LARIONOV <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>),

S. S. BASOK <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6389-5081>),

A. S. REDER <sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1801-8378>)

<sup>1</sup> Bogatskiy Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Odesa

<sup>2</sup> SLC «INTERCHEM», Odesa

## **TESTING OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF N-( $\gamma$ -AMINOBTURYL)-1-AZA-15-CROWN-5 HYDROCHLORIDE IN AMES TEST MICROPLATE MODIFICATION**

**Key words:** gene mutations, Ames test, N-( $\gamma$ -aminobuturyl)-1-aza-15-crown-5 hydrochloride

Макроциклічні полієфіри (краун-етери) є сімейством сполук із унікальними іоноформними характеристиками, що сприяють їх широкому використанню у різних галузях промисловості [1]. Вони утворюють стійкі ліпофільні комплекси з катіонами лужних та лужноземельних металів. При цьому катіон включається у внутрішню порожнину краун-етеру і втримується там завдяки йон-дипольній взаємодії з гетероатомами. Краун-етери здатні екстрагувати солі металів і деякі органічні сполуки (аміни, амінокислоти та ін.) з водної фази в органічну і здійснювати їх транспорт через рідкі мембрани. Біологічна активність краун-етерів зумовлена їх впливом на іонну і субстратну проникність біологічних мембран, а також на ферментні системи [2]. Краун-етери виявляють протимікробну та протипаразитарну активність, забезпечують виведення важких металів і радіоактивних ізотопів цезію та стронцію з організму [3, 4].

У пошуках нових препаратів нейротропної дії синтезовано гідрохлорид N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан (аббревіатура, ТОЦПД), в якому аза-15-краун-5 ковалентно з'єднаний із  $\gamma$ -аміномасяною кислотою. Сполука ТОЦПД має широкий спектр протигіпоксичних властивостей та виявляє анксиолітичну, антиагресивну та протисудомну дію [5].

Механізм дії ТОЦПД зумовлений його здатністю спричинювати зміни білкового метаболізму мозку, збільшувати вміст білків у різних відділах головного мозку (неокортексі, гіпокампі, мозочку, гіпоталамусі), активізувати синтез білків як сумарних, так і окремих фракцій (тих, що розчинні та нерозчинні у воді) у корі і гіпокампі експериментальних тварин. Відзначено виражену активність включення 3Н-лейцину і 35S-метіоніну в сумарні білки крові, що може свідчити про периферичні ефекти сполуки. [6]. Механізм дії ТОЦПД пов'язують [7] також із активацією ефектів ГАМК-ергічної системи, про що свідчить збільшення вмісту ГАМК у гомогенаті головного мозку щурів і зменшення ферментативної активності ГАМК-трансамінази, а такі ефекти як антиамнестичний та протисудомний усуваються конкурентним антагоністом ГАМКА-рецептора бікукуліном.

© Колектив авторів, 2019

Незважаючи на широке використання різних похідних краун-етерів все ще залишається мало вивченою проблема їх токсичності та особливо генотоксичності, що не дає гарантії їх безпечності, особливо у фармацевтичній галузі.

**Мета** цього дослідження – виявити можливе індукування генних мутацій за дії ТОЦПД на штамх *S. typhimurium* TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (мутації типу заміни пар основ) без та з метаболічною активацією (фракція S9) у мікропланшетних варіантах тесту Еймса:  $\mu$ Ames kit, Moltox та Muta-ChromoPlate kit.

### **Матеріали та методи дослідження**

У досліджах використано гідрохлорид N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан, який представляє собою тверду порошкоподібну речовину, що добре розчинна у воді. У дослідженні використовували класичні для «мікробного» мутагенезу дози: від 10 до 1 000 мкг/мл.

У роботі застосовано мікропланшети  $\mu$ Ames kit, Moltox та ChromoPlate kit, до ключових перевагах їх відносять використання якісних та сертифікованих штамів, невелику кількість досліджуваної хімічної речовини, а також можливість автоматизації низки стадій при проведенні великих скринінгових програм. Зручності надає і те, що на відміну від класичного варіанту з використанням агаризованого твердого середовища, для мікропланшетного варіанту методу в умовах активації не потрібно готувати мікросомну фракцію печінки тварин, оскільки S9 безпосередньо вміщується у лунках.

З метою виявлення різних типів мутацій в експерименті використовували наступні штами *S. typhimurium*:

- TA\_98 (his D 3052, rfa,  $\Delta$  uvr B, + R: pkM 101), рееструючий мутації за типом зсуву рамки зчитування;
- TA\_100 (his G 46, rfa,  $\Delta$  uvr B, + R: pkM 101), несе мутацію у гістидиновому опероні (місенс-мутація his G46), що дає можливість зафіксувати точкові мутації типу заміни пар основ.

Експерименти в обох тестах проводили у двох паралельних варіантах – без метаболічної активації та з активацією мікросомною активуючою сумішшю (S9 mix). У варіантах без метаболічної активації реестрували дію прямих мутагенів – сполук, які індукують мутації за рахунок активності первинної структури досліджуваної речовини. Дія ж промутагенів – речовин, ефект яких зумовлений утворенням мутагенних метаболітів – реестрували в варіантах експерименту з метаболічною активацією.

У дослідженні використано варіант тесту Еймса, який засновано на визначенні ревертованих бактерій за їх метаболічною активністю [8]. Як негативний контроль використовували розчинник досліджуваних сполук – воду. Як позитивні контролю використовували відомі мутагени: 2-нітрофлуорен для *S. typhimurium* TA 98 і азид натрію для *S. typhimurium* TA 100 в тестах без активації. Усі дослідження здійснювали у 3-разових варіантах позитивного контролю і при нормальному фоновому рівні.

Оцінка отриманих даних базувалася на підрахунку кількості лунок, в яких спостерігається зміна кольору середовища з пурпурного на жовтий. Появу ревертантів в тесті  $\mu$ Ames kit, Moltox оцінювали за кількістю колоній, що виростили у лунках 24-лункових планшетів на твердому поживному середовищі через 48–72 год та розрахунком співвідношення (K) між кількістю ревертантних колоній у досліді (досліджувана сполука) та негативним контролем (розчинник) за формулою:

$$K = \frac{a + 0,5}{b + 0,5},$$

де  $a$  – середня кількість ревертантних колоній у досліді;

$b$  – середня кількість ревертантних колоній у негативному контролі.

Результат вважається позитивним за  $K > 2$  та його зростанні пропорційно концентрації хоча б при одній експериментальній точці.

У дослідженні використано флуктаційний варіант тесту Еймса ChromoPlate kit, який засновано також на визначенні ревертованих бактерій за їх метаболічною активністю [8]. Версія цього тесту передбачає дослідження генотоксичності в рамках належної лабораторної практики. Усі визначення проводили у 3-разових повторях. Результати враховували по порівнянням мутагенних ефектів у всіх варіантах позитивного контролю з аналогічними показниками нормального фонового рівня. Оцінка отриманих даних базувалася на підрахунку кількості лунок, в яких спостерігається зміна кольору середовища з пурпурного на жовтий. При цьому матеріал із кожного варіанта досліду вноситься у 48 лунок 96-лункових планшетів. Негативним результатом (відсутність мутагенної активності) вважається наявність менш ніж 15 ревертантних лунок серед 48 лунок, позитивним (наявність мутагенної активності) – 25 і більше ревертантних лунок серед 48 лунок і пряма залежність ефекту від концентрації досліджуваної сполуки. Існує і інший підхід, у якому незалежно від коливань дисперсії досліду, мутагенний ефект в тесті Еймса вважається встановленим при перевищенні кількості ревертантів в дослідних варіантах над контрольними штамами для ТА 98 – в 2 рази, для ТА 100 – в 1,8 рази [9].

### Результати дослідження та обговорення

Використані у роботі експериментальні токсикологічні моделі відповідають загальним цілям програми досліджень безпеки лікарських засобів і вмщують результати визначення дії прямих мутагенів (варіант без метаболічної активації сполук) та промутагенів (ефект, яких пов'язаний з утворенням мутагенних метаболітів), а також аналогічну процедуру для контрольного варіанту, тобто розчинника. Таким чином, реєструється можливість досліджуваної речовини і/або його метаболітів індукувати реверс мутації від ауксотрофності до прототрофності по гістидину у індикаторних штамів *S. typhimurium*, які несуть *his* мутації і не здатні синтезувати гістидин.

Тест  $\mu$ Ames передбачає оцінку генотоксичності на ранній стадії вивчення безпеки нової сполуки. Версія тесту Moltox та Muta-ChromoPlate kit є наступним дослідженням генотоксичності речовини в рамках належної лабораторної практики. Дані, що отримані у тесті  $\mu$ Ames були використані для екстраполяції дизайну дослідження в умовах стандартного тесту Muta-ChromoPlate kit.

Контрольні дані, одержані з використанням штамів *Salmonella typhimurium* ТА 98 і ТА 100, наведено в табл. 1. Стандартними мутагенами для штамів було використано 2-нітрофлуорен та азид натрію, відповідно.

Т а б л и ц я 1

### Контрольні показники для штамів *Salmonella typhimurium* ТА 98 і ТА 100

(кількість лунок з ревертантами серед 24,  $M \pm m$ ,  $n = 3$ )

Варіант	Контроль стерильності	Негативний контроль (вода)	Позитивний контроль (мутаген)
<i>Salmonella typhimurium</i> ТА 98			
Без активації	0	1,3 ± 0,3	10,0 ± 0,58
<i>K</i>			5,3
З активацією +S9		1,7 ± 0,3	12,3 ± 0,8
<i>K</i>			5,8
<i>Salmonella typhimurium</i> ТА 100			
Без активації	0	5,7 ± 0,33	27,7 ± 1.45
<i>K</i>			4,6
З активацією +S9	0	7,3 ± 0,67	44,3 ± 4,3
<i>K</i>			5,7

**Активність сполуки ТОЦПД в тесті з *S. typhimurium* штамів ТА 98 і ТА 100**

Варіант	Активність ТОЦПД за використання у різних концентраціях (мкг/мл)				
	10	100	250	500	1 000
<i>Salmonella typhimurium</i> ТА 98					
Без активації	0,3 ± 0,3	0,7 ± 0,30,3	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,2
<i>K</i>	0,44	0,67	1,00	1,22	0,83
З активацією +S9	0,3 ± 0,3	2,7 ± 0,67	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,67
<i>K</i>	0,36	1,45	1,00	1,27	1,45
<i>Salmonella typhimurium</i> ТА 100					
Без активації	4,3 ± 0,3	4,3 ± 0,3	5,3 ± 0,3	6,7 ± 0,88	7,0
<i>K</i>	0,77	0,77	0,94	1,16	1,21
З активацією +S9	3,7 ± 0,3	6,0 ± 1,2	7,7 ± 0,88	7,7 ± 0,88	7,3 ± 0,67
<i>K</i>	0,54	0,83	1,05	1,05	1,0

Як показують результати експериментів у тесті  $\mu$ Ames, у контрольному (негативний контроль) варіанті частота спонтанних мутацій не перевищувала стандартного рівня відповідного до генетичних особливостей кожного з референтних штамів. Для обох штамів нами отримано (табл. 1) близькі за значенням дані щодо контролю стерильності, негативного контролю (розчинник) та позитивного контролю (відповідні мутагени). Незважаючи на те, що в обох випадках дані дослідження мутагенної активності зразків сполуки ТОЦПД (табл. 2) дещо перевищують аналогічні показники контролю (табл. 1), можна зробити висновок, що в межах чутливості даного методу сполука не є мутагеном прямої або непрямої дії, яка спроможна індукувати мутації типу зсуву рамки зчитування генетичної інформації або заміни пар основ.

Близькими по значенням були результати отримані нами на планшеті Muta-ChromoPlate kit, щодо контрольних показників штаму *Salmonella typhimurium* ТА 98 і ТА 100 (табл. 3) та активності сполуки ТОЦПД у аналогічних умовах (табл. 4).

Т а б л и ц я 3

**Контрольні значення для штаму *S. typhimurium* ТА 98 і ТА 100 (Muta-ChromoPlate kit)**

Варіант тесту	Контроль стерильності	Негативний контроль, вода	Позитивний контроль, мутаген
<i>S. typhimurium</i> ТА 98			
Без активації	0	2 ± 0,3	43,5 ± 2,03
З активацією + S9	0	1,3 ± 0,3	41,0 ± 2,89
<i>S. typhimurium</i> ТА 100			
Без активації	0	2 ± 0,3	43,5 ± 2,03
З активацією + S9	0	1,3 ± 0,3	41 ± 2,89

Т а б л и ц я 4

**Активність сполуки ТОЦПД у тесті з *S. typhimurium* ТА 98 і ТА 100 (Muta-ChromoPlate kit)**

Варіант	Концентрація, мкг/мл				
	10	100	250	500	1 000
<i>S. typhimurium</i> ТА 100					
Без активації	4,3 ± 0,88	3,7 ± 0,88	4,7 ± 0,88	5,3 ± 0,33	4,3 ± 0,88
З активацією	3,3 ± 0,88	2,7 ± 0,33	1,7 ± 0,33	3,7 ± 0,88	2,7 ± 0,33
<i>S. typhimurium</i> ТА 98					
Без активації	7,0 ± 0,58	6,7 ± 0,33	7,0 ± 0,58	5,7 ± 0,33	4,0 ± 0,58
З активацією	3,0 ± 0,58	2,3 ± 0,33	1,3 ± 0,33	2,3 ± 0,33	3,3 ± 0,33

Негативні результати (табл. 2 та табл. 4) у тестах з активацією (+S9) свідчать про відсутність мутагенної активності також у метаболітів досліджуваної сполуки. Цей

факт не є незвичайним, так як відомо, що сполука ТОЦПД не піддається окисному метаболізму (залежному від CYP450), а в організмах експериментальних тварин утворює ацетильоване похідне, що не є реакційноздатним метаболітом [11].

Отже, сполука ТОЦПД не є ні «прямим», ні «непрямим» мутагеном для штамів *S. typhimurium*. Незначне перевищення середнього числа ревертантів у дослідях щодо контролю (табл. 2, 4) не є статистично достовірним. Чутливість обох тест-штамів щодо досліджуваних речовин виявилася приблизно однаковою, тобто перевищення контрольних значень в обох варіантах дослідів практично не мінялося, що свідчить про однозначність дії сполуки. Загальним для всього експерименту є також відсутність перевищення числа ревертантів в дослідних варіантах на максимальних дозах.

Таким чином, дані, отримані в ході проведення мікропланшетних варіантів тесту Еймса ( $\mu$ Ames kit, Moltox та Muta-ChromoPlate kit) на штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100, свідчать про відсутність мутагенної активності сполуки ТОЦПД у вивчених концентраціях. Більшість краун-етерів різної структури у дозах 0,176–15 408 мг на лунку при використанні не тільки штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100, але й TA1530 і TA1537 також не проявляли генотоксичної дії [11]. У зв'язку з цим, наявність у сполуки ТОЦПД канцерогенних властивостей, пов'язаних з генотоксичністю, є також малоймовірною.

### Висновок

Сполука ТОЦПД у концентраціях 10–1 000 мкг/мл не спричинює мутацій у штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і *Salmonella typhimurium* TA 100 в тестах з та без активації при дослідженні у двох варіантах тесту Еймса: Muta-ChromoPlate kit, Канада та  $\mu$ Ames kit, Moltox, США, що свідчить про відсутність мутагенної активності сполуки та наявності у неї мутагенних метаболітів.

### Список використаної літератури

1. Khalid M., Shireen M. Crown ether schiff bases and their complexes: Recent advances (A Review ) // Orient. J. Chem. – 2018. – V. 34 (4). – P. 1701–1718. <https://doi.org/10.13005/ojc/340402>
2. Богатський А. В., Назаров Е. И., Головенко Н. Я. Биологические аспекты действия краун-эфиров, криптандов и их аналогов. // ЖВХО. – 1985. – Т. XXX, № 5. – С. 593–599.
3. Yildiz M., Kiraz A., Dülger A. Synthesis and antimicrobial activity of new crown ethers of Schiff base type // J. Serb. Chem. Soc. – 2007. – 72 (3). – P. 215–224. <https://doi.org/10.2298/JSC0703215Y>
4. Basim I. Alabdaly, Mohammed H. A. Al-Almery, Mustafa K. Albayaty. Synthesis, characterization and antibacterial activity of new complexes of some lanthanide ions with benzo 18-crown-6 and 221-cryptand // IOSR-JAC. – 2013. – V. 6, N 4. – P. 32–39. <https://doi.org/10.13005/ojc/320228>
5. Богатський О. В., Лук'яненко М. Г., Вороніна Т. О. та ін. Пат. 7121 Україна, МКИ С 07 Д 273/01. N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан-гідрохлорид, що має антиамнестичну, антигіпоксичну та протисудомну активність. Бюл. № 2. 8 с.
6. Карасьова Т. Л., Цапенко Ж. М., Басок С. С., Кулигіна К. Ю., Лук'яненко М. Г. Вплив похідного аза-15-краун-5 із ноотропною властивістю на обмін білків у різних відділах головного мозку і крові шурів // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2010. – N 1. – P. 67–70.
7. Карасьова Т. Л., Цапенко Ж. М., Онуфриєнко О. В., Шандра О., А. Дослідження ролі ГАМК-ергічної системи в реалізації нейротропних ефектів похідного аза-15-краун-5-естеру // Одеський мед. журн. – 2013. – № 6. – С. 37–42.
8. Curieux F., Marzin D., Erb F. Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the new micronucleus test // Mutation Res. – 1994. – V. 341. – P. 1–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)90019-1)
9. Kim B., Margolin B. Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review Mutation Research // Reviews in Mutation Research. – 1999. – V 436 (1). – P. 113–122. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00025-8)
10. Плотникова Е. К., Головенко Н. Я., Зиньковський В. Г. и др. Кинетика выведения мембранного макрогетероцикла из организма мышей // Фармакол. токсикол. – 1986. – № 7. – С. 64–67.
11. Arenaz P., Bitticks L., Pannell K., Garcia S. Genotoxic potential of crown ethers in *Salmonella typhimurium* // Mutagenesis. – 1989. – V. 4, N 6. – P. 437–438. <https://doi.org/10.1093/mutage/4.6.437>

### References

1. Khalid M., Shireen M. Crown ether schiff bases and their complexes: Recent advances (A Review ) // Orient. J. Chem. – 2018. – V. 34 (4). – P. 1701–1718. <https://doi.org/10.13005/ojc/340402>

2. Bogatsky A. V., Nazarov Ye. I., Golovenko N. Ya. Biologicheskiye aspekty deystviya kraun-efirov, kriptandov i ikh analogov // JVCO. – 1985. – V. XXX, № 5. – P. 593–599.
3. Yildiz M., Kiraz A., Dülger A. Synthesis and antimicrobial activity of new crown ethers of Schiff base type // J. Serb. Chem. Soc. – 2007. – 72 (3). – P. 215–224. <https://doi.org/10.2298/JSC0703215Y>
4. Basim I. Alabdaly, Mohammed H. A. Al-Almery, Mustafa K. Albayaty. Synthesis, characterization and antibacterial activity of new complexes of some lanthanide ions with benzo 18-crown-6 and 221-cryptand // IOSR-JAC. – 2013. – V. 6, N 4. – P. 32–39. <https://doi.org/10.13005/ojc/320228>
5. Bogatsky O. V., Luk'yanenko M. G., Voronina T. O. ta in. Pat. 7121 Ukraïna, MKI S 07 D 273/01. N-( $\gamma$ -aminobutiril)-1-aza-4,7,10,13-tetraoksatsiklopentadekan-gidrokhlorid, shcho maє antiamnesticynu, antigipoksichnu ta protisudomnu aktivnist. Bull. № 2. 8 p.
6. Karasyova T. L., Tsapenko Zh. M., Basok S. S., Kuligina K. Yu., Luk'yanenko M. G. Vpliv pokhidnogo aza-15-kraun-5 iz nootropnoyu vlastivystyu na obmin bilkiv u riznikh viddilakh golovnogo mozku i krovi shchuriv // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2010. – N 1. – P. 67–70.
7. Karasyova T. L., Tsapenko Zh. M., Onufrienko O. V., Shandra O. A. Doslidzhennya roli GAMK-ergichnoi sistemi v realizatsii neyrotropnikh effektiv pokhidnogo aza-15-kraun-5-eteru // Odeskiy med. zh. – 2013. – № 6. – P. 37–42.
8. Curieux F., Marzin D., Erb F. Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the new micronucleus test // Mutation Res. – 1994. – V. 341. – P. 1–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)90019-1)
9. Kim B., Margolin B. Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review Mutation Research // Reviews in Mutation Research. – 1999. – V 436 (1). – P. 113–122. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00025-8)
10. Plotnikova Ye. K., Golovenko N. Ya., Zinkovsky V. G., Yakubovskaya L. N., Plotnikova Ye. K., Basok S. S. Kinetika vyvedeniya membranogo makrogeterotsikla iz organizma myshey // Pharmacol. toksikol. – 1986. – N 7. – S. 64–67.
11. Arenaz P., Bitticks L., Pannell K., Garcia S. Genotoxic potential of crown ethers in *Salmonella typhimurium* // Mutagenesis. – 1989. – V. 4, N 6. – P. 437–438. <https://doi.org/10.1093/mutage/4.6.437>

Надійшла до редакції 16 січня 2019 р.

Прийнято до друку 31 січня 2019 р.

М. Я. Головенко <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>),

В. Б. Ларіонов <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>),

С. С. Басок <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6389-5081>),

А. С. Редер <sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1801-8378>),

<sup>1</sup> Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

<sup>2</sup> ТДВ «ІНТЕРХІМ», м. Одеса

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕНОЇ АКТИВНОСТІ ГІДРОХЛОРИД N-( $\gamma$ -АМІНОБУТИРИЛ)-1-АЗА-15-КРАУН-5 У МІКРОПЛАНШЕТНИХ ВАРІАНТАХ ТЕСТУ ЕЙМСА

**Ключові слова:** генні мутації, тест Еймса, N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан гідрохлорид

А Н О Т А Ц І Я

За останні роки дослідження в області хімічного мутагенезу отримали значний розвиток, що пов'язано з впровадженням великої кількості різних хімічних речовин та науковими досягненнями зі створення та використання нових тест-систем, що дає змогу провести повну оцінку як самих мутагенів, так і їх метаболітів. Мета роботи – виявити можливе індукування генних мутацій за дії гідрохлориду N-( $\gamma$ -амінобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан (сполука ТОЦПД), що виявляє ноотропну, анксиолітичну та протисудомну дію.

Здатність ТОЦПД викликати генні мутації оцінювали у тесті Еймса на штамх *Salmonella typhimurium* TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (точкові мутації типу заміни пар основ). Сполуку використовували у концентраціях 10, 100, 250, 500 та 1 000 мкг/мл. Стандартними мутагенами слугували 2-нітрофлуорен для *Salmonella typhimurium* TA 98 і азид натрію для *Salmonella typhimurium* TA 100 у тестах без метаболічної активації. У варіанті з активацією використовували мікросомну активуючу суміш (S9 міх). В тестах з активацією для обох штамів був застосований 2-аміноантрацен. У роботі використовували тест-набір  $\mu$ Ames kit, Molttox (США) та Muta-ChromoPlate kit (Канада). Результати оцінювали за кількістю лунок із мутованими клітинами, що ресстрували за зміною забарвлення середовища з пурпурного на жовтий.

Одержані дані показали, що у контролі та за дії відповідних мутагенів відсоток лунок з мутованими клітинами відповідав стандартним показникам, визначеним протоколом мікропланшетного тесту. За дії сполуки ТОЦПД у межах використаних концентрацій не відмічено генних мутацій у штамів *S. typhimurium* TA 98 і TA 100.

Н. Я. Головенко <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>),

В. Б. Ларионов <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>),

С. С. Басок <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6389-5081>),

А. С. Редер <sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1801-8378>)

<sup>1</sup> Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, г. Одесса

<sup>2</sup> ОДО «ИНТЕРХІМ», г. Одесса

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОХЛОРИДА N-( $\gamma$ -АМИНОБУТИРИЛ)-1-АЗА-15-КРАУН-5 В МИКРОПЛАНШЕТНЫХ ВАРИАНТАХ ТЕСТА ЭЙМСА

**Ключевые слова:** генные мутации, тест Эймса, N-( $\gamma$ -аминобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекан гидрохлорид

А Н Н О Т А Ц И Я

За последние годы достижения в области химического мутагенеза получили значительное развитие, что связано с внедрением большого количества разных химических веществ и научными достижениями по созданию и использованию новых тест-систем, позволяющих провести полную оценку как самих мутагенов, так и их метаболитов.

Цель работы – выявить возможную индукцию генных мутаций при действии гидрохлорида N-( $\gamma$ -аминобутирил)-1-аза-4,7,10,13-тетраоксациклопентадекана (соединение ТОЦПД), проявляющего ноотропное, анксиолитическое и противосудорожное действие.

Способность ТОЦПД вызывать генные мутации оценивали в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA 98 (мутации по типу сдвига рамки считывания) и TA 100 (точные мутации замены пар оснований). Соединение использовали в концентрациях 10, 100, 250, 500 и 1 000 мкг/мл. Стандартными мутагенами служили 2-нитрофлуорен для *Salmonella typhimurium* TA 98 и азид натрия для *Salmonella typhimurium* TA 100 в тестах без метаболической активации. В вариантах с активацией использовали микросомальную активирующую смесь (S9 mix). В тестах с активацией для обоих штаммов был использован 2-аминоантрацен. В работе использовали тест-набор  $\mu$ Ames kit, Molttox (США) и Muta-ChromoPlate kit (Канада). Результаты оценивали по количеству лунок с мутировавшими клетками, которые регистрировали по изменению цвета среды с пурпурного на желтый.

Полученные данные показали, что в контроле и при действии соответствующих мутагенов процент лунок соответствовал стандартным показателям, установленным протоколом микропланшетного теста. При действии соединения ТОЦПД в границах использованных концентраций не отмечено генных мутаций штаммов *S. typhimurium* TA 98 и TA 100.

М. Ya. Golovenko <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>),

V. B. Larionov <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>),

S. S. Basok <sup>1</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6389-5081>),

A. S. Reder <sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1801-8378>),

<sup>1</sup> Bogatskiy Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Odesa

<sup>2</sup> SLC «INTERCHEM», Odesa

TESTING OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF N-( $\gamma$ -AMINO BUTYRYL)-1-AZA-15-CROWN-5 HYDROCHLORIDE IN AMES TEST MICROPLATE MODIFICATION

**Key words:** gene mutations, Ames test, N-( $\gamma$ -aminobutyryl)-1-aza-15-crown-5 hydrochloride

А Б С Т Р А К Т

In recent years, studies in the field of chemical mutagenesis have undergone significant development, due to the introduction of a large number of different chemicals and scientific advances in the creation and use of new test systems, allowing a complete assessment of both mutagens themselves and their metabolites. The aim of the work was to determine possible induction of gene mutations under influence of hydrochloride N-( $\gamma$ -aminobutyryl)-1-aza-4,7,10,13-tetraazacyclopentadecan (TOCPD), which has nootropic, anxiolytic and anticonvulsant activity.

The ability of TOCPD to induce gene mutations was evaluated in Ames test on strains *Salmonella typhimurium* TA 98 (frame shift mutations) and TA 100 (substitution point mutations). The compound was used at concentrations of 10, 100, 250, 500 and 1 000  $\mu$ g/ml. Standard mutagens were 2-nitrofluorene for *Salmonella typhimurium* TA 98 and sodium azide for *Salmonella typhimurium* TA 100 in test without metabolic activation. In an activation variant a microsomal activating mixture was used (S9 mix). In tests with activation for both strains, 2-aminoanthracene was used. The  $\mu$ Ames kit, Molttox (USA) and Muta-ChromoPlate kit (Canada) were used in the work. The results were evaluated by the number of wells with mutated cells with medium color changing from purple to yellow.

The obtained data showed that in the control and according to the action of corresponding mutagens, the percentage of wells with mutated cells corresponded to the standard parameters determined by protocol of the microplate test. For the action of TOCPD compound, no gene mutations were detected in both *S. typhimurium* TA 98 and TA 100 strains within the concentrations used.

Електронна адреса для листування з авторами: [n.golovenko@gmail.com](mailto:n.golovenko@gmail.com)

(Головенко М. Я.)