

Болтіна І.В., к.б.н.

## ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ ТА АНТИМУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТУ НА ІНДУКЦІЮ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

ДП "Інститут екогігієни та токсикології ім. Л.І. Медведя", м. Київ.

Одним із тестів, який входить до стандартної схеми випробувань мутагенної активності лікарських препаратів [1], є тест на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro*. Це один з найбільш відпрацьованих, стандартизованих і поширених методів, який дає можливість досить об'єктивно порівнювати отримані результати інших авторів.

Але фармакологічні препарати можуть мати і антимутагенні властивості, тобто виступати у вигляді чинників, які знижують частоту мутацій. Крім ефективності захисної дії антимутагену варто враховувати ще ряд параметрів: фармакокінетичні, токсичні характеристики речовини, можливість його сполучення з агентом, що модифікується у людини, а також інші характеристики, обов'язкові при розробці кожного лікарського засобу. Особливо важливою є доклінічна оцінка небезпечності антимутагену, що включає дослідження його токсичності, мутагенності, ембріотоксичності, тератогенності, імунотоксичності та вивчення сумісництва протектора та мутагену з погляду завдань фармакології (якщо мова йде про мутагенні ліки), а також з позицій нешкідливості при профілактиці мутагенезу в здорових людей. В усіх випадках абсолютно необхідно, щоб ефект антимутагену був підтверджений на етапі клінічних іспитів. Саме так було визначено антимутагенну дію бемігілу стосовно діоксину і по-

казано антимутагенний ефект аскорбінової кислоти на робітників, що піддаються впливу мутагенних виробничих факторів [2].

### Матеріали та методи.

Культивування лімфоцитів *in vitro* та приготування препаратів хромосом виконували за стандартним напівмікрометодом з модифікаціями, що прийняті в лабораторії мутагенезу. Експерименти проводили в двох варіантах — без та з метаболічною активацією. У варіантах без метаболічної активації реєструють дію прямих мутагенів — з'єднань, що індують мутації за рахунок активності первинної структури досліджуваної речовини. Дія ж промутагенів — з'єднань, ефект яких обумовлений утворенням мутагенних метаболітів, — реєструють у варіантах експерименту з метаболічною активацією. При постановці експерименту з метаболічною активацією разом з препаратом додавали мікросомальну активуючу суміш (S-9 mix), яку готували за методичними рекомендаціями D.M. Maron і B.N. Ames. Для цитогенетичного аналізу використовували метафазні пластинки без перехресень хромосом, які містили 46 + 2 хромосоми — для фонові частоти аберацій і від 24 до 93 хромосом — для кількості анеуплоїдних клітин. Для вивчення антимутагенного ефекту препарати культивували спільно з позитивними контролями, які застосовувалися конкретно для кожного випадку: Мітоміцином-С

(експерименти без активації) або Циклофосфаном (експерименти з активацією). Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до критеріїв Ст'юденту.

### Результати та обговорення.

За час існування лабораторії мутагенезу були "перевірені" на мутагенність за стандартними схемами такі фармпрепарати, як Піродазол [3], Амізон [4], Ербісол@Ультрафарм [5], Ентеросгель [6]. Жоден з вище перелічених препаратів не мав мутагенної активності.

При вивченні препаратів Ербісол@Ультрафарм [7] і Ентеросгель [8] були виявлені їхні антимутагенні властивості.

Під час проведення досліджень було виявлено, що препарат Ербісол@Ультрафарм — метаболічний антимутаген, тобто виявляє антимутагенні властивості лише за наявності ферментативної системи цитохромів P 450 [7].

Під час вивчення мутагенної/антимутагенної активності препарату Ербісол@Ультрафарм була проведена модифікація препаратом *in vitro* культур лімфоцитів периферичної крові жінок, у яких виявлено фіброміому. В результаті (в умовах експерименту з метаболічною активацією) отримано статистично достовірне зниження частоти аберацій хромосом (1,7 0,2 % проти 3,2 0,3 % в контролі — без додавання препарату) і кількості анеуплоїдних клітин (12,7 0,8% проти 16,2 0,9 % в контролі — без додавання препарату) в культурах лімфоцитів периферичної крові хворих. Це може свідчити про здатність препарату запобігати виникненню змін в геномі людини і забезпечувати його стабільність.

При клінічній апробації препарату Ербісол@Ультрафарм, був проведений забір крові в 52 хворих з діагнозом — гепатит С, що звернулися до Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Грошевського, у відділення гепатитів. Спеціального підбору груп не проводилося. В основну (дослідну) групу (32 пацієнти) потрапляли ті особи, які давали згоду на прийом препарату. Інші, що лікувалися за загальноприйнятим методом, були віднесені до контрольної групи (20 осіб). Забір крові проводився до лікування, на 20, 70 і 120 день лікування. Після двох курсів лікування

(70 днів лікування) препаратом Ербісол®Ультрафарм спостерігається достовірне зниження частоти аберації хромосом, анеуплоїдних і мультиаберантних клітин і стабілізація цих показників після

третього курсу (120 днів лікування). Препарат Ербісол®Ультрафарм ефективно діє на хромосомний апарат хворих на гепатит С після двох курсів прийому (табл.1).

Пам'ятаючи про проведену мо-

Таблиця 1

**Частота метафаз з абераціями хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові обстежених пацієнтів протягом трьох курсів лікування Ербісол®Ультрафармом, включаючи "модифікацію in vitro" препаратом**

Показники		Частота метафаз з абераціями, %		Кількість клітин, %	
Дні	Групи	Реальна	"Модифікація in vitro"	Анеуплоїдних	Мультиаберантних
До обстеження	Дослід	17,2±0,80	—	16,9±0,79	43,0±1,00
	Контроль	18,4±0,76	—	16,0±0,72	43,6±0,98
20 (один курс)	Дослід	13,3±0,46	13,1±0,80	14,4±0,48	42,7±0,68
	Контроль	14,0±0,65	14,5±0,80	16,0±0,68	43,5±0,92
70 (два курси)	Дослід	5,70±0,35*	6,6±0,41	11,5±0,48*	19,4±0,60*
	Контроль	10,4±0,68	9,4±0,68	14,6±0,78	34,6±1,00
120 (три курси)	Дослід	4,90±0,35*	4,8±0,37	10,7±0,56*	13,8±0,57*
	Контроль	8,60±1,00	7,1±0,67	14,0±1,40	38,8±1,90
Подальший прогноз	Дослід	—	3,7±0,30	—	—
	Контроль	—	6,1±0,90	—	—

\* — p 0,05 порівняно з паралельними даними контрольної групи

Таблиця 2

**Основні цитогенетичні показники при додаванні Ентеросгелю в культуру лімфоцитів периферичної крові людини після обробки Мітоміцином — С**

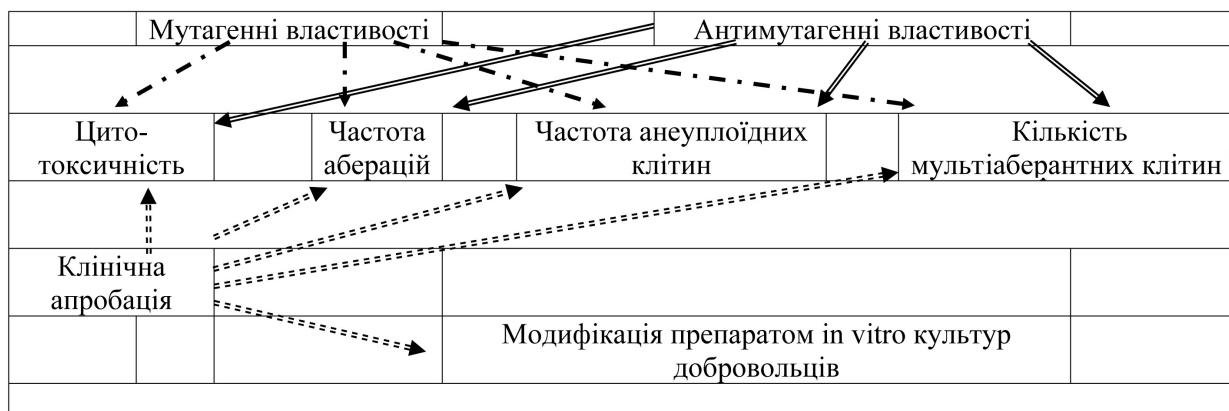
Концентрації, мг/мл	Метафази з абераціями, %	Клітини, %	
		Анеуплоїдні	Мультиаберантні
Контроль	1,0±0,9	11,50±2,30	0
Мітоміцин-С	14,00±3,4	22,00±4,10	51,0±4,9
Ентеросгель, який додавали в культуру разом з Мітоміцином — С			
10,0	7,2±2,7	6,00±2,4*	33,3 4,7*
5,0	8,0±2,7	7,00±2,5*	45,0 4,9
2,5	14,0±3,4	12,00±3,2	50,0 4,9
1,25	14,5±3,4	15,00±3,5	50,0 4,9
0,625	14,5±3,4	16,00±3,6	50,0 4,9
Мітоміцин — С з преінкубацією + Ентеросгель, який додавали в культуру за 48 годин до закінчення культивування			
10,0	4,0±2,3*	6,00±2,4*	0 *
5,0	5,0±2,3*	7,00±2,6*	0 *
2,5	8,0±2,7	8,00±2,7*	14,0±3,5*
Мітоміцин — С з преінкубацією + Ентеросгель, який додавали в культуру за 24 години до закінчення культивування			
10,0	4,0±2,3*	5,30±2,3*	0 *
5,0	5,0±2,4*	6,00±2,4*	0 *
2,5	8,0±2,7	8,00±2,7*	14,0±3,5*

\* p 0,001 порівняно з Мітоміцином-С

дифікацію препаратом Ербісол®Ультрафарм частоти аберацій клітин в культурах лімфоцитів периферичної крові хворих на фіброміоми, було вирішено додати препарат в культури лімфоцитів периферичної крові хворих і спрогнозувати дію субстанції (табл.1). Це дало можливість порівняти прогнозовані дані in vitro "реальними" даними, які отримані після лікування препаратом Ербісол®Ультрафарм. Таким чином, проведені дослідження показують можливість модифікації препаратом Ербісол®Ультрафарм культур лімфоцитів периферичної крові обстежених пацієнтів для прогнозування дії препарату. Безумовно, це досить дороге вирішення проблеми, але можливе за деяких обставин.

Лікарський препарат Ентеросгель (паста для перорального вживання) при вивченні мутагенної активності досліджували в наступних концентраціях: 10,0 мг/мл — максимальна концентрація за весь курс для людини; 5,0 мг/мл — звичайний курс лікування для людини; 2,50 мг/мл — доза, що перевищує добову в 4 рази; 125 мг/мл — подвійна добова доза; 0,625 мг/мл — добова доза для людини. Із даних табл. 2 видно, що достовірне зниження цитогенетичних показників спостерігалось при проведенні "преінкубаційної" обробки, схема якої полягала в тому, що клітини крові людини оброблялися Мітоміцином-С, а через три години після "відмиття" мутагену, відтворювалася стандартна схема культивування. Можливо, це може бути пояснено тим, що Ентеросгель не має прямої взаємодії з мутагеном (Мітоміцином-С), а починає "працювати", коли накопичуються певні об'єми і мутагену, і сорбенту. Крім того, з даних таблиці 2 видно, що час дії сорбенту не відіграє особливої ролі для прояву його антимурагенних властивостей. Отже, результати досліджень щодо ентеросорбенту Ентеросгель (паста для перорального вживання) виробництва ЗАТ ЕОФ "КРЕОМА-ФАРМ", який має антимурагенні властивості, можливо, відкривають нові підходи до використання препарату для профілактики уражень слизової оболонки ШКТ, викликаних, наприклад, радіонуклідним навантаженням, а також деякими іншими виробничими чинниками, що мають мутагенний ефект.

Схема 1. Вивчення мутагенної та антимутагенної активності фармакологічних препаратів, включаючи клінічну апробацію



### Висновок

Використання культури лімфоцитів периферичної крові при дослідженнях фармпрепаратів можна розширити. Перш за все, потрібно підходити до вивчення

кожного препарату "індивідуально", а також проводити паралельні дослідження як мутагенної, так і антимутагенної активності кожної лікарської субстанції, що дасть можливість розширити сферу застосу-

вання препарату. І, безумовно, більше застосовувати можливості цитогенетичного обстеження при клінічній апробації фармакологічних препаратів, що відображено на схемі 1.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) // [За ред. член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова] — К.: Авіценна. — 2001. — 528 с
2. Дурнев А.Д. Фармакологические проблемы поиска и применения антимутагенов / А.Д. Дурнев, С.Б. Середнин // Вестник РАМН. — 1993. — № 1. — С. 19-26.
3. Кравчук О.П. Результаты вивчення мутагенної активності препарату Піродазол / О.П. Кравчук, І.В. Болтіна, О.Л. Костик та ін. // Современные проблемы токсикологии — 2003. — № 1. — С. 69-72.
4. Кравчук А.П. Результаты изучения мутагенной активности препарата Амизон / А.П. Кравчук, Ю.Н. Максимов, Т.И. Григорьева и др. // Современные проблемы токсикологии — 2003. — № 2. — С. 63-67.
5. Болтіна І.В. Вивчення активності препарату ЕРБІСОЛ УЛЬТРА-ФАРМ у тесті на індукцію аберацій хромосом у культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* з метаболічною активацією та без неї / І.В. Болтіна, О.М. Ніколаєнко // Лікі. — 2004. — № 5 — 6. — С.111-118.
6. Доклиническое исследование мутагенного действия энтеросорбентов на примере лекарственного препарата Энтеросгель производства ЗАО ЭОФ "Креома Фарм" / И. Болтина, Н. Кокшарева, О. Костик [та ін.] // Вісник фармакології та фармацевції. — 2008. — № 2. — С. 30-39.
7. Болтіна І.В. Цитогенетические показатели больных с вирусным гепатитом с до и после лечения препаратом Эрбисол®Ультрафарм / И.В. Болтина // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. Збірник наукових праць. — 2009. — Випуск 17. — С. 172 — 182/
8. Болтіна І.В. Доклиническое исследование мутагенного действия энтеросорбентов на примере лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) / И.В. Болтина // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. Збірник наукових праць. — 2009. — Випуск 16. — С. 281-288

*Болтіна І.В.*

#### ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАГЕННОЙ И АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА НА ИНДУКЦИЮ АБЕРАЦИЙ ХРОМОСОМ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

В статье приведены результаты использования культуры лимфоцитов периферической крови при исследовании фармакологических препаратов. Описаны эксперименты по изучению их мутагенных и антимутагенных свойств. Приведена целесообразность использования цитогенетических показателей при клинической апробации препаратов. Поставлен вопрос о комплексном обследовании при изучении препаратов. Описана модификация препаратом *in vitro* культур лимфоцитов периферической крови больных для прогноза применения препарата.

*Ключевые слова:* лимфоциты периферической крови, фармпрепараты, мутагенные и антимутагенные свойства.

*Boltina I.V.*

#### MUTAGENICAL AND ANTIMUTAGENICAL PHARMACOLOGICAL PREPARATIONS ACTIVITY INVESTIGATION BY MEANS OF TESTING CHROMOSOME ABERATION INDUCTION IN THE LYMPHOCYTE CULTURE OF PERIPHERAL BLOOD OF A HUMAN *IN VITRO*

In the article the results of the use of culture of peripheral blood lymphocytes for researches of pharmacological preparations. Experiments are described on a study their mutagenicity and antimutagenicity properties. Expedience of the use of cytogenetics indexes is resulted during clinical approbation of preparations. A question is put about a complex inspection at the study of preparations. Modification is described by preparation of *in vitro* cultures of peripheral blood lymphocytes of patients for the prognosis of application of preparation.

*Key words:* of peripheral blood lymphocytes, pharmacological preparations, mutagenicity and antimutagenicity properties