

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА L-ЛИЗИНА ЭСЦИНАТ

¹И.В. Болтина, к.биол.н.; ¹Е.Л. Костик, ¹И.В. Лепешкин, к.мед.н.; ¹Н.В. Кокшарева, д.биол.н.;
¹Я.В. Колянчук; ²А.Е. Кузьменко, к.биол.н.; ²Ю.Г. Кувайсков

¹Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя МЗ Украины, г. Киев

²Корпорация "Артериум", г. Киев

РЕЗЮМЕ. Мутагенні властивості препарату L-Лізину есцинат вивчені в двох тестах: індуція аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові *in vitro* без та з метаболічною активацією мікросомальною фракцією S-9 та індуція мутацій в тесті Еймса (*Salmonella typhimurium*) без та з метаболічною активацією мікросомальною фракцією S-9. Встановлено, що препарат не має мутагенної активності.

Ключові слова: мутагенна активність, препарат L-Лізину есцинат.

РЕЗЮМЕ. Мутагенные свойства препарата L-Лизина эсцинат изучены в двух тестах: индукция аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови *in vitro* без и с метаболической активацией микросомальной фракцией S-9 и индукция мутаций в тесте Эймса (*Salmonella typhimurium*) без и с метаболической активацией микросомальной фракцией S-9. Установлено, что препарат не обладает мутагенной активностью.

Ключевые слова: мутагенная активность, препарат L-Лизина эсцинат.

SUMMARY. Mutagenic activity of preparation L -Lizin eszinate was investigated in two tests: induce increasing of structural chromosomal aberrations in human lymphocytes *in vitro* without and with the metabolic activating of mammalian microsomal fraction S — 9 and induce mutations in used strains of *Salmonella typhimurium* without and with the metabolic activating of mammalian microsomal fraction S — 9. Conclusion that preparations do not have mutagenic activity was established as a result of investigations.

Key words: mutagenic activity, preparation L -Lizin eszinate.

Лекарственное средство L-лизина эсцинат, разработанное в Государственном научном центре лекарственных средств Украины, относится к фармакотерапевтической группе капилляростабилизирующих средств и обладает противоотечной, противовоспалительной и анальгезирующей активностью. Фармакологическая активность L-лизина эсцината быстро диссоциирующего на ионы лизина и эсцина в водной среде или крови, определяется эсцином — тритерпеновым сапониновым гликозидом каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.), представляющим собой смесь α -эсцина, β -эсцина и криптоэсцина [1]. Эсцин уменьшает содержание аденозинтрифосфата (АТФ) в венозных эндотелиальных клетках в условиях гипоксии [2], снижает активность лизосомальных гидролаз, предупреждая расщепление мукополисахаридов в стенках капилляров и в окружающей их соединительной ткани [3], увеличивает текучесть липидного слоя биомембран [4]. Перечисленные механизмы обуславливают фармакотерапевтические свойства L-лизина эсцината [5].

Клиническая эффективность и безопасность L-лизина эсцината подтверждена данными более чем 10 клинических исследований, с участием более чем 2000 пациентов обоих полов. По результатам проведенных исследований отмечено отсутствие клинически значимых побочных реакций, что свидетельствует о высокой безопасности применения L-

лизина эсцината. Всестороннее изучение биологической активности L-лизина эсцината продолжается и по сегодняшний день. Так, в связи с гармонизацией украинского и европейского законодательства в области регулирования обращения лекарственных средств в Украине возросли требования к качеству доказательной базы по безопасности и, в частности, генотоксичности лекарственных средств, что отражено в Приказе МЗ Украины № 944 от 14.12.2009 р. "Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів".

Особое внимание к исследованиям генотоксичности лекарственных препаратов связано с тем, что различные соединения как синтетического, так и биологического происхождения могут индуцировать генные, хромосомные и геномные мутации, давая при этом высокую специфичность в отношении тех или иных типов мутаций. Руководящий документ Европейского Медицинского Агентства "Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use" рекомендует набор методов, позволяющих регистрировать все типы генетических изменений [6].

Стандартная схема испытаний лекарственных препаратов [7] включает в себя четыре теста: 1. Учет генных мутаций на микроорганизмах (тест Эймса) или на дрожозифиле.

2. Учет доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей.
3. Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.
4. Учет хромосомных aberrаций или сестринских хроматидных обменов в культуре лимфоцитов человека.

Общей чертой имеющихся систем является то, что используемые в них методы позволяют поэтапно решать две различные задачи: выявление потенциальных мутагенов и оценка их генетической активности.

Методы тестирования веществ с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов получили довольно широкое распространение, так как микроорганизмы размножаются быстро, содержат их достаточно просто и сравнительно дешево. Но при трактовке результатов таких испытаний и перенесении их на человека возникает ряд проблем:

- Во-первых, в данном случае изучается действие химического вещества на прокариоты, а значимость результатов переносят на эукариоты.
- Во-вторых, при исследованиях на микроорганизмах выпадает феномен метаболической активации промутагенов в мутагены, для чего в среду культивирования вводят микросомальную фракцию S-9, полученную из клеток печени крыс, предварительно обработанных индукторами.
- В-третьих, не учитываются возможности репарации возникновения предмутационных повреждений в эукариотических клетках, которые существенно отличаются от таковых в клетках прокариот (имеются качественные различия в системах репараций повреждений ДНК даже между клетками человека и мышей).

Но все-таки тест обладает рядом преимуществ, главные из которых быстрота ответа и ранжирование данных по силе эффекта. Это единственный тест, где сразу можно получить ответ о силе мутагенного воздействия.

Цитогенетические тесты в культуре *in vitro* направлены на то, чтобы продемонстрировать индукцию хромосомных нарушений в культивируемых клетках, в данном случае лимфоцитов периферической крови, которые равномерно распределены и находятся в одной фазе клеточного цикла (G₀). Наиболее информативным является метод изучения хромосом на стадии метафазы, поскольку он позволяет исследовать весь спектр структурных и количественных нарушений хромосом. Это один из наиболее отработанных, стандартизированных и широко распространенных методов, что дает возможность достаточно объективно сравнивать полученные результаты с данными других авторов.

В тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови определяют следующие показатели:

- частоту aberrаций хромосом;
- числовые нарушения — количество анеуплоидных и полиплоидных клеток (возможный онкологический маркер [8]);
- количество мультиабберрантных клеток, возникновение которых может привести к активации протоонкогенов, в результате чего может возникнуть опухолевый процесс. Кроме того, наличие мультиабберрантных клеток свидетельствует об изменениях в системе репарации [9].

Целью проведенных экспериментальных исследований являлась оценка мутагенного действия лекарственного препарата L-Лизина эсцинат.

Поставленную задачу решали следующим образом:

- в концентрациях 100,0 10,0 1,0 и 0,1 мкг/мл тестировали индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* без и с метаболической активацией.
- в концентрациях 100,0 10,0 1,0 и 0,1 мкг/чашку тестировали индукцию обратных генных мутаций у *Salmonella typhimurium* (тест Эймса без и с метаболической активацией).

Материалы и методы

Исследовалось лекарственное средство L-лизина эсцинат, 1 мг/мл, раствор для инъекций в ампулах по 5 мл, производства АО "Галичфарм" (Корпорация "Артериум", Украина), серия 10311. Лекарственное средство L-лизина эсцинат представляет собой стерильный водный раствор, содержащий 0,1% действующего вещества — L-лизина эсцината, 20% этанола и 20% пропиленгликоля.

В качестве плацебо использовали стерильный водный раствор, содержащий 20% этанола и 20% пропиленгликоля, изготовленный АО "Галичфарм" (Корпорация "Артериум", Украина).

Эксперименты в обоих тестах проводили в двух параллельных вариантах — без метаболической активации и с активацией микросомальной активирующей смесью — S-9 mix. В вариантах без метаболической активации регистрировали действие прямых мутагенов — соединений, индуцирующих мутации за счет активности первичной структуры исследуемого вещества. Действие же промутагенов — соединений, эффект которых обусловлен образованием мутагенных метаболитов — регистрировали в вариантах эксперимента с метаболической активацией. Приготовление микросомальной фракции гомогената печени крыс — S-9, которую использовали в двух тестах, проводили согласно методическим рекомендациям D.M. Maron и B.N. Ames [10].

Методика культивирования лимфоцитов и приготовление препаратов хромосом было проведено стандартным полумикрометодом. Эксперимент сопровождали отрицательным и

положительным контролями. В положительном контрольном варианте в эксперименте без метаболической активации в культуру лимфоцитов на 28-м часу инкубации вносили Митомин-С в концентрации 0,1 мкг/мл культуральной среды, в варианте с метаболической активацией в качестве положительного контроля использовали Циклофосфан в концентрации 20 мкг/мл. Все рабочие растворы готовили непосредственно перед внесением в культуру.

Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и учет aberrаций хромосом были общепринятыми. Анализ проводили на микроскопе "АХИО-SCOP". В каждом варианте эксперимента анализировали по 200 метафазных пластинок, которые содержали не менее 44 хромосом и имели не более 3 наложений хромосом в одной метафазе. Учитывали aberrации хроматидного и хромосомного типов. Пробелы регистрировали, но в число aberrаций не включали. При подсчете количества анеуплоидных клеток учитывали метафазы гипоплоидные — от 26 до 42 хромосом и гиперплоидные — более 48 хромосом.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики.

С помощью теста Эймса регистрируются способности исследуемого вещества и/или его метаболитов индуцировать реверс-мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у индикаторных штаммов *S. typhimurium*, которые несут his--мутации и не способны синтезировать гистидин.

Наличие мутагенного эффекта учитывалось по индукции обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину. С целью выявления разных типов мутаций в эксперименте использовали два индикаторных штамма *S. typhimurium*:

- ТА-98 (his D 3052, rfa, Δ uvr B, + R: pkM 101), регистрирующий мутации по типу смещения рамки считывания,
- ТА-100 (his G 46, rfa, Δ uvr B, + R: pkM 101), регистрирующий мутации по типу замены пар оснований.

Штаммы были получены из Лаборатории Эймса (Bruce Ames Laboratory, Department of Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley, 401 Barker Hall, 94720-0001) в 1993 году.

Использование этого набора штаммов позволяет регистрировать индукции мутации и молекулярный механизм действия мутагенов.

Мутагенную активность лекарственного препарата исследовали методом стандартного чашечного теста, предложенного D.M. Maron

и V.N. Ames [10]. Соответствие каждого бактериального штамма своему генотипу и характерный спонтанный уровень реверс-мутаций определяли также по методике D.M. Maron и V.N. Ames [10].

Статистическую обработку данных проводили с использованием формул, предложенных Maron D.M., Ames V.N. [10] для расчета среднего значения степени кратности превышения количества колоний-ревертантов в каждой концентрации над количеством колоний в контроле, как описано в методических рекомендациях [11].

Согласно методическим рекомендациям Л.М. Фонштейна [11] определялась степень мутагенного эффекта кратностью превышения количества колоний-ревертантов в определенной концентрации над таковыми в контроле. При отсутствии статистически значимых отличий, степень мутагенного эффекта оценивалась знаком "-".

При наличии статистических отличий и превышения количества колоний при данной концентрации над контролем:

- до 10 раз, мутагенный эффект оценивается как слабый ("+"),
- от 10 до 100 — средний ("++"),
- более чем в 100 раз — сильный ("+++").

Опыт практической работы показывает, что более рациональным есть подход, который предусматривает, что независимо от колебаний дисперсии опыта, мутагенный эффект в тесте Эймса считается установленным при превышении количества колоний-ревертантов в опытных вариантах над контрольными штаммами для ТА 98 — в 2 раза, для ТА 100 — в 1,8 раза. Слабый, средний и сильный мутагенные эффекты оцениваются согласно рекомендациям Л.М. Фонштейна [11]. Такой подход позволяет избежать неправильных результатов и с большей надежностью идентифицировать мутагены.

Согласно вышесказанному, рассчитывали кратность превышения количества ревертантных колоний *S. typhimurium* на штамме ТА-98 опыта над контролем (спонтанным уровнем).

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментов представлены в таблицах 1 — 3.

Из данных таблицы видно, что достоверное повышение частоты метафаз с aberrациями было отмечено только в положительных контролях, что доказывает адекватность использования данной тест-системы для оценки мутагенных свойств химических агентов. Ни в одной из концентраций достоверного повышения частоты метафаз с aberrациями ни при действии препарата, ни при действии плацебо получено не было.

**Частота метафаз с абберациями хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови
без и с метаболической активацией**

Показатели	Количество метафаз		Средняя частота метафаз с абберациями, $M \pm m, \%$
	Всего	С абберациями	
Контроль	200	4	$2,00 \pm 0,99$
Контроль S-9	200	5	$2,50 \pm 1,10$
Митомидин — С (положительный контроль без активации)	100	15	$15,00 \pm 3,51^*$
Циклофосфан (положительный контроль с активацией)	100	16	$16,00 \pm 3,67^*$
Концентрации лекарственного препарата L-Лизина эсцинат в мкг/мл без активации			
100,0	200	7	$3,50 \pm 1,30$
10,0	200	7	$3,50 \pm 1,30$
1,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
0,1	200	6	$3,00 \pm 1,21$
Концентрации Плацебо в мкг/мл без активации			
100,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
10,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
1,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
0,1	200	5	$2,50 \pm 1,10$
Концентрации лекарственного препарата L-Лизина эсцинат в мг/мл с активацией			
100,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
10,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
1,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
0,1	200	5	$2,50 \pm 1,10$
Концентрации Плацебо в мкг/мл с активацией			
100,0	200	7	$3,50 \pm 1,30$
10,0	200	7	$3,50 \pm 1,30$
1,0	200	6	$3,00 \pm 1,21$
0,1	200	6	$3,00 \pm 1,21$

Примечание: * — $P < 0,05$

Наблюдаемые абберации хромосом были представлены в основном одиночными фрагментами. Полученное преобладание аббераций хроматидного типа над абберациями хромосомного типа, как известно, характерно для действия агентов химической природы, какими являются и лекарственный препарат L-Лизина эсцинат и плацебо.

Мультиабберантных клеток при действии исследуемых веществ не найдено, что может свидетельствовать об отсутствии влияния препарата на систему репарации ДНК. Остановимся на еще одном показателе канцерогенного риска — анеуплоидных клетках (табл. 2).

Из представленных данных видно, что ни в одной из концентраций ни лекарственный препарат L-Лизина эсцинат, ни плацебо не индуцировали достоверного повышения количества анеуплоидных клеток. Достоверное их по-

вышение отмечено только в положительных контролях.

Итак, в тесте на индукцию аббераций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* в вариантах эксперимента без и с метаболической активацией в концентрациях от 100,0 до 0,1 мкг/мл мутагенной активности ни лекарственного препарата L-Лизина эсцинат, ни плацебо не выявлено (табл. 3).

L-Лизина эсцинат в концентрациях от 100 до 0,10 мкг/чашку в экспериментах с и без метаболической активации не индуцировал превышения количества ревертантных колоний *S. typhimurium* в тестерных штаммах TA-98 и TA-100 по сравнению со спонтанными уровнями реверсий (негативные контроли и контроль плацебо). Это свидетельствует об отсутствии мутагенных свойств у L-лизина эсцината в данном тесте.

Таблица 2

Частота анеуплоидных клеток в культуре лимфоцитов периферической крови без и с метаболической активацией

Показатели	Количество метафаз		Средняя частота анеуплоидных клеток, М±m, %
	Всего	Анеуплоидных	
Контроль	200	23	11,50±2,30
Контроль S-9	200	23	11,50±2,30
Митоминин — С (положительный контроль без активации)	100	22	22,00±4,10*
Циклофосфан (положительный контроль с активацией)	100	24	24,00±4,30*
Концентрации лекарственного препарата L-Лизина эсцинат в мкг/мл без активации			
100,0	200	33	16,50 ± 2,62
10,0	200	32	16,00 ± 2,59
1,0	200	29	14,50 ± 2,49
0,1	200	29	14,50 ± 2,49
Концентрации Плацебо в мкг/мл без активации			
100,0	200	24	12,00 ± 2,30
10,0	200	22	11,00 ± 2,21
1,0	200	22	11,00 ± 2,21
0,1	200	25	12,50 ± 2,34
Концентрации лекарственного препарата L-Лизина эсцинат в мг/мл с активацией			
100,0	200	28	13,00 ± 2,38
10,0	200	27	13,50 ± 2,42
1,0	200	26	13,00 ± 2,38
0,1	200	27	13,50 ± 2,42
Концентрации Плацебо в мкг/мл с активацией			
100,0	200	26	13,00 ± 2,38
10,0	200	27	13,50 ± 2,42
1,0	200	26	13,00 ± 2,38
0,1	200	26	13,00 ± 2,38

Примечание: * — P < 0,05

Таблица 3

Оценка мутагенного эффекта L-Лизина эсцинат на штаммах S. Typhimurium (тест Эймса)

№ штамма		Плацебо	Мутаген	Концентрации препарата (мкг/чашку)			
				100,0	10,0	1,0	1,0
ТА-98	без м/а	0,90	22,47	1,27	1,06	1,28	0,97
		—	++	—	—	—	—
	с м/а	1,00	24,51	1,21	1,16	1,07	1,02
		—	++	—	—	—	—
ТА-100	без м/а	0,75	19,90	0,86	0,92	0,96	1,10
		—	++	—	—	—	—
	с м/а	1,02	27,75	0,85	0,95	1,05	0,89
		—	++	—	—	—	—

отсутствие эффекта "—" для ТА-98 до 2 раз, для ТА-100 до 1,8 раз
 слабый мутагенный эффект "+"
 средний мутагенный эффект "++"

Выводы. Мутагенные свойства лекарственного препарата L-Лизина эсцинат исследованы в тестах, позволяющих выявлять способность веществ индуцировать геномные, генные и хромосомные мутации *in vitro*. В тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека

in vitro (в вариантах эксперимента без и с метаболической активацией) и в тесте Эймса мутагенной активности лекарственного препарата не выявлено.

Таким образом, лекарственный препарат L-Лизина эсцинат мутагенной активностью не обладает.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куцик Р.В. Каштан конский (Аналитический обзор) / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук, В.В. Дьячок // Провизор. — 2002. — № 4. — С.28 — 32.
2. Frick R.W. Three treatments for chronic venous insufficiency: escin, hydroxyethylrutin and Daflon / h.w. Frick // *Angiology*. — 2000. — №51 (3). — P.197 — 205.
3. Kreysel H.W. Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of varicosis and the reduction in their serum activity by Venostasin (TM) / H.W. Kreysel, H.P. Nissen, E. A. Enghofer // *Vasa*. — 1983. — V.12. — P. 377 — 382.
4. Воздействие эсцина на биологические мембраны / [Л.В. Иванов, Я.И. Хаджай, И.И. Чуева, В.Ю. Веселовский] // *Химико-фармацевтический журнал*. — 1988. — Т. 22. — № 12. — С. 1417 — 1421.
5. Лизогуб М.В. Клініко-імунохімічна оцінка ефекту захисту мозку при тяжкій черепно-мозковій травмі: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.30 / М. В. Лизогуб — Донецьк, 2008. — 16 с.
6. ICH S2R1: Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. EMEA/CHMP/ICH/126642/2008 [электронный ресурс] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) // за ред. член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова — К.: Авіцена. — 2001. — 528 с.
8. Duesberg P. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / P. Duesberg, D. Rasnick // *Cell Motility and Cytoskeleton*. — 2000. — V. 47. — P. 81 — 107.
9. Выявление мультиабберрантных лимфоцитов при цитогенетическом обследовании различных групп людей, контактирующих с мутагенными факторами / [М.А. Пилинская, А.М. Шеметун, С.С. Дыбский, Д.В. Редько, И.А. Знаевская] // *Цитология и генетика*. — 1994. — Т. 28. — № 1. — С. 27 — 32.
10. Maron D.M. Revised for the Salmonella mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // *Mut. Res.* — 1983. — Vol 113. — P. 172 — 215.
11. Фонштейн Л.М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. (Методические указания). / Л.М. Фонштейн, С.К. Абилов, Е.В. Бобринев // М.:ВИНИТИ, 1985. — 34 с.

Надійшла до редакції 17.08.2011 р.