

ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОГО И АНТИМУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ЭНТЕРОСГЕЛЬ (ПАСТА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ)"

И.В. Болтина к.биол.н., Н.В. Кокшарева д.биол.н., Е.Л. Костик, Т.В. Ткачук, Е.Н. Струменская к.мед.н.*

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

* Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев

РЕЗЮМЕ. Результати проведеного дослідження свідчать про те, що ентеросорбент Ентеросгель (паста для перорального вживання) виробництва ЗАТ ЕОФ "КРЕОМА-ФАРМ" володіє антимутагенними властивостями, що, можливо, відкриває 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.

Ключові слова: ентеросгель, мутагенна дія, антимутагенні властивості.

РЕЗЮМЕ. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что энтеросорбент Энтеросгель (паста для перорального применения) производства ЗАО ЭОФ "КРЕОМА-ФАРМ" обладает антимутагенными свойствами, что, возможно, открывает новые подходы к использованию препарата для профилактики поражений слизистой ЖКТ, вызванных, например, радионуклидной нагрузкой, а также некоторыми другими производственными факторами, обладающими мутагенным эффектом.

Ключевые слова: энтеросгель, мутагенное действие, антимутагенные свойства.

SUMMARY. The results of the conducted research testify that Enterosorbent Enterosgel' (paste for peroral'nogo application) of production of joint-stock COMPANY ZAO EOF "KREOMA-FARM" possesses antimutagenicity properties, that, possibly, opens the new going near the use of preparation for the prophylaxis of defeats of mucous membrane of ZHKT, caused, for example, radionuklidnoy loading, and also some other by a production factors, possessing mutagens an effect.

Key words: enterosgel', mutagenicity, antimutagenicity.

Лекарственный препарат Энтеросгель (паста для перорального применения) представляет собой гидрогель метилированных клеток и является химически синтезированным энтеросорбентом. Известно, что химические вещества могут индуцировать генные, хромосомные и геномные мутации и давать при этом высокую специфичность в отношении тех или иных типов мутаций. В этой связи при оценке мутагенного потенциала вещества используется набор методов, позволяющих регистрировать все типы генетических изменений.

Стандартная схема испытаний лекарственных препаратов [1] включает в себя четыре теста: учет генных мутаций на микроорганизмах (тест Эймса) или на дрозофиле; учет доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей; учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей и учет хромосомных aberrаций или сестринских хроматидных обменов в культуре лимфоцитов человека.

Общим для этих тестовых систем является то, что используемые в них методы позволяют поэтапно решать две различные задачи: выявление

потенциальных мутагенов и оценка их генетической активности

Цель проведенных экспериментальных исследований — оценка мутагенного и антимутагенного действия лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения).

Согласно поставленным задачам исследовали: мутагенную активность лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) в трех тестах: на индукцию обратных генных мутаций у *Salmonella typhimurium* (тест Эймса без и с метаболической активацией); на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* без и с метаболической активацией; на индукцию aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей *in vivo*.

Изучение антимутагенной активности лекарственного препарата Энтеросгель изучали в тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* без и с метаболической активацией.

Тест на индукцию aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей *in vivo*

Мутагенную активность лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) в тесте на индукцию aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей *in vivo* исследовали на белых нелинейных мышцах, самцах, весом 18-20 г, которые были получены из питомника клиники лабораторных животных ЧП "Биомодельсервис" (г. Киев, ул. Э. Потье, 14). Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины. В подопытные и контрольные группы входило по 6 животных.

Во время проведения эксперимента животные содержались в виварии в стандартных пластиковых клетках, группами по 6 голов, при температуре окружающей среды 20-22°C, влажности воздуха 50-60%, стандартном световом режиме "день-ночь". Препараты хромосом клеток костного мозга готовили по методу Н.Д.Эванс [2]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критериев Стьюдента [3].

При воздействии лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) во всех испытанных дозах гибели животных

и клинических симптомов интоксикации не наблюдалось. Поведение подопытных мышей не отличалось от контрольных. Лекарственный препарат Энтеросгель (паста для перорального применения) в дозах от 5,0 до 0,5 г/кг веса тела животного не индуцировал статистически достоверного превышения спонтанной частоты aberrаций хромосом. В то же время в группе животных, затравленных Циклофосфаном, отмечено статистически достоверное ($P \leq 0,001$) превышение спонтанной частоты aberrаций, что доказывает адекватность использования данной тест-системы для оценки мутагенных свойств химических агентов.

В тесте Эймса и в тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* лекарственный препарат Энтеросгель (паста для перорального применения) вносили в следующих концентрациях:

- 10,0 мг/мл — максимальная концентрация за весь курс для человека;
- 5,0 мг/мл — обычный курс лечения для человека;
- 2,50 мг/мл — доза, превышающая суточную в 4 раза;
- 1,25 мг/мл — двойная суточная доза;
- 0,625 мг/мл — суточная доза для человека

Эксперимент 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 регистрируют действие прямых мутагенов — соединений, индуцирующих мутации за счет активности первичной структуры исследуемого вещества. Действие же промутагенов — соединений, эффект которых обусловлен образованием мутагенных метаболитов — регистрируют в вариантах эксперимента с метаболической активацией.

Тест Эймса

Наличие мутагенного эффекта в тесте Эймса учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину. С целью выявления разных типов мутаций в эксперименте использовали два индикаторных штамма *S. typhimurium*: TA-98 (his D 3052, rfa, Δ uvr B, + R: pkM 101), регистрирующий мутации по типу смещения рамки считывания и TA-100 (his G 46, rfa, Δ uvr B, + R: pkM 101), реги-

стрирующий мутации по типу замены пар оснований, которые 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.

При исследовании мутагенной активности лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) методом стандартного чашечного теста, предложенного D.M. Maron и B.N. Ames [4], обнаружен слабый мутагенный эффект в максимальной концентрации за весь курс — 10,0 мг/мл в экспериментах на двух штаммах TA-98 и TA-100 без и с метаболической активацией, а также во второй концентрации — 5,0 мкг/мл (обычный курс лечения). Однако, учитывая активность препарата как в отношении питательной среды, так и в отношении бактерии (ложномутагенный эффект, который был получен в стандартном чашечном тесте), более адекватным в данном случае считается тест с преинкубацией, в котором отсутствует фактор соприкосновения сорбента с твердой питательной средой. Сущность его заключается в том, что суспензия бактерий, раствор изучаемого соединения и активирующая смесь (если эксперимент с метаболической активацией) инкубируются совместно при +37°C в течение 0,5-3 часов, затем отбирается бактерия и вносится в 2 мл расплавленного полужидкого агара при +45°C и наслаиваются на селективный агар. Дальнейшая инкубация происходит на чашке в агаризованной среде, как в обычном тесте Эймса. Результаты этого теста представлены в таблице 1.

Из таблицы видим, что слабый мутагенный эффект наблюдается в максимальной концентрации за весь курс — 10,0 мг/мл в эксперименте на штамме TA 98 с метаболической активацией.

Таким образом, лекарственный препарат Энтеросгель (паста для перорального применения), исследованная в тесте на индукцию обратных генных мутаций у *Salmonella typhimurium* (тест Эймса) с преинкубацией, проявляет слабый мутагенный эффект только в максимальной концентрации за весь курс (10,0 мг/мл) в варианте эксперимента с метаболической активацией на индикаторном штамме TA-98, которая не является лимитирующей при оценке безопасности лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения).

Тест на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*

Основу культивирования лимфоцитов периферической крови и приготовления препаратов хромосом составлял стандартный полумикрометод [5], но с модификациями, принятыми в лаборатории мутагенеза [6]. Отбор метафазных пластинок для цитогенетического анализа, классификация и учет aberrаций хромосом были общепринятыми. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критериев Стьюдента [3].

Учитывали: частоту aberrаций хромосом, количество анеуплоидных клеток (возможный канцерогенный риск), количество мультиаберрантных клеток (возможные нарушения системы репарации ДНК).

Итак, в тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфо-

Таблица.1

Кратность превышения количества ревертантных колоний *S. typhimurium* на разных штаммах в исследованиях с преинкубацией

Штаммы	Мутаген	Концентрации лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) (мг/мл)				
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625
TA-98	без м/а	++	—	—	—	—
	с м/а	+++	+	—	—	—
TA-100	без м/а	+	—	—	—	—
	с м/а	+	—	—	—	—

отсутствие эффекта "?" для TA 98 - до 2 раз, для TA 100 - до 1,8 раз, слабый мутагенный эффект ("+"), средний мутагенный эффект ("+++"), сильный мутагенный эффект ("++++").

цитов периферической крови человека *in vitro* в вариантах эксперимента без и с метаболической активацией в концентрациях от максимальной за весь курс (10,0 мг/мл) до суточной дозы (0,625 мг/мл) мутагенной активности лекарственного препарата Энтеросгель (паста для перорального применения) не выявлено.

Исследования антимутагенной активности лекарственного препарата проводили в тесте на индукцию aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* в тех же концентрациях, что и при изучении мутагенной активности.

В первом варианте эксперимента Энтеросгель добавляли в каждый флакон через 3 часа после добавления Митомицина-С (концентрация мутагена 10 мкг/мл — как и в положительном контроле). Результаты

представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что при добавлении Энтеросгеля через три часа после Митомицина-С, достоверного снижения aberrаций хромосом не получено, хотя при высоких дозах тенденция к этому явно просматривается.

Из этой же таблицы следует, что в двух высших концентрациях — максимальной и обычной дозе лечения за весь курс было обнаружено статистически достоверное снижение анеуплоидных клеток по сравнению и индукцией Митомицином-С. В остальных концентрациях достоверного снижения анеуплоидных клеток обнаружено не было.

С целью исключения прямого взаимодействия мутагена с сорбентом, этот же эксперимент производился с преинкубацией. Схема "преинкубации" состояла в том, что клетки крови человека обрабатыва-

лись Митомицином-С, а через три часа после "отмывания" мутагена, воспроизводилась стандартная схема культивирования (табл. 3).

Из данных таблицы видно, что время действия сорбента не играет особой роли для проявления его антимутагенных свойств. При этом наблюдается достоверное улучшение всех цитогенетических показателей, а именно: частоты метафаз с aberrациями, анеуплоидных и мультиабберрантных клеток при двух максимальных концентрациях Энтеросгеля.

Итак, энтеросорбент Энтеросгель (паста для перорального применения) производства ЗАО ЭОФ "КРЕОМА-ФАРМ" обладает антимутагенными свойствами, что, возможно, открывает новые подходы к использованию препарата для профилактики поражений слизистой ЖКТ, вызванных, например, радио-

Таблица 2

Основные цитогенетические показатели при добавлении Энтеросгеля (паста для перорального применения) в культуру лимфоцитов периферической крови человека через три часа после добавления Митомицина - С

Исследуемое вещество	Средняя частота, (%±m)		
	Метафазы		Мультиабберрантные клетки
	С aberrациями	Анеуплоидные	
Контроль отрицательный	1,0±0,9	11,50±2,30	
Митомицин-С (контроль)	14,00±3,4	22,00±4,10	51,0±4,9
Энтеросгель (паста для перорального применения) мг/мл, добавленный в культуру через 3 часа после добавления Митомицина - 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

* p<0,001 по сравнению с контролем Митомицин-С

Таблица 3

Основные цитогенетические показатели при добавлении Энтеросгеля (паста для перорального применения) в культуру лимфоцитов периферической крови человека с преинкубацией Митомицина-С

Исследуемое вещество	Средняя частота, (%±m)		
	Метафазы		Мультиабберрантные клетки
	С aberrациями	Анеуплоидные	
Контроль отрицательный	1,0±0,9	11,50±2,30	
Митомицин-С (контроль)	14,00±3,4*	22,00±4,10*	51,0±4,9
Митомицин - С с преинкубацией (10 мкг/мл) + Энтеросгель (паста для перорального применения) мг/мл, добавленный в культуру за 48 часов до окончания культивирования			
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*
Митомицин-С с преинкубацией (10 мкг/мл) + Энтеросгель (паста для перорального применения) мг/мл, добавленный в культуру за 24 часа до окончания культивирования			
10,0	4,0±2,3*	5,30±2,3*	0 *
5,0	6,0±2,4*	6,00±2,4*	0 *
2,5	8,0±2,7	8,00±2,7*	15,0±3,6*

* p<0,001 по сравнению с контролем Митомицин-С

нуклидной нагрузкой, а также некоторыми другими производственными факторами, обладающими мутагенным эффектом.

В результате можно сделать вывод, что только комплексное исследование лекарственных препаратов может достаточно точно ответить на вопрос о наличии мутагенных

свойств у исследуемого вещества. Кроме того, при изучении лекарственных препаратов, наряду с исследованиями мутагенной активности, целесообразно проводить исследования антимуагенной активности препаратов для уточнения и расширения сферы их применения. Еще необходимо отметить,

что важен индивидуальный подход при исследованиях каждой лекарственной субстанции во избежание получения ложноположительных мутагенных эффектов, как в случае изучения Энтеросгеля в стандартном чашечном тесте Эймса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) // [за ред. член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова] — К.: Авіцена. — 2001. — 528 с.
2. Evans H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. In: Hollaender A. ed. Chemical mutagens: principles and methods for their detection. / H.J Evans // New York, London, Plenum Press. — 1976. — Vol. 4. — P. 1 — 29.
3. Атраментова Л.А. Статистические методы в биологии. Учебник для студентов высших учебных заведений / Л.А.Атраментова, О.М Утевская. — Горловка: "Видавництво Ліхтар", 2008. — 247 с.
4. Maron D.M. Revised for the Salmonella mutagenicity test. / D.M. Maron, B.N. Ames // Mut. Res. — 1983. — Vol 113. — P. 172 — 215.
5. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. / D.A. Hungerford // Stain Techn. — 1965. — V. 40. — P. 333-338.
6. А.с. (Свідоцтво про державну реєстрацію прав автора на твір) Модифікація методу вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) *in vitro* з метаболічною активацією / Болтіна І.В. — № 23794, заяв. 21.12.2007; опубл. 05.03.2008.

Надійшла до редакції: 23.02.2011