

УДК: 575.224.46

**ОЦІНКА ОСОБЛИВОСТЕЙ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ
ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ ДІОКСИДИНУ У КЛІТИНАХ
КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ**

Стрижельчик Н.Г.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Досліджували вплив лікарського препарату діоксидину на частоту хромосомних аберацій у соматичних клітинах ссавців у дослідах *in vivo* в умовах спонтанного мутагенезу. Тестування проводили в гострому та хронічному експерименті. Встановлено, що при внутрішньоочеревинному введенні препарат діоксидин індукує мутагенний ефект, достовірно підвищуючи частоту хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку мишей.

Одержані результати обговорюються стосовно можливих механізмів мутагенної дії препарату.

Ключові слова: соматичні клітини, індукований мутагенез, лікарські препарати, мутагенна активність, хромосомні аберації, стандартні мутагени.

Assessment of specifics of cytogenetic effects of dioxidine drugs on bone marrow cells of mice. Stryzhelchuk N. G. – The influence of dioxidine drugs on the frequency of chromosomal aberrations in somatic cells of mammals has been studied in *in vivo* experiments during spontaneous mutagenesis. The evaluation was made in acute and chronic experiments. It was shown that intraperitoneally dioxidine drugs expose mutagenic effect through the trustworthy rise of chromosomal aberration frequency in bone marrow cells of mice. The results obtained have been discussed in terms of possible mechanisms of mutagenic effects of the drugs.

Key words: somatic cells, induced mutagenesis, drugs, mutagenic activity, chromosomal aberrations, standard mutagenes.

ВСТУП

Фундаментальні дослідження з проблем мутагенезу, виявлення причинного зв'язку між індукованими мутаціями та появою злоякісних новоутворень, вроджених вад розвитку та спадкових хвороб обумовили необхідність розвитку досліджень, спрямованих на виявлення та усунення мутагенів із оточуючого середовища. Результати експериментальних та епідеміологічних спостережень переконують у тому, що ураження генома людини може призводити до появи злоякісних новоутворень, вад розвитку у дітей, безпліддя подружніх пар, спонтанних абортів тощо. Звісно, що нові індуковані мутації спричиняють зростання успадкованої, вродженої та онкологічної патології [1; 7]. Наявність генетичної активності у лікарських препаратів має особливу небезпеку для людини, адже їх впливу підлягає все населення, у тому числі й ті його представники, що не вийшли з репродуктивного віку.

Метою даної роботи є вивчення за допомогою методу обліку хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку мишей мутагенних властивостей лікарського препарату діоксидину.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Найбільш інформативним методом оцінки мутагенності хімічних речовин у соматичних клітинах ссавців є метод обліку хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку мишей [4; 5; 8]. В основі методу лежить реєстрація структурних пошкоджень хромосом (хромосомних аберацій) у клітинах кісткового мозку на стадії метафази. Це дозволяє оцінити цитогенетичну активність препаратів на соматичних клітинах ссавців [2; 6].

Дослідження проводили на самцях мишей лінії С57В1/6 у віці 8-10 тижнів масою 18-20 г у гострому та хронічному експерименті. Препарат вводили внутрішньоочеревинно у дозі 200 мг/кг. Експозиція препарату складала у гострому експерименті 24 години, у хронічному експерименті препарат вводили протягом 5 діб. Введення препарату у хронічному

експерименті завершували за 6 годин до евтаназії тварин. За 2 години до евтаназії тваринам вводили внутрішньоочеревинно розчин колхіцину (0,025 % р-н по 0,01 мл на 1 г маси). Тварин знеживлювали шляхом зміщення шийних хребців під легким ефірним наркозом. У якості гіпотонічного розчину використовували розчин хлористого калію (0,55 %). Фіксацію та приготування препаратів хромосом виконували згідно з методичними рекомендаціями. Фіксатором служила суміш етилового спирту та льодяної оцтової кислоти (у співвідношенні 3:1). Зміну фіксатора проводили 2-3 рази. Препарати фарбували розчином азур-еозину. Аналіз хромосомних препаратів проводили на мікроскопі МБІ-6 під імерсійним об'єктивом при збільшенні 10x90. На кожну тварину аналізували 100 метафаз. Під час дослідження враховували такі показники: відсоток клітин з абераціями хромосом, кількість поодиноких фрагментів, кількість парних фрагментів, кількість обмінів, загальна кількість аберацій на 100 метафаз. Ахроматичні прогалини (“тепи”) як аберації не реєстрували, а фіксували окремо.

Визначальним показником є “частота аберантних метафаз”. Висновок про мутагенну (або немутагенну) дію препарату ґрунтувався на порівнянні частоти клітин зі структурними пошкодженнями хромосом у дослідній та контрольній групі. Статистичний аналіз одержаних результатів проводили за допомогою критерію χ^2 та критерію Стьюдента t [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень цитогенетичної активності діоксидину відображені у табл. 1-2. Вивчення 500 метафаз контрольної серії дослідів дозволило виявити $1,0 \pm 0,50$ % метафаз із абераціями хромосом. Спектр аберацій у контролі був представлений поодинокими 1,0 % фрагментами. Ахроматичні прогалини склали 1,2 %.

Таблиця 1

Вплив препарату діоксидину на частоту аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей (у гострому експерименті)

Доза препарату мг/кг	Проан. мета- фаз	Частота метафаз з аберац. % $M \pm m$	На 100 клітин				Доля метаф. з прога- линами, %	Зна- чен- ня χ^2
			пооди- ноких фраг- ментів	пар- них фраг- ментів	обмі- нів	<i>МП</i>		
Контроль								
–	500	$1,0 \pm 0,33$	1,0	0	0	0	1,2	–
Діоксидин								
200	500	$8,6 \pm 1,2^*$	5,6	0,2	0,2	2,6	1,0	31,5*

Примітка: * – $p < 0,01$

Цитогенетичний аналіз 500 метафазних пластин, одержаних під час впливу діоксидину в гострому експерименті, виявив статистично значуще підвищення частоти аберантних метафаз у дослідній групі тварин у порівнянні з контролем. Частота метафаз із абераціями дорівнювала $8,6\% \pm 1,2\%$ ($\chi^2=31,5$; $p < 0,05$). Спектр аберацій, індукованих діоксидином у гострому експерименті, відрізнявся від спектра аберацій, представлених у контрольній групі тварин. Окрім поодиноких фрагментів (5,6 %) зафіксовані також парні фрагменти (0,2 %), аберації обмінного типу (0,2 %) та клітини з множинними пошкодженнями (2,6 %). Ахроматичні прогалини склали 1,0 %.

Цитогенетичний аналіз 500 метафазних пластин, що одержані у хронічному експерименті, показав статистично значуще підвищення частоти аберантних метафаз у дослідній групі тварин порівняно з контролем. Частота метафаз з абераціями дорівнювала $18,4 \pm 1,6\%$ ($\chi^2=85,8$; $p < 0,01$). Спектр аберацій, індукованих діоксидином у хронічному експерименті, відрізнявся від контролю і був представлений: поодинокими фрагментами (14,2 %), парними фрагментами (1,2 %), абераціями обмінного типу (1,0 %) та клітинами з множинними пошкодженнями хромосом (2,0 %). Ахроматичні прогалини склали 3,4 %.

Таблиця 2

Вплив препарату діоксидину на частоту аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку мишей (у хронічному експерименті)

Доза препарату мг/кг	Проан. метафаз	Частота метафаз з аберац. % $M \pm m$	На 100 клітин				Доля метаф. з прогалинами, %	Значення χ^2
			поодиноких фрагментів	парних фрагментів	обмінів	МП		
Контроль								
–	500	1,0±0,50	1,0	0	0	0	1,2	–
Діоксидин								
200	500	18,4±1,6*	14,2	1,2	1,0	2,0	3,4	85,8

Примітка: * – $p < 0,01$

Одержані результати щодо мутагенних властивостей діоксидину, добре узгоджуються із даними, що зафіксовані у науковій літературі з цього питання. Мутагенні властивості діоксидину встановлені в експериментах у системах *in vitro* та *in vivo*. Так, діоксидин виявляє генотоксичні властивості (в концентраціях 5 мкг/мл та вище), індукуючи хромосомні аберації у клітинах периферійної крові людини [5]. При цитогенетичному обстеженні хворих, які проходили курс лікування препаратом, також виявляється мутагенний ефект діоксидину. Одноразове введення діоксидину у дозах більше, ніж 10 мг/кг, викликає індукцію хромосомних аберацій у соматичних клітинах ссавців. У

дозах 10 і 270 мг/кг діоксидин індукує домінуючі летальні мутації у зародкових клітинах мишей [8]. Мутагенна дія діоксидину опосередкована спроможністю індукувати утворення ВРК [4].

ВИСНОВКИ

Таким чином, у результаті проведених експериментальних досліджень мутагенної активності препарату діоксидину встановлено, що препарат діоксидин при внутрішньоочеревному введенні у дозі 200 мг/кг (в гострому та хронічному експерименті) індукує цитогенетичний ефект – статистично значуще підвищує частоту аберацій хромосом у соматичних клітинах кісткового мозку мишей порівняно з контролем.

Література

1. Бариляк І.Р., Бердишев Г.Д., Бонь О.В. Генотип народонаселення України і сучасний стан та нові підходи до проблеми захисту і збереження // Цитология и генетика. – К., 2001. – Т. 35. – № 3. – С. 66-71.
2. Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В., Кривошеїн Ю.Г. та ін. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). – К. : ФК МЗ України, 2000. – С. 166-186.
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – М. : Медицина, 1973. – С. 21-25, 53-56.
4. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены – скрининг и фармакологическая профилактика воздействия – М. : Медицина, 1998. – 397 с.
5. Золотарева Г.Н., Мексина Э.Н., Акаева Э.А. Цитогенетическое изучение диоксида в соматических клетках // Хим.-фарм. журнал. – 1978. – № 11. – С.16-18.
6. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств фармацевтических средств. – М. : Медицина, 1994. – 46 с.
7. Сычева Л.П., Журков В.С., Рахманин Ю.А. и др. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды // Гигиена и санитария. – Двухмес. научно-практ. журн. 2003. – № 6. – С. 87-91.
8. Фонштейн Л.М., Золотарева Г.Н., Ревазова Ю.А. и др. Изучение мутагенной активности диоксида // Хим.-фарм. журнал. – 1978. – № 2. – С. 24-29.