

УДК: 575.224.46

ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ ЦИКЛОФОСФАМІДУ У КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ

Стрижельчик Н.Г.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Досліджували вплив лікарського препарату циклофосфаміду 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 циклофосфамід 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.

Study of specific features of cytogenetic effects of cyclophosphamide drugs on bone marrow cells of mice. Stryzhelchik, N. G. – The influence of cyclophosphamide 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 cyclophosphamide 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 the drugs mutagenic effects.

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

ВСТУП

Проблема генетичних наслідків хімічного мутагенезу має багато аспектів, одним із яких є лікарський мутагенез. Бурхливий розвиток фармакології та фармацевтичної промисловості призводить до того, що практично кожна людина стає об'єктом впливу лікарських препаратів. Основними вимогами, що пред'являються до лікарських препаратів, є їх ефективність та безпечність [7]. Проте, велика кількість досліджень на різних біологічних об'єктах продемонструвала наявність мутагенної активності у багатьох із них [1].

Профілактика індукованого мутагенезу базується на широкому генетичному скринінгу. Реальна небезпека віддалених патогенетичних наслідків індукованого мутагенезу призвела до необхідності розвитку досліджень, спрямованих на виявлення та усунення мутагенів із оточуючого середовища.

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

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Найбільш інформативним методом оцінки мутагенності хімічних речовин у соматичних клітинах ссавців є метод обліку хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку мишей. 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 [5; 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 20 мг/кг. Експозиція препарату складала у гострому експерименті 24 години, у хронічному експерименті препарат вводили продовж 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 10х90. 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 ("гепи") 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 [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень цитогенетичної активності циклофосаміду відображені у табл. 1-2. Вивчення 500 метафаз контрольної групи тварин дозволило виявити $1,0 \pm 0,5\%$ метафаз із абераціями хромосом. Спектр аберацій у контролі був представлений поодинокими 0,8 % та парними 0,2 % фрагментами. Ахроматичні прогалини складала 1,2 %.

Таблиця 1

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

Доза препарату мг/кг	Проан. метафаз	Частота мета фаз з аберац. % $M \pm m$	На 100 клітин				Доля метаф. з прогалинами, %	Значення χ^2
			поодиноких фрагментів	парних фрагментів	обмінів	<i>МП</i>		
Контроль								
–	500	1,0±0,33	0,8	0,2	0	0	1,2	–
Циклофосфамід								
200	500	16,4±1,2*	11,2	1,2	1,2	2,8	2,0	74,0*

Примітка: * – $p < 0,01$.

Цитогенетичний аналіз 500 метафазних пластин, одержаних під час впливу в гострому експерименті, виявив статистично значуще підвищення частоти абераційних метафаз у дослідній групі тварин у порівнянні з контролем. Частота метафаз із абераціями дорівнювала $16,4\% \pm 0,2\%$ ($\chi^2 = 74,5$; $p < 0,01$). Спектр аберацій, індукованих циклофосфамідом у гострому експерименті, відрізнявся від спектра аберацій, представлених у контрольній групі тварин. Окрім поодиноких фрагментів (11,2 %) зафіксовані також парні фрагменти (1,2 %), аберації обмінного типу (1,2 %) та клітини з множинними пошкодженнями (2,8 %). Ахроматичні прогалини склали 2,0 %.

Таблиця 2

Вплив препарату циклофосфаміду 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	<i>МП</i>		
Контроль								
–	500	1,0±0,50	0,8	0,2	0	0	1,2	–
Циклофосфаміду								
200	500	21,6±1,6*	15,0	1,2	2,4	3,0	4,2	103,2

Примітка: * – $p < 0,01$

Одержані результати щодо мутагенних властивостей циклофосфаміду добре узгоджуються із даними, що зафіксовані у науковій літературі з цього питання. Мутагенні властивості циклофосфаміду встановлені в експериментах у системах *in vitro* та *in vivo*. Так, у дослідях *in vitro* виявлена спроможність

циклофосфаміду підвищувати частоту хромосомних аберацій у лімфоцитах людини. Циклофосфамід виявляє мутагенні властивості у дослідах на ссавцях. Показана здатність препарату індукувати домінуючі летальні мутації у зародкових клітинах мишей [3]. Мутагенна дія циклофосфаміду опосередкована спроможністю препарату індукувати утворення ВРК [5].

ВИСНОВКИ

Таким чином, у результаті проведених експериментальних досліджень мутагенної активності препарату циклофосфаміду встановлено, що препарат циклофосфамід при внутрішньоочеревинному введенні у дозі 20 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. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены – скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. – М. : Медицина, 1998. – 397 с.
2. Журков, В.С. Методические основы и принципы оценки мутагенных эффектов химических факторов окружающей среды. – М., 1988. – 34 с.
3. Журков, В.С., Шрам, Р.Я. Динамика доминантных летальных мутаций у самцов мышей при разных сроках экспозиции циклофосфамида / Генетика. – М., 1978. – Т. 14. – № 5. – С. 824-828.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів // І.Р. Бариліак, Л.В. Неумержицька, О.М. Дуган, Ю.Г. Кривошеїн, Г.Г. Порошенко, Т.А. Логодир // Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). – К. : ФК МЗ України, 2000. – С. 166-186.
6. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств. Методические рекомендации // Ведомости фармакологического факультета. – М., 1998. – № 4. – 30 с.
7. Фонштейн, Л.М., Исследование мутагенного действия лекарственных препаратов и других биологически активных соединений с помощью микробных тест-систем. – М. 1979. МГУ. – 36 с.

Оценка особенностей цитогенетического эффекта лекарственного препарата циклофосфамида в клетках костного мозга мышей. Стрижельчик Н.Г. Исследование влияния лекарственного препарата циклофосфамида на частоту хромосомных aberrаций в соматических клетках млекопитающих в исследованиях *in vivo* в условиях спонтанного мутагенеза. Тестирование проводили в остром и хроническом эксперименте. Установлено, что при внутрибрюшинном введении препарат циклофосфамид в дозе 20 мг/кг индуцирует мутагенный эффект достоверно повышая частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей. Полученные результаты обсуждаются относительно возможных механизмов мутагенного действия препарата.

Ключевые слова: соматические клетки, индуцированный мутагенез, лекарственные препараты, мутагенная активность, хромосомные aberrации, стандартные мутагены.