

**ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ УРОКСАЛІНУ
В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ**

Досліджено мутагенну активність нової субстанції – амідованого похідного (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот з умовною назвою уроксалін, якому властива анаболічна активність. Тестування проводили в культурі лімфоцитів людини при дослідженнях in vitro. Отримані результати свідчать про те, що уроксалін не є мутагеном, не викликає індукції генних мутацій та хромосомних аберацій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мутагенна активність, лімфоцити людини, хромосомні аберації, уроксалін.

ВСТУП. Перед тим як рекомендувати новий препарат для клінічних випробувань, обов'язковим є проведення доклінічного дослідження, при якому вивчають вплив субстанції на органи та системи організму, включаючи тести на гонадо- та ембріотоксичність, а також мутагенез. У Національному фармацевтичному університеті було синтезовано нові похідні (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот. На різних експериментальних моделях білкового голодування встановлено анаболічний ефект уроксаліну, що стало основою подальшого вивчення його безпеки для живого організму [1–3].

Фармацевтична промисловість, на думку багатьох спеціалістів, є одним із головних факторів підвищення мутагенезу в людини [4]. При оцінці мутагенної активності мутагенезу має значення вибір тест-об'єкта. Багато експериментальних даних вказує на те, що мутагени (канцерогени) здатні метаболізуватися в клітинах, які культивуються поза організмом. У зв'язку з цим, культура лімфоцитів периферичної крові людини є зручним тест-об'єктом, оскільки дає можливість оцінювати дію речовин, що впливають на генетичний апарат людини [5].

Метою даної роботи було вивчити здатність нового похідного (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот – уроксаліну індукувати мутагенну активність в культурі лімфоцитів у дослідках in vitro.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для вивчення здатності субстанції викликати пошкодження

© М. О. Алексєєва, А. І. Березнякова, 2011.

хромосом оцінювали їх цитогенетичну активність в культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дослідках in vitro. Для постановки культури використовували метод Хангерфорда з деякими модифікаціями [6]. Культурне середовище складалося з таких компонентів, як: середовище 199 – 75 % об'єму, сироватка великої рогатої худоби – 15 %, цільна кров – до 10 %, фітогемаглютинін вводили з розрахунку 0,2 мл на 10 мл культурного середовища. Досліджувану субстанцію вводили в культуру на 48-й годині культивування. Інкубацію без відмивання проводили до кінця культивування. Уроксалін розчиняли в стерильній воді. Терапевтичну дозу, розраховану на 1 кг середньої маси людини, приймали за концентрацію препарату на 1 л культурального середовища. Наступні концентрації субстанції були вищими в 10 чи 100 разів. Фіксація культури проходила на 72-й годині культивування. За 2,5–3 год до фіксації вводили колхіцин з метою зупинки ділення лімфоцитів на стадії метафази і скупчення метафазних пластинок. Для роз'єднання хромосомного набору використовували гіпертонічний розчин KCl (0,55 % розчин). Фіксатором слугували льодяна оцтова кислота та метиловий спирт (1:3). Зміну фіксатора проводили 2–3 рази. Готували висушені над спиртівкою препарати хромосом. Для рівномірного забарвлення використовували основні барвники азур та еозин. Отримані препарати хромосом аналізували на мікроскопі МБІ. Для аналізу вибирали метафазні пластинки круглої чи овальної форми з рівномірним розміщенням хромосом, в яких

міститься від 44 до 47 хромосом. На кожен концентрацію субстанції аналізували від 50 до 100 метафаз. Відмічали такі види аберацій: одиночні й парні фрагменти, хроматидні обміни, дицентричні хромосоми, кільця, атипичні хромосоми. Прогалини в якості аберацій не відмічали і реєстрували окремо [7].

Про ступінь мутагенного ефекту досліджуваної субстанції судили за підвищенням спонтанного рівня частоти аберацій хромосом в 2,5

і більше разів. Для оцінки статистичної значущості порівнюваних значень у дослідній і контрольній групах використовували критерій χ^2 -квадрат.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати оцінювання цитогенетичної активності уроксалину – нового амідованого похідного карбонових кислот в культурі лімфоцитів периферичної крові людини наведено в таблицях 1, 2.

Таблиця 1 – Вплив уроксалину на частоту хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дозі 10,7 мг/кг

Варіант дослідів	Проаналізовано метафаз	Кількість клітин з абераціями	Кількість хромосомних аберацій, % (M \pm m)	Кількість хромосомних аберацій на 1 кл.	Тип аберацій	
					одиночні фрагменти (M \pm m)	парні фрагменти (M \pm m)
Контроль	300	5	1,66 \pm 0,33	0,016	1,33 \pm 0,36	0,33
Дослід	300	4	1,33 \pm 0,35	0,013	1,33 \pm 0,3	–

Таблиця 2 – Вплив уроксалину на частоту хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дозі, збільшеній в 10 разів

Варіант дослідів	Проаналізовано метафаз	Кількість клітин з абераціями	Кількість хромосомних аберацій, % (M \pm m)	Кількість хромосомних аберацій на 1 кл.	Тип аберацій	
					одиночні фрагменти (M \pm m)	парні фрагменти (M \pm m)
Контроль	300	5	1,66 \pm 0,33	0,016	1,33 \pm 0,36	0,33
Дослід	300	6	2,00 \pm 0,67	0,02	2,00 \pm 0,68	–

Цитогенетичний аналіз 300 контрольних метафазних пластин дозволив виявити (1,66 \pm 0,33) та (1,66 \pm 0,35) % абераційних метафаз.

Спектр хромосомних аберацій у контролі був представлений одиночними та парними (0,33 %) фрагментами. Аберацій обмінного типу та дицентричних хромосом не виявлено.

Цитогенетичний аналіз 300 метафазних пластин, отриманих при дії уроксалину в дозі 10,7 мг/кг та дозі, збільшеній у 10 разів, дав змогу виявити (1,33 \pm 0,35) та (2,00 \pm 0,67) % абераційних метафаз. Типи аберацій були представлені одиночними (1,33 і 2,00 %) та парни-

ми (0,33 і 0,33 %) фрагментами. Порівняння отриманих результатів у дослідній та контрольній групах не виявило статистично значущих відмінностей (χ^2 -квадрат=0,112; $p > 0,05$ і 0,092).

ВИСНОВКИ. 1. Уроксалин – новий амідований похідний (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот – є перспективною субстанцією, оскільки не проявляє мутагенної активності в терапевтичних дозах і в дозах, збільшених у 10 разів.

2. Після завершення доклінічних досліджень уроксалин може бути рекомендований для клінічних випробувань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дурнев А. Д. Мутагены – скрининг и фармакологическая профилактика воздействия / А. Д. Дурнев, С. Б. Середин. – М. : Медицина, 1998. – 397 с.
2. Дурнев А. Д. Общие вопросы изучения мутагенных свойств лекарственных средств / А. Д. Дурнев, Г. М. Волгарев, С. Б. Середин // Экспер. и клин. фармакол. – 1998. – № 2. – С. 4–12.

3. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів. Доклінічні іспити лікарських засобів : метод. рекомендації / [І. Р. Бариляк, Л. В. Неумержицька, О. М. Дуган та ін.]. – К. : ФКМЗ України, 2000. – С. 166–186.

4. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М. :

Медицина, 2000. – 170 с.

5. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

6. Hungerford D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of meta-

phase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D. A. Hungerford // Stain Techn. – 1995. – **40**. – P. 333–338.

7. Mutagenicity of antibiotics in microbes assay problems of evaluation / Mitchell I de G., P. A. Dixon, P. L. Gielbert, D. J. White // Mutat. Res. – 1988. – **79** (2). – P. 91–105.

М. О. Алексеева, А. И. Березнякова

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ УРОКСАЛИНА В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Исследована мутагенная активность новой субстанции – амидированного производного (2-оксоиндолинлиден-3) карбоновых кислот с условным названием уроксалин, которому свойственна анаболическая активность. Тестирование проводили в культуре лимфоцитов человека при исследованиях *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уроксалин не является мутагеном, не вызывает индукции генных мутаций и хромосомных aberrаций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мутагенная активность, лимфоциты человека, хромосомные aberrации, уроксалин.

M. O. Aleksieyeva, A. I. Bereznyakova

NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

EVALUATION OF MUTAGENIC ACTIVITY OF UROKSALIN IN CULTURE OF HUMAN LYMPHOCYTES

Summary

It was investigated the mutagenic activity of a new substance – the amidation derivative (2-oxoindoliniliden-3) carboxylic acids with the provisional name uroksalin, which is characterized by anabolic activity. Testing was performed in a culture of human lymphocytes in studies *in vitro*. These results indicate that uroksalin is not a mutagen, does not cause induction of gene mutations and chromosomal aberrations.

KEY WORDS: mutagenic activity of human lymphocytes, chromosome aberrations, uroksalin.

Отримано 13.05.11

Адреса для листування: М. О. Алексеева, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61210, Україна.