

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

КОРРЕКЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПАКЛИТАКСЕЛА И ЦИСПЛАТИНА ЭКСТРАКТОМ КОРНЕЙ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

О. В. Неупокоева¹, О. Л. Воронова¹, А. А. Чурин^{1, 2}, Н. И. Суслов¹,
И. В. Шилова¹, И. Н. Кузовкина³

Изучено влияние экстракта корней шлемника байкальского, культивируемого в условиях *in vitro* на генетические структуры клеток костного мозга мышей линии СВА/СаЛас, повреждаемые противоопухолевыми препаратами паклитакселом и цисплатином. Выявлено его генопротекторное свойство как при однократном, так и при курсовом применении.

Ключевые слова: паклитаксел; цисплатин; экстракт корней шлемника байкальского; клетки костного мозга; аберрации

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что индуцированный мутагенез является существенным фактором, оказывающим негативное влияние на приспособленность популяции в целом и на здоровье пораженного индивидуума, в частности [1, 8]. Несомненную важность представляют исследования, направленные на изучение механизмов повреждения генетических структур различными факторами (в том числе и лекарственными препаратами), а также поиск соединений, обладающих антимуtagenной активностью по отношению к изученному фактору или их группе. Можно предположить подобные свойства и у биотехнологического шлемника байкальского, так как у дикорастущего растения ранее уже был выявлен широкий спектр биологических эффектов, в том числе антимуtagenных [3, 5, 7, 12].

Целью исследования явилось изучение генопротекторных свойств у экстракта корней шлемника байкальского, полученного биотехнологическим путем, при моделировании мутагенеза препаратами с различными механизмами действия паклитакселом (как анеуген) и цисплатином (в качестве прямого мутагена, повреждающего ДНК).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты поставлены на 135 мышках-самцах и самках, массой 18 – 22 г линии СВА/СаЛас разводки лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страс-

бург, 1986). Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации.

В исследовании использовали противоопухолевые препараты: цисплатин (цисплатин, “Ebewe”, Австрия) и паклитаксел (митотакс, “Dr. Reddy’s”, Индия). Цитостатики вводили мышам однократно, внутривенно в максимально переносимой дозе (МПД), которая составила для паклитаксела 40 мг/кг, а для цисплатина 6 мг/кг. МПД или дозу, вызывающую 10 % летальность, рассчитывали методом Литчфилда и Уилкоксона [10]. Фармакологическую коррекцию выявленных нарушений проводили с помощью экстракта корней шлемника байкальского (ЭШБ). ЭШБ вводили внутривенно однократно (самцам) и 5-дневным курсом (самцам и самкам) в дозе 40 мг/кг предварительно за 1 ч до инъекции цитостатиков. Эффекты однократного применения ЭШБ и противоопухолевых препаратов изучали через 24 ч (время клеточного цикла популяции быстро делящихся клеток костного мозга (ККМ), соответствует первому клеточному поколению, в котором представлен весь объем нарушений, возникших под влиянием мутагена), 48 ч и 3 мес после введения (ранние и отдаленные эффекты). Результаты курсового применения ЭШБ оценивали через 24 ч после его последнего применения и инъекции цитостатиков.

Сырьем для экстракта послужили корни шлемника байкальского, полученные биотехнологическим способом в Институте физиологии растений РАН [4]. ЭШБ представляет комплекс веществ, извлекаемых из сырья 70 % раствором этанола, и содержащих 72 % вогонизида и вогонина (63,3 и 8,6 % соответственно) от общего содержания флавонов. ЭШБ вводили после сгущения отгонкой этанола и последующим разведением дистиллированной водой. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

В работе проводили учет аберраций хромосом в ККМ млекопитающих [9]. На готовых препаратах учи-

¹ Лаборатория лекарственной токсикологии ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, Томск, пр. Ленина, 3.

² ФГБОУ ВПО НИ ТГУ, Томск.

³ ФГБУН НИИ физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва.

тывали долю поврежденных клеток, aberrантные хромосомы, клетки с увеличенным набором хромосом (поли и тетраплоидные — $4n$ округлые метафазы, с хорошим разбросом хромосом, одинаковых по структуре, без наложений) в процентах. Вычисляли фактор эффективности антимуагена (ФЭА): $ФЭА = \frac{АМм - АМк}{АМм}$, где АМм — aberrантные метафазы в серии с муаагеном, АМк — aberrантные метафазы в серии с корректором. ФЭА считается эффективным, если его значение приближается к 1. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики и критерия Манна-Уитни ($P_u < 0,05$ и $P_u < 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 ч после однократного введения паклитаксела на препаратах ККМ мышей были зафиксированы метафазные пластинки со структурными нарушениями хромосом. В группе мышей-самцов доля поврежденных клеток составила 6,3 %, aberrантных хромосом — 7,5 %. В группе мышей-самок эти показатели составили 12 и 13,2 % соответственно. Кроме того, после введения паклитаксела в костном мозге мышей происходило образование клеток с геномной аномалией — полиплоидов (рис. 1). Выявленная генетическая патология является следствием особенностей действия паклитаксела на микротрубочки [2, 6, 11, 13]. Максимальное количество полиплоидных клеток на препаратах ККМ было зафиксировано на 48 ч наблюдения и достигало 19,9 % (рис. 2). Через 3 мес после введения паклитаксела у мышей-самцов было выявлено 1,1 % геномных нарушений и 3,9 % клеток с поврежденными хромосомами, что превысило соответствующий контрольный показатель в 3,9 раза.

Через 24 ч после однократного введения цисплатина в ККМ группы мышей-самцов было выявлено 24,2 % поврежденных клеток и 37 % aberrантных хромосом, а в группе мышей-самок эти показатели составили 21,2 и 25 % (рис. 3). Среди нарушений хромосом были зафиксированы одиночные, парные фрагменты и обмены. Отмечены клетки с множественными aberrациями, что свидетельствовало об изменениях в системе клеточной репарации. Через 48 ч после введения цисплатина мышам-самцам, количество метафаз с поврежденными хромосомами в 11,5 раз превысило соответствующий показатель в контрольной группе животных. Спустя 3 мес после введения цисплатина у мышей-самцов было отмечено в 4,4 раза больше клеток с aberrациями, чем в контроле. В числе нарушений были отмечены преимущественно одиночные фрагменты (4 %).

Через 24 ч после сочетанного использования ЭШБ и паклитаксела хромосомные повреждения были отмечены в 3,3 % исследованных клеток, что в 1,9 раза меньше, чем в группе животных, получивших только паклитаксел (рис. 2, а). Среди aberrаций выявлены только одиночные фрагменты. Количество полиплоид-

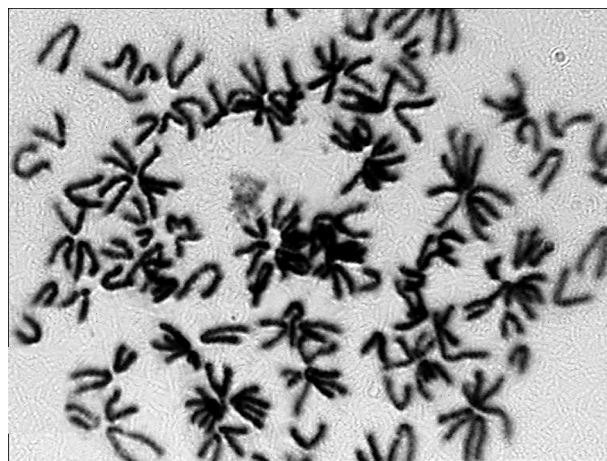


Рис. 1. Полиплоидная клетка в костном мозге мышей линии СВА/СaLac через 48 ч после однократной инъекции паклитаксела в дозе 40 мг/кг.

ных клеток осталось без изменений при сравнении с группой паклитаксела. Значение ФЭА для однократного применения ЭШБ составило 0,48. Через 48 ч после сочетанного введения ЭШБ и паклитаксела на препаратах ККМ мышей-самцов было выявлено снижение количества aberrантных клеток на 52,6 % относительно группы паклитаксела, что составило 1,73 % и достигло значения в контроле. Содержание клеток с геномными нарушениями достигло 21,8 % и не отличалось от соответствующего показателя при применении паклитаксела на 48 ч наблюдения (рис. 2, б). Через три месяца — на препаратах ККМ мышей-самцов были обнаружены нарушения в 1,25 % исследованных метафаз. Отмечено снижение количества aberrаций в 3,1 раза, по сравнению с группой, получавшей только паклитаксел в те же сроки наблюдения (рис. 2, в). Выявлено всего 0,5 % полиплоидных клеток. На отдаленных сроках исследования после применения ЭШБ происходила нормализация цитогенетических показателей, значение ФЭА составило 0,67. При исследовании курсового введения ЭШБ на фоне действия паклитаксела в костном мозге мышей-самцов было обнаружено в 3,5 раза меньше поврежденных метафаз, чем в группе с введением цитостатика, что составило 1,78 % и не превышало значение в контроле. Все нарушения представляли собой одиночные фрагменты. Количество полиплоидных клеток, не изменилось, по сравнению с группой животных, получивших только паклитаксел (рис. 2, г). Значение ФЭА для курсового применения ЭШБ составило 0,72. Курсовое введение ЭШБ группе мышей-самок способствовало снижению доли клеток, повреждаемых паклитакселом, в 3,2 раза, по сравнению с группой цитостатика (рис. 2, г). Значение ФЭА ЭШБ в этой группе составило 0,6.

Таким образом, применение ЭШБ позволило защитить хромосомы от генотоксического действия паклитаксела, не затрагивая при этом специфический механизм действия цитостатика. Нормализуя цитогенети-

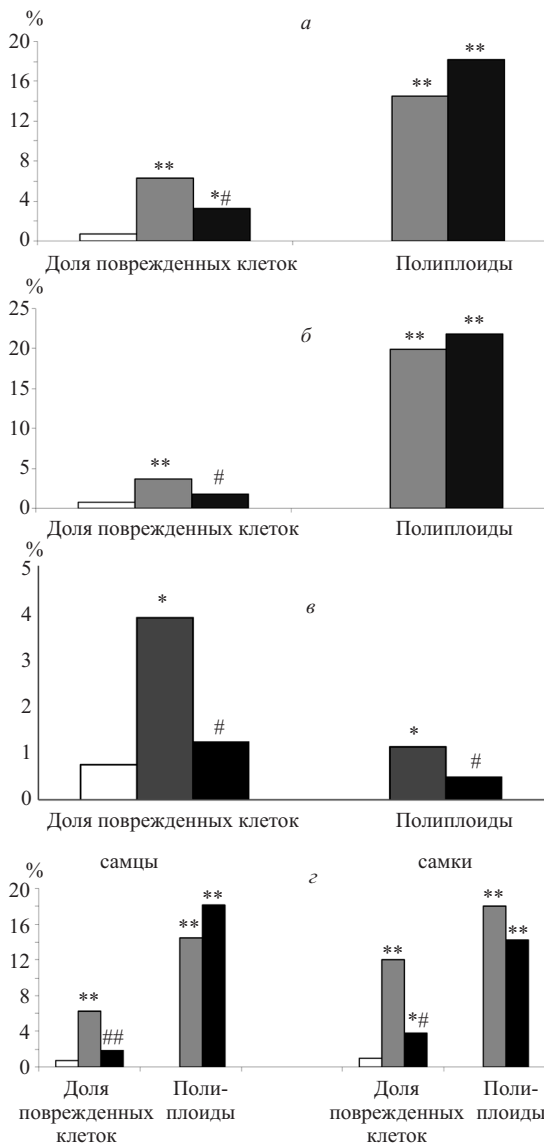


Рис. 2. Цитогенетические показатели клеток костного мозга мышей под влиянием паклитаксела и экстракта корней шлемника байкальского (ЭШБ).

а — через 24 ч после однократного введения паклитаксела и комбинации ЭШБ + паклитаксел, *б* — через 48 ч после однократного введения паклитаксела и комбинации ЭШБ + паклитаксел, *в* — через 3 мес после однократного введения паклитаксела и комбинации ЭШБ + паклитаксел, *г* — через 24 ч после курсового введения ЭШБ и однократного введения паклитаксела.

Здесь и на рис. 3: Отличия значимы по отношению к группе: * — контрольных животных ($p < 0,05$), ** — контрольных животных ($p < 0,01$); # — животных, получивших цитостатик ($p < 0,05$), ### — животных, получивших цитостатик ($p < 0,01$). Белый столбец — контроль, серый — группа цитостатика, черный — ЭШБ + цитостатик.

ческие показатели, ЭШБ предотвращал развитие отдаленных негативных эффектов цитостатика.

Через 24 ч после предварительного введения ЭШБ и последующей инъекции цисплатина мышам-самцам доля метафаз с поврежденными хромосомами снизилась на 50,4 %, а количество aberrantных хромосом на 57,8 %, по сравнению с группой цитостатика (рис. 3, *а*). ФЭА ЭШБ составил 0,50. Через 48 ч после

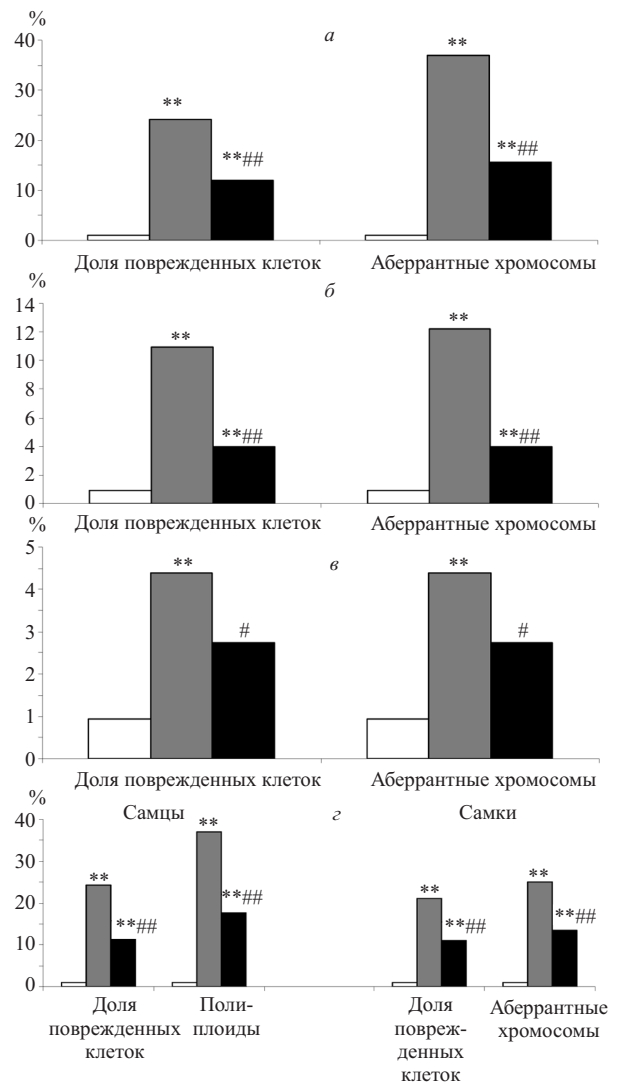


Рис. 3. Цитогенетические показатели клеток костного мозга мышей под влиянием цисплатина и экстракта корней шлемника байкальского (ЭШБ).

а — через 24 ч после однократного введения цисплатина и ЭШБ + цисплатин, *б* — через 48 ч после однократного введения цисплатина и ЭШБ + цисплатин, *в* — через 3 мес после однократного введения цисплатина и ЭШБ + цисплатин, *г* — через 24 ч после курсового введения ЭШБ и однократного введения цисплатина. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

введения цисплатина на фоне однократного применения ЭШБ отмечено снижение доли поврежденных метафазных пластинок на 63,4 % (рис. 3, *б*). Через 3 мес после введения ЭШБ и цисплатина было зафиксировано 2,7 % клеток с поврежденными хромосомами (рис. 3, *в*), что соответствовало их количеству в контрольной группе животных. Применение ЭШБ способствовало нормализации цитогенетических показателей на отдаленных сроках наблюдения. После предварительного курсового введения ЭШБ доля поврежденных клеток снизилась на 53 %, по сравнению с группой животных, получивших только цисплатин (рис. 3, *г*). В числе нарушений были отмечены, в основном, одиночные фрагменты (16 %). Значение ФЭА

для курсового применения ЭШБ составило 0,53. У самок после пятидневного введения ЭШБ и инъекции цисплатина на препаратах ККМ было отмечено на 48 % меньше поврежденных метафаз, чем у самок, получивших цитостатик без экстракта шлемника байкальского (рис. 3, *z*). Значение ФЭА для ЭШБ составило 0,5.

Таким образом, однократное и курсовое применение ЭШБ снижало количество структурных нарушений в ККМ мышей, вызванных изученными цитостатиками, что свидетельствует о наличии у ЭШБ антимутагенных свойств. Антимутагенный эффект, вероятно, связан с антиоксидантной активностью биофлавоноидов (байкалина, вогонина, вогонозида, байкалеина), содержащихся в ЭШБ. В литературе имеются данные об антиокислительной активности байкалина, в 2 раза превышающую таковую у рутина, известного препарата сравнения в исследованиях различных антиоксидантов [5, 7, 12].

ВЫВОДЫ

1. На модели индуцированного паклитакселом мутагенеза выявлено образование геномных и структурных нарушений в клетках костного мозга (ККМ) самцов и самок мышей СВА/СаЛас. Через 3 мес после введения цитостатика выявленные нарушения сохраняются в костном мозге экспериментальных животных.

2. Цисплатин индуцировал образование исключительно структурных aberrаций в ККМ мышей и обладала эффектом продленного мутагенеза.

3. Однократное и курсовое введение экстракта корней шлемника байкальского (40 мг/кг) снижало кла-

стогенный эффект паклитаксела и цисплатина. Курсовое введение корректора на паклитаксел-индуцированной модели мутагенеза было более эффективно, чем его однократное применение ($\text{ФЭА ЭШБ}_{\text{однокр.}} = 0,48 < \text{ФЭА ЭШБ}_{\text{курс.}} = 0,72$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. С. Агапова, Б. П. Копнин, *Вестн. РАМН*, № 11, 3–9 (2007).
2. С. С. Бессмельцев, *Современная онкология*, 5(1), 19–21 (2003).
3. О. А. Капля, Ю. В. Шерстобоев, Е. П. Зуева и др., *Бюл. экпер. биол.*, 137(5), 538–541 (2004).
4. И. Н. Кузовкина, А. В. Гусева, И. Е. Альтерман, Р. А. Карначук, *Физиология растений*, 48(4), 523–528 (2001).
5. В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, В. Г. Воловик, Е. Д. Гольдберг и др., *Фитохимия и фармакологические свойства препаратов шлемника байкальского*, Харьков (2007).
6. Б. Н. Лю, С. Б. Исмаилов, М. Б. Лю, *Биомед. химия*, 54(1), 58–77 (2008).
7. О. А. Макаренко, А. П. Левицкий, В. И. Литвиненко, И. В. Ходаков, *Вісник ОНУ*, 15(6), 15–20 (2010).
8. С. Б. Середенин, А. Д. Дурнев, *Фармакологическая защита генома*, ВИНТИИ, Москва (1992).
9. Н. Б. Рубцов, *Методы работы с хромосомами млекопитающих*, Новосибирск (2006).
10. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
11. А. А. Чуринов, В. Е. Гольдберг, Г. В. Карпова и др., *Бюл. экпер. биол.*, 145(2), 173–177 (2008).
12. O. M. Andersen, K. R. Markham (ed.) *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Application*, CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL, US (2006).
13. R. Vaclavikova, S. Ozegova, M. Stiborova, *Toxicol. Lett.*, 123(Suppl 1), 85 (2001).

Поступила 10.07.13

EFFECT OF SCUTELLARIA BAICALENSIS ROOT EXTRACT ON CYTOGENETIC DAMAGE INDUCED BY PACLITAXEL AND CISPLATIN IN MICE

O. V. Neupokoeva¹, O. L. Voronova¹, A. A. Churin^{1, 2}, N. I. Suslov¹, I. V. Shilova¹, and I. N. Kuzovkina³

¹ Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

² Tomsk State University, pr. Lenina, Tomsk, 634050, Russia

³ Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276, Russia

The effect of root extract of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) cultivated *in vitro*, on the gene structure of CBA/CaLac mice bone marrow cells damaged by anticancer drugs paclitaxel and cisplatin has been studied. It is established that the root extract exhibits gene protective property upon both single and chronic administration.

Key words: paclitaxel; cisplatin; root extract of *Scutellaria baicalensis*; bone marrow cells; aberrations