

# ФАРМАКОГЕНЕТИКА

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЦИСПЛАТИНА

О. Л. Воронова<sup>1</sup>, О. В. Неупокоева<sup>1</sup>, Е. П. Федорова<sup>1</sup>,  
А. Е. Просенко<sup>2</sup>, А. А. Чурин<sup>1</sup>

В экспериментах на мышах линии СВА/СаЛас показано, что цисплатин при однократном внутрибрюшинном введении вызывает увеличение количества хромосомных aberrаций в клетках костного мозга, начиная с первых часов исследования. На препаратах костного мозга мышей через 24 ч после введения цисплатина в метафазных пластинках выявлено значительное повышение содержания структурных нарушений хромосом за счет хроматидных разрывов. В поздние сроки исследования (90 сут) сохранялся высокий уровень aberrаций хромосом. При предварительном курсовом введении тиофана наиболее выражено корректировался мутагенный эффект цисплатина.

**Ключевые слова:** цисплатин, тиофан, клетки костного мозга, мутагенность

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время химиотерапия играет ведущую роль в лечении онкопатологии. Арсенал химиотерапевтических препаратов постоянно пополняется современными лекарственными средствами, однако остается актуальной проблема повреждения этими средствами ДНК в здоровых клетках [2, 9]. Кроме того, происходит развитие лекарственной резистентности, токсичности, из-за которых приходится отказываться от используемых средств, а также возникновение вторичных злокачественных новообразований [1, 3, 7]. Цисплатин обладает эмбриотоксическими, тератогенными и мутагенными свойствами [3, 4]. Одним из путей снижения риска развития токсических реакций организма, вызванных противоопухолевыми препаратами и сопряженных с окислительным стрессом, является усиление антиокислительных возможностей организма за счет введения антиоксидантов [6, 8].

В связи с этим целью работы явилось изучение фармакологических генопротекторных свойств синтетического антиоксидантного средства в условиях применения цитостатического препарата цисплатина.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 55 мышах-самцах линии СВА/СаЛас 18–22 г, полученных из коллекционного фонда лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (сертификат имеется). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Животных выводили из опыта методом червикальной дислокации.

В исследовании использовали противоопухолевый препарат алкилирующего действия цисплатин (Циспла-

тин-Эбева, “ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б. Х. Нфг. КГ”, Австрия). Препарат вводили мышам однократно внутрибрюшинно, в дозе, основанной на данных литературы – 6 мг/кг [4]. В экспериментах с *Drosophila melanogaster* цисплатин добавляли в питательную среду в 0,002 и 0,009% концентрациях, что соответствует дозам 1 и 6 мг/кг. В качестве антиоксидантного средства использовали тиофан (фонд “Биоантиоксидант”, Новосибирск). Препарат вводили мышам однократно в желудок или 5-дневным курсом в дозе 30 мг/кг, растворяя в 1% крахмальной взвеси, за 1 ч до введения цисплатина. В экспериментах с *Drosophila melanogaster* тиофан добавляли в питательную среду в 0,056% концентрации. В качестве контроля использовали растворитель.

Для изучения мутагенных свойств исследуемых средств применяли метод учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей и тест-систему соматического мозаицизма на *Drosophila melanogaster*. Взятие клеточного материала костного мозга производили через 6, 12, 24, 48 ч и на 5-е, 14-е и 90-е сутки после введения цисплатина. Наибольший выход хромосомных aberrаций наблюдали через 24 и 48 ч после введения мышам препарата. Соответственно этим срокам проводили исследование возможных антимуtagenных эффектов тиофана, учитывая долю поврежденных клеток, aberrантных хромосом в процентах и фактор эффективности антимутагена (ФЭА). В тесте по учету соматического мозаицизма анализировали количество особей дрозофилы с мутациями, возникающими у мух при скрещивании девственных самок линии 1 — yellow — генотип  $u/y$  ( $y$ -рецессивный ген, обуславливающий развитие желтой окраски тела и щетинок) и самцов линии 2 —  $w, sn^3$  — генотип —  $w sn^3/Y$  ( $w$  — white — белая окраска глаз,  $sn^3$  — signed — извитая скрученная форма щетинок). Регистрировали не менее 1000 просмотренных самок в группе, число особей с одиночными ( $y, sn^{3+}$ ) и двойными пятнами ( $y sn^{3+}$ ) [3, 5].

<sup>1</sup> НИИ фармакологии СО РАМН, Томск, 634028, пр. Ленина, 3.

<sup>2</sup> НИИ химии антиоксидантов ГОУ ВПО НГПУ, Новосибирск.

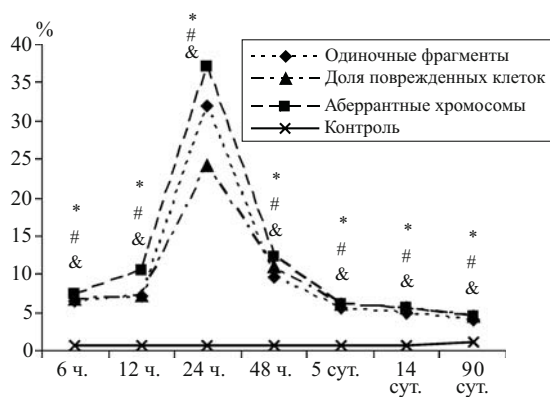


Рис. 1. Цитогенетические показатели клеток костного мозга мышей под влиянием цисплатина в разные сроки исследования.

\*, #, & — достоверность отличий ( $p < 0,05$ ) между опытом и контролем

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ) и хи ( $\chi^2$ ) квадрата.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования мутагенной активности цисплатина у мышей выявил кластогенный эффект препарата на протяжении всего эксперимента. Через 24 ч после однократного введения цисплатина наблюдали достоверное увеличение количества поврежденных клеток и аберрантных хромосом до  $24,2 \pm 1,1$  и  $37,0 \pm 2,6\%$  соответственно (рис. 1). Среди нарушений отмечены преимущественно одиночные фрагменты.

Предварительное однократное внутрижелудочное введение тиофана в дозе 30 мг/кг оказывало протекторное действие на изученные генетические структуры. Так, общее число поврежденных метафаз через 24 ч после предварительного введения протектора и последующей инъекции цитостатика снизилось на 20% по сравнению с группой цисплатина. Кроме того, количество аберрантных хромосом уменьшилось на 25,4%. Основу этого показателя составило снижение содержания одиночных фрагментов (рис. 2, а). Для тиофана ФЭА на 24 ч составил 0,25.

Через 48 ч после введения цисплатина на фоне однократного применения тиофана отмечено снижение доли поврежденных метафазных пластинок на 41,4%. Количество аберрантных хромосом было на 44,2% ниже аналогичного показателя в группе, получавшей только цисплатин (рис. 2, б). ФЭА равен 0,41.

Предварительное 5-дневное внутрижелудочное введение тиофана перед инъекцией цисплатина оказало выраженный протекторный эффект на генетические структуры клетки. Так, доля аберрантных метафаз снизилась на 30,8% по сравнению с группой цитостатика, а количество структурных нарушений на 47,2% (рис. 2, в). Эта схема введения протектора была эффективнее его однократного применения. ФЭА равен 0,47.

В SMART-тесте на *Drosophila melanogaster* получено подтверждение генопротекторных свойств тиофана с применением цисплатина как в 0,002%, так и в 0,009% концентрациях. В результате проведенных эксперимен-

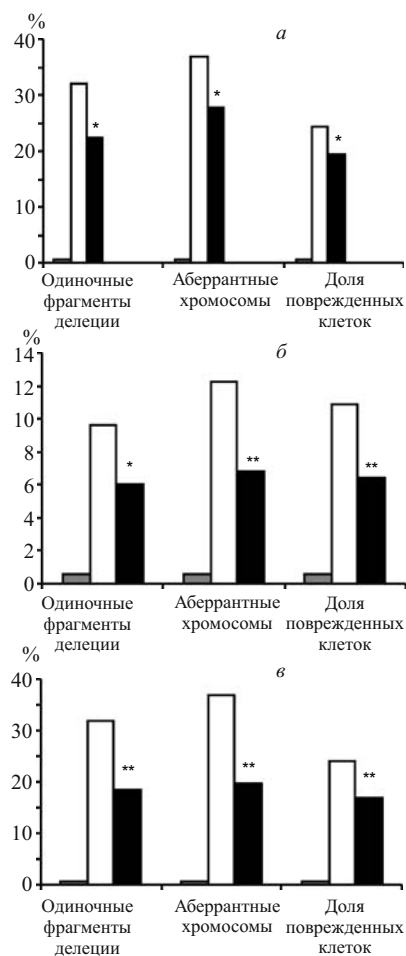


Рис. 2. Цитогенетические показатели клеток костного мозга мышей под влиянием цисплатина и тиофана.

а — через 24 ч после однократного введения препаратов, б — через 48 ч после однократного введения препаратов, в — через 24 ч после курсового введения препаратов. Серые столбики — контроль, светлые — цисплатин, черные — цисплатин с тиофаном.

тов при добавлении в питательную среду цисплатина в 0,009% концентрации обнаружено достоверное увеличение количества самок, несущих мутантные признаки в виде пятен ( $y$ ) и ( $sn^3$ ). Из 1154 просмотренных самок отмечено 92 мутантных пятна. Носителями пятен ( $sn^3$ ) была 61 самка — 5,2%, признаком ( $y$ ) обладали 28 особей — 2,4%, мозаичные пятна ( $y sn^3$ ) имели 3 мухи — 0,2%. Пятна преимущественно имели фенотипическое проявление скрученных оплавленных щетинок (рис. 3).

Применение комбинации тиофана в 0,056% концентрации и цисплатина в 0,009% концентрации на 1090 просмотренных самках дрозофилы привело к возникновению мутантных пятен у 60 особей (5,5%), что было на 34,8% ниже соответствующего показателя в группе, получивший только цитостатик. При этом наблюдались статистически значимые различия между группой цисплатина и цитостатика с корректором согласно критерию  $\chi^2$  (4,72).

Применение антиоксиданта снижало также развитие кластогенных эффектов цисплатина в 0,002% концентрации. На 1000 просмотренных самках, выращенных в сре-

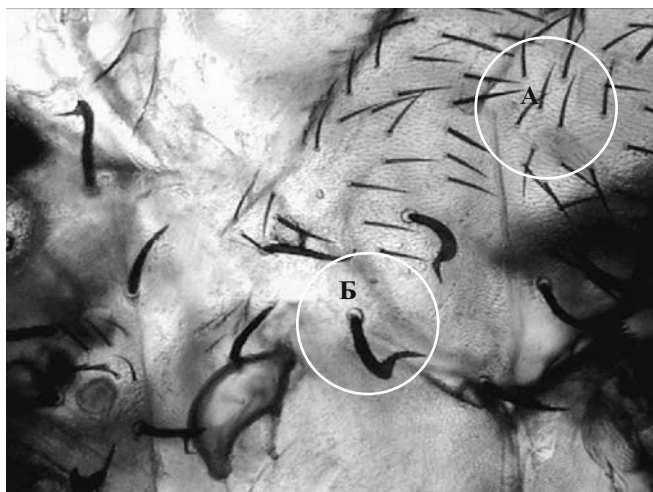


Рис. 3. Мутация signed у самки *Drosophila melanogaster*.

А — нормальные щетинки, Б — скрученные оплавленные щетинки — signed.

де с этой комбинацией препаратов, было обнаружено 27 самок с мутациями, что на 32,5% меньше аналогичного показателя в группе, получавший цисплатин. При анализе полученных результатов был выявлен дозозависимый эффект цисплатина. При снижении концентрации цитостатика уменьшалось и число мутаций. Эффективность корректора антиоксиданта также зависела от концентрации мутагена.

Ранее были изучены антиокислительные эффекты тиофана и показано, что предварительное введение этого вещества стабилизировало клеточные структуры (мембраны), делая их менее подверженными воздействию высокорективных метаболитов, повреждающих чувствительные структуры клетки [6–8]. Этот эффект достигался благодаря антирадикальной активности фенольных фрагментов и противопероксидным действиям сульфидной группы. На основании данных литературы можно заключить, что исследуемый антиоксидант блокировал развитие процесса перекисного окисления органических молекул, запускаемого цитостатическим препаратом, и служил “ловушкой” активных форм кислорода.

Таким образом, при однократном внутривентральном введении цисплатина в дозе 6 мг/кг мышам линии СВА/СаЛас наблюдалось выраженное генотоксическое

действие на клетки костного мозга экспериментальных животных. В отдаленные сроки после введения цитостатика (через 90 дней) сохранялось достоверное повышение количества поврежденных метафаз в клетках костного мозга по сравнению с контрольной группой. Наиболее эффективный протекторный эффект тиофана наблюдался при его предварительном курсовом введении.

## ВЫВОДЫ

1. Цисплатин при однократном внутривентральном введении мышам линии СВА/СаЛас оказывает выраженное мутагенное действие.
2. При действии цисплатина в отдаленные сроки после введения (через 90 дней) сохраняется генотоксический эффект в костном мозге мышей.
3. Предварительное курсовое введение тиофана более эффективно в сравнении с однократным применением.
4. Количество соматических мутаций у развивающихся особей *Drosophila melanogaster* под воздействием цисплатина в 0,009% концентрации снижалось под влиянием тиофана.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. С. Агапова, Б. П. Копнин, *Вестн. Российской АМН*, № 11, 3–9 (2007).
2. И. В. Болтина, *Цитол. и генет.*, № 1, 66–73 (2007).
3. А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий*, Медицина, Москва (1998).
4. Г. В. Карпова, В. Е. Гольдберг, Т. И. Фомина и др., *Бюл. ТНЦ АМН СССР*, Томск (1990), вып. 2, сс. 90–101.
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
6. Л. А. Ермолаева, *Автореф. дисс. канд. мед. наук*, Томск (2008).
7. Е. Р. Немцова, Т. В. Сергеева, О. А. Безбородова, Р. И. Якубовская, *Рос. онкол. ж.*, № 5, 48–53 (2003).
8. А. Е. Просенко, К. И. Вошинкин, А. М. Зайдман и др., *Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные экологические и клинические аспекты. Матер. Всерос. конф.*, Новосибирск (2004), сс. 390–391.
9. В. В. Резцова, *Вопр. онкол.*, 53 (3), 262–268 (2007).

Поступила 12.04.10

## PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF THE CYTOGENETIC EFFECTS OF CISPLATIN

O. L. Voronova<sup>1</sup>, O. V. Neupokoeva<sup>1</sup>, E. P. Fedorova<sup>1</sup>, A. E. Prosenko<sup>2</sup>, and A. A. Churin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Antioxidant Chemisgtry, Novosibirsk State Pedagogical University, pr. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090, Russia

Beginning with the first hours of experiments, cisplatin evoked an increase of chromosomal aberrations in CBA/Calac bone marrow cells. Significant increase of structural infringements of chromosomes due to chromatid breaks was revealed in metaphase plates of murine bone marrow preparations through 24 h after cisplatin intraperitoneal introduction. In late terms of research (90th day), the high level of aberrations of chromosomes was retained. The most pronounced correction of cisplatin mutagenicity was achieved using a preliminary course of thiophan introduction.

**Key words:** Cisplatin, thiophan, bone marrow cells, mutagenicity