

# ФАРМАКОГЕНЕТИКА

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГИПОКСЕНА *in vivo*

О. А. Карпова<sup>1</sup>, Л. В. Михина<sup>1</sup>, А. А. Денисов<sup>1</sup>, М. К. Кузьмич<sup>2</sup>

Исследован антимутагенный эффект гипоксена (натриевая соль поли- $\{2,5\}$ -дигидроксифенилен $\}$ -4 тиосульфокислоты) методом регистрации хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей линии C57BL/6. Установлено, что гипоксен в дозе 20 мг/кг при одновременном внутрибрюшинном введении с диоксидином (300 мг/кг) на 24 ч снижал генотоксическое действие последнего на 35%. Предварительное введение гипоксена *per os* в дозе 70 мг/кг в течение 5 дней не уменьшало повреждающее действие диоксида. Показано, что гипоксен обладает более высокой генопротективной способностью по сравнению с препаратом сравнения аспартамом при внутрибрюшинном введении.

**Ключевые слова:** хромосомные aberrации, гипоксен, натриевая соль поли- $\{2,5\}$ -дигидроксифенилен $\}$ -4 тиосульфокислоты, аспартам, антимутаген

### ВВЕДЕНИЕ

Гипоксен оказывает антигипоксическое действие за счет повышения эффективности тканевого дыхания в условиях гипоксии, особенно в органах с высоким уровнем обмена веществ. Препарат оптимизирует деятельность митохондрий клеток и снижает за счет этого потребление ими кислорода. Гипоксен обладает выраженными электроноакцепторными свойствами и действует непосредственно на дыхательную цепь митохондрий. Наличие в полимерной структуре молекулы тиосульфатной группы обеспечивает антирадикальное и антиокислительное действие препарата.

Цель настоящего исследования — выявление антимутагенного действия гипоксена применительно к цитогенетическому эффекту диоксида в клетках костного мозга мышей.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модели для оценки антимутагенной активности гипоксена *in vivo* использовали цитогенетический тест по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей. Эксперименты выполнены на инбредных мышках-самцах линии C57BL/6 в возрасте 2 месяцев, содержащихся в условиях вивария при 12-часовом световом режиме на полнорационном комбикорме при свободном доступе к воде. Перед началом испытаний препарата животных выдерживали в карантинных условиях в течение двух недель.

Для индукции хромосомных aberrаций применяли мутаген прооксидантного типа действия диоксидин. Подопытным животным внутрибрюшинно одновременно вводили диоксидин (300 мг/кг) и гипоксен (20 мг/кг). При массе мышей  $20 \pm 2$  г это составило 0,6 мл 1% раствора диоксида (ОАО “МосАгроГен”) и 0,2 мл 0,2% раствора гипоксена на животное. В экспериментах использовали стерильный коммерческий 7% раствор гипоксена, предназначенный для внутривенного введения, который перед использованием разводили 5% раствором глюкозы в 35 раз.

В качестве препарата сравнения использовали сладекс (КПХВО “Татхимфармпрепараты”, Казань). Одна таблетка препарата содержала 0,018 г аспартама, для которого установлено антимутагенное действие [4]. Аспартам вводили по той же схеме и в той же дозе, что и гипоксен. Для получения необходимой дозы (20 мг/кг) одну таблетку сладекса растворяли в 9 мл стерильной дистиллированной воды и полученный 0,2% раствор вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл.

Для изучения антимутагенного действия гипоксена в условиях предобработки животным вводили препарат *per os* в течение 5 дней в дозе 70 мг/кг. Последнее введение сочетали с внутрибрюшинной инъекцией диоксида в дозе 300 мг/кг.

Положительным контролем служили мыши, получавшие только диоксидин в той же дозе, что и опытные животные. В отрицательную контрольную группу брали интактных мышей. На каждый вариант контроля и опыта использовали по пять животных.

Получение хромосомных препаратов и принципы цитогенетического анализа не отличались от общепринятых [2, 3, 5, 8]. Анализ метафаз проводили на первой волне митозов. Через 24 ч после введения диокси-

<sup>1</sup> Отдел молекулярной генетики и иммунологии (зав. — А. А. Денисов) Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов, Московская область, Серпухов, 142253, ул. Ленина, 102-А.

<sup>2</sup> ЗАО “КОРПОРАЦИИ ОЛИФЕН”, Москва, 125299, ул. К. Цеткин, 18.

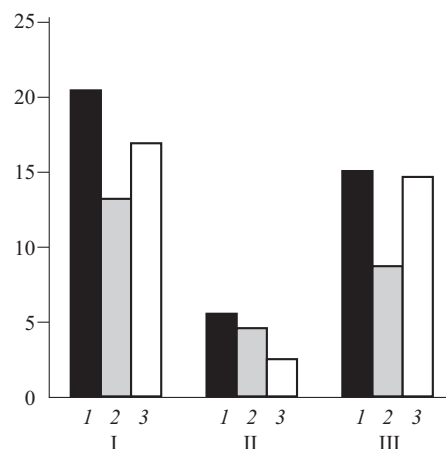
дина мышцы получали внутрибрюшинную инъекцию 0,025% раствора колхицина ("Fluka") в объеме 0,3 мл. Через 2,5 ч животных умерщвляли (в атмосфере углекислого газа) и приступали к приготовлению хромосомных препаратов. От каждого животного анализировали по 100 – 200 метафаз. При анализе нарушения структуры хромосом учитывали хроматидные и изохроматидные разрывы. Гепы считали отдельно, в общую таблицу их число не вносили. В отдельную категорию — клетки со множественными повреждениями — включали метафазы, имеющие пять и более хромосомных aberrаций. Заключение об антимуtagenном действии исследуемого препарата делали на основании сравнения доли поврежденных клеток в опыте и положительном контроле. При статистической обработке результатов исследования достоверность различия средних величин определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента [1].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При цитогенетическом анализе костного мозга мышши выявляли структурные нарушения хромосом в клетках на стадии метафазы. Для анализа отбирали метафазные пластинки с полным набором хромосом ( $2n = 40$ ) и с хорошим разбросом их без наложений.

Как видно из таблицы, уровень поврежденных клеток в костном мозге интактных мышши составил 0 – 2% ( $1,3 \pm 0,25$ ). Цитогенетическое исследование генотоксической активности диоксида показало, что внутрибрюшинное введение его в дозе 300 мг/кг приводило к статистически достоверному увеличению доли клеток с хромосомными aberrациями ( $20,4 \pm 2,3\%$ ).

После совместного однократного внутрибрюшинного введения мутагена и гипоксена количество поврежденных клеток по сравнению с положительным контролем снижалось до  $13,2 \pm 0,51\%$  (уровень значимости 95%). По эффективности антимуtagenного действия гипоксен превосходил аспартам, который при



Распределение типов хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышши линии C57BL/6, в зависимости от вводимого препарата.

I — всего клеток с хромосомными aberrациями, II — из них с фрагментами, III — из них с множественными повреждениями. 1 — диоксида 300 мг/кг, в/б; 2 — гипоксен 20 мг/кг + диоксида 300 мг/кг, в/б; 3 — аспартам 20 мг/кг + диоксида 300 мг/кг, в/б. По оси ординат — количество клеток с хромосомными aberrациями, %.

введении в той же дозе и по той же схеме, что и гипоксен, также ослаблял кластогенное действие диоксида (до  $16,8 \pm 1,46\%$ ). Однако это снижение было статистически не достоверным.

Ослабление эффекта мутагена (*K*) под воздействием гипоксена, рассчитанное по формуле  $K = (Nm - Nma) : Nm \cdot 100$  (где *Nm* — процентное содержание поврежденных клеток в группе, получавшей только мутаген, *Nma* — процентное содержание поврежденных клеток в группе, получавшей мутаген и антимуtagen), составило 35%.

При введении гипоксена *per os* в дозе 70 мг/кг в течение 5 дней с последующей инъекцией диоксида в костном мозге мышши выявлено  $18,2 \pm 1,53\%$  клеток с хромосомными aberrациями, что не отличалось от уровня положительного контроля ( $20,4 \pm 2,3\%$ ).

### Влияние гипоксена и аспартама на кластогенные эффекты диоксида

Условия опыта	Всего клеток	Количество клеток с aberrациями, %			<i>p</i>	Ослабление эффекта мутагена, %
		С фрагментами (одиночные + двойные)	С множественными повреждениями	Всего метафаз с aberrациями		
Отрицательный контроль (интактные мышши)	1000	$1,30 \pm 0,25$	—	$1,30 \pm 0,25$		—
Положительный контроль (диоксида 300 мг/кг, в/б)	1000	$5,50 \pm 0,27$	$15,00 \pm 4,20$	$20,40 \pm 2,30$		—
Гипоксен (20 мг/кг, в/б) + диоксида (300 мг/кг, в/б)	1000	$4,60 \pm 0,29$	$8,60 \pm 2,68$	$13,20 \pm 0,51$	< 0,05	35
Аспартам (20 мг/кг в/б) + диоксида (300 мг/кг, в/б)	500	$2,40 \pm 0,57$	$14,60 \pm 1,52$	$16,80 \pm 1,46$	> 0,05	17
Гипоксен ( <i>per os</i> , $5 \times 70$ мг/кг) + диоксида (300 мг/кг, в/б)	1000	$5,00 \pm 0,90$	$13,20 \pm 3,44$	$18,20 \pm 1,53$	> 0,05	11

Таким образом, предобработка гипоксеном *per os* в исследуемой дозе не снижала генотоксической активности диоксидина.

Анализ спектра хромосомных aberrаций (рисунок) выявил интересную особенность защитного эффекта исследуемых препаратов. Так, ингибирующее действие гипоксена проявлялось в основном уменьшением числа клеток, имеющих множественные повреждения хромосом. Аспартам вызывал статистически достоверное снижение числа клеток с одиночными и двойными фрагментами и практически не влиял на количество клеток, имеющих множественные повреждения хромосом.

Это наблюдение позволяет предположить, что механизм действия гипоксена, по-видимому, направлен на защиту генетического аппарата клетки в целом. Этот механизм осуществляется путем активации естественной системы антимутагенеза (ЕСА), контролирующей нормальную работу генетических структур. Процесс активации ЕСА может осуществлять антимутагеном на разных стадиях рецепторно-регуляторного каскада, при этом протектор внутрь клетки может не проникать [6]. В рамках гипотезы о возможном действии антимутагенов через рецепторные структуры клетки с участием внутриклеточных регуляторных систем [6, 7], можно предположить, что гипоксен, обладающий выраженными электронно-акцепторными свойствами, относится к антимутагенам рецепторного типа действия.

## ВЫВОДЫ

1. Гипоксен ослабляет цитогенетическое действие диоксидина у мышей линии C57BL/6 при его внутрибрюшинном введении одновременно с мутагеном.
2. Предварительное введение гипоксена *per os* в дозе 70 мг/кг мышам линии C57BL/6 в течение 5 дней не вызывает статистически достоверного снижения уровня хромосомных aberrаций, индуцированных диоксидином.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев, *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Госизд-во мед. литературы, Ленинград (1962).
2. А. М. Малашенко, Н. И. Суркова, Х. Х. Семенов, *Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах (методические указания)*, Медицина, Москва (1977).
3. *Метод. реком. по оценке мутагенных свойств фармакологических средств*, Министерство здравоохранения РФ, Москва (1994).
4. А. В. Орещенко, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, Москва (2000).
5. *Оценка мутагенных свойств фармакологических средств: Метод. реком. Фармкомитета МЗ РФ*, Ведом. фармакол. комит. № 4, 32 – 39 (1998).
6. В. В. Семенов, *Вестн. РАМН*, № 7, 28 – 32 (1997).
7. В. В. Семенов, Г. М. Артёмьева, *Матер. 2-й итоговой конф. Генетика человека и патология*, (1992).
8. С. Е. Ford and J. L. Hamerton, *Stain Technol.*, **31**, 247 (1956).

Поступила 26.03.2001

## STUDY OF THE *in vivo* ANTIMUTAGEN ACTIVITY OF HYPOXEN

O. A. Karpova<sup>1</sup>, L. V. Mikhina<sup>1</sup>, A. A. Denisov<sup>1</sup>, and M. K. Kuz'mich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molecular Genetics and Immunology Department, Research Center for Toxicological and Hygienic Control of Biopreparations, ul. Lenina 102A, Serpukhov, Moscow oblast, 142253 Russia

<sup>2</sup> OLIFEN Corporation, ul. K. Tsetkin 18, Moscow, 125299 Russia

The antimutagen effect of the drug hypoxen, representing poly(2,5-dihydroxyphenylene)-4-thiosulfonic acid sodium salt, was studied by chromosome aberration assay in the bone marrow cells of C57BL/6 mice. Hypoxen (20 mg/kg, i.p.) administered simultaneously with dioxidine (300 mg/kg, i.p.) reduced genotoxicity of the latter compound by 35 % over a time period of 24 h. Preliminary five-day administration of hypoxen (70 mg/kg, p.o.) did not decrease the dioxidine damage. The genoprotector activity of hypoxen upon interaperitoneal injection is more pronounced as compared to that of the reference drug sladex (aspartam).