

# ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Стрижельчик Н.Г.

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## РЕЗЮМЕ

Исследовали потенциальную мутагенную активность новых вспомогательных фармацевтических веществ (эмульгаторов, загустителей таблеток) — натрий-карбоксиметилкрахмала и натрий-карбоксиметилцеллюлозы на млекопитающих в опытах *in vivo*. Установлено, что при внутрижелудочном введении изучаемые вещества не индуцируют хромосомные aberrации в клетках костного мозга и доминантные летальные мутации в половых клетках самцов мышей. Полученные результаты обсуждаются в отношении возможности применения изучаемых веществ в фармацевтической промышленности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мутагенность, вспомогательные фармацевтические вещества, хромосомные aberrации, доминантные летальные мутации

## ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия исследования в области химического мутагенеза получили большое развитие. Это связано, с одной стороны, с внедрением огромного количества различных химических веществ во все сферы жизнедеятельности человека, требующих генетического контроля, с другой стороны, научными достижениями, связанными с созданием и использованием новых тест-систем, позволяющих провести более полную оценку как самих мутагенов, так и их метаболитов [1, 2].

Особое место в жизнедеятельности человека занимают такие широко распространенные вещества, как лекарственные препараты, число которых постоянно увеличивается. Мутагенность многих из них установлена на разных генетических объектах [3, 4]. В широком ассортименте лекарственных средств значительное место занимают вспомогательные фармацевтические вещества. Тенденция к увеличению их количества связана с тем, что вспомогательные фармацевтические вещества влияют не только на физико-химические свойства, а и на терапевтический эффект лекарств. В то же время мутагенность (канцерогенность) лекарственных препаратов может зависеть от разновидности и качества используемых вспомогательных веществ. В связи с этим одним из основных требований, предъявляемых к таким соединениям, является безопасность для человека в применяемых дозах.

Целью данной работы являлось изучение потенциальной мутагенной активности новых вспомогательных фармацевтических

веществ — натрий-карбоксиметил-крахмала и натрий-карбоксиметилцеллюлозы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на мышах. Вспомогательные фармацевтические вещества натрий-карбоксиметилкрахмал и натрий-карбоксиметилцеллюлоза вводились внутрижелудочно однократно в дозе 60 мг/кг. Для оценки цитогенетического эффекта веществ использовали метод учета aberrаций хромосом в клетках костного мозга. В этой серии опытов исследуемые вещества вводились самцам мышей линии C57Bl/6. Экспозиция препаратов составляла 6, 24 и 48 часов. За два часа до забоя животных внутрибрюшинно вводили колхицин (0,025% р-р по 0,01 мл на 1 г массы). Фиксацию и приготовление препаратов хромосом осуществляли по стандартной методике [5, 6].

Для оценки эффекта в половых клетках использовали метод учета доминантных летальных мутаций. Препараты вводились самцам мышей-гибридов первого поколения F<sub>1</sub> CBA x C57Bl/6. Сразу после прекращения введения препаратов самцы подсаживались к интактным виргинным самкам в соотношении 1:3. Смену самок проводили ежедневно в течение 3-х недель. Отсаженных самок анализировали на 15-17 день беременности. Учитывали следующие показатели: число беременных самок, процент фертильности, число мертвых и живых эмбрионов (ЖЭ, МЭ), доимплантационную и постимплантационную гибель эмбрионов. Основным показателем частоты доминантных летальных мутаций (ДЛМ) служил уровень постимплантационных потерь.

Для оценки статистической значимости сравнимых значений в опытных и контрольных вариантах использовали критерий хи-квадрат [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты влияния натрий-карбоксиметилкрахмала и натрий-карбоксиметилцеллю-

лозы на клетки костного мозга мышей представлены в таблицах 1 и 2. Изучение 600 метафаз контрольной группы позволило выявить в сумме  $1,3 \pm 0,34\%$  аномальных клеток. Типы aberrаций были представлены одиночными фрагментами (0,8%). Ахроматические пробелы в число aberrаций не входили, а учитывались отдельно (0,5%).

**Таблица 1**  
**Частота и типы aberrаций хромосом, индуцированных в клетках костного мозга мышей новым студнеобразующим веществом натрий-карбоксиметилкрахмалом**

Варианты опытов	Доза препарата в мг/кг	Экспозиция препарата в час.	Проанализировано метафаз	Количество метафаз с aberrациями, % $\pm m$	Типы aberrаций			Про-белы, %	Значение	
					Одиночные фрагменты	Обменные	Парные фрагменты		Хи-квадрат	P
Опыт	60	6	600	$0.5 \pm$	0.5	0	0	0.8	0.52	$> 0.05$
	60	24	600	0.22	0.8	0	0	0.6	0.0	$> 0.05$
	60	48	600	$0.8 \pm$ 0.15 $0.6 \pm$ 0.20	0.6	0	0	0.8	0.11	$> 0.05$
Контроль	—	—	600	$0.8 \pm$ 0.18	0.8	0	0	0.5	—	—

**Таблица 2**  
**Частота и типы aberrаций хромосом, индуцированных в клетках костного мозга мышей новым студнеобразующим веществом натрий-карбоксиметилцеллюлозой**

Варианты опытов	Доза препарата в мг/кг	Экспозиция препарата в час.	Проанализировано метафаз	Количество метафаз с aberrациями, % $\pm m$	Типы aberrаций			Про-белы, %	Значение	
					Одиночные фрагменты	Обменные	Парные фрагменты		Хи-квадрат	P
Опыт	60	6	600	$0.6 \pm$	0.6	0	0	1.0	0.11	$> 0.05$
	60	24	600	0.20	1.0	0	0	0.8	0.09	$> 0.05$
	60	48	600	$1.0 \pm$ 0.25 $0.8 \pm$ 0.15	0.8	0	0	0.6	0.00	$> 0.05$
Контроль	—	—	600	$0.8 \pm$ 0.18	0.8	0	0	0.5	—	—

Цитогенетический анализ влияния натрий-карбоксиметилкрахмала на клетки костного мозга мышей показал, что процент

аномальных клеток при изучении 1800 метафаз составил: экспозиция 6 часов —  $1,3 \pm 0,36\%$ , экспозиция 24 и 48 часов —  $1,4 \pm$

0,22%. Типы aberrаций были представлены одиночными фрагментами. Наблюдались ахроматические пробелы. Парные фрагменты и aberrации обменного типа не выявлены. Статистический анализ результатов не показал достоверных различий между частотой возникновения aberrантных метафаз в контрольных и опытных вариантах при всех сроках экспозиции натрий-карбоксиметилкрахмала ( $P > 0,05$ ).

Аналогичные данные получены при оценке воздействия натрий-карбоксиметилцеллюлозы. Цитогенетический анализ 1800 метафаз позволил установить, что при экспозиции 6 часов процент аномальных клеток был равен  $1,6 \pm 0,20$  %, 24 часа —  $1,8 \pm 0,42$

% и 48 часов —  $1,4 \pm 0,22$  %. Типы aberrаций, как и в контрольных вариантах, были представлены одиночными фрагментами, отмечены ахроматические пробелы (см. табл. 2). Сравнение полученных результатов с контрольными значениями не выявило статистически значимых различий между частотой возникновения aberrантных метафаз при всех экспозициях препарата ( $P > 0,05$ ).

В таблицах 3 и 4 отражены результаты экспериментальных исследований влияния натрий-карбоксиметилкрахмала и натрий-карбокси-метилцеллюлозы на половые клетки самцов мышей. В этой серии исследований было проанализировано более 400 самок мышей и 2600 эмбрионов.

**Таблица 3**  
**Показатели доминантных летальных мутаций у самцов мышей при воздействии натрий-карбоксиметилкрахмала**

Стадии сперматогенеза	Варианты опытов	Фертильность, %	На 1 беременную самку		Постимплантационная смертность
			ЖЭ	МЭ	
Зрелые спермии	Контроль	82.2	8.72	0.45	0.0500
	Опыт	84.4	8.42	0.47	0.0532
Поздние сперматиды	Контроль	80.0	7.52	0.38	0.0491
	Опыт	82.2	6.67	0.35	0.0500
Ранние сперматиды	Контроль	84.4	7.81	0.42	0.0511
	Опыт	86.6	7.07	0.35	0.0482

**Таблица 4**  
**Показатели доминантных летальных мутаций у самцов мышей при воздействии натрий-карбоксиметилцеллюлозы**

Стадии сперматогенеза	Варианты опытов	Фертильность, %	На 1 беременную самку		Постимплантационная смертность
			ЖЭ	МЭ	
Зрелые спермии	Контроль	82.2	8.72	0.45	0.500
	Опыт	77.7	7.88	0.42	0.052
Поздние сперматиды	Контроль	80.0	7.52	0.38	0.0491
	Опыт	75.5	6.85	0.32	0.0450
Ранние сперматиды	Контроль	8.44	7.81	0.42	0.0511
	Опыт	80.0	7.16	0.33	0.0444

В контрольных вариантах частота доминантных летальных мутаций составляла: на 1-й неделе скрещивания -  $5,0 \pm 0,62$ %, на 2-й -  $4,9 \pm 0,98$ %, на 3-й -  $5,1 \pm 0,49$ %.

При воздействии натрий-карбоксиметилкрахмала процент беременных самок на разных сроках скрещивания достоверно не отличался от контроля. Не отмечено снижения числа живых эмбрионов и увеличения числа мертвых эмбрионов на одну беременную самку. Частота доминантных летальных мутаций на 1-й неделе скрещивания составила —  $5,3 \pm 0,61$ %, на 2-й неделе —  $5,0 \pm 0,62$ %, на 3-й неделе —  $4,8 \pm 0,45$ % (см. табл. 3).

Статистический анализ результатов не показал достоверных различий между частотой возникновения доминантных летальных мутаций в контрольных и опытных вариантах ( $P > 0,05$ ).

Аналогичные результаты были получены при воздействии натрий-карбоксиметилцеллюлозы. Не отмечено снижения процента фертильности и уменьшения числа живых эмбрионов, а также увеличения числа мертвых эмбрионов на одну беременную самку по отношению к контролю. Частота доминантных летальных мутаций равнялась: на 1-й неделе скрещивания —  $5,2 \pm 0,64$ %, на

2-й неделе —  $4,5 \pm 0,44\%$ , на 3-й неделе —  $4,4 \pm 0,23\%$  (см. табл. 4). Достоверные различия между контрольными и опытными вариантами не установлены ( $P > 0,05$ ).

Представленные в работе результаты и проведенные ранее исследования [8-10] свидетельствуют о том, что новые вспомогательные вещества натрий-карбоксиметилкрахмал и натрий-карбоксиметилцеллюлоза не являются мутагенами — не вызывают индукции генных мутаций и хромосомных aberrаций у разных генетических объектов.

Так, в тесте Эймса-Salmonella/ микросомы изучаемые вещества не были мутагенны для Salmonella typhimurium штаммов TA 98 и TA 100 — в дозах 0,1-1000,0 мкг/мл не вызывали достоверного повышения генных мутаций как в условиях без метаболической активации, так и с метаболической активацией фракцией S-9 печени крыс [8].

В исследованиях на Drosophila melanogaster натрий-карбоксиметилкрахмал и натрий-карбо-ксиметилцеллюлоза не вызывали повышения частоты доминантных летальных мутаций в зрелых сперматозоидах при заправке взрослых самцов [9, 10].

В представленных в настоящей работе исследованиях изучаемые вещества не были

мутагенны для соматических и половых клеток млекопитающих — не индуцировали aberrаций хромосом в клетках костного мозга и доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов мышей на постмейотических стадиях сперматогенеза. Следовательно, новые вспомогательные фармацевтические вещества не проявляли активности на трех генетических объектах в системах *in vitro* и *in vivo* (микроорганизмы, насекомые, млекопитающие).

Следует отметить, что в исследованиях на млекопитающих, согласно рекомендациям ВОЗ и принципам, применяемым для оценки фармацевтических средств, изучаемые соединения тестировались в дозе, суточной рекомендованной для человека и увеличенной в 100 раз [5].

Таким образом, учитывая все вышесказанное, в соответствии с общими принципами экстраполяции данных, принятыми в области генетической токсикологии [6], следует заключить, что изучаемые вещества — натрий-карбоксиметилкрахмал и натрий-карбоксиметилцеллюлоза в качестве вспомогательных фармацевтических веществ не представляют мутагенной опасности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рапопорт И.А. // Проблемы химического мутагенеза. - М.: Медицина, 1970. - с. 249-266.
2. Худoley В.В. В кн. Выявление мутагенности химических канцерогенов и первичная профилактика рака, теоретические и практические аспекты // Первичная профилактика рака (под ред. Н.Н. Блохина), - М.: Медицина, 1986. - с. 41-47.
3. Журков В.С. // Генетика, 1975. - № 11. - с. 146-149.
4. Рапопорт И.А., Филиппова Л.М., Журков В.С. // Генетика, 1971. - Т. VII, № 7. - с. 8-12.
5. Бочков Н.П., Шрам Р.Н., Кулешов Н.П., и др. // Генетика, 1975. - Т. XI, № 10. - с. 156-172.
6. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств фармакологических средств // М.: Медицина. 1994. - 40 с.
7. Гублер Е.В., Генкин А.А. // М.: Медицина, 1971. - с. 21-25, 53-56.
8. Стрижельчик Н.Г., Кульшин В.Е. // Цитология и генетика, 1994. - № 2. - с. 91-93.
9. Стрижельчик Н.Г. // Вестник проблем современной медицины, УАННП, Харьков, 1995. - №12. - с. 99-101.
10. Новик И.И., Стрижельчик Н.Г. // Вестник проблем современной медицины, УАННП, Харьков, 1995. - № 12. - с. 105-107.

## ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ДОПОМІЖНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ РЕЧОВИН НА ТВАРИНАХ

Стрижельчик Н.Г.  
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

## РЕЗЮМЕ

Вивчали потенційну мутагенну активність нових допоміжних фармацевтичних речовин (емульгаторів, загустювачів таблеток) — натрій-карбоксіметилкрахмалу та натрій-карбоксіметилцеллюлози на тваринах у дослідах *in vivo*. При внутрішньошлунковому введенні досліджувані речовини не викликають хромосомні aberrації у клі-

тинах кісткового мозку та доміантні мутації в статевих клітинах самців мишей. Одержані результати обговорюються у відношенні можливості застосування досліджуваних речовин у фармацевтичній промисловості.

**КЛЮЧЕВІ СЛОВА:** мутагенність, допоміжні фармацевтичні речовини, хромосомні аберації, доміантні летальні мутації

## **THE MUTAGENIC TESTS OF NEW AUXILARY FARMACEUTICAL SUBSTANCIES FOR MAMMALIANS**

Strygelchyk N.G.

Kharkov National V.N. Karazin University

---

### **SUMMARY**

The potential mutagenic effects of new auxilary farmaceutical substancies (emulgators) was investigated. Under per os injection the substancies not induced the chromosomal aberrations in the narrow cells and dominant lethal mutations in male gametes of mouse. The results are discussed in connection to using at investigated substancies in pharmacology.

**KEY WORDS:** mutagenic, auxilary farmaceutical substancies, chromosomal aberrations, dominant lethal mutations