

ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВОЇ ПРОТИСУДОМНОЇ СУБСТАНЦІЇ ДИБАМКУ

Л.В.Яковлева, С.О.Мачуліна

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: епілепсія; протисудомні засоби; дибамк; мутагенні властивості

Викладені результати вивчення мутагенних властивостей нової протисудомної субстанції дибамку. Дослідження проведено трьома методами: методом обліку хромосомних аберацій, у тесті домінантних летальних мутацій та методом рецесивних летальних мутацій. Результати дослідження свідчать про відсутність мутагенної активності субстанції дибамку: вона не викликає збільшення частоти хромосомних аберацій і процесів порушення клітинного поділу в ана-телофазах кісткового мозку мишей та щурів; не індукує домінуючу летальність у зародкових клітинах щурів; не викликає підвищення спонтанного рівня рецесивних, пов'язаних зі статтю летальних мутацій. Таким чином, субстанція дибамку не виявляє мутагенної активності, що вказує на перспективність поглибленого вивчення та створення на її основі нового протисудомного засобу для лікування епілепсії.

Проблема створення нових протисудомних засобів відома однією з актуальних проблем в усьому світі. Це пояснюється збільшенням останнім часом захворювань, які супроводжуються судомами [2, 9]. Підвищення захворюваності на епілепсію спричиняють погіршення екологічного оточення, інтенсифікація способу життя, емоційні, психічні та фізичні перевантаження.

За оцінками ВООЗ на сьогодні в світі налічується понад 40 мільйонів осіб, які страждають на епілепсію. У середньому за даними світової статистики розповсюдженість епілепсії та епілептичних нападів складає 1,0%, а в популяції дітей та підлітків — близько 4,0%. Актуальною є проблема епілепсії і для України, де захворюваність дітей на епілепсію у 2000 р. становила 0,36% [8].

За сучасними уявленнями епілепсія є хронічним захворюванням головного мозку, на різних рівнях якого формується епілептична активність, яка детермінує епілептичну хворобу. Захворювання часто носить хронічний харак-

тер, що вимагає тривалої терапії (від 6 місяців до декількох років, а іноді й протягом усього життя) протиепілептичними (передусім, протисудомними) засобами.

На цей час найбільш широко вживаними протиепілептичними засобами є вальпроєва кислота (депакін, конвульсофін) та карбамазепін (фінлепсин, тегретол, тिमоніл). Доведена їх виражена клінічна ефективність при різних формах епілептичних нападів [2, 12, 15]. Недоліками цих препаратів є розвиток тяжких побічних реакцій та ускладнень, що значно обмежує їх тривале застосування у клінічній практиці [3]. Крім того, встановлено, що ефективно та безпечно використання протисудомних препаратів у клініці вимагає їх періодичної зміни. До того ж бажано мати прості за технологією виробництва та рентабельні протисудомні препарати, які були б доступні для широкого кола пацієнтів. У зв'язку з вищевикладеним проблема створення нових більш ефективних та менш токсичних лікарських засобів для лікування епілепсії є актуальною.

До перспективних сполук у цьому аспекті належать похідні маленової кислоти, які виявляють протисудомну, спазмолітичну, протизапальну та інші види фармакологічної активності.

На кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету синтезовано субстанцію дибамку (похідне 2-карбоксіфеніламіду маленової кислоти), яка виявляє виразну протисудомну активність, має низькі показники токсичності, що свідчить про перспективність створення на основі отриманої субстанції нового протиепілептичного засобу [10, 11, 13, 14].

Фармакологічними дослідженнями, проведеними в НФаУ, встановлено протисудомна дія субстанції дибамку на експериментальних моделях судомного стану у щурів, викликаного різними чинниками.

Таким чином, вищевикладене свідчить про виражену протисудомну дію субстанції дибамку в експериментальних умовах та перспективність поглибленого вивчення та створення на її основі нового протисудомного засобу для лікування епілепсії.

Згідно з вимогами Державного фармакологічного центру МОЗ

Таблиця 1

Частота хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку мишей при введенні субстанції дибамку в дозі 1000 мг/кг (n=20)

Показники	Групи тварин			
	інтактний контроль	через 6 год після введення препарату	через 24 год після введення препарату	через 48 год після введення препарату
Кількість тварин	5	5	5	5
Кількість проаналізованих клітин	1000	1000	1000	1000
Фрагменти, %	0,9±0,42	1,4±0,42*	1,2±0,27	0,8±0,45
Хромосомні мости, %	2,5±1,12	2,5±0,61	2,0±0,79	2,3±0,84
Хроматидні мости, %	1,3±0,57	1,6±0,42	1,3±0,27	1,3±0,57
Кількість власне аберацій, %	4,7±1,15	5,5±0,79	4,5±1,0	4,4±0,96
Злипання хромосом, %	1,6±0,42	2,0±0,87	1,8±0,84	1,5±0,61
Відставання хромосом, %	0,4±0,42	0,7±0,57	0,6±0,42	0,5±0,35
Сукупна кількість порушень, %	6,7±1,72	8,2±1,35*	6,9±1,92	6,4±1,24
Мітотичний індекс	1,7±0,47	1,8±0,31	1,6±0,21	1,7±0,48

Примітка: * — відхилення вірогідне по відношенню до групи інтактного контролю, $p < 0,05$

України необхідною умовою комплексу досліджень специфічної токсичності є вивчення мутагенної дії препарату, що стало метою нашої роботи.

Дослідження мутагенної активності субстанції дибамку проведено в ЦНДЛ НФаУ на щурах обох статей та мишах. За методом обліку хромосомних аберацій (ХА) у клітинах кісткового мозку досліджено вплив препарату на соматичні клітини [1]. Чутливість статевих клітин до препарату вивчена в тесті домінуючих летальних мутацій (ДЛМ) в клітинах змішаної генерації сперматогенного епітелію [4]. На дрозофілах за методом рецесивних летальних мутацій було вивчено можливість препарату викликати генні мутації [5].

Матеріали та методи

Для вивчення цитогенетичної активності субстанції дибамку були проведені експерименти в умовах гострого та підгострого введення. Ці два тести дозволяють оцінити як потенційні мутагенні властивості препарату (короткострокове введення), так і його вплив на генетичний апарат при його тривалому введенні.

Експерименти для дослідження потенційних мутагенних влас-

тостей субстанції дибамку на рівні 10 умовно терапевтичних доз (УТД) були проведені на мишах в умовах гострого експерименту. Для цього субстанцію вводили внутрішньошлунково в дозі 1000 мг/кг одноразово. Через 6, 24, 48 год проводили евтаназію тварин згідно з вимогами та принципами біоетики і виймали стегонову кістку. Після проводки фіксованих кісток через спирти зростаючої концентрації з кісткового мозку готували тимчасові давлені препарати, які фарбували розчином ацетокарміну. Облік частоти ХА проводили ана-телофазним методом, який дозволяє зареєструвати власне ХА, в тому числі й порушення на рівні хроматид, а також злипання та відставання хромосом, пов'язаних з порушенням структури клітинних мембран і одночасно зареєструвати рівень проліферативної активності (мітотичний індекс) [6].

В умовах підгострого дослідження щурам самцям вводили субстанцію дибамку в дозі 100 мг/кг та 1000 мг/кг протягом 1 міс. Після закінчення експерименту проводили евтаназію тварин згідно з вимогами та принципами біоетики, виймали стегонову кістку і готували та оцінювали препарати за вищевказаною схемою.

Генетичні зміни в статевих клітинах досліджували методом домінуючих летальних мутацій. У дослідах використовували щурів самців, яким вводили субстанцію внутрішньошлунково протягом 5 днів на тиждень у продовж 2,5 місяців. Після цього до кожного самця підсаджували по 3 віргінні самки на 1 тиждень. Тривалість експерименту охоплювала усі стадії сперматогенезу у щурів, тобто 8 тижнів. Самок щурів розтинали на 20 день вагітності і підраховували кількість живих і мертвих ембріонів (табл. 3).

Сутність методу обліку рецесивних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* полягає в тому, що оцінюється здатність препарату індукувати в X-хромосомі (хромосома-1) самців рецесивні летальні мутації, що через самок першого покоління передаються самцям другого покоління. Завдяки лінії аналізатора, яка має видимі мутації і відрізняється від ліній дикого типу, можна візуально провести аналіз нащадків кожної особини.

В експерименті були використані дві лінії: Мелер-5 — тестерна лінія та Conton-S — дослідна лінія. Препарат вводили в поживне середовище. Спочатку визначали ЛД₅₀ субстанції дибамку. За робочу дозу було прийнято 40 мг/мл.

Таблиця 2

Частота хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів самців при уведенні субстанції дибамку (n=18)

Показники	Групи тварин		
	Інтактний контроль	Субстанція дибамку	
		1000 мг/кг	100 мг/кг
Кількість тварин	6	6	6
Кількість проаналізованих клітин	1200	1200	1200
Фрагменти, %	0,6±0,88	0,8±0,52	0,8±0,41
Хромосомні мости, %	0,9±0,58	0,8±0,82	0,8±0,42
Хроматидні мости, %	0,6±0,20	0,9±0,86	0,8±0,42
Кількість власне аберацій, %	2,1±0,58	2,6±0,86	2,3±0,65
Злипання хромосом, %	0,4±0,38	0,5±0,45	0,5±0,45
Відставання хромосом, %	0,3±0,27	0,4±0,38	0,4±0,20
Сукупна кількість порушень, %	2,8±0,88	3,5±0,84	3,3±0,76

Потім самців дикого типу, які отримали таку дозу субстанції дибамку схрещували з самками Мелер-5. Якщо в X-хромосомі самців була рецесивна леталь, то в другому поколінні серед нащадків гетерозиготних самок, які, в свою чергу, були схрещені з самцями Мелер-5, не повинно бути самців дикого типу. У другому поколінні підраховували загальну кількість пробірок без сам-

ців дикого типу. Кількість культуральних пробірок становить число проаналізованих X-хромосом самців, які отримували субстанцію дибамку. Отримані результати обробляти статистичними методами [7].

Результати та їх обговорення

Дослідження мутагенних властивостей нової протисудомної суб-

станції дибамку методом обліку хромосомних аберацій показали, що при одноразовому введенні дибамку мишам через 6 год спостерігали незначний рівень підвищення частоти ХА, головним чином за рахунок підвищення кількості фрагментів (табл. 1). Так, при тій же експозиції препарату зареєстровано збільшення кількості злипань хромосом, пов'язане з впливом препарату на цілісність клітинних мембран. Однак через 24 та 48 год кількість ХА у мишей знижувалась до рівня інтактного контролю. Виявлене підвищення частоти ХА не перевищує популяційних коливань цього показника і тому не може вважатися значущим.

При введенні субстанції дибамку щурам самцям протягом 1 місяця у клітинах кісткового мозку також не спостерігалось будь-яких суттєвих порушень, які б вказували на пошкодження хромосом (табл. 2).

Слід звернути увагу на те, що при обліку мітотичного індексу при дослідженні субстанції дибамку на рівні 1000 мг/кг у 4-х тварин з 6-ти відмічали атипівні мітози, що свідчить про вплив препарату на мембрани клітин ссавців. Однак при дослідженні препарату в дозі 100 мг/кг підвищення частоти ХА та будь-яких порушень мітозу не зареєстровано.

Таким чином, можна зробити висновок про відсутність мутагенного впливу субстанції дибамку на соматичні та генеративні клітини щурів та мишей в умовно терапевтичній дозі.

Домінантні мутації — генетичні зміни в статевих клітинах батьківських особин, які призводять до загибелі нащадків першого покоління на ембріональних стадіях розвитку. Мутагенний ефект виявляється в підвищенні ембріональної смертності нащадків першого покоління в період до і після імплантації [1].

Вивчення мутагенної дії за методом обліку доміантних летальних мутацій показало, що відсоток усіх видів ембріональної загибелі плодів не перевищував контрольні значення. Одержані від

Таблиця 3

Частота доміантних летальних мутацій у щурів при уведенні субстанції дибамку (n=52)

Показники	Групи тварин		
	Інтактний контроль	Субстанція дибамку	
		1000 мг/кг	100 мг/кг
Число спостережень	14	18	20
Кількість жовтих тіл	9,8±1,48	10,1±2,1	9,0±1,43
Кількість місць імплантації	8,4±1,99	8,8±1,50	8,4±1,54
Загальна ембріональна летальність, %	15,1 (0+38,0)	12,9 (0+31,3)	9,0 (0+25,0)
Доімплантаційна загибель плодів, %	6,9 (0+25)	11,2 (0+22,5)	7,0 (0+25,0)
Постімплантаційна загибель плодів, %	9,0 (0+27,3)	1,9 (0+12,5)	2,1 (0+14,9)
Число живих плодів на 1 самку	8,36±1,95	8,7±1,53	8,2±1,68
Частота доміантних летальних мутацій	-	0	0
Маса плодів	2,4±1,60	2,6±1,35	2,6±1,23
Розміри плодів	3,1±0,26	3,2±0,25	3,3±0,15

Таблиця 4

Вивчення рецесивних летальних мутацій в X-хромосомах самців дрозофіли

Препарат, концентрація, мг/мл	Стадія сперматогенезу	Число вивчених хромосом	Рецесивні леталі: число проаналізованих хромосом, %±m	Ступінь мутагенного ефекту
Інтактний контроль	премейотична	1004	0,0996±0,09	0
Субстанція дибамку 40 мг/мл	премейотична	1006	0,1988±0,14	0

самок ембріони дослідної групи також не відрізнялись від ембріонів контрольної групи ні за розмірами, ні за масою. Підвищення частоти ДЛМ під впливом субстанції дибамку зареєстроване не було, що засвідчує відсутність у препарату мутагенних властивостей.

Таким чином, при дослідженні субстанції дибамку в тесті ДЛМ при введенні в дозі 1000 та 100 мг/кг протягом 2,5 місяців було встановлено, що препарат не здатний викликати порушення в статевих клітинах експериментальних тварин (табл. 3).

Результати експерименту методом обліку рецесивних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster*, наведені у табл. 4, також показали відсутність мутагенного ефекту у субстанції дибамку.

Таким чином, отримані результати свідчать про відсутність мутагенних властивостей у субстанції дибамку.

ВИСНОВКИ

1. Нова протисудомна субстанція з робочою назвою "Дибамк" не викликає підвищення спонтанного рівня рецесивних, пов'язаних зі статтю летальних мутацій у дрозофіли.

2. Засіб не викликає збільшення частоти хромосомних аберацій і процесів порушення клітинного поділу в ана-телофазах кісткового мозку мишей та щурів і не виявляє проліферативної активності.

3. Субстанція дибамку не індукує домінуючу летальність у зародкових клітинах щурів.

Таким чином, у дослідях *in vivo* субстанція дибамку не виявляє мутагенної активності, що вказує на перспективність поглибленого вивчення та створення на її основі нового протисудомного засобу для лікування епілепсії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — С. 82-83, 115-138.
2. Доказательная медицина. — Вып. 1. — М.: Медиа Сфера, 2002. — С. 17.
3. Компендиум 2001/2002. — Лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — К.: Моріон, 2001. — 1664 с.
4. Оценка мутагенности новых лекарственных средств: Метод. рекомендації. — М., 1990. — 39 с.
5. Орлова И.Н. Генетический анализ. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — С. 256-258.
6. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Сер. Гигиенические критерии состояния окружающей среды (совместное издание ВОЗ и МОТ). — Женева, 1989. — Вып. 51. — 212 с.
7. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. — Мн.: Беларусь, 1967. — 211 с.
8. Aicardi J. Epilepsy in children. — New York: Raven Press, 1994. — 555 p.
9. Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. //Epilepsia. — 1989. — Vol. 30. — P. 389-399.
10. Houlna C.A. //Expert. Opin. Invest. Drugs. — 2002. — Vol. 11, №10. — P. 1387-1406.
11. Manocha A., Sharma K.K., Mediratta P.K. //Pharmacol. Biochem. Behav. — 2003. — Vol. 74, №2. — P. 343-350.
12. Marson A.G., Williamson P.R., Hutton J.L. et al. Carbamazepine versus valproate monotherapy for epilepsy. In: The Cochrane Library, Issue 3, 2000. — Oxford: Update Software. Search date 1999; primary sources Medline, Cochrane Library, manufacturers, investigators.
13. Sederpalm B. //Eur. J. Pain. — 2002. — №6, Suppl. A. — P. 3-9.
14. Weaver D.F. //Can. J. Neurol. Sci. — 2003. — Vol. 30, №1. — P. 4-7.
15. Wilson J.F., Watson I.D., Williams J. et al. //Clin. Chem. — 2002. — Vol. 48, №11. — P. 1963-1969.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12. Тел. (057) 714-27-15. Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 17.02.2005 р.