

НЕУПОКОЕВА ОКСАНА ВЛАДИМИРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ТИОФАНА И ЭКСТРАКТА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ
КОРНЕЙ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО НА ИНДУЦИРОВАННЫЙ
МУТАГЕНЕЗ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Чурин Алексей Александрович

Официальные оппоненты:

Сорокина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория фармакологических исследований отдела медицинской химии, ведущий научный сотрудник

Гурьев Артем Михайлович, доктор фармацевтических наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, центр внедрения технологий, руководитель центра

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится «__» _____ 2015 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, Томск, пр. Ленина, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (www.pharmso.ru)

Автореферат разослан «__» октября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Генетический аппарат клеток человека испытывает постоянное воздействие различных повреждающих агентов. Это производственные вредности, сельскохозяйственные ядохимикаты, химические соединения бытового назначения, мутагенные лекарства, а также пищевые мутагены [Гончарова Т.Г., 2005; Савина Н.В. и др. 2009; Савченко Я.А., 2012; Дурнев А.Д. и др. 2013; Weber W.W., 1995; Jackson S., Bartek J., 2009]. Особенно остро проблема стабильности генетического аппарата стоит в онкологии, где основная масса используемых препаратов является классическими мутагенами. Так, в настоящее время в России и за рубежом «золотым стандартом» первой линии химиотерапии рака яичников является комбинация карбоплатина и паклитаксела и продолжается широкое использование схемы, включающей цисплатин и циклофосфамид (Циклофосфан) [Тюляндин С.А., 1998; Bolis G. et al., 2000; Seiden M.V. et al., 2001; Dison S. et al., 2002; Duenas-Gonzalez A. et al., 2003; Adamoa V. et al 2004]. При этом мутагенные и канцерогенные эффекты цисплатина и циклофосфана давно известны и доказаны [Nau H., 1982; Ferguson L.R., 1996; Bhana S. et al., 2008; Danesi C.C. et al, 2010]. Генетические нарушения привлекают к себе внимание через определенное время, когда развивается лекарственная устойчивость или вторичный процесс опухолеобразования [Резцова В.В. 2007; Домрачева Е.В. и др. 2012; Voivin I.-F., 1990; Jackson S., 2009; Qin J. et al., 2009]. Кроме того, существует ряд заболеваний (системная красная волчанка, пигментная ксеродерма, анемия Фанкони, синдром Блюма и др.), при которых наблюдается увеличение уровня спонтанного мутирования и повышенная чувствительность к действию мутагенов. У таких больных частота возникновения злокачественных новообразований многократно превышает средние показатели, что делает акцент на необходимость разработки и применения фармакологических корректоров генотоксических эффектов и у этой группы населения [Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998; Дурнев А.Д. и др., 2013].

Степень разработанности. За последние 10 лет уровень мутирования в клетках периферической крови жителей России вырос в 2 раза [Середенин С.Б., 2004; Рахманин Ю.А., Сычева Л.П., 2007]. Известно, что мутации возникают как в соматических, так и генеративных клетках. Наследственные дефекты являются причиной инвалидности у 10-15 из 1000 детей. В связи с тем, что основная часть возникающих мутаций имеет рецессивный тип наследования, угрозу распространения и роста генетически обусловленной патологии в структуре заболеваемости будущих поколений трудно переоценить [Бочков Н.П., 2001; Середенин С.Б., 2004; Дурнев А.Д. и др., 2013].

Важным представляется не только знание механизмов генотоксичности различных групп химиопрепаратов или каких-либо других фармакологических агентов, но и возможность защиты генетических структур в процессе контактирования с ними, без уменьшения терапевтической активности используемых препаратов в клинике [Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1993; Иванова А.А., 2009].

Перспективным является поиск генопротекторов среди антиоксидантных соединений [Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998; Зиновьева В.Н., Спасов А.А., 2005; Гончарова Р.И., 2005; Soobrattee M.A. et al., 2005; Simic A., 2007]. Несомненную пользу может также принести использование веществ растительного происхождения [Амосова Е.Н. и др., 1991; Бариляк И.Р. и др., 1994; Разина Т.Г. и др., 2009].

др., 2005; Vanisree M., Tsay H.S., 2004]. Преимущественными объектами для решения проблемы индуцированного мутагенеза являются вещества, которые наряду с антимуtagenными свойствами, обладают еще каким-либо видом фармакологической активности: иммуностимулирующей, гемостимулирующей, гепатопротекторной [Бочков Н.П. и др., 1992; Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998; Середенин С.Б., 2004; Middleton E., Kandaswami S., 1992].

На основании данных научно-технической и патентной литературы был сделан вывод о перспективности использования антиоксиданта тиофана и экстракта культуры корней шлемника байкальского (ЭШБ), выращенной *in vitro* в качестве средств защиты генома [Воевода Т.В. и др., 2000; Просенко А.Е. и др., 2004; Плотников М.Б. и др., 2004; Капля О.А., 2004; Амосова Е.Н., 2007; Ермолаева Л.А., 2008; Федорова Е.П., 2010; Zueva E.P. et al., 2003; Kovacs D. et al., 2004; Woz'niak D. et al., 2004; Kuzovkina I.N., 2005]. Кроме того, сведения о возможных антимуtagenных свойствах данных фармакологических композиций в отношении таких генотоксичных агентов как паклитаксел, цисплатин и циклофосфан в литературе отсутствуют.

В генотоксикологических исследованиях важно учитывать схемы применения корректора (однократное или курсовое введение, до или после использования повреждающего агента) [Жанатаев А.К., 2000; Ревазова Ю.А., Журков В.С., 2001; Дурнев А.Д., 2001; Куценко С.А., 2002].

Вышесказанное послужило основанием для изучения возможного антимуtagenного действия тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского (*hairy roots*) на моделях индуцированного мутагенеза противоопухолевыми препаратами паклитакселом, цисплатином и циклофосфаном.

Цель исследования: Изучить антимуtagenные свойства антиоксиданта тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского на моделях индуцированного противоопухолевыми препаратами мутагенеза в клетках костного мозга мышей линии СВА/СaLac и соматических клетках *Drosophila melanogaster*.

Задачи исследования:

1. Оценить характер и динамику цитогенетических нарушений в клетках костного мозга у самцов и самок мышей линии СВА/СaLac при однократном внутрибрюшинном введении противоопухолевых препаратов различного механизма действия: паклитаксела, цисплатина и циклофосфана.

2. Изучить генотоксические эффекты паклитаксела, цисплатина и циклофосфана в тест-системе соматического мозаицизма на *Drosophila melanogaster* с использованием маркеров *yellow* и *singed*.

3. Исследовать влияние тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского при их предварительном пероральном однократном и курсовом введении на генотоксические эффекты паклитаксела, цисплатина и циклофосфана в метафазных пластинках костного мозга у самцов и самок мышей линии СВА/СaLac.

4. Оценить возможность фармакологической защиты генома соматических клеток развивающихся особей *Dr. melanogaster* с помощью тиофана и экстракта культуры корней шлемника байкальского.

Научная новизна. В работе впервые проведена оценка цитогенетической активности паклитаксела в клетках костного мозга мышей (ККМ) в ранние и отдаленные сроки наблюдения. Показано, что введение паклитаксела индуцирует

образование геномных и структурных аномалий хромосом в метафазах костного мозга самцов и самок мышей. В динамике изучен процесс становления и элиминации мутантно измененных клеток, выявлены aberrантные метафазные пластинки и полиплоидные клетки через 3 месяца после однократного применения паклитаксела у мышей-самцов. В клетках костного мозга мышей-самок линии СВА/СаLас доля aberrантных метафаз и aberrантных хромосом значительно больше, чем у самцов в ранние сроки наблюдения. Полученные данные о мутагенности паклитаксела создают основу для его применения в генетической токсикологии при моделировании геномных нарушений. Это позволит исследовать возможные средства защиты генома на способность предупреждать появление геномных нарушений в клетках. Показана зависимость антимутагенного эффекта протекторов от применяемых моделей мутагенеза: выраженное антимутагенное влияние тиофана на паклитаксел-индуцированной модели генотоксичности, слабо выраженное – на цисплатин-индуцированной и отсутствие антигенотоксической активности на циклофосфановой модели. Экстракт шлемника байкальского (ЭШБ) снижал генотоксические эффекты паклиаксела, цисплатина и циклофосфана в ККМ на ранних сроках исследования и способствовал нормализации значений цитогенетических показателей через 3 месяца. Впервые проведено исследование рекомбинационных и мутационных событий на трех моделях мутагенеза в соматических клетках личинок *Dr. melanogaster* с маркерными мутациями «у» и «sn³⁺». Показана возможность фармакологической защиты генома клеток у дрозофилы на самых ранних стадиях развития с помощью ЭШБ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные позволяют судить о механизмах генетических нарушений, возникающих в костном мозге мышей и соматических клетках личинок дрозофилы под влиянием паклитаксела, цисплатина и циклофосфана. Определены сроки репарации, ведущие к восстановлению поврежденного генома, что важно для клиницистов-онкологов при выборе наиболее безопасного в плане отдаленных эффектов генотоксических воздействий лекарственного средства. Важное значение для экспериментальных исследований имеют полученные данные о паклитаксел-индуцируемом кратном увеличении набора хромосом, что дает основания для его применения в генетической токсикологии как «модельного мутагена полиплоидии». Различные схемы введения фармакологических средств защиты генома и противоопухолевых препаратов позволят выбрать оптимальный режим использования корректоров (однократное или курсовое). Кроме того, особую значимость будут иметь данные об антимутагенном действии конкретных веществ в отношении определенных групп мутагенов.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование выполнено в несколько этапов. На первом этапе была изучена отечественная и зарубежная литература по данной теме. Всего проанализировано 303 источника, из них 163 - отечественных и 140 – зарубежных. На втором этапе проведены экспериментальные исследования на мышах линии СВА/СаLас обоего пола. Основные методы исследования: методы определения мутагенности согласно методическому «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Москва, 2012]. Затем использовались *Dr. melanogaster* двух тестерных линий «yellow» и «singed» в SMART-тесте для определения рекомбинационной и мутагенной активности фармакологических веществ. На

третьем этапе диссертационного исследования проведен анализ и статическая обработка полученных результатов.

Положения выносимые на защиту.

1. Паклитаксел вызывает в клетках костного мозга самцов и самок мышей образование геномных и структурных нарушений хромосом, а также индуцирует соматическую рекомбинацию у *Drosophila melanogaster*.
2. Тиофан оказывает антимуtagenное действие на паклитаксел-индуцированной модели мутагенеза, и не проявляет антигенотоксической активности в условиях циклофосфан-индуцированного мутагенеза в клетках костного мозга мышей. Применение тиофана снижает частоту соматического мозаицизма, индуцируемого паклитакселом, цисплатином и циклофосфаном у *Drosophila melanogaster*.
3. Экстракт трансформированных корней шлемника байкальского снижает количество паклитаксел, цисплатин и циклофосфан-индуцированных аберраций в метафазах костного мозга на ранних сроках наблюдения и приводит к нормализации значения цитогенетических показателей на отдаленных сроках наблюдения. Экстракт шлемника байкальского предупреждает появление цисплатин-индуцированных двойных пятен у *Drosophila melanogaster*.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференциях «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии» (Томск, 2007, 2012), «Науки о человеке» (Томск, 2007), «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2007, 2008, 2009), «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), «Биология – наука XXI века»: 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 2014), VII международная научная школа для молодых ученых по экологической генетике «Генетическая токсикология» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, отражающих основные положения из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получен 1 патент (RU) на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 14 таблицами. Библиографический указатель включает 303 литературных источника, из них 163 отечественных и 140 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели, задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение работы.

В первой главе по теме исследования проведен анализ отечественной и зарубежной литературы. В первом разделе представлены сведения о проблеме индуцированного мутагенеза, его значимости для современной медицины и

популяции людей в целом. Далее представлены данные о структуре, физико-химических и фармакологических свойствах модельных мутагенов и веществ, взятых для коррекции генотоксических эффектов этих агентов.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Эксперименты проведены на 400 мышах линии СВА/СаLас массой 18-20 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга и мухах *Drosophila melanogaster*, полученных с кафедры цитологии и генетики Биологического Института ТГУ. Животные содержались в соответствии с международными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (1986). Эвтаназию мышей проводили методом цервикальной дислокации.

В качестве экспериментальных моделей генетических нарушений вводили противоопухолевые препараты с различными механизмами действия:

Паклитаксел (митотакс «Д-р Реддис Лабораторис ЛТД» производство Индия). Цитостатик вводили однократно внутрибрюшинно в максимально переносимой дозе (МПД) 40 мг/кг. МПД рассчитывали методом графического пробит анализа при наблюдении за животными в течении 30 дней. За величину МПД принимали дозу, вызывающую 10% летальность [Беленький Л. М., 1963]. Цитостатик растворяли *ex tempore*.

Цисплатин-Эбеве (Эбеве Фарма, Австрия). Раствор готовый к применению. Вводили однократно внутрибрюшинно, в МПД 6 мг/кг, в качестве прямого мутагена.

Циклофосфан (Саранский комбинат «Биохимик»). Растворяли в 0,9% NaCl, вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг (1/10 от МПД, применяемая в генотоксикологических исследованиях), в качестве промутагена [Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998].

Физиологический раствор группе контрольных животных вводили однократно внутрибрюшинно в эквивалентном объеме. Исследования проводили через 6, 12, 24, 48 часов на 5 и 14 сутки и 3 месяца после применения цитостатиков.

В качестве корректоров генетических нарушений использовали: Тиофан (НИИ химии антиоксидантов НГПУ) в дозе 150 мг/кг однократно внутрижелудочно в 1% крахмальной слизи предварительно за 1 ч до инъекции цитостатиков (самцам) и в дозе 30 мг/кг 5-дневным курсом (самцам и самкам). Эффекты однократного применения тиофана и противоопухолевых препаратов изучали через 24 ч (что соответствует клеточному циклу, в котором представлен весь объем нарушений, возникших под влиянием мутагена), 48 ч и 3 месяца после введения (ранние и отдаленные эффекты). Результаты курсового применения тиофана оценивали через 24 ч после его последнего применения и инъекции цитостатика. Экстракт трансформированных корней шлемника байкальского после сгущения отгонкой этанола и последующего разведения дистиллированной водой вводился по двум схемам: однократно внутрижелудочно в дозе 200 мг/кг предварительно за 1 ч до инъекции индукторов мутагенеза (самцам) и 5-дневным курсом внутрижелудочно в дозе 40 мг/кг (самцам и самкам). Сырьем для экстракта послужили корни шлемника байкальского, полученные биотехнологическим способом в Институте физиологии растений РАН [Кузовкина И.Н., 2005]. ЭШБ представляет собой комплекс веществ, извлекаемых из сырья 70% раствором этанола, и содержащих 72% вогонизида и вогонина (63,3 и 8,6% соответственно) от

общего содержания флавонов. Эффекты однократного применения ЭШБ изучали также через 24, 48 ч и 3 месяца после введения индукторов мутагенеза. Результаты курсового применения ЭШБ оценивали через 24 ч после его последнего введения и инъекции цитостатиков.

Противоопухолевые препараты добавляли в корм личинок дрозофилы: паклитаксел - в концентрации 0,005%, цисплатин - в двух концентрациях 0,009% и 0,0015%, циклофосфан в концентрации 0,03%. Тиофан добавляли в питательную среду в концентрации 0,056%, ЭШБ – 0,08% предварительно за 1 час до введения цитостатиков.

В работе использовали метод учета микроядер в эритроцитах периферической крови, хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей (ККМ) и тест-систему соматического мозаицизма на *Drosophila melanogaster* (с маркерными мутациями *yellow* и *singed*). Данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ «StatPlus 2009». Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего арифметического (m). Проверку на нормальность распределения проводили с помощью стандартизованных коэффициентов асимметрии и эксцесса. При несоответствии распределения нормальному закону использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень значимости критериев задавали равным 1% и 5%. Значимость различий для показателя частоты появления самок с мутациями при статистической обработке данных оценивали по критерию χ^2 с поправкой Йейтса, которая применяется только для таблиц 2×2. Для 5% уровня значимости критическое значение χ^2 составляет 3,84 [Трухачева Н.В., 2012].

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов влияния различных индукторов мутагенеза на структуры наследственности метафаз костного мозга мышей линии СВА/СaLac и развивающихся особей *Dr. melanogaster*, и применения корректоров на проявление эффектов мутагенов. Полученные данные представлены в виде таблиц и рисунков.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов исследования с привлечением данных литературы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что однократное внутрибрюшинное введение паклитаксела в МПД 40 мг/кг вызывает в эритроцитах периферической крови самок и самцов-мышей образование микроядер. Это свидетельствует о повреждающем действии паклитаксела на генетические структуры. [Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., 1992]. Применение метода учета хромосомных aberrаций в ККМ позволило выявить образование структурных и геномных нарушений.

Через 24 часа после однократного применения паклитаксела в МПД в костном мозге мышей-самцов доля клеток со структурными нарушениями в 8,3 раза превышала значение соответствующего показателя в контроле, а в группе мышей-самок в 11,8 раза ($P < 0,01$) (Рисунок 2). При изучении цитогенетической активности паклитаксела выявлена большая чувствительность ККМ самок к кластогенному действию цитостатика по сравнению с самцами. У мышей-самок зафиксировано в 1,9 раза больше поврежденных метафаз, чем у самцов. Количество aberrантных хромосом в группе самок в 1,75 раза больше, чем у

самцов ($P < 0,05$). Кроме того, у самок было зафиксировано появление парных фрагментов хромосом в ККМ и клеток с множественными нарушениями, что, как известно, свидетельствует об изменениях в системе клеточной репарации [Болтина И.В., 2007; Duesberg P., Rasnick D., 2000]. Возникновение структурных нарушений в ККМ, вероятно, связано с повышением интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), что является следствием неспецифического токсического действия паклитаксела и накоплением токсических продуктов его метаболизма [Ветошкина Т.В., Дубская Т.Ю., Тимина Е.А. и др., 1998; Ермолаева Л.А., 2008; Безбородова О.А. и др., 2011]. Данные литературы свидетельствуют о повреждающем ДНК и мутагенном действии активных форм кислорода (АФК), промежуточных и конечных продуктов липидной перекисидации, в особенности малонового диальдегида (МДА) [Fang J.L., Vaca C.E., Valsta L.M., 1996]. Первые геномные нарушения (полиплоиды $4n$, числовые хромосомные нарушения) (Рисунок 1) появляются через 6 ч после введения паклитаксела. Выявленная геномная патология является следствием особенностей действия паклитаксела на микротрубочки. Связываясь с β -субъединицей тубулина, паклитаксел образует большое количество дефектных микротрубочек, что препятствует их взаимодействию с хромосомами. Происходит задержка клеток в G_2 и M – фазах митоза и удвоенный набор хромосом не расходуется в дочерние клетки, образуя полиплоиды [Бессмельцев С.С., 2003; Давыдов М.И., 2004; Маренич А.Ф. и др., 2005; Лю Б.Н. и др., 2008; Vlagosklonny M.V., 2002; Jordan M.A., Wilson L., 2004]. В нашем исследовании максимальное количество полиплоидных клеток было выявлено через 48 часов наблюдения и составило 19,9% от общего количества изученных метафаз. Нарушения хромосомных наборов, связанные с аппаратом деления клеток появляются в ана-, телофазе митоза и, следовательно, выявляются в метафазе второго митоза [Бочков Н.П., 1971]. Последующее резкое уменьшение числа полиплоидов, по-видимому, свидетельствует о запуске механизма апоптоза, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований [Карпова Г.В., Чуринов А.А., и др., 2008; Федорова Е.П., 2011; Vlagosklonny M.V., et al., 1996]. Изучение препаратов метафаз костного мозга на 5 и 14 сутки позволило выявить нормализацию такого цитогенетического показателя, как доля клеток со структурными нарушениями. В то же время, количество клеток с геномными нарушениями значительно превышало соответствующее значение в контроле ($P < 0,01$). Данный факт указывает на то, что паклитаксел воздействует непосредственно на клеточный аппарат деления, индуцирует кратное увеличение хромосомного набора, т.е. вызывает полиплоидию, что расширяет представление о мутагенных свойствах препарата и может иметь важное значение в генетической токсикологии.

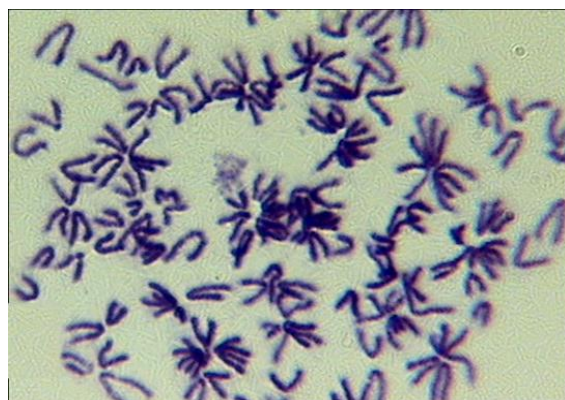


Рисунок 1 - полиплоидная клетка, X 1350

В ранее проведенных исследованиях в НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга было установлено, что введение паклитаксела вызывает развитие гипоплазии лимфоидных органов и костного мозга, что является признаками иммунной недостаточности [Карпова Г.В. и др., 2007; Шерстобоев Е.Ю. и др., 2008; Федорова

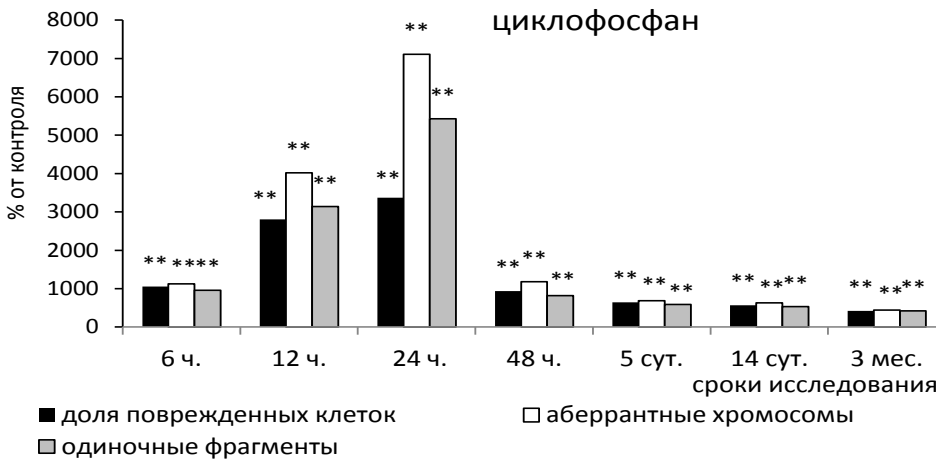
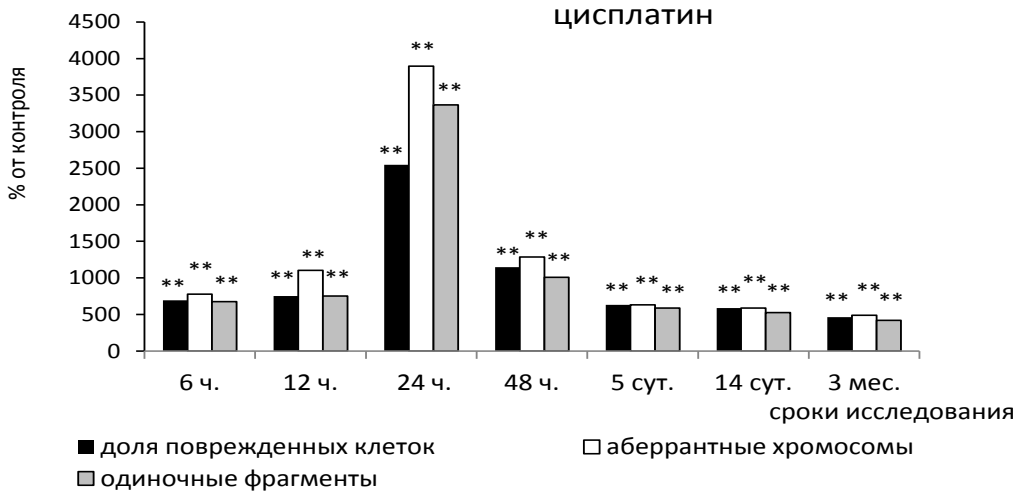
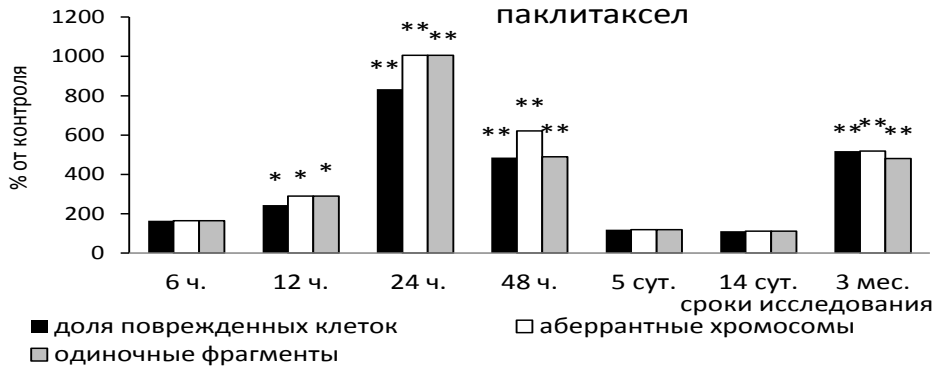


Рисунок 2 – Влияние различных индукторов мутагенеза на цитогенетические показатели в клетках костного мозга мышей-самцов линии СВА/СаЛас

Примечание - по вертикали - % нарушений от контроля, по горизонтали – сроки наблюдения; * и ** - статистически значимые различия (P<0,5 и P<0,01) по сравнению с контролем

Е.П., 2011]. Согласно литературным данным, иммунодепрессия тимуса, может оказать значительное влияние на частоту мутирования [Ильинских Н.Н. и др., 1986; Ильинских Н.Н. и др., 1992, Фролов А.К. и др., 1993; Brode S., Cooke A., 2008]. Принимая во внимание ранее выявленное снижение численности субпопуляций лимфоцитов после применения паклитаксела и повышенный уровень цитогенетических нарушений в ККМ можно предположить, что паклитаксел-индуцированная иммунная недостаточность была одним из механизмов, способствовавших сохранению и накоплению аномальных клеток на ранних и отдаленных сроках исследования. Через 3 месяца после введения паклитаксела количество поврежденных метафаз достоверно превышало значение соответствующего показателя в контрольной группе животных. Это свидетельствует о том, что макромолекулы ККМ и, вероятно, тимуса, получили скрытые повреждения, что способствовало возникновению, развитию и реализации неблагоприятных последствий для организма в целом. Ранее было показано, что потомство интактных самок и самцов, получавших паклитаксел непосредственно за 3 месяца до спаривания, характеризуется повышенной частотой встречаемости патологических нарушений и изменениями в реакции иммунной системы [Шерстобоев Е.Ю. и др., 2008; Румпель О.А., 2009, Боровская Т.Г. и др., 2010].

В качестве другого индуктора мутагенеза был выбран алкилирующий противоопухолевый препарат цисплатин, непосредственно повреждающий структуру ДНК [Bhana S. et al., 2008]. При однократном внутрибрюшинном введении цисплатина в МПД происходила индукция структурных aberrаций хромосом в ККМ мышей, которые были представлены одиночными и парными ацентрическими фрагментами и хроматидными обменами. Первые aberrации появлялись через 6 ч после применения цисплатина. Максимальное количество поврежденных метафазных пластинок и aberrантных хромосом было выявлено через 24 ч с момента инъекции противоопухолевого препарата (Рисунок 2). Количество aberrантных хромосом в метафазных пластинках у самцов в 1,5 раза превышало соответствующий показатель у самок ($P < 0,05$). Спустя 48 ч после введения цитостатика часть aberrантных клеток подвергалась элиминации. Изучение метафаз костного мозга через 5, 14 суток позволило наблюдать в 6 раз больше поврежденных клеток, чем в контрольной группе ($P < 0,01$) (Рисунок 3). Часть поврежденных клеток не подверглась апоптозу или элиминации иммунокомпетентными клетками вследствие иммунодепрессивного действия цисплатина [Карпова Г.В., 1992; Дыгай А.М. и др., 2009]. Кроме того, стабильное превышение значений цитогенетических показателей в группе цисплатина по сравнению с контрольной группы может быть связано со скрытыми предмутационными изменениями молекулы ДНК [Бочков Н.П. и др., 1972; Лучник Н.В., 1996; Кузин С.М., Стукалов С.В., 1998]. Так, к 3 месяцам наблюдения было выявлено статистически значимое превышение значений цитогенетических показателей по сравнению с группой контроля ($P < 0,01$) (Рисунок 2).

В качестве следующего индуктора мутагенеза был выбран алкилирующий препарат промутаген – циклофосфан [Clarke L., Waxman D.J., 1989]. Его однократное введение оказывало выраженное генотоксическое действие уже через 6 ч. Уровень aberrантных клеток через 24 ч достиг своего максимума (Рисунок 2). Количество aberrантных хромосом в группе мышей-самцов СВА/СаЛас через 24 ч после инъекции ЦФ в 1,5 раза превышает таковой показатель у самок, что указывает на разную чувствительность к данному генотоксиканту. Спектр

нарушений в ККМ был представлен концевыми делециями, изохроматидными делециями, изохроматидно-хроматидными обментами, асимметричными транслокациями. Особенностью действия ЦФ является резкое увеличение числа хроматидных обменов в ККМ мышей (Рисунок 3). Кроме того, под влиянием ЦФ в



Рисунок 3 Множественные обмены

ККМ мышей-самцов и самок обнаружено значительное количество мультиаберрантных клеток. Индуцируя мутагенез циклофосфаном, мы обнаруживали появление перестроек хромосом через два синтеза ДНК (48 ч), а также через 5, 14 суток и 3 месяца после его применения. Клетки, не подвергшиеся апоптозу после повреждения ДНК, могут быть более склонными к большему накоплению генетических изменений по сравнению с нормальными клетками, что допускает дисрегуляцию генов, онкогенную трансформацию, канцерогенез [Попов Л.С., Корочкин Л.И., 2004; Копнин Б.П., 2007; Гервас П.А. и др., 2009; Домрачева Е.В. и др., 2012; Kerr J.F., 1994; Jackson S., 2009]. Кроме того, появление отдаленных мутагенных эффектов цитостатического воздействия, вероятно, было обусловлено и выраженным иммунодепрессивным эффектом ЦФ [Масная Н.В., 2005; Дыгай А.М. и др., 2009; Sefc L. et al., 2003; Prakash V. et al., 2007; Brode S., Cooke A., 2008].

В работе для защиты структур наследственности от генотоксического действия противоопухолевых препаратов различного механизма действия применяли фармакологические вещества с антиоксидантной активностью - тиофан (антиоксидант синтетического происхождения, фонд «Биооксидант», г. Новосибирск) и экстракт трансформированных корней шлемника байкальского (адаптогенное, ноотропное, гемо- и иммуностимулирующее средство). Определяли наличие антимутагенного эффекта по способности минимизировать повреждающее действие на хромосомный материал, а также фактор эффективности антимутагена (ФЭА) по расчетной формуле: $ФЭА = M_1 - M_2 / M_1$, где ФЭА – фактор эффективности антимутагена, M_1 - % метафаз с абберациями при действии мутагена, M_2 - % метафаз с абберациями при действии мутагена и исследуемой комбинации. Чем более ФЭА приближен к 1, тем более эффективным считают действие антимутагена [Алекперов У.К., 1984].

Так, при исследовании метафазных пластин ККМ мышей после применения антиоксиданта тиофана и инъекции паклитаксела, было выявлено снижение доли поврежденных клеток и числа аберрантных хромосом через 24, 48 ч и 3 месяца, по сравнению с группой паклитаксела (Рисунок 4). Однократное и курсовое применение тиофана снижало количество структурных аббераций до уровня контрольных значений. Полученный эффект объясняется способностью тиофана проявлять свою антирадикальную активность за счет наличия фенольного кольца и противопероксидного действия его сульфидной группы [Сторожок Н.М. и др., 2001; Терах Е.И. и др., 2003; Soobrattee M.A. et al., 2005; Ovchinnikova L.P. et al., 2009; Menshchikova E.V. et al., 2010]. По результатам исследования ФЭА однократного использования тиофана составил 0,7, а курсового 0,79. Применение тиофана не оказывало влияния на содержание полиплоидных клеток (Рисунок 4).

Это может свидетельствовать о том, что изученный корректор не влиял на специфический микротрубочковый механизм действия паклитаксела, что может являться существенным фактом для клинической практики. Принципиально важным в экспериментальных и клинических исследованиях является хорошо контролируемое применение антиоксидантов, нормализующих уровень АФК [Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., 2007]. Так, снижение уровня АФК ниже нормального может привести к образованию клеток с измененным числом хромосом [Агапова Л.С., Копнин Б.П., 2007; Lafleur M.V., Retel J. 1993; Sakihama Y., 2002; Simic A., 2007]. В нашем исследовании установлено статистически достоверное снижение кластогенного эффекта паклитаксела после однократного и курсового применения тиофана при отсутствии влияния последнего на уровень геномной патологии, что указывает на целесообразность однократного применения исследуемого антиоксиданта.

Однократное и курсовое использование ЭШБ приводило к снижению, повышенного при введении паклитаксела, количества аберрантных клеток (Рисунок 4), что вероятно, связано с наличием в экстракте флавоноидов вогонина, вогонозида (63,3 и 8,6% соответственно от общего содержания флавонов) [Kovacs, D., Kuzovkina I.N., 2004, Woz'niak D. et al., 2004]. Предварительное применение экстракта не вызывало снижения количества полиплоидных клеток в ККМ мышей-самцов и самок, что косвенно указывает на то, что ЭШБ не изменяет механизм действия паклитаксела. Снижение же числа aberrаций, в данном случае, вероятно, связано с изменением уровня генерируемых цитостатиком АФК. Было выявлено, что значение ФЭА курсового применения ЭШБ выше, чем при его однократном введении ($0,72 > 0,48$). Так как сочетанное использование экстракта и цитостатика не индуцирует образование полиплоидных клеток в ККМ мышей, можно сделать заключение, что курсовое введение ЭШБ проявляло более выраженное антимуtagenное действие по сравнению с его однократным применением ($P < 0,05$). Известно, что ЭШБ оказывает стимулирующее действие как на гуморальный, так и на клеточный иммунный ответ [Капля О.А., и др., 2004; Дыгай А. М. и др., 2009; Midleton E., Kandaswami S., 1992]. Это, вероятно, способствует элиминации генетически измененных клеток. Так, в нашем исследовании было показано, что спустя 3 месяца после применения экстракта и инъекции цитостатика число aberrантных метафаз и полиплоидных клеток нормализовалось. Значение ФЭА ЭШБ на этом сроке наблюдения составило 0,68, что превышает значение соответствующего показателя у тиофана (0,45) и указывает на то, что кроме антиоксидантного компонента в защиту включается иммунный контроль. После введения ЭШБ полностью исчезают из ККМ мышей-самок мультиабerrантные клетки, вероятно, за счет активации системы репарации ДНК. Воздействие на эту мишень препятствует переходу первичных повреждений ДНК в видимые aberrации [Дубинин Н.П., 1977; Разин С.В., Быстрицкий А.А., 2013].

Однократное и курсовое введение корректоров тиофана и ЭШБ на фоне действия алкилирующих цитостатиков оказывало различные эффекты на генетический материал ККМ мышей. Курсовое применение тиофана с последующей инъекцией цисплатина приводило к более выраженному генопротекторному эффекту, чем при однократном введении за счет уменьшения количества одиночных фрагментов и обменных aberrаций. При однократном применении тиофана у мышей-самцов статистически значимо снижалось только

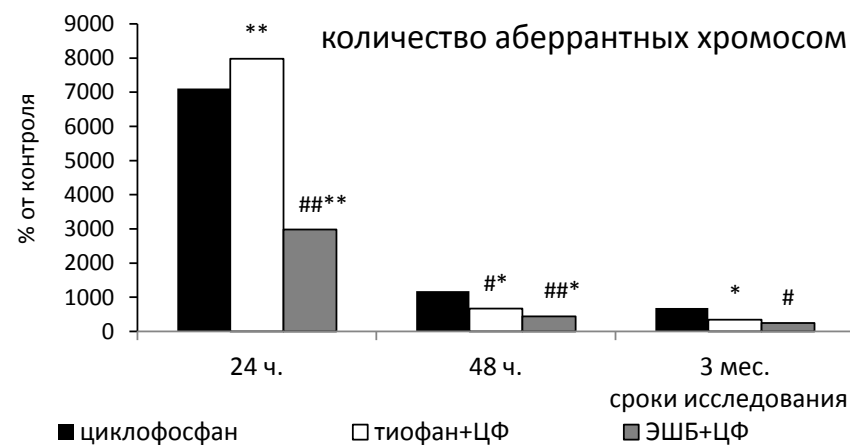
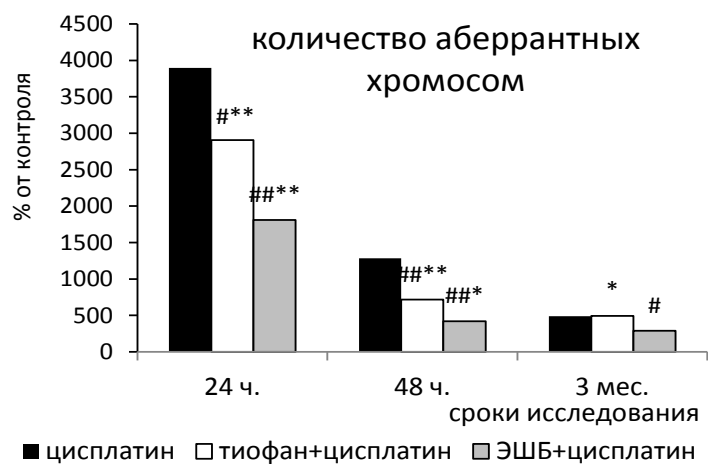
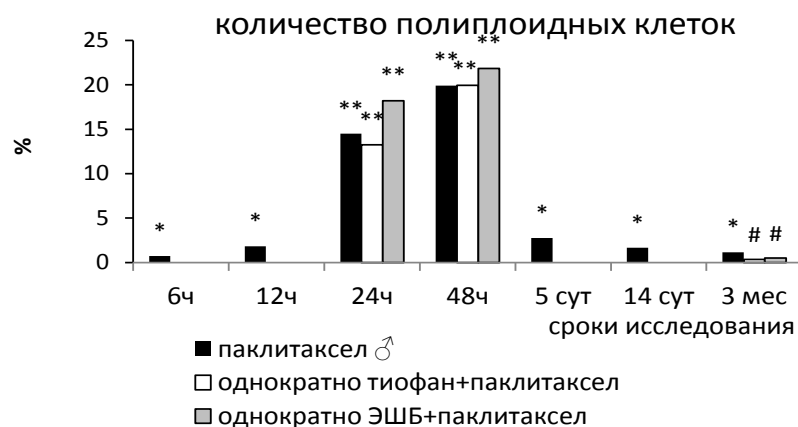
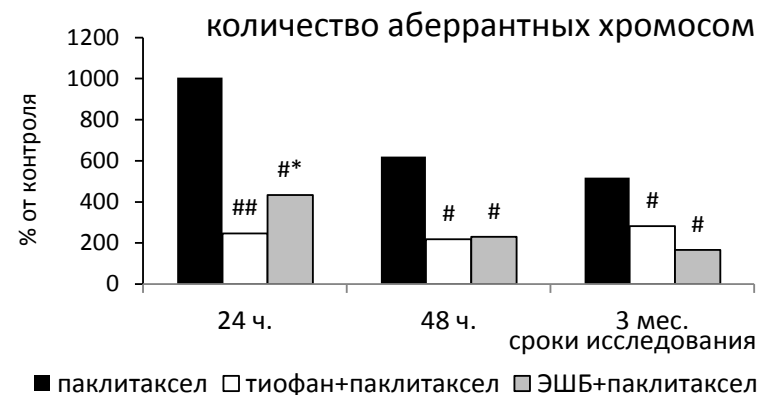


Рисунок 4 – Влияние однократного применения тиофана и ЭШБ на цитогенетическую активность паклитаксела, цисплатина и ЦФ в ККМ мышей-самцов линии СВА/СаLас. Примечание - сравнение полученных данных у животных, получавших корректоры и цитостатик с соответствующими значениями животных, получавших только цитостатик $P < 0,05$ - #; $P < 0,01$ - ##. Сравнение полученных данных с соответствующими значениями у контрольных животных $P < 0,05$ - *; $P < 0,01$ - **.

количество одиночных фрагментов ($P < 0,05$). Значение ФЭА тиофана при курсовом введении 0,38 превышало ФЭА при его однократном применении (0,2) на ранних сроках наблюдения, тем не менее его значение не приближалось к 1, что свидетельствует о его малой эффективности в условиях данного эксперимента.

Исследование тиофана на циклофосфановой модели мутагенеза в ККМ мышей протекторного действия не выявило. Более того, после его однократного применения и инъекции ЦФ через 24 ч отмечено увеличение числа aberrантных хромосом (Рисунок 4) за счет увеличения числа обменов. Из литературы известно, что тиофан является индуктором ключевых ферментов, таких как цитохром P 450-зависимых монооксигеназ печени, участвующих в метаболизме стероидных гормонов и некоторых лекарственных препаратов (CYP3A4/5, CYP1A1) [Ляхович В.В., 2000; Душкин М.И., Просенко А.Е., Кандалинцева Н.В., 2003]. В ряде случаев, стадия метаболических превращений приводит к повышению активности мутагенов с образованием активных метаболитов из промутагенов [Ревазова Ю.А., Брацлавский В.А., 1993; Умнова Н.В., 1993; Пентюк А.А., Дурнев А.Д., 1995]. Известно, что среди ферментов, трансформирующих неактивные мутагены в их генетически активные формы, активное участие принимают цитохромы P-450 (CYP3A4). Вероятно, механизм модификации эффекта непрямого мутагена ЦФ связан с индукцией микросомальных монооксигеназ тиофаном, так как антиоксидант использовался по схеме предварительного введения. Усиление генотоксичности ЦФ у мышей-самцов на фоне индукции микросомальных ферментов печени, возможно, было связано с усилением образования его активных метаболитов [Журков В.С., Сычева Л.П., 1993; Куценко С.А., 2002]. Рядом авторов теоретически обосновано и экспериментально подтверждено положение о том, что предварительная индукция ферментативных метаболизирующих систем *in vivo* приводит к ослаблению эффектов прямых мутагенов и усиливает повреждающее действие промутагенов, таких как ЦФ [Журков В.С., Сычева Л.П., 1993; Умнова Н.В. и др, 1993; Дурнев А.Д., 2001]. Поэтому в исследованиях с применением промутагенов антимуtagenное действие оказывают ингибиторы микросомальных монооксигеназ [Умнова Н.В., 1993; Пентюк А.А., Дурнев А.Д., 1995; Середенин С.Б. 2004; Иванова А.А., 2009]. Через 3 месяца после однократного применения тиофана и инъекции цисплатина или ЦФ нормализации цитогенетических показателей не выявлено (Рисунок 4). Значения ФЭА тиофана при этом составили 0,19 и 0,24, что свидетельствует о его малой генопротекторной активности в условиях данного эксперимента.

При изучении антимуtagenного действия экстракта трансформированных корней шлемника байкальского на цисплатиновой и циклофосфановой моделях мутагенеза было выявлено, что его применение вызывает значительное снижение доли поврежденных метафазных пластин и aberrантных хромосом в них. Однократное и курсовое применение ЭШБ перед инъекцией цисплатина или ЦФ способствовало тому, что клеток с нарушениями возникало в 2-2,5 раза меньше, чем в группах с модельными мутагенами (Рисунок 4). Тем не менее, курсовое применение ЭШБ на ЦФ-индуцированной модели оказывало более выраженное протекторное действие на структуру хромосом. При курсовом применении ЭШБ одиночных фрагментов в метафазах мышей выявлено в 1,5 раза меньше ($P < 0,05$), чем при однократном использовании. Реализация антимуtagenного потенциала представляется в виде событий, направленных от поверхности мембраны к индукции вторичных мессенджеров, которые через систему регуляторных

ферментов индуцируют различные механизмы антимутагенеза – репарацию ДНК, систему антиоксидантной защиты, изменение проницаемости клеточной мембраны. Основными биологическими веществами ЭШБ являются флавоноиды байкалин, байкалеин, вогонин, скутеллярин [Stojakowska A., Malarz J., 2000; Chan F.L. et al., 2000; Chi Y.S. et al., 2003; Matkowsky A., 2008]. Байкалин и байкалеин выводят свободные гидроксильные и щелочные радикалы, проявляя антиоксидантную активность [Гольдберг Е.Д. и др., 1994; Gao D., 1998; Shieh, D.E. 2000; Huang, W.-H. et al., 2006; Shang Y.Z. et al., 2006].

Установленное нами снижение числа индуцированных разрывов ДНК при применении ЭШБ с цитостатиками могло быть вызвано усилением репаративной активности в клетках [Воронова О.Л., Пашинский В.Г., 1991; Засухина Г.Д., Синельщикова Т.А., 1993]. Так, коррекция повреждений ДНК до их фиксации в мутации осуществляется эксцизионной системой репарации [Жимулев И.Ф., 2003; Инге-Вечтомов С.Г., 1989]. Исчезновение мультиаберрантных клеток в ККМ мышей также свидетельствует о нормализации в системе клеточной репарации. Известно, что ЭШБ обладает мембраностабилизирующим действием, что вероятно, влияет и на стабилизацию лизосомальных мембран [Литвиненко В.И. и др., 2007; Макаренко О.А. и др., 2010; Gao Z. et al., 1999; Andersen O.M., Markham K.R., 2005; Woo A.Y. et al., 2005; Taniguchi H. et al., 2008]. Сохранение целостности лизосом препятствует высвобождению эндомутагена – фермента ДНК-азы [Семенов В.В., Студенцова И.А., Дурнев А.Д., 1994; Bradley M.O., Victoria T.I. et al., 1987]. На цисплатиновой и ЦФ моделях мутагенеза показано, что профилактическое применение ЭШБ способствовало нормализации цитогенетических показателей и на отдаленных сроках исследования (Рисунок 4). Немаловажную роль в этом играет его способность стимулировать иммунную систему: экстракт повышает функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов и цитотоксичность лимфоидных клеток, а также количество естественных киллеров [Капля О.А. и др., 2004; Матяш М.Г., 2008; Дыгай А.М. и др., 2009; Амосова Е.Н. и др., 1991; Middleton E., 1992; Ye F. et al., 2002].

Таким образом, генопротекторное действие ЭШБ при введении с алкилирующими цитостатиками было выше по сравнению с тиофаном. Так, при введении ЭШБ и цисплатина значение ФЭА на ранних сроках наблюдения составило 0,5, а у тиофана - 0,2. Через 3 месяца значение ФЭА ЭШБ составило 0,38, а у тиофана - 0,2. На ЦФ модели мутагенеза протекторного действия у тиофана вообще не установлено.

С помощью SMART-теста были изучены рекомбинационные и мутационные события в соматических клетках личинок дрозофилы, возникающие под влиянием противоопухолевых препаратов паклитаксела, цисплатина и ЦФ. Проведена фармакологическая коррекция выявленных мутагенных эффектов с помощью тиофана и ЭШБ. Использовали две линии дрозофил с рецессивными мутантными признаками. Самок линии *yellow* (красноглазые, желтое тело, нормальные щетинки) скрещивали с самцами линии *w, sn³* (белоглазые, серое тело с опаленными щетинками). Самки первого поколения гетерозиготны и имеют генотип y^+wsn/yw^+sn^{3+} , а фенотип *wild type* (нормальный, т.е. серое тело, красные глаза и длинные щетинки). В этом случае гены *yellow* и *singed* находятся в транспозиции в X-хромосоме и вследствие гетерозиготности фенотипически не проявляются [Медведев Н.Н., 1968; Алиханян С.И. и др., 1985; Сидоров П.В. и др., 2008; Ashburner M., 1989; Xu T., Rubin G.M., 1993].

При структурных нарушениях в хромосоме они приходят в гомозиготное состояние, что приводит к фенотипическому изменению формы и цвета щетинок. В зависимости от места разрыва появляются пятна разных типов.

У самок первого поколения, развивавшихся в питательной среде с добавлением паклитаксела, было отмечено появление одиночных пятен фенотипа yellow и singed в 9,4 раза превышающее число подобных пятен у самок в контроле (значение χ^2 -квадрата с поправкой Йейтса при этом составило 34,5) (Рисунок 5). Известно, что ген «у» расположен дальше от центромерного района, чем «sn», а вероятность кроссинговера максимальна в теломерных участках, поэтому гомозиготизация по «у» происходит чаще, чем по обоим генам, или по гену «sn» [Медведев Н.Н., 1968; Инге-Вечтомов С.Г., 1989; Жимулев И.Ф., 2003; Захаренко Л.П., Перепелкина М.П., Захаров И.К., 2008; Lindsley D.J., Zimm G.G., 1992]. Это было продемонстрировано в нашем исследовании - пятен «usn» не было зафиксировано вообще, пятен «у» больше, чем «sn». В сериях эксперимента, где кроме паклитаксела в питательную среду были добавлены тиофан или ЭШБ отмечено статистически достоверное снижение количества самок с мозаичными пятнами (Рисунок 5). Выявленный эффект можно объяснить снижением интенсивности обменов гомологами хромосом, что, в свою очередь, зависит от уменьшения частоты разрывов генетических структур. Использование тиофана и ЭШБ способствовало сохранению целостности хромосом и, соответственно, снижало вероятность обмена их фрагментами. Об этом свидетельствовало значительное в 1,6 и 1,83 раза, соответственно, уменьшение количества рекомбинантов у особей, получивших корректоры по сравнению с самками *Dr. melanogaster*, которым в корм был добавлен один цитостатик. Значение χ^2 -квадрата превышало критическое табличное значение 3,84 для 5% уровня значимости ($\chi^2=4,78$ для тиофана, $\chi^2=4,98$ для ЭШБ). Мозаичные особи обладали одиночными мутантными пятнами «у» и «sn». Особей с двойными пятнами не было зафиксировано. В экспериментальных группах с корректорами количество рекомбинантных самок было меньше, чем в группе с одним цитостатиком, но превышало число подобных особей в контроле.

Влияние цисплатина было изучено в двух концентрациях - 0,009% и 0,0015%. Концентрация 0,009% соответствовала дозе 6 мг/кг – применимой для млекопитающих (мышей), а концентрация 0,0015% - дозе 1 мг/кг и была оптимальной для проявления эффектов у *Dr. melanogaster*. При внесении в питательную среду препарат в обеих концентрациях индуцировал образование мутантных пятен у самок *Dr. melanogaster*, общее количество которых в 16 и 8,2 раза превосходило уровень спонтанного мутагенеза, при этом значение χ^2 составило 67,83 и 26,28 соответственно (при $P<0,0001$). Кроме одиночных пятен «у» и «sn» были обнаружены двойные пятна «usn». Преобладание особей с пятнами «sn» указывает на то, что участок хромосомы, приближенный к центромере, активно подвергался воздействию препарата, его метаболитов и продуктов ПОЛ. Цисплатин индуцировал разрывы хромосом, что способствовало интенсивному обмену этими участками при кроссинговере [Katz A.J., 1987]. Выраженность генопротекторных эффектов при применении тиофана и ЭШБ зависела от концентрации цитостатика (Рисунок 5). Так, добавление тиофана в концентрации 0,056% в серии экспериментов, где цисплатин применялся в концентрации 0,009%, способствовало значительному снижению числа рекомбинантов (в 1,4 раза) по сравнению с дрозофилами, получавшими только цитостатик, значение χ^2 при этом

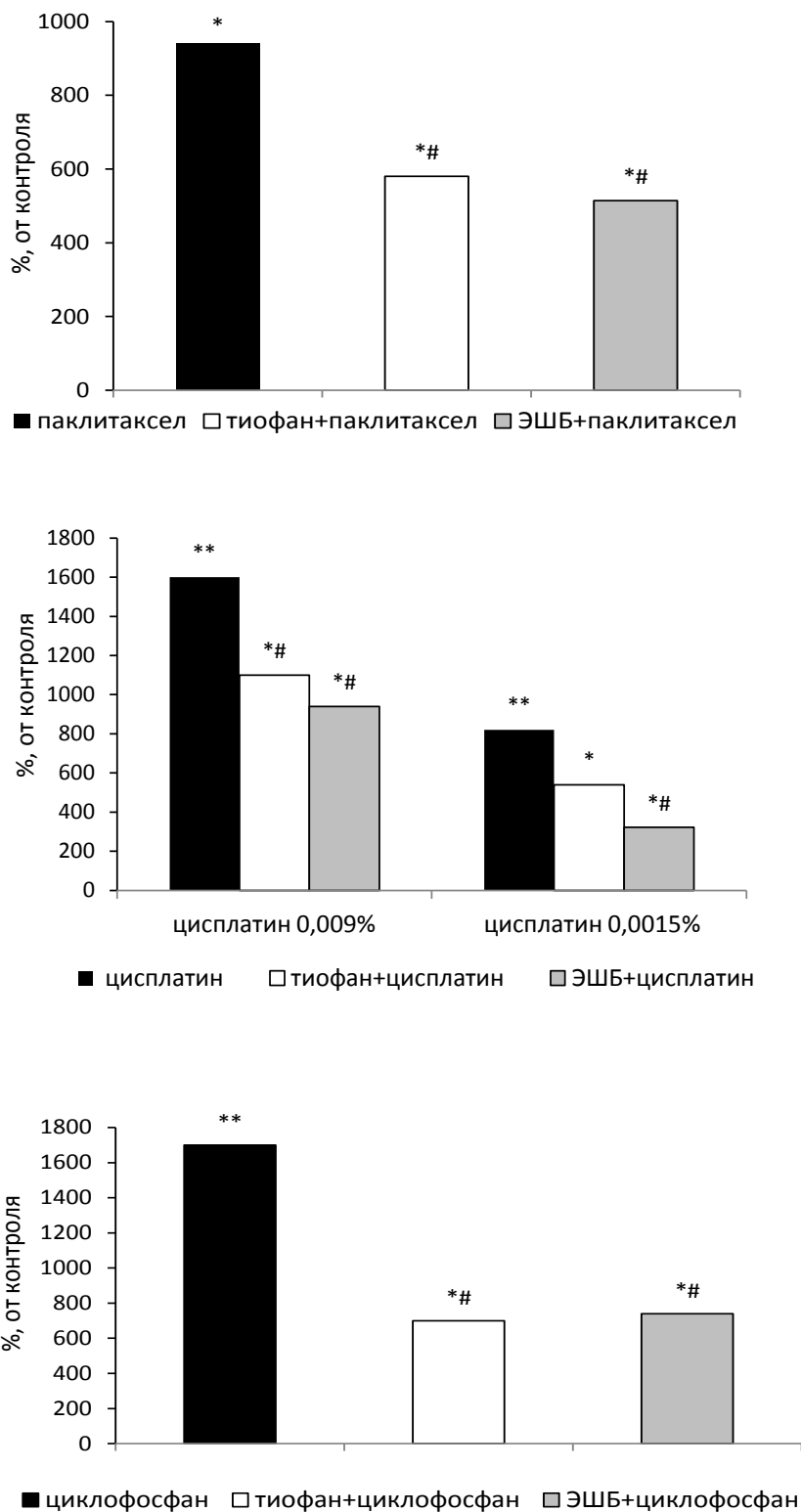


Рисунок 5 - Количество рекомбинантных особей *Dr. melanogaster* в SMART-тесте

Примечание - *, ** - значимость различий при сравнении групп, получавших цитостатик и цитостатик с корректорами, с группой контроля, при $P < 0,05$ и $P < 0,01$ соответственно; #, ## значимость различий при сравнении групп, получавших цитостатик и корректоры с группой цитостатика, при $P < 0,05$ и $P < 0,01$ соответственно.

составило 5,02 ($>3,84$) относительно группы цитостатика. Цисплатин в концентрации 0,0015% индуцировал меньшее количество нарушений, что выражалось в появлении меньшего количества особей с фенотипическим проявлением рецессивных мутантных признаков. Добавление тиофана в этом случае также сопровождалось снижением числа рекомбинантов, но значение χ^2 при этом соответствовало 2,2 ($<3,84$), что не достигало 5% уровня значимости.

Применение ЭШБ оказывало выраженный генопротекторный эффект на фоне повреждающего действия цисплатина, вводимого в обеих концентрациях в корм личинок. Добавление ЭШБ в концентрации 0,08% способствовало тому, что количество рекомбинантных самок снизилось в 1,7 раза по сравнению с этим показателем в группе 0,009% цисплатина ($\chi^2=6,68$). В серии эксперимента, где цисплатин вводили в концентрации 0,0015%, самок с нарушениями гено- и фенотипа возникло в 2,5 раза меньше, чем у дрозофил, получавших только цитостатик, при этом χ^2 составил 10,78. В этой экспериментальной группе не было зафиксировано мозаичных самок с двойными пятнами «*ysn*». Несмотря на протекторный эффект, зафиксированное количество рекомбинантов в несколько раз превышало контрольные значения.

Применение ЦФ также во много раз повышало частоту соматического мозаицизма у дрозофил, что соответственно, и способствовало формированию рекомбинантов. Обращает на себя внимание тот факт, что данный препарат эффективен в индукции малых одиночных пятен «*sn³*» и «*y*» при отсутствии увеличения частот двойных пятен «*ysn*». Известно, что размеры пятен зависят от стадии развития, на которой произошла рекомбинация; чем раньше произошло это событие, тем больше будут размеры пятен (клонов) [Ратнер В.А. и др., 1987; Серов О.Л., 1998; Шварцман П.Я., 1999; Савина Н.В. и др., 2009; Fullilove L.S., 1978]. Наличие мозаичных особей, несущих малые одиночные пятна, в нашем исследовании свидетельствует о том, что рекомбинация произошла на более поздних сроках развития. В связи с тем, что индивидуальное развитие организма сопровождается изменениями в активности многих ферментативных систем, имеются основания полагать, что система, осуществляющая метаболизм таких ксенобиотиков, как ЦФ, у дрозофил имеет более поздние сроки созревания [Ратнер В.А., 1987; Рарог М.А. и др. 1998; Корочкин Л.И., 1977, 2000]. Это согласуется с отсроченным возникновением реактивных метаболитов ЦФ, вызывающих нарушения целостности структуры хромосом и, соответственно, формированием мозаичных особей, несущих малые одиночные пятна.

Таким образом, применение ЦФ в качестве мутагенного фактора индуцировало образование мозаичных особей в 17 раз больше, чем в контроле ($\chi^2=73,03$). Добавление антиоксиданта тиофана и ЦФ в питательную среду в - 2,45 раза снижало количество рекомбинантных самок, при этом значение χ^2 составило 26,68 (Рисунок 5). Снижение количества мозаичных особей в данном случае может быть связано с возникновением мутаций, которые являются «запирателями» кроссинговера, что, вероятно, и вызвало эффект уменьшения количества мозаиков. Возникновение подобных нарушений препятствует взаимодействию хромосом и обмену гомологичными участками между ними [Инге-Вечтомов С.Г., 1989; Жимулев И.Ф., 2003; Golic K.G., 1991].

Применение экстракта шлемника байкальского приводило к выраженным генопротекторным эффектам. Рекомбинантных особей возникло в 2,3 раза меньше, чем в группе ЦФ ($\chi^2=17,45$) (Рисунок 5). Самок с двойными пятнами «*ysn*»

зафиксировано не было, что указывает на защитный эффект с самых ранних стадий развития. Среди одиночных пятен преобладали пятна «у».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя результаты проведенного исследования, можно сделать заключение о том, что в основе мутагенеза, индуцированного различными противоопухолевыми препаратами, лежат как общие, так и специфические механизмы. Соответственно, наблюдаемые мутагенные эффекты отличались качественным проявлением (геномные, структурные аномалии) и количественным содержанием.

Применение тиофана и ЭШБ в качестве генопротекторов на фоне воздействия трех различных моделей мутагенеза по-разному оказывало свое защитное действие. Введение тиофана оказывало более выраженное генопротекторное действие на паклитаксел-индуцированной модели мутагенеза на ранних сроках наблюдения. На отдаленных сроках наблюдения было выявлено, что значение ФЭА ЭШБ превышало значение соответствующего показателя у тиофана, что предполагает наличие у экстракта шлемника нескольких защитных механизмов, которые реализуются в ряде клеточных поколений. Изучаемые корректоры не оказывали влияния на количество полиплоидных клеток, индуцируемых паклитакселом. Это косвенно указывает на то, что тиофан и ЭШБ не влияют на его механизм действия, а снижают побочное кластогенное действие на структуру хромосом, что может оказаться существенным фактом для клинической практики. Использование тиофана оказывало слабый генопротекторный эффект на цисплатиновой модели мутагенеза, на что указывают низкие значения ФЭА даже через 3 месяца наблюдения. Применение тиофана для защиты структур наследственности на ЦФ-модели мутагенеза не оказало протекторного действия. Его предварительное введение индуцировало образование активных метаболитов ЦФ, что выражалось в значительном количестве поврежденных хромосом в ККМ. Применение ЭШБ приводило к выраженным генопротекторным эффектам на моделях цисплатин- и ЦФ- индуцированного мутагенеза на ранних и отдаленных сроках исследования.

Добавление препаратов паклитаксела, цисплатина и ЦФ в питательную среду личинок дрозофилы индуцировало у них соматическую рекомбинацию. Добавление тиофана или ЭШБ значительно снижало количество разрывов хромосом и интенсивность обмена их участками, что выражалось в возникновении меньшего количества особей с мозаичными мутантными пятнами. Установленное снижение количества рекомбинантов при применении тиофана на модели мутагенеза с использованием ЦФ и отсутствие защитного эффекта в цитогенетическом тесте на ККМ мышей, вероятно, связано с мутациями «запирателями» кроссинговера, либо с отсроченным появлением активных метаболитов ЦФ. Неоднозначность результатов еще раз подчеркивает важность исследований на млекопитающих.

Таким образом, для успешного профилактического использования антимутагенов необходимо длительное всестороннее изучение их в эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. Паклитаксел в максимально переносимой дозе 40 мг/кг при однократном внутривнутрибрюшинном введении вызывает в клетках костного мозга самцов и самок мышей образование структурных aberrаций хромосом и полиплоидию (геномные нарушения). Максимальное количество структурных повреждений выявлено через 24 ч, а геномных через 48 ч после инъекции цитостатика. Паклитаксел индуцирует в костном мозге мышей-самок большее количество структурных aberrаций, чем у мышей-самцов (24 ч). На отдаленных сроках наблюдения (3 мес) уровень цитогенетических нарушений у мышей-самцов превышает контрольные показатели.

2. В отдаленные сроки (3 мес) после однократного внутривнутрибрюшинного введения препаратов прямого повреждения ДНК - цисплатина и препарата с промутагенным действием - циклофосфана количество aberrаций хромосом в метафазах костного мозга мышей значительно превышает контрольные значения.

3. В SMART-тесте на *Dr. melanogaster* с применением маркерных мутаций «yellow» и «singed» выявлено, что цисплатин повышает частоту соматического мозаицизма и рекомбинации на самых ранних этапах развития личинок и индуцирует появление обширных двойных - «usp» мутантных пятен, а также пятен «sn³». Паклитаксел и циклофосфан индуцируют рекомбинацию на более поздних сроках развития особей, что фенотипически проявляется в появлении малых одиночных пятен, преимущественно «yellow».

4. Тиофан в дозах 150 мг/кг при однократном введении и 30 мг/кг при курсовом пероральном применении значительно снижает уровень паклитаксел-индуцированных структурных повреждений, не оказывая влияния на анеугенные эффекты паклитаксела в ранние сроки наблюдения, и нормализует все цитогенетические показатели на отдаленных сроках исследования.

5. Экстракт трансформированных корней шлемника байкальского в дозе 200 мг/кг при однократном пероральном введении снизит количество паклитаксел-индуцированных aberrаций на ранних сроках исследования и нормализует их на отдаленных сроках. При курсовом применении в дозе 40 мг/кг шлемник байкальский нормализует цитогенетические показатели клеток костного мозга у мышей-самцов линии СВА/СаЛас уже на ранних сроках наблюдения. Геномные нарушения на отдаленных сроках наблюдения не выявлены.

6. Применение тиофана и экстракта трансформированных корней шлемника байкальского снижает кластогенное действие цисплатина на структуры наследственности клеток костного мозга самцов и самок-мышей. Экстракт шлемника байкальского обладает более выраженным протекторным действием на генетические структуры, чем тиофан, и приводит к нормализации значений цитогенетических показателей на отдаленных сроках наблюдения (3 месяца).

7. В условиях циклофосфан-индуцированной модели мутагенеза (промутагенной) тиофан при однократном и курсовом пероральном введении не проявляет антигенотоксической активности. Экстракт шлемника байкальского значительно снижает кластогенное действие циклофосфана на всех сроках наблюдения в группах самцов и самок мышей. Применение экстракта шлемника байкальского также нормализует цитогенетические показатели в метафазах костного мозга в отдаленные сроки исследования.

8. Применение тиофана и экстракта культуры корней шлемника байкальского значительно снижает частоту соматического мозаицизма, индуцируемого паклитакселом, цисплатином и циклофосфаном у *Drosophila melanogaster*. Экстракт шлемника байкальского предупреждает появление цисплатин-индуцированных двойных пятен в отличие от тиофана.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Федорова, Е.П. Особенности гематотоксического действия паклитаксела (митотакса) / Федорова Е.П., **Колотова О.В.**, Чурин А.А. // VIII конгресс молодых ученых «Науки о человеке»: Томск, 17-18 мая 2007 г., С. 205-206.
2. **Колотова, О.В.** Некоторые мутагенные свойства паклитаксела (митотакса) / О.В. Колотова, Е.П. Федорова // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии.- Томск, 2007. - С. 40-42.
3. Чурин, А.А. К механизму гематотоксического действия паклитаксела (митотакса) / А.А. Чурин, Е.П. Федорова, **О.В. Колотова** // Материалы конф. «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии».- Томск, 27 апреля 2007, С. 120-122.
4. **Колотова, О.В.** Возможность коррекции токсических эффектов паклитаксела / О.В. Колотова, Е.П. Федорова, Л.А. Ермолаева, А.А. Чурин и др. // Сибирский онкологический журнал. Приложение №1 Материалы конф. «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». - Томск, 29 апреля. – 2008. - С. 66-68.
5. Карпова, Г.В. Фармакологическая коррекция общетоксического действия паклитаксела / Г.В. Карпова, А.А. Чурин, Л.А. Ермолаева, Т.И. Фомина, Т.В. Ветошкина, О.Л. Воронова, Т.Ю. Дубская, **О.В. Колотова**, Е.П. Федорова // Материалы конференции «Проблемы онкофармакологии» - Томск, 2008. - С. 44-48.
6. Чурин, А.А. Реакции костномозгового кроветворения на токсическое воздействие паклитаксела / А.А. Чурин, В.Е. Гольдберг, Г.В. Карпова, О.Л. Воронова, Е.П. Федорова, **О.В. Колотова**, Е.Г. Скурихин, О.В. Першина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 2. - С. 173-177.
7. Suslov, N.I. Pharmacological properties of *Scutellariae baicalensis* Georg. extract, received from hairy root cultures / N.I. Suslov, A.A. Churin, E.P. Fedorova, O.L. Voronova, **O.V. Kolotova**, I.N. Kuzovkina, A.V. Gusseva // «German-Russian Forum Biotechnology GRFB'09» Novosibirsk, June 15th – 19th, 2009. - P. 49.
8. **Колотова, О.В.** Токсические эффекты паклитаксела и пути их снижения / О.В. Колотова, Е. П. Федорова, Л. А. Ермолаева // Сибирский онкологический журнал. Приложение №1 Материалы конф. «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии».- Томск, 24 апреля. – 2009. - С. 100-101.
9. Воронова, О.Л. Фармакологическая коррекция цитогенетических эффектов цисплатина / О.Л. Воронова, **О.В. Неупокоева**, Е.П. Федорова и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2010. - Т.73, №10. - С. 37–39.
10. **Неупокоева, О.В.** Влияние экстракта шлемника байкальского на цитогенетические эффекты противоопухолевых препаратов / О.В. Неупокоева, Е.П. Федорова, Л.А. Ермолаева // Актуальные проблемы экспериментальной и

клинической фармакологии: материалы конф. молодых ученых. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. – С. 31-33.

11. Федорова, Е.П. Влияние противоопухолевых препаратов растительного происхождения на систему крови / Е.П. Федорова, Л.А. Ермолаева, **О.В. Неупокоева** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: материалы конф. молодых ученых. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. – С. 46-48.

12. **Неупокоева, О.В.** Антимутагенная активность *in vivo* тиофана и экстракта корней биотехнологического шлемника байкальского / О.В. Неупокоева, Л.А. Ермолаева, Е.П. Федорова // Первая всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых. Проблемы разработки новых лекарственных средств: сб. тезисов. – М., 2013. – С. 82.

13. Ермолаева, Л.А. Токсическое действие противоопухолевых препаратов на систему крови и морфофункциональное состояние печени / Л.А. Ермолаева, Е.П. Федорова, **О.В. Неупокоева** // Первая всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых. Проблемы разработки новых лекарственных средств: сб. тезисов. – М., 2013. – С. 28.

14. **Неупокоева, О.В.** Коррекция цитогенетических эффектов паклитаксела и цисплатина экстрактом корней шлемника байкальского / О.В. Неупокоева, О.Л. Воронова, А.А. Чурин и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, №12. – С. 24-27.

15. **Неупокоева, О.В.** Мутаген-модифицирующее действие экстракта биотехнологически выращенных корней шлемника байкальского / О.В. Неупокоева, О.Л. Воронова, Л.А. Ермолаева, Е.П. Федорова // Биология – наука XXI века: 18-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.): сб. тезисов. – г. Пушино, 2014. – С. 72.

16. Ермолаева, Л.А. Фармакологическая коррекция токсического гепатита вызванного введением противоопухолевых препаратов растительного происхождения паклитаксела и этопозида с помощью средств с антиоксидантной активностью / Л.А. Ермолаева, Е.П. Федорова, **О.В. Неупокоева**, Т.И. Фомина // Биология – наука XXI века: 18-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.): сб. тезисов. – г. Пушино, 2014. – С. 66.

17. Федорова, Е.П. Миелотоксичность противоопухолевых препаратов растительного происхождения, ее фармакологическая коррекция экстрактом шлемника байкальского / Е.П. Федорова, Л.А. Ермолаева, **О.В. Неупокоева**, А.А. Чурин // Биология – наука XXI века: 18-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.): сб. тезисов. – г. Пушино, 2014. – С. 75.

18. **Неупокоева, О.В.** Изучение мутагенных свойств $\alpha(1,2)$ -I-рамно- $\alpha(1,4)$ -d-галактопиранозилуронана *Asogus calamus* L. / О.В. Неупокоева, К.А. Лопатина, О.Л. Воронова и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. - №2. – С. 24-25.

19. **Неупокоева, О.В.** Влияние экстракта трансформированных корней шлемника байкальского на паклитаксел- индуцированную гено- и гематотоксичность / О.В. Неупокоева, Е.П. Федорова, М.В. Филонова, Л.А. Ермолаева, А.А. Чурин // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых

ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва (г. Томск, 25-29 мая 2015 г.) / Томский политехнический университет. В 2 томах. Том 1. - Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. — С. 308.

20. **Неупокоева, О.В.** Изучение мутагенных свойств $\alpha(1,2)$ -1-рамно- $\alpha(1,4)$ -d-галактопиранозилуронана *Asogus calamus* L. / О.В. Неупокоева, К.А. Лопатина, О.Л. Воронова, Е.А. Сафонова, Е.П. Зуева, А.А. Чурин // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. Т. 60, № 2. – С. 22-23.

Патент на изобретение

Патент (RU) № 2438691 от 10 января 2012 г. «Средство, обладающее гемостимулирующим, антимуtagenным, противоопухолевым, церебропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, анксиолитическим, противоневротическим действием» / Дыгай А.М., Суслов Н.И., Зюзьков Г.Н., Кузовкина И.Н., Жданов В.В., Удут Е.В., Гусева А.В., Вдовитченко М. Ю., Шилова И.В., Смирнов В.Ю., Чурин А.А., Воронова О.Л., Симанина Е.В., Неупокоева О.В., Федорова Е.П.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
 ККМ – клетки костного мозга
 МДА – малоновый диальдегид
 МПД – максимально переносимая доза
 МТ – микротрубочки
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 ФЭА – фактор эффективности антимуtagена
 ЦФ – циклофосфан
 ЭШБ – экстракт шлемника байкальского