

Б. С. Кибрик<sup>1</sup>, И. М. Прохорова<sup>2</sup>, Д. С. Песня<sup>3</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОЙ И МИТОЗМОДИФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ТУБОСАНА

<sup>1</sup> Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль, Россия;

<sup>2</sup> Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

<sup>3</sup> Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл., Россия

С целью сравнительной оценки мутагенного и митозмодифицирующего действия проведено исследование одного из основных противотуберкулезных препаратов изониазида и иммуномодулирующего препарата тубосана. В качестве метода исследования был выбран Allium test. Учитывалась частота хромосомных aberrаций, отстаиваний хромосом и микроядер. Определялись митотический и фазные индексы. Установлено, что изониазид в концентрациях 10, 60 и 120 мг/л полностью останавливает митотическую активность тканей, при которой митотический индекс соответствует нулю. Следовательно, изониазид обладает очень сильной митотоксической активностью. Микроядерный тест позволил зарегистрировать мутагенную активность изониазида, которая возрастала с увеличением концентрации. Микроядра, индуцированные изониазидом, образовывались как результат почкующихся ядер “nuclear budding” в интерфазу. При концентрации 300 мг/л изониазид приводит к гибели тест-объекта. Тубосан при концентрации от 60, 120, 800 и 1200 мг/л не проявил мутагенной и митозмодифицирующей активности. Фазные индексы также соответствуют таковым в контрольном варианте. Таким образом, тубосан не обладает генотоксической активностью и является генетически безопасным в исследованных концентрациях.

**Ключевые слова:** тубосан, изониазид, митотический индекс, хромосомные aberrации, микроядра, Allium test.

При множественной и широкой лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) тубосан в диапазоне концентраций 60 – 80 мкг/мл оказывает противотуберкулезное действие в 100 % случаев, из них в 71 % случаев проявляет бактериостатическую активность и в 29 % случаев бактерицидное действие [1, 2].

Генетическая активность тубосана, который является химическим производным изониазида, не изучена. Наиболее опасным из негативных последствий является генотоксическое действие [3, 4], которое может сохраняться в популяции, передаваясь от поколения к поколению [5].

Мутагенное действие стандартного противотуберкулезного препарата изониазида хорошо изучено. Так, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлено мутагенное и канцерогенное действие изониазида [6, 7]. В экспериментах на мышах установлено, что инъекции изониазида вызывают рак легких [7]. В клинических испытаниях обнаружена повышенная частота хромосомных мутаций у людей, которым вводился изониазид [6]. Однако действие изониазида на митотические процессы не исследовано.

Предлагаемое исследование направлено на выявление генотоксических показателей: мутагенного эффекта и митозмодифицирующей активности тубосана и изониазида.

Цель данного исследования — изучение генотоксической активности препаратов изониазида и тубосана. В нашу задачу входило исследование мутагенной и митозмодифицирующей активности изониазида в концентрациях 10, 60, 120 и 300 мг/л и исследование му-

тагенной и митозмодифицирующей активности тубосана в концентрациях 60, 120, 800 и 1200 мг/л.

### Экспериментальная часть

Материалом исследования служили стандартный противотуберкулезный препарат “Изониазид” (10 %, 5 мл, Мосхимфармпрепараты им. Семашко); Тубосан — метилдиоксотетрагидропиримидин сульфониноиноил гидразид — внесен в Государственный реестр лекарственных средств под № ЛСР-006593/08-140808. Относится к классу иммуностимуляторов других АТХ: L03 AX иммуностимуляторы другие [8]. Исходный маточный раствор препарата изониазида последовательно разводили дистиллированной водой до получения концентрации 10, 60, 120 и 300 мг/л. Порошок тубосана растворяли в дистиллированной воде и последовательным разведением получали концентрации 60, 120, 800 и 1200 мг/л.

В качестве метода исследования генетической активности изониазида и тубосана использовался Allium test. Тест позволяет регистрировать различные типы хромосомных мутаций, индуцируемые как прямыми мутагенами, так и промутагенами, приобретающими генетическую активность только после метаболической активации в растительном организме [3]. Allium test рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт в доклинических исследованиях лекарственных препаратов [9, 10], поскольку результаты, полученные в данном тесте соответствуют результатам, полученным в тестах в культурах клеток человека и животных [9 – 11]. В настоящее время метод рассматривается как альтернатива тестам на животных [12, 13].

Таблица 1

Воздействие изониазида и тубосана на меристему *A. Сера*

Концентрация, мг/л	ХА + отс., %	МЯ, %	ВМА, балл	Уровень МА
Контроль	0,8 ± 0,10	0,02 ± 0,008		
<b>Раствор изониазида</b>				
10	нет митозов	0,08 ± 0,011*	4	слабый
60	нет митозов	0,09 ± 0,027*	4,5	слабый
120	нет митозов	0,14 ± 0,029*	7	средний
300		Гибель тест-объекта		
<b>Раствор тубосана</b>				
60	0,8 ± 0,22	0,03 ± 0,015	1	отсутствует
120	0,9 ± 0,18	0,03 ± 0,018	1	отсутствует
800	1,1 ± 0,85	0,04 ± 0,011	2	отсутствует
1200	1,6 ± 0,64	0,05 ± 0,023	2	отсутствует

\* — различие статистически достоверно при  $p < 0,05$ 

**Мутагенную активность** препаратов определяли с использованием модификации ана-телофазного анализа хромосомных aberrаций (ХА) и отставаний (отс.) хромосом (ХА + отс., %) и микроядерного теста для изучения частоты микроядер (МЯ, %). Одновременное использование 2 тестов на одном препарате позволило анализировать всю совокупность делящихся и неделящихся клеток, что повышает разрешающую способность метода и даёт более достоверные результаты [3].

Степень мутагенного эффекта оценивали по ВМЭ (выраженности мутагенного эффекта) [3, 4]. ВМЭ определялась как кратность превышения процента индуцированных мутаций над контрольным значением (спонтанным уровнем) и выражалась в баллах. Баллы ВМЭ ранжировали по уровням мутагенного эффекта и классифицировали как сильный, средний, слабый или отсутствие [3].

**Митозмодифицирующую активность** изониазида и тубосана оценивали также в *Allium test*. Митозмодифицирующее действие препаратов оценивалось по изменению митотического индекса (МИ) и фазных индексов (ПИ — профазный; МИ — метафазный; АИ — анафазный; ТИ — телофазный). Определение МИ позволило оценить пролиферативную активность ткани. Анализ фазных индексов позволил судить о типах нарушения митоза. Митозмодифицирующее действие

относят к генотоксическим явлениям, поскольку нарушение деления клеток может влиять на выход мутаций [4]. Подсчитывали общее количество делящихся клеток и отдельно клетки на разных стадиях митоза.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-test и ANOVA при уровне значимости  $p = 0,05$  (\*) в программе Statistica 8.0.

**Постановка опыта** проводилась по стандартной методике [3, 4, 11]. Всего было приготовлено 90 микропрепаратов (по 10 на вариант опыта). На каждом препарате было проанализировано 700 клеток для определения митотического и фазных индексов, 3000 интерфаз для микроядерного теста и все анафазы и телофазы на препарате для определения частоты хромосомных aberrаций и отставаний.

## Результаты и их обсуждение

**Мутагенная и митозмодифицирующая активность изониазида в концентрациях 10, 60, 120 и 300 мг/л**

Для исследования мутагенного и митозмодифицирующего эффекта изониазида воздействовали раствором изониазида в дистиллированной воде в концентрации 10, 60, 120 и 300 мг/л на корневые меристемы *A. сера*. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. При концентрации 300 мг/л изониазид вызвал гибель тест-объекта. Поскольку митотическая активность ткани после воздействия изониазида стала нулевой, и делящиеся клетки полностью отсутствовали, то невозможно было использовать ана-телофазный анализ для оценки частоты хромосомных aberrаций и отставаний хромосом. Изониазид в концентрациях 10, 60 и 120 мг/л индуцировал повышение частоты микроядер в интерфазных клетках, которая достоверно превышает контрольный уровень. Микроядра в данном случае образовывались как следствие почкования ядер "nuclear budding". Данное явление связывают с возникновением блока митотических процессов, невозможностью митоза и нарушением белкового синтеза, что приводит к деструкции интерфазного хроматина и апоптозу [14]. Следовательно, изониазид в концентрации 10, 60 и 120 мг/л проявляет мутагенную активность в данной тест-системе (при концентрации 300 мг/л вызывает гибель тест-объекта). Уровень мутагенного эффекта классифицируется как средний.

Таблица 2

## Значение митотического и фазных индексов при воздействии изониазида и тубосана

Концентрация, мг/л	МИ, %	ПИ, %	МИ, %	АИ, %	ТИ, %
Контроль	8,8 ± 0,12	55,7 ± 3,34	22,5 ± 1,31	10,4 ± 1,12	15,3 ± 1,33
<b>Раствор изониазида</b>					
10	Митозы отсутствуют. Митотическая активность ткани нулевая				
60					
120					
300	Гибель тест-объекта				
<b>Раствор тубосана</b>					
60	9,2 ± 0,55	55,6 ± 0,33	25,9 ± 0,96	12,4 ± 1,35	18,5 ± 1,10
120	8,9 ± 0,31	54,8 ± 1,06	22,5 ± 1,80	14,3 ± 0,37	11,4 ± 1,23
800	8,4 ± 0,78	53,3 ± 0,99	21,4 ± 0,32	12,9 ± 0,61	13,7 ± 2,40
1200	8,1 ± 0,43	52,8 ± 2,40	24,1 ± 0,53	15,8 ± 1,77	12,1 ± 0,59

Как видно из табл. 2, изониазид приводит к статистически значимому уменьшению митотического индекса до нуля (0 %) по сравнению с контрольным уровнем ( $8,8 \pm 0,12$  %). Митозы не обнаружены. Следовательно, изониазид в концентрации 10, 60 и 120 мг/л обладает очень сильной митотоксической активностью.

#### **Мутагенная и митозмодифицирующая активность тубосана в концентрациях 60, 120, 800 и 1200 мг/л**

Для исследования генотоксических эффектов тубосана нами использовались растворы тубосана с концентрациями 60, 120, 800 и 1200 мг/л. Минимальная концентрация 60 мг/л выбрана, поскольку при ней начинает проявляться бактерицидная активность тубосана в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [2, 3]. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, выход хромосомных aberrаций и отставаний хромосом не отличается достоверно от контрольного уровня при всех исследованных концентрациях тубосана. Частота микроядер при данных вариантах также статистически значимо не отличается от контрольного уровня. Следовательно, данные дозы тубосана не обладают генотоксическим действием.

Значения митотического и фазных индексов при воздействии тубосана в различных концентрациях представлены в табл. 2.

Как показано в табл. 2, тубосан при всех исследованных концентрациях не вызывает достоверного уменьшения митотического индекса по сравнению с контрольным уровнем.

Анализ фазных индексов показал, что количество клеток, входящих в профазу (ПИ, %) митоза, изменяется не достоверно при всех исследованных концентрациях. Следовательно, можно предположить, что тубосан при всех исследованных концентрациях не угнетает процессы подготовки клетки к делению. В дальнейшем ходе митоза соотношение фазных индексов в целом соответствуют таковому в контрольном варианте. Следовательно, в Allium test воздействие тубосана в концентрациях от 60, 120, 800 и 1200 мг/л не влияет на прохождение клетками митоза.

При исследовании различных веществ, в том числе и лекарственных химических веществ, результаты полученные в Allium test, качественно соответствуют и коррелируют количественно с результатами тестов в культурах клеток человека [7]. Это связано с тем, что структура и функции (хранение, реализация и передача наследственной информации) генного аппарата одинаковы у всех эукариот. Поэтому результаты, полученные в данном исследовании, позволяют предполагать, что тубосан в изученных дозах не представляет опасности для клеток человека.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Б. С. Кибрик, О. Г. Челнокова, *Иммунохимиотерапия туберкулеза. Бифункциональный препарат тубосан*, Москва (2011), с. 154.
2. Б. С. Кибрик, О. Г. Челнокова, Р. В. Майстат, *Противотуберкулезное и иммуномодулирующее действие тубосана в эксперименте и клинической практике. Материалы сессии ЦНИИТ РАМН*, Москва (2011), сс. 93 – 95.
3. Д. С. Песня, А. В. Романовский, И. М. Прохорова, Т. К. Артёмова и др., *Биомед. радиозлектроника*, № 4, 34 – 45 (2011).
4. И. М. Прохорова, А. Н. Фомичёва, М. И. Ковалёва, О. В. Бабаназарова, *Биология внутренних вод*, № 2, 17 – 23 (2008).
5. В. А. Тарасов, *Мутагены и канцерогены в окружающей среде. Новые подходы к оценке риска для здоровья*, Санкт-Петербург (1998), сс. 15 – 30.
6. V. V. N. Gopal Rao, E. V. Venkatarama Gupta, I. M. Thomas, *Mut. Res.*, **259**, 13 – 19 (1991).
7. H. Takasawa, H. Suzuki, I. Ogawa, Y. Shimada, *Mut. Res.*, **698**, 30 – 37 (2010).
8. Патент РФ 2141322 (1999).
9. S. Cotelle, J. F. Masfarau, J. F. Féraud, *Mutat. Res.*, **426**(2), 167 – 171 (1990).
10. A. Majewska, E. Sliwinska, M. Wierzbicka, M. Kuras, *Caryologia*, **61**(1), 26 – 44 (2008).
11. A. Barberrio, J. C. Voltolini, M. L. S. Mello, *Ecotoxicology*, **20**(4), 927 – 935 (2011).
12. M. Ghosh, A. Chakraborty, M. Bandyopadhyay, A. Mukherjee, *J. Hazard. Mater.*, **197**, 327 – 336 (2011).
13. A. H. Siddiqui, S. Tabrez, M. Ahmad, *Environ. Monit. Assess.*, **179**, 241 – 253 (2011).
14. H. K. Lindberg, X. Wang, H. Jarventaus, et al., *Mut. Res.*, **617**, 33 – 45 (2007).

Поступила 28.04.12

#### **STUDYING MUTAGENIC AND ANTIMITOTIC ACTIVITY OF IMMUNOMODULATORY DRUG TUBOSAN**

B. S. Kibrik, I. M. Prokhorova, and D. S. Pesnya

<sup>1</sup> Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, 150000, Russia;

<sup>2</sup> Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150000, Russia

The mutagenic action and antimutagenic activity of the standard anti-tuberculosis drug isoniazid and its new derivative tubosan, a well-known immunomodulatory drug in Russia, have been investigated using the Allium test, which takes into account the frequency of chromosome aberrations, chromosome lagging and micronuclei and allows the mitotic and phase indices to be determined. It is established that isoniazid at concentrations 10, 60, and 120 mg/L fully inhibits the mitotic activity in tissues (for which the mitotic index is zero), which implies that isoniazid exhibits a very strong mitotoxic activity. A test for micronuclei showed that the mutagenic activity of isoniazid increased with the concentration. The micronuclei induced by isoniazid were formed as a result of the nuclear budding into the interphase. Isoniazid at a concentration of 300 mg/L led to the loss of a test object. Tubosan at a concentration of 60, 120, 800 and 1200 mg/L showed neither mutagenic activity nor antimutagenic effect. The phase indices were also the same as those in the control. Thus, tubosan does exhibit genotoxicity and can be classified as a genetically safe drug in the concentration range studied.

**Keywords:** tubosan, isoniazid, mitotic index, chromosome aberration, micronuclei, Allium test