

О МУТАГЕННОМ ДЕЙСТВИИ ЛИЗОМУСТИНА

Луковникова Л.В., Сидорин Г.И., Дьякова Л.И., Лельбикс Л.А.,

Шестова Г.В., Зацепин Э.П., Лесиовская Е.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева 1,

Тел./факс: (812) 365-06-80; E-mail: institute@toxicology.ru

Резюме.

Актуальность. Лизомустин – противоопухолевый препарат, из группы N-нитрозоалкилмочевины, для которых характерно проявление мутагенного действия.

Цель исследования: изучить возможность проявления мутагенного действия лизомустина.

Материалы и методы исследования. Мутагенное действие лизомустина изучали с помощью микроядерного теста, используя клетки костного мозга мышей (в опытах *in vivo*) при введении в брюшную полость 200 мг/кг (LD16) и 100 мг/кг (LD8) лизомустина.

Результаты исследования. Выявленные различия по соотношению полихроматофильных (ПХЭ) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов, количеству микроядер на 500 полихроматофильных эритроцитов в контрольной и подопытной группах при введении испытанных доз, указывают на проявление мутагенного действия лизомустина.

Заключение. На клетках костного мозга мышей (в опытах *in vivo*) показано, что лизомустин - производное нитрозоалкилмочевины относится к лекарственным средствам с высокой потенциальной возможностью проявления мутагенного эффекта.

Ключевые слова: лизомустин, микроядерный тест, мутагенное действие.

ON THE MUTAGENIC EFFECT OF LISOMUSTINE

Lukovnikova L. V., Sidorin G. I., Dyakova, L. I., Lelbiks L. A.,

Shestova G. V., Zatsepin E. P., Lesiovskaya E. E.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency,

192019, Saint Petersburg, ul. Bekhtereva, 1, tel./fax (812) 365-06-80; E-mail:

institute@toxicology.ru

Abstract.

Relevance. Lizomustine is an antineoplastic drug from the group of N-nitrosoalkylureas, which are characterized by the manifestation of mutagenic effect.

Purpose of the research: to study the possibility of manifestation of the mutagenic effect of lysomustine.

Materials and research methods. The mutagenic effect of lysomustine was studied using a micronucleus test using mouse bone marrow cells (in vivo experiments) with the introduction of 200 mg / kg (LD16) and 100 mg / kg (LD8) lysomustine into the abdominal cavity.

Research results. The revealed differences in the ratio of polychromatophilic (PCE) and normochromic (NCE) erythrocytes, the number of micronuclei per 500 polychromatophilic erythrocytes in the control and experimental groups with the introduction of the tested doses indicate the manifestation of the mutagenic effect of lysomustine.

Conclusion. It was shown on mouse bone marrow cells (in vivo experiments) that lysomustine, a nitrosoalkylurea derivative, belongs to drugs with a high potential for mutagenic effect.

Key words: lysomustine, micronucleus test, mutagenic effect.

Введение. Синтетические биологически активные соединения находят все большее применение как лекарственные препараты и могут представлять реальную опасность для здоровья пациентов, поскольку наряду с проявлением специфического терапевтического действия, характеризуются широким спектром побочных токсических эффектов. К лекарственным препаратам с подобными свойствами относится ряд алкилирующих соединений производных N-нитрозоалкилмочевины, среди которых противоопухолевый препарат – лизомустин. Большинство лекарственных препаратов из группы N-нитрозоалкилмочевины являются цитостатиками и способны оказывать мутагенное, эмбриотоксическое, тератогенное и канцерогенное действие.

Лизомустин – оригинальный противоопухолевый препарат, относящийся к соединениям алкилирующего действия, из группы нитрозоалкилмочевин [НАМ], обладающий высокой противоопухолевой активностью. В его молекуле хлорэтилнитрозомочевина соединена с редкой аминокислотой – гомоцитруллином, позволяющей транспортировать лекарство через цитоплазматические мембраны к опухолевым клеткам.

Основной механизм противоопухолевого действия алкилнитрозомочевин (лизомустина в том числе) связан, главным образом, с алкилированием оснований ДНК, появлением апуриновых сайтов, одно- и двутяжевых разрывов, а также ковалентных сшивок между основаниями ДНК. Эти дефекты в молекуле ДНК изменяют стабильность ее вторичной структуры, затрудняют процессы репликации и транскрипции в опухолевой клетке [1, 2].

Известно, что производные N-нитрозоалкилмочевины проявляют мутагенные свойства на делящиеся клетки здоровых животных и опухоленосителей. Характер таких нарушений был исследован на примере синтеза ДНК в клетках костного мозга и эпителия тонкого кишечника в различные сроки (от 0 до 140 часов) после однократного введения ряда нитрозосоединений: нитрозометилмочевины, нитрозодиэтилмочевины, стрептозотоцина, хлорозотоцина. Отмечалось глубокое, но обратимое ингибирование синтеза ДНК [3, 4].

Введение 50 мг/кг нитрозометилмочевины в брюшную полость вызывало летальные мутации у мышей. В культуре фибробластов человека, мышей, гепатоцитов крыс под воздействием нитрозометилмочевины обнаруживаются нарушения синтеза ДНК [5, 6]. Мутагенность нитрозоэтилмочевины выявлена для бактерий, низших и высших растений, дрозофил [5]. Взаимодействуя с ДНК, 1,3-Бис-(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина вызывает мутации у бактерий, дрозофил и в клетках млекопитающих, а также хромосомные aberrации и обмен сестринских хроматид в клетках костного мозга мышей [7]. Как показали исследования, хлорозотонин проявляет наименьшую мутагенную активность [8].

Целью настоящего исследования было изучить возможность проявления мутагенного действия лизомустина.

Материалы и методы исследования.

Лизомустин представляет собой смесь изомеров 2-хлорэтил-нитрозо-L-гомоцитруллина: 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллина (I) и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллина (II).

Мутагенное действие лизомустина изучали с помощью микроядерного теста *in vivo* на мышах [6, 9]. Было показано, что микроядерный тест по чувствительности не уступает тесту по изучению хромосомных aberrаций в клетках костного мозга животных, являясь одновременно гораздо менее трудоемким. С помощью этого метода проведено тестирование на мутагенную активность большого числа химических, физических и биологических агентов, тест применяется уже на первом этапе проверки потенциальных мутагенов и канцерогенов.

Микроядра образуются из хромосомного материала на стадии анафазы. В ходе митоза хромосомный материал попадает в одну из дочерних клеток и может оказаться включенным в основное ядро, или сформировать несколько мелких ядер, так называемых микроядер. Обычно микроядра образуются в результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе апоптоза. Молодые эритроциты называются

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 1 АВГУСТА 2020 полихроматофильными (ПХЭ), тогда как зрелые – нормохромными (НХЭ). Индуцированные мутагеном микроядра, развивающиеся из хромосомных фрагментов, которые образовались в предшествующем клеточном цикле, появляются в ПХЭ не ранее, чем через 10 часов после экспозиции. Этот тест, используемый на целостном организме животного, лишен недостатков, связанных с применением искусственных систем метаболической активации *in vitro*.

Исследования проводились на клетках костного мозга молодых беспородных белых мышах обоего пола. Эксперимент проводили на четырех группах животных (по 10 животных в группе): две контрольные группы (самки и самцы) и две подопытные группы (самки и самцы).

Лизомустин вводили в брюшную полость, с последующим отбором материала через 30 часов. Выбор уровня доз основывался на величине максимально переносимой дозы и составил 200 мг/кг (LD_{16}). Для подтверждения результатов эксперимента тест был проведен дважды, и вторая доза составила 100 мг/кг (LD_8).

Через 30 часов после однократного введения названных доз лизомустина подопытных животных декапитировали. Костный мозг вымывали из бедренных костей в эмбриональную телячью сыворотку. Аналогичным образом поступали с контрольной группой животных, не получавшей препарата. После подготовки смеси делали мазок из осадка, окрашивали препарат и проводили исследование полихроматофильных (ПХЭ) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов на наличие микроядер.

Работа выполнена с соблюдением правил гуманного отношения к животным в соответствии с требованиями “Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных” (ВОЗ, 1985).

Экспериментальные данные обрабатывались с применением непараметрического метода Вилкоксона-Уитни-Манна [10].

Результаты исследования.

Результаты исследования мутагенного действия лизомустина представлены в таблице, из которой видно, что препарат оказывает мутагенный эффект.

Выявленные различия по соотношению ПХЭ/НХЭ, отражающие цитотоксический эффект в контрольной и подопытной группах при введении дозы 200 мг/кг не достоверны ($p > 0,05$). Напротив, по количеству микроядер на 500 клеток в контрольной и подопытной группах при введении обеих доз получены статистически значимые результаты ($p < 0,05$).

Экспериментальные данные о мутагенном действии исследованной смеси изомеров 2-хлорэтил-нитрозо-L-гомоцитруллина подтверждаются литературными сведениями о мутагенном действии производных нитроалкилмочевины. Установленные мутагенные

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 1 АВГУСТА 2020

свойства являются одним из важнейших механизмов токсического действия лизомустина, что указывает на высокую степень вероятности развития канцерогенного эффекта, присущего многим цитостатикам, в том числе представителям класса нитроалкилмочевин [1, 7]. Как было показано ранее, токсическое действие лизомустина на энергетическое обеспечение клетки и детоксицирующую функцию печени в значительной степени снижает устойчивость тканей, функция которых связана с постоянным обновлением клеточной массы: стволовые клетки костного мозга, тонкого кишечника [11].

Таблица

Результаты исследования мутагенного действия лизомустина методом микроядерного теста на мышах

Пол животных	Группы животных	Доза 100 мг/кг		Доза 200 мг/кг	
		ПХЭ/НХЭ	Содержание ПХЭ с микроядрами (ед./500 ПХЭ)	ПХЭ/НХЭ	Содержание ПХЭ с микроядрами (ед./500 ПХЭ)
самцы	контроль	0,93±0,08	0,7	1,00±0,06	0,9
	опыт	0,83±0,09	3,5*	0,84±0,05	9,0*
самки	контроль	1,29±0,14	0,9	0,91±0,13	0,9
	опыт	0,83±0,07*	3,4*	0,74±0,09	5,6*

Обозначения: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Таким образом, лизомустин, как и большинство противоопухолевых препаратов из группы нитроалкилмочевин, характеризуется проявлением мутагенного эффекта, чем обусловлен высокий риск развития отдаленных последствий.

Эпидемиологические наблюдения за состоянием здоровья лиц, занятых в технологическом процессе производства противоопухолевых цитостатиков по разным причинам практически отсутствуют [12, 13]. В последнее время появилась информация о вредном действии этих препаратов на медицинский персонал онкологических клиник [14, 15, 16]. По данным некоторых авторов, моча лиц, занятых приготовлением лекарственных форм цитостатиков содержит мутагенные субстанции, что можно расценивать как показатель высокой степени риска здоровью персонала [12]. В соответствии с п. 2.3 «Концепция опасности ЕС, подходы и принципы обращения с химическими веществами» полученные результаты позволяют отнести лизомустин к особо опасным веществам

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 1 АВГУСТА 2020 (мутагены категорий 1 или 2 Директива 67/548/ЕЕС), а в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 к 1 классу опасности, чрезвычайно опасные вещества [11].

Заключение

На клетках костного мозга мышей (в опытах *in vivo*) показано, что лизомустин - производное нитрозоалкилмочевины относится к лекарственным средствам с высокой потенциальной возможностью проявления мутагенного эффекта.

При синтезе и применении лизомустина в качестве лекарственного препарата следует принимать во внимание его опасность для здоровья персонала и предусмотреть необходимые меры защиты.

Список литературы

1. Дементьева, Н.П. Нитрозомочевина в клинической химиотерапии злокачественных опухолей // Вопросы онкологии. – 1988. – Т. 34. – С. 8-13.
2. Блюхтерова, Н.В. Препараты класса нитрозоалкилмочевин в отечественной противоопухолевой химиотерапии / Н.В. Блюхтерова, Д.Б. Корман, Л.А. Островская // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – № 1. – С. 24-36.
3. Горбачева, Л.Б. Нарушение в синтезе ДНК в клетках костного мозга и эпителия тонкого кишечника мышей после введения ряда N-нитрозомочевин / Л.Б. Горбачева, И.С. Соколова, Г.В. Кукушкина / В кн. Канцерогенные N-нитрозосоединения – действие, образование, определение. Таллинн, 1990. – С. 9-11.
4. Горбачева, Л.Б. Нарушения синтеза РНК и белка в клетках экспериментальных опухолей животных N- нитрозо- N-метилмочевины (НММ) / Л.Б. Горбачева, И.С. Соколова, Г.В. Кукушкина / В кн. Канцерогенные N-нитрозосоединения – действие, образование, определение. Таллинн, 1978. – С. 92-94.
5. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans // IARC Monographs. – 1987. – Vol. 1, № 42. – P. 40-45.
6. Гигиенические критерии состояния окружающей среды // Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. ВОЗ, Женева, 1989. – № 51. – 183 с.
7. Sava, G. Antitumor effects of GANU and other nitrosourea derivatives transplantable leukemias and solid tumors in mice/ G. Sava, T. Girardi // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2004. – Vol. 10, № 3. – P. 167-169.
8. Shein, P.S. Pharmacology of chlorozocin (Nsc-178248), a new nitrosourea antitumor agent / P.S. Shein, L. Panasci, P.V. Wooley // Cancer Treatment Reports. – 1976. – Vol. 60, № 6. – P. 5.
9. Томилин, Н.В. Сравнительное экспериментальное исследование мутагенного и цитотоксического действия нитрозодиметиламина в условиях острого и субхронического введения с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах и лимфоцитах периферической крови белых крыс / Н.В. Томилин, О.А. Филько, А.В. Храброва, Н.Е. Соловьева, К.В. Сизова, В.А. Утсаль, К.А. Краснов // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2017. – Т. 18, № 2. – С. 382-394.
10. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. И.В. Санюцкого. М.: Медицина, 1970. – 343 с.

11. Сидорин, Г.И. Токсикологическая характеристика противоопухолевого препарата лизомустина / Г.И. Сидорин, М.А. Битти, Л.В. Луковникова, Л.И. Дьякова, Н.И. Сходкина, О.С. Черкащенко // Медицина труда и промышленная экология. – 2010. – № 4. – С. 19-24.
12. Буров, Ю.В. Проблемы экологической безопасности человека в химико-фармацевтической промышленности. - М.: Наука, 1995. – С. 132-140.
13. Горохова, Л.Г. Гигиенические аспекты состояния здоровья работающих в химико-фармацевтическом производстве / Л.Г. Горохова, Н.А. Мартынова, Н.В. Кизиченко, Т.Д. Логунова // Медицина в Кузбассе. – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 11-16.
14. Рожнов, Г.И. Вопросы промышленной и экологической безопасности при производстве лекарственных средств / Г.И. Рожнов, М.И. Голубева, Л.Ф. Шашкина // Материалы Пленума «Угрозы здоровью человека: современные гигиенические проблемы и пути их решения». – М., 2002. – С. 208-211.
15. Иманкулова, Б.Н. Влияние химического фактора производственной среды на здоровье медицинского персонала в онкологической клинике / Б.Н. Иманкулова, К.О. Джусупов // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. – 2016. – № 5. – С. 85-91.
16. Соленова, Л.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами / Л.Г. Соленова, М.Г. Якубовская // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 10-20.