УДК 619:615.5

ПОКАЗНИКИ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ В ЕРИТРОЦИТАХ КРОВІ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА ОДНОРАЗОВОГО ТА ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ КЛОЗАВЕРМ А

І. Я. Коцюмбас[1], О. Л. Тішин[1], І. П. Патерега[1], В. В. Стибель[2], М. В. Глечик[2]

[1]Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок
[2]Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Ґжицького

За мікроядерним тестом на еритроцитах крові білих щурів вивчені мутагенні властивості клозаверму А, залежно від доз та часу застосування, а також відновлювальна здатність організму лабораторних тварин після тривалого застосування препарату. Встановлено, що за терапевтичної дози клозаверм А не проявляє мутагенної дії, а за одноразового введення препарату в дозах 1/10 і 1/2 DL_{50} і за 14-добового введення в дозах 1/20 і 1/10 DL_{50} проявляється його мутагенна дія. Цей ефект більш виражений за вищих доз. 28-добовий період реабілітації достатній для відновлення організму від мутагенного впливу препарату, навіть, у значних дозах, а 21 доба відновлення — за 14-добового введення клозаверму А в дозі у 2,5 раза вищої від терапевтичної.

На сьогоднішній день в Україні випускається широкий асортимент протипаразитарних засобів для тварин. Однак, внаслідок складного синтезу нових препаратів, розробляються способи розширення спектру дії відомих препаратів за рахунок їх комплексного застосування. Для профілактики та лікування худоби, овець і кіз за умов екто- і ендопаразитозів, ВАТ ВНП «Укрзооветпромпостач» запропонувало комбінований препарат клозаверм А, до складу якого входять діючі речовини — аверсектин С і клозантел. Одним з основних показників, які характеризують якість ветеринарних препаратів, є їх безпека, тому важливим етапом у розробці нового препарату є токсикологічні дослідження, в тому числі виявлення віддалених наслідків, зокрема мутагенної активності [1]. Єдиного методу, за допомогою якого можна було б зареєструвати всі типи мутацій, не існує, тому використовується комплекс методів.

В останні роки, у зв’язку з необхідністю оцінки мутагенної дії великої кількості речовин, які впроваджуються у тваринництві, все більше уваги приділяється короткостроковим тестам на потенційну мутагенність [2–4]. Одним з найважливіших серед них вважається мікроядерний тест (МТ) обліку хромосомних порушень. Суть феномена полягає в тому, що під час поділу клітин ацентричні фрагменти хромосом і відсутні хромосоми, які не увійшли в дочірні ядра, формують у цитоплазмі клітин одне, рідше два ДНК-вмісні утворення, які отримали назву мікроядра (МЯ). Мікроядра — внутрішньоклітинні хроматинові утворення, які мають власну оболонку та відокремлені від ядра, вони утворюються з ацентричних фрагментів хромосом і цілісних хромосом, які затрималися в розвитку в анафазі через дефекти веретена ділення [5]. Це включення у вигляді уламків ядер, що розпадаються, тілець Жолі — залишків ядерної субстанції круглої форми. Утворення МЯ пов’язують з порушенням мітозу як наслідок кластогенної дії багатьох мутагенів і канцерогенів, тобто здатністю викликати розриви ДНК на стадії реплікації за типом делецій [1, 6]. Таким чином, облік частості клітин з МЯ може вказувати на цитогенетичну активність досліджуваного фактора [1].

Протипаразитарні препарати, зокрема аверсектин С і клозантел, широко використовуються у лікувальній практиці. Кожен із них у терапевтичній дозі не проявляє віддалених наслідків на організм. Зважуючи на те, що клозаверм А є комплексним

препаратом, до складу якого входять ці дві діючі речовини, проведені дослідження щодо вивчення його мутагенної дії на еритроцитах крові білих щурів.

Метою досліджень було вивчення мутагенної дії препарату клозаверм А за МЯ тестом на периферичній крові білих щурів у гострому та хронічному дослідах, а також відновлювальної здатності організму лабораторних тварин після тривалого застосування препарату.

Матеріали і методи. Для оцінки мутагенної активності на еритроцитах використано 24 білі щури-самці 3-місячного віку, масою 180−200 г для гострого досліду та 24 білі щури-самці 2−3-місячного віку, масою 170–185 г — для хронічного. Дослідні тварини для кожного експерименту були розділені на 4 групи по 6 щурів у кожній. МЯ тест проводили за методикою W. Schmid (1973) [7].

У гострому досліді I група тварин була контрольною. Тваринам трьох дослідних груп уводили клозаверм А одноразово, підшкірно у дозах: терапевтичній — 0,05 мл/кг або 1/50 DL_{50} (II група), 1/2 DL_{50} — 1,25 мл/кг (IV група) та середню між ними 1/10 DL_{50} — 0,25 мл/кг (III група). Після ін'єкції препарату периферичну кров відбирали від тварин усіх I, II, III і IV груп через 24, 48 і 72 години.

У хронічному досліді щурам I контрольної групи вводили розчин з дистильованої води та пропіленгліколю у співвідношенні 1 : 1. Тваринам інших трьох груп вводили клозаверм А у дозах: II групи — терапевтичну, III групи — 0,125 мл/кг, тобто 1/20 DL_{50} (середню між терапевтичною та 1/10 DL_{50}) та IV групи — 1/10 DL_{50}. Розчин та препарат вводили щурам підшкірно, одноразово, щодобово протягом 14 діб. Для вивчення динаміки мутагенних змін та відновлювальної здатності організму, внаслідок дії препарату, периферичну кров відбирали від щурів на 7 і 14 доби введення клозаверму А та на 21 і 28 доби періоду реабілітації.

У вказаних дослідах після введення препарату периферичну кров, після легкого ефірного наркозу, брали від тварин з хвостової вени шляхом надрізу. Краплю крові наносили на предметне скло, змішуючи її з краплею 10 % розчину цитрату натрію, готували мазки, сушили на повітрі, фіксували метанолом та фарбували за Д. Л. Романовським. Одержані мазки аналізували за допомогою мікроскопа (збільшення 90 х 10) шляхом підрахунку кількості мікроядерних поліхромних еритроцитів у 1000 клітинах. Результати наводили в промілях. Мікроядрами в кров'яних клітинах вважали помітні великі утворення з діаметром, що складав 1/5–1/20 розміру еритроцита [8].

У всіх вищевказаних дослідах статистичну обробку отриманих даних та оцінку вірогідності різниць у порівняльних показниках проводили за допомогою параметричного критерію Фішера-Ст'юдента з використанням IBM-сумісного комп'ютера.

Результати та обговорення. Мікроскопічним дослідженням в еритроцитах периферичної крові за проведення гострого і хронічного дослідів на щурах виявляли МЯ різних розмірів.

У гострому досліді встановлено, що кількість тілець Жолі в еритроцитах периферичної крові щурів вірогідно збільшилася, порівняно з контролем, за умов ін'єкції клозаверму А в дозах 1/10 та 1/2 DL_{50} (0,25 і 1,25 мл/кг) вже через 24 години після застосування препарату. За дози 1/10 DL_{50} кількість клітин з МЯ, порівняно з контролем, зростала через 24 години на 79,2 % ($p < 0,05$), через 48 годин — на 76,9 % та через 72 години — на 88,0 % ($p < 0,01$), а за дози 1/2 DL_{50} —на 112,5; 111,5 і 164,0 % ($p < 0,001$) відповідно. За одноразового введення препарату у терапевтичній дозі (0,05 мл/кг) вірогідного збільшення кількості тілець Жолі в еритроцитах тварин, порівняно з контролем, через 24, 48 і 72 години не встановлено, а виявлена лише тенденція до її збільшення, відповідно, на 25,0; 23,1 і 30,0 % (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість еритроцитів з МЯ у периферичній крові білих щурів, за умов одноразового введення клозаверму А, ‰ (M±m, n=6)

Групи	Дози клозаверму А	Кількість еритроцитів з МЯ через:		
		24 год	48 год	72 год
I	контроль	0,48±0,08	0,52±0,11	0,50±0,08
II	терапевтична (1/50 DL_{50})	0,60±0,10	0,64±0,03	0,65±0,08
III	1/10 DL_{50}	0,86±0,04*	0,92±0,04**	0,94±0,11**
IV	1/2 DL_{50}	1,02±0,06***	1,10±0,06***	1,32±0,05***

Примітка: у цій і наступній таблиці ступінь вірогідності до контролю * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

Така ж картина спостерігалася в еритроцитах крові тварин на різних періодах хронічного досліду, де виявлено вірогідне збільшення кількості тілець Жолі за тривалого застосування клозаверму А у дозах, більших за терапевтичну. Так, на 7 добу введення препарату кількість тілець Жолі, порівняно з контролем, зростала на 51,8 % ($p < 0,01$) і 71,4 % ($p < 0,001$) за доз, відповідно, 1/20 і 1/10 DL_{50} (0,125 і 0,25 мл/кг), а на 14 добу — на 74,5 і 135,3 % ($p < 0,01$ і $p < 0,001$) відповідно. За умов щодобової ін'єкції клозаверму А в терапевтичній дозі встановлено лише тенденцію до збільшення кількості еритроцитів з МЯ на 7 і 14 добу на 14,3 і 21,6 %, відповідно, порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість еритроцитів з МЯ у периферичній крові білих щурів, за умов тривалого введення клозаверму А, ‰ (M±m, n=6)

Групи	Дози клозаверму А, мл/кг	Кількість еритроцитів з МЯ			
		доби введення		доби відновлення	
		7	14	21	28
I	контроль	0,56±0,03	0,51±0,06	0,54±0,07	0,49±0,06
II	терапевтична (1/50 DL_{50})	0,64±0,08	0,62±0,10	0,60±0,08	0,56±0,10
III	1/20 DL_{50} — 0,125	0,85±0,07**	0,89±0,09**	0,68±0,11	0,60±0,09
IV	1/10 DL_{50} — 0,25	0,96±0,04***	1,20±0,08***	0,79±0,10*	0,68±0,14

Таким чином, як випливає з проведених досліджень, ін'єкція клозаверму А в дозах, вищих за терапевтичну за одноразового застосування (за доз 1/10 і 1/2 DL_{50}, які, відповідно, більші за терапевтичну в 5 і 25 разів), так і за тривалого застосування (за доз 1/20 і 1/10 DL_{50}, які, відповідно, більші за терапевтичну в 2,5 і 5,0 разів) викликала збільшення, порівняно з контролем, кількості мікроядерних еритроцитів, тобто мутагенний ефект. При цьому цей ефект посилювався за умов підвищення доз.

При вивченні реабілітаційних властивостей організму після дії препарату встановлено, що організм відновлює фізіологічну структуру генетичного апарату, тобто за цим методом на 28 добу відновлення не виявлено мутагенної дії клозаверму А на еритроцити периферичної крові білих щурів, а на 21 добу відновлення встановлена вірогідна мутагенна дія за попереднього застосування препарату в дозі 1/10 DL_{50}. Так, на 21 добу у хронічному досліді після останнього 14-добового щоденного підшкірного введення препарату в дозі 1/10 DL_{50}, встановлено, порівняно з контролем, вірогідне збільшення кількості тілець Жолі в еритроцитах крові на 46,3 % ($p < 0,05$), а на 28 добу спостерігалася лише тенденція до її збільшення на 38,8 %. За тривалого введення препарату в дозі 1/20 DL_{50} на 21 і 28 доби відновлення встановлена тенденція, порівняно з контролем, до збільшення кількості тілець Жолі в еритроцитах крові, відповідно, на 25,9 і 22,4 %, а за терапевтичної дози ця тенденція до збільшення становила лише, відповідно, 11,1 і 14,3 % (табл. 2).

Таким чином, дані цитогенетичних досліджень, одержані за вивчення мутагенних властивостей клозаверму А за МЯ тестом, свідчать про мутагенну дію препарату за доз 1/10 та 1/2 DL_{50} за одноразового введення та за 14-добового застосування препарату у дозах 1/20 і 1/10 DL_{50}, які відповідно вищі від терапевтичної у 5 і 25 та у 2,5 і 5,0 разів. 28-

добовий період реабілітації достатній для відновлення організму від мутагенного впливу препарату, тобто клозаверм А за названих доз не проявляє прогресуючого мутагенного ефекту. Крім того, не виявлено мутагенного ефекту препарату на 21 добу відновлення, за 14-добового підшкірного введення клозаверму А в дозі, більшій у 2,5 раза від терапевтичної. За одноразового та багаторазового введення препарату в терапевтичній дозі клозаверм А мутагенної дії не проявляє.

Отже, клозаверм А не проявив мутагенної дії за його одноразового та тривалого застосування в терапевтичній дозі.

В И С Н О В К И

1. За умов одноразового та 14-добового підшкірного введення клозаверму А в терапевтичній дозі (0,05 мл/кг) мутагенна дія препарату не проявляється.
2. За умов одноразової ін'єкції клозаверму А у дозах 1/10 і 1/2 DL_{50}, які, відповідно, вищі за терапевтичну в 5 і 25 разів, згідно з МТ проявляється мутагенна дія препарату.
3. За доз 1/20 і 1/10 DL_{50}, які, відповідно, більші за терапевтичну в 2,5 і 5,0 разів, клозаверм А за тривалого 14-добового введення за МТ на еритроцитах крові викликає мутагенний ефект. При цьому даний ефект більш виражений за вищих доз.
4. 28-добовий період реабілітації достатній для відновлення організму від мутагенного впливу клозаверму А навіть за значних доз, а 21 доба відновлення — за тривалого введення клозаверму А в дозі, у 2,5 раза більшій від терапевтичної.

Перспективи подальших досліджень. Для всебічного вивчення мутагенного впливу клозаверму А на організм доцільно провести на лабораторних тваринах дослідження за методом метафазного аналізу на клітинах кісткового мозку.

INDEXES OF MICRO-KERNEL TEST IN RED CORPUSCLES OF BLOOD OF WHITE RATS AT NON-PERMANENT AND PROTRACTED INJECTION OF PREPARATION KLOZAVERM A

I. Y. Kotsyumbas, O. L. Tishyn, I. P. Paterega, V. V. Stybel, M. V. Glechyk

S U M M A R Y

After a micro-kernel test on red corpuscles of blood of white rats mutagene properties of Klosaverm A was studied depending on doses and time of injection, and also regenerative properties of organism of laboratory animals after the protracted action of preparation. It was set that at the therapeutic dose of Klozaverm A does not show mutagene action, and at non-permanent injection of preparation in doses 1/10 and 1/2 DL50 and at the protracted injection in doses 1/20 and 1/10 DL50 shows up mutagene action, and this effect is more expressed at greater doses. 28-day's period of renewal is enough for the rehabilitation of organism from mutagene influence of preparation even in considerable doses, and a 21 days of renewal — at the protracted introduction of Klozaverm A in 2,5 times higher dose than therapeutic.

ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТА КЛОЗАВЕРМ А

И. Я. Коцюмбас, А. Л. Тишин, И. П. Патерега, В. В. Стыбель, М. В. Глечик

А Н Н О Т А Ц И Я

С помощью микроядерного теста на эритроцитах крови белых крыс изучены мутагенные свойства клозаверма А в зависимости от доз и времени применения, а также восстановительные свойства организма лабораторных животных после длительного

применения препарата. Установлено, что при терапевтической дозе клозаверм А не проявляет мутагенного действия, а при однократном введении препарата в дозах 1/10 и 1/2 DL_{50} и при 14-суточном введении в дозах 1/20 и 1/10 DL_{50} проявляется его мутагенное действие и данный эффект более выражен при высших дозах. Период реабилитации в 28 суток достаточный для восстановления организма от мутагенного влияния препарата даже в значительных дозах, а 21 сутки восстановления — при 14-суточном введении клозаверма А в дозе, высшей от терапевтической, в 2,5 раза.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Коцюмбас І. Я.* Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега та ін. ; за ред. І. Я. Коцюмбаса. — Львів : Тріада плюс, 2006. — 360 с.
2. *Purchase G. F. H.* An appraisal of predictive test for carcinogenicity / G. F. H. Purchase // Mutat. Res. — 1982. — Vol. 99, № 1. — P. 53–71.
3. *Худолей В. В.* Перспективы использования краткосрочных тестов для первичной профилактики рака / В. В. Худолей, Г. В. Плисс // Вопросы онкологии. — 1984. — Т. 30, № 8. — С. 3–12.
4. *Ванчугова Н. Н.* Влияние некоторых канцерогенных веществ на клетки костного мозга у мышей СВА / Н. Н Ванчугова, Л. И. Привалова, О. В. Комисарова, С. А. Гребенщиков // Экспериментальная онкология. — 1985. — Т. 7, № 7. — С. 65–66.
5. *Дурнев А. Д.* Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий) / А. Д. Дурнев, С. Б. Серединин. — М. : Медицина, 1998. — 328 с.
6. *Карпуть И. М.* Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И. М. Карпуть. — Минск : Ураджай, 1986. — 183 с.
7. *Schmid W.* Chemical mutagen testing on in vivo Somatic mammalis cells / W. Schmid // Agents and acting. — 1973. — № 3. — P. 47–85.
8. *Козинец Г. И.* Исследования системы крови в клинической практике / Под ред. Г. И. Козинца, В. А. Макарова. — М. : Триада-Х, 1997. — 480 с.

Рецензент: доктор біологічних наук О. Г. Малик, Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок.