

ИЗУЧЕНИЕ КАНЦЕРОГЕННОСТИ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

[Т. А. Эмедова¹, С. В. Мишенина¹, П. Г. Мадонов¹, Т. Г. Боровская², А. В. Вычужанина²,
В. А. Машанова²](#)

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава
России (г. Новосибирск)

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной
медицины им. Е. Д. Гольдберга» (г. Томск)

В статье представлены результаты оценки потенциальной канцерогенности иммобилизованных субтилизинов в тесте ДНК-комет. Установлено, что лекарственное средство на основе иммобилизованных субтилизинов при введении его в терапевтической дозе, судя по используемому тесту, не обладает потенциальным канцерогенным действием.

Ключевые слова: иммобилизованные субтилизины, ДНК-кометы, костный мозг, кровь, почки, прямая кишка.

Эмедова Татьяна Анновна — аспирант кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 220-65-11, e-mail: tatianameddkb@ngs.ru

Мишенина Светлана Владимировна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Мадонов Павел Геннадьевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: madonov@scpb.ru

Боровская Татьяна Геннадьевна — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии репродуктивной системы «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: reporpharm@yandex.ru

Вычужанина Анна Владимировна — кандидат биологических наук, старший научный

сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы
«Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им.
Е. Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: reprop harm@yandex.ru

Машанова Валерия Александровна — младший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: reprop harm@yandex.ru

Введение. Имобилизированные субтилизины представляют собой бактериальные протеиназы, обладающие высокой тромболитической активностью, способные улучшать периферическое кровообращение не только за счёт растворения тромба, но и посредством стимуляции лимфооттока, уменьшения проявлений эндотелиальной дисфункции. На основе имобилизированных протеиназ синтеза создано лекарственное средство Тромбовазим®, которое используется в виде инфузии для лечения острого инфаркта миокарда и в виде капсул для лечения тяжёлых нарушений венозного кровообращения. Одним из преимуществ Тромбовазима®, в отличие от известных фибринолитиков, является отсутствие геморрагических осложнений и возможность перорального применения. Фибринолитическое действие Тромбовазима® связано с прямой деструкцией нитей фибрина. Препарат обеспечивает повышение резервных возможностей антикоагулянтного звена гемостаза, при этом не снижает уровень фибриногена, тромбоцитов, не влияет на время свертывания крови и длительность кровотечения. Тромбовазим® уменьшает интенсивность ишемических и реперфузионных повреждений, поскольку обладает противовоспалительным и цитопротективным эффектом, не гидролизует нативные белки тканей. Препарат не оказывает местно-раздражающего действия, обладает низкой иммуногенностью, не проявляет токсических свойств в дозах, значительно превышающих терапевтические. Эффективность и безопасность средства Тромбовазима® показана в экспериментальных и клинических исследованиях [1, 2]. Однако вопрос о его канцерогенной безопасности практически не изучен.

Вопрос о потенциальной канцерогенной безопасности в настоящее время может решаться на основании краткосрочных тестов, к числу которых принадлежит тест по учету повреждений (comet assay) методом щелочного электрофореза. Метод ДНК-комет в настоящее время широко используется в токсикологической практике, так как он позволяет определить повреждения ДНК в любом органе, независимо от степени митотической активности [3]. В связи с этим необходимость его использования определяется потребностью полиорганной оценки мутагенности и канцерогенности [4].

Цель настоящей работы представляет собой изучение канцерогенной безопасности имобилизированных субтилизинов методом повреждений ДНК (comet assay) в клетках костного мозга, печени, почки и прямой кишки мышей.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 30-ти мышах линии F₁СВАхС₅₇Вl/6 массой 18–20 г в возрасте 8–12 недель. Животные получены из отдела экспериментальных и биологических моделей ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, г. Томск (сертификат имеется). Учитывая, что при изучении токсических эффектов имобилизированных субтилизинов не было выявлено существенных различий между самцами и самками, то исследования проводились только на мышах-самцах. До и в период эксперимента

мыши находились в виварии при $t_{\text{возд}} = 20,22\text{ }^{\circ}\text{C}$; влажность — не более 50 %; объем воздухообмена (вытяжка : приток) — 8 : 10; в световом режиме день-ночь; в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой по 10-12 голов; на стандартном рационе, при свободном доступе к воде и пище.

Канцерогенную безопасность исследовали *in vivo*. В тесте на индукцию ДНК-повреждений испытуемый препарат Тромбовазим® вводили 20-ти самцам линии F₁СВАхС₅₇В1/6 однократно перорально в дозах 250, 500, 750 и 2000 мг/кг. Мышам контрольной группы (негативный контроль) вводили эквивалентный объем растворителя препарата. В качестве позитивного контроля использовали мышей, которым вводили метилметансульфонат в дозе 40 мг/кг, внутрибрюшинно. Для фиксации ДНК-повреждений использовался метод ДНК-комет в щелочной версии в соответствии с рекомендациями [5].

На основании данных о фармакодинамике, фармакокинетики Тромбовазима® и методическим рекомендациям для исследования были выбраны следующие органы и ткани:

1. костный мозг, как активно пролиферирующая ткань высокочувствительная к действию мутагенов, канцерогенов;
2. печень, являющаяся основным органом биотрансформации ксенобиотиков и обладающая высокой чувствительностью к действию мутагенов и канцерогенов (20 % Тромбовазима® метаболизируется и выводится через печень);
3. эпителий толстого кишечника — орган-мишень выведения вещества и метаболитов через желудочно-кишечный тракт;
4. почки — как орган, осуществляющий основной путь выведения Тромбовазима® (при нарушении функции почек возможно увеличение периода полувыведения).

Гель-электрофорез проводили в щелочной версии. С учетом того, что Тромбовазим® является стабильным соединением и обладает не очень высокой скоростью биотрансформации, животных забивали (методом дислокации шейных позвонков) через 3 часа после введения. Затем выделяли бедренные кости, печень, почку и прямую кишку. Учитывая, что длительные манипуляции при получении суспензии могут приводить к искажению результатов, выделение органов производили максимально быстро. Эпифизы бедренных костей срезали и вымывали клетки костного мозга 2 мл предварительно охлажденного до 4 °С фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 20 mM EDTA-Na₂ и 10 % ДМСО (pH 7,5). Печень, почки и кишку измельчали в стеклянной пробирке в 3 мл того же буфера и раздавливали стеклянной палочкой. Пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносили в новую пробирку. Суспензии клеток в объеме 60 мкл вносили в пробирки с 240 мкл 0,9 % раствора легкоплавкой агарозы ($T_{\text{плав.}} < 42\text{ }^{\circ}\text{C}$) в ФСБ, подогретом до 42 °С (микротермостат «Термит») и ресуспендировали. Затем 60 мкл раствора агарозы с клетками наносили на предварительно покрытые 1 % универсальной агарозой предметные стекла, покрывали покровным стеклом и помещали на лед.

Все проводимые впоследствии операции проводили в затемненном помещении при желтом свете. После затвердевания агарозы (около 10 мин) покровные стекла осторожно удаляли, микропрепараты помещали в стеклянную кювету (тип Шиффендекер), заливали предварительно охлажденным до 4 °С лизирующим буфером (10 mM Tris-HCl [pH 10], 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1 % TritonX-100, 10 % DMSO) и инкубировали не менее 1 часа. После окончания лизиса микропрепараты переносили в камеру для электрофореза (Sub Cell GT, «Bio-Rad»). Камеру заполняли буфером для электрофореза

(300 mM NaOH, 1 mM EDTA- Na_2 , pH > 13). Приготовленные микропрепараты инкубировали в течение 20 мин для реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК, затем проводили электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1 V/cm и силе тока ~300 mA. По окончании электрофореза микропрепараты перемещали в стеклянную кювету и фиксировали в 70 % растворе этилового спирта (время фиксации 15 мин). После фиксации микропрепараты высушивали и хранили до начала микроскопирования. Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1 : 10000 в TE-буфере с 50 % глицерином) в течение 20 мин в темноте. Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе (Микромед 3 Люм, Россия), совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения, при увеличении 200 $\times$. Полученные с микропрепаратов изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CometD. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 клеток. Полученные экспериментальные данные обрабатывались статистически с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. В таблице представлены результаты исследования влияния иммобилизованных субтилизинов на уровень ДНК-повреждений в клетках костного мозга, печени, почек и кишки экспериментальных животных.

**Влияние иммобилизованных субтилизинов на уровень ДНК-повреждений
(% ДНК-комет) в органах и тканях мышей, $\bar{X} \pm m$**

Группа/номер животного	Костный мозг	Печень	Почка	Эпителий толстого кишечника
Тромбовазим 250 мг/кг	3,81 $\pm$ 0,16	3,37 $\pm$ 0,17	3,98 $\pm$ 0,19	4,69 $\pm$ 0,30
Тромбовазим 500 мг/кг	3,91 $\pm$ 0,17*	6,13 $\pm$ 0,46*	4,78 $\pm$ 0,13*	10,30 $\pm$ 0,31*
Тромбовазим 750 мг/кг	4,11 $\pm$ 0,26*	6,37 $\pm$ 0,58*	5,39 $\pm$ 0,18*	10,69 $\pm$ 0,72*
Тромбовазим 2000 мг/кг	6,05 $\pm$ 0,16*	6,59 $\pm$ 0,57*	7,08 $\pm$ 0,52*	13,96 $\pm$ 0,23*
Негативный контроль	3,08 $\pm$ 0,28	3,28 $\pm$ 0,34	3,30 $\pm$ 0,34	4,12 $\pm$ 0,30
Метилметансульфонат	15,35 $\pm$ 1,48#	19,70 $\pm$ 0,47#	19,50 $\pm$ 0,36#	20,59 $\pm$ 0,42#

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с показателем негативного контроля (растворитель); # $p < 0,05$ по сравнению с метилметансульфонатом

Введение мышам метилметансульфоната (позитивный контроль) привело к существенному увеличению количества ДНК-комет во всех исследуемых органах и тканях по сравнению с таковым в негативном контроле (растворитель), что вполне закономерно, поскольку метилметансульфонат является супермутагеном (см. табл.). Так процент ДНК-повреждений в костном мозге составил 15,35 $\pm$ 1,48; в клетках печени — 19,70 $\pm$ 0,47; в почке — 19,50 $\pm$ 0,36; в клетках прямой кишки — 20,59 $\pm$ 0,42. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что супермутагены вызывают существенное (столь же кратное) возрастание числа ДНК-комет [5]. Эти данные свидетельствуют о правильности выполнения всех манипуляций, связанных с приготовлением препаратов и подсчетом ДНК-комет.

У животных контрольной группы (негативный контроль), которым вводили растворитель, спонтанный уровень ДНК-повреждений в клетках костного мозга составил 3,08 $\pm$ 0,28, в печени — 3,28 $\pm$ 0,34; в клетках почки — 3,30 $\pm$ 0,34; в прямой кишке — 4,12 $\pm$ 0,30.

Сходные данные получены А. К. Жанатаевым и др. при проведении подобных исследований [6].

У мышей, получавших иммобилизированные субтилизины в дозе 250 мг/кг, уровни ДНК-повреждений в клетках костного мозга, печени, почек, кишки составили $3,81 \pm 0,16$; $3,37 \pm 0,17$; $3,98 \pm 0,19$; $4,69 \pm 0,30$ соответственно и достоверно не отличались от таковых в негативном контроле (растворитель).

При введении иммобилизированных субтилизинов животным в дозах 500, 750, 2000 мг/кг было достоверное увеличение процента ДНК-комет по сравнению с негативным контролем во всех исследуемых клетках органов и тканей (костного мозга, печени, почки и прямой кишки). Этот эффект носил дозозависимый характер, так в группе мышей получавших Тромбовазим® в дозе 500 мг/кг показатели ДНК-повреждений составили $3,91 \pm 0,17$ (клетки костного мозга), в клетках печени — $6,13 \pm 0,46$, в почке — $4,78 \pm 0,13$, в клетках прямой кишки — $10,30 \pm 0,31$, а в группе животных, получавших препарат в дозе 2000 мг/кг, в клетках костного мозга — $6,05 \pm 0,16$, в клетках печени — $6,59 \pm 0,57$, в почке — $7,08 \pm 0,52$, в клетках прямой кишки — $13,96 \pm 0,23$.

Выводы. При анализе ДНК-повреждений в клетках костного мозга, печени, почек, эпителия толстого кишечника мышей методом щелочного гель-электрофореза было установлено, что иммобилизированные субтилизины в дозе 250 мг/кг, что на 150 % выше терапевтической дозы, не повышают уровень ДНК-комет. С увеличением дозы лекарственного средства на 300 % выявляется повышение уровня ДНК-повреждений. Учитывая, что метод ДНК-комет является тестовым и не позволяет делать однозначных выводов, необходимо провести полное комплексное исследование канцерогенной безопасности препарата Тромбовазим®.

Список литературы

1. Плотников М. Б. Антитромбический и тромболитический эффекты нового отечественного препарата тромбовазим / М. Б. Плотников, А. М. Дыгай, О. И. Алиев // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2009. — Т. 147. — С. 418-421.
2. Мадонов П. Г. Фармакологические свойства и клиническое применение Тромбовазима / П. Г. Мадонов, К. И. Ершов, М. А. Шилова // Флебология. — 2014. — Т. 8, № 2. — С. 90-91.
3. Anderson D. General overview of the comet assay / D. Anderson // J. Clin. Toxicol. — 2015. — Vol. 5, Issue 3. — P. 28.
4. Методические указания по оценке канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах : руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Г. А. Белицкий [и др.] ; под ред. А. Н. Миронова. — М. : Медицина, 2013. — С. 129.
5. Дурнев А. Д. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза от отдельных клеток в фармакологических исследованиях / А. Д. Дурнев, А. К. Жанатаев, Е. А. Анисина. — М. : Медицина, 2012. — С. 115-130.
6. Изучение генотоксичности дигидрокверцетина in vivo / А. К. Жанатаев [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2008. — Т. 145, № 3. — С. 309-311.

STUDYING OF CARCINOGENICITY OF IMMOBILIZED SUBTILISINES BY DNA-COMET'S METHOD

[*T. A. Emedova¹, S. V. Mishenina¹, P. G. Madonov¹, T. G. Borovskaya², A. V. Vychuzhanina²,
V. A. Mashanova²*](#)

¹*SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)*

²*FSBE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg» (Tomsk)*

The results of assessment of potential carcinogenicity of the immobilized subtilisin in the test of DNA comets are presented in the article. It is established that medicine on the basis of the immobilized subtilisin doesn't possess potential cancerogenic action at its introduction in a therapeutic dose judging by the used dough.

Keywords: immobilized subtilisin, DNA comets, marrow, blood, kidneys, rectum.

About authors:

Emedova Tatyana Annavna — post-graduate student of obstetrics and gynecology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 267-94-11

Mishenina Svetlana Vladimirovna — candidate of medical science, assistant professor of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Madonov Pavel Gennadevich — doctor of medical science, professor, head of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: madonov@scpb.ru

Borovskaya Tatyana Gennadyevna — doctor of biological science, professor, head of laboratory of pharmacology of genesial system at FSBE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: repropharm@yandex.ru

Vychuzhanina Anna Vladimirovna — candidate of biological science, senior research associate of laboratory of pharmacology of genesial system at FSBE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: repropharm@yandex.ru

Mashanova Valeria Aleksandrovna — junior researcher of laboratory of pharmacology of genesial system at FSBE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: repropharm@yandex.ru

List of the Literature:

1. Plotnikov M. B. Antithrombotic and thrombolytic effects of a new domestic medicine thrombovasim / M. B. Plotnikov, A. M. Dygay, O. I. Aliyev // Bulletin of exper. biology and medicine. — 2009. — Vol. 147. — P. 418-421.
2. Madonov P. G. Pharmacological properties and clinical application thrombovasim / P. G. Madonov, K. I. Yershov, M. A. Shilova // Phlebology. — 2014. — Vol. 8, N 2. — P. 90-91.
3. Anderson D. General overview of the comet assay / D. Anderson // J. Clin. Toxicol. — 2015. — Vol. 5, Issue 3. — P. 28.
4. Methodical indicatings according to carcinogenicity of pharmacological agents and excipients in short-term tests: guide to experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances / G. A. Belitsky [et al.] ; under the editorship of A. N. Mironov. — M. : Medicine, 2013. — P. 129.
5. Durnev A. D. Methodical references according to DNA damages by method alkaline gel electrophoresis from separate cells in pharmacological researches / A. D. Durnev, A. K. Zhanatayev, E. A. Anisina. — M. : Medicine, 2012. — P. 115-130.
6. Studying of genotoxicity of dihydroquercetin in vivo / A. K. Zhanatayev [et al.] // Bulletin of exper. biology and medicine. — 2008. — Vol. 145, N 3. — P. 309-311.