

*На правах рукописи*

**Чшиева Фатима Таймуразовна**

**ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЯДА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ  
DROSOPHYLA MELANOGASTER И МЛЕКОПИТАЮЩИХ  
(MAMMALIA)**

03.00.32 – биологические ресурсы

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Владикавказ  
2006**

Работа выполнена в Северо-Осетинском государственном университете  
им. К.Л. Хетагурова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Чопикашвили Лидия Васильевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Доева Алла Николаевна**

кандидат биологических наук, доцент  
**Гагиева Лариса Черменовна**

Ведущая организация: Кабардино-Балкарский государственный  
университет им. Х.М. Бербекова

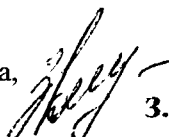
Защита состоится 30 мая 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного  
совета К 220.023.02 при ФГОУ ВПО «Горский государственный аграрный  
университет» по адресу: 362000, РСО-А, г. Владикавказ, ул. Кирова, 37,  
Горский ГАУ, факультет биотехнологии и стандартизации, компьютерный  
зал.

Тел. (8-8672) 53-99-26, факс (8-8672) 53-02-49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Горский  
государственный аграрный университет».

Автореферат разослан 29 апреля 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент



**З.Л. Дзиццоева**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время среда обитания человека переполнена генотоксикантами, с которыми человек сталкивается не только на вредном производстве (радиация, тяжелые металлы и др.), но и в быту (полимеры, пластмассы, бытовая химия, пищевые мутагены др.) и медицине (лекарственные препараты, средства диагностики и др.). По существующим оценкам поступление в организм человека средовых мутагенных соединений составляет около 2 - 3 г в сутки (Засухина Г.Д. 1992).

Развитие цивилизации превратило лекарственные средства в существенный компонент среды обитания человека. Отечественными и зарубежными исследованиями установлено наличие мутагенной активности у части широко распространенных лекарств - психотропных, гипотензивных, антибактериальных и др. Конкретные последствия применения генетически активных средств в настоящее время непредсказуемы. Очевидно, что использование таких препаратов может привести к увеличению мутационного груза в человеческой популяции, повышению риска возникновения бластомогенных факторов (в силу существования высокой корреляции в проявлении мутагенных и канцерогенных свойств ряда химических соединений), частоты спонтанных выкидышей и другим нежелательным эффектам.

Особого внимания заслуживают проблемы биологического мутагенеза. Комплексное воздействие многочисленных химических и радиационных веществ, а также инфекционный мутагенез представляет существенную и неконтролируемую опасность для наследственности человека (Дурнев А.Д., Худолей В.В. 1994). Выявление причинной связи индуцированных мутаций с возникновением злокачественных новообразований, врожденных пороков развития, наследственных и многих других заболеваний обосновали необходимость изучения мутагенеза и поиска способов защиты человека от мутагенных воздействий (Бочков Н.П. 2004).

Существенной проблемой является выбор природных или синтезированных соединений, обладающих антимутагенными свойствами, способных проявлять их при комплексном воздействии генотоксикантов.

Сведения о влиянии витаминов и микроэлементов на спонтанный и индуцированный мутагенез, полученные в исследованиях на клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*, противоречивы. В одних работах показаны антимутагенные свойства витаминов, которые связывают с их способностью

ингибировать процессы индуцированного свободнорадикального окисления (Дурнев А.Д., Середенин С.Б. 1998., Kuroda Y. 1987). В ряде других исследований выявлены комутагенные и даже мутагенные эффекты витаминов, объясняемые их автоокислением, сопровождающимся инициацией свободнорадикального окисления (Kuroda Y. 1990; Sahu K., Das R.K. 1994). В этой связи вопрос о возможном влиянии антиоксидантов на хромосомную изменчивость остается открытым.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение влияния некоторых лекарственных препаратов, применяемых при лечении детей с гастродуоденальными заболеваниями на наследственные структуры. А также возможность снижения нежелательных последствий с помощью антиоксидантов (ветарон, витамин С, димефосфон).

**Для достижения цели решались следующие задачи:**

1. Оценить уровень ДЛМ и плодовитость *Drosophila melanogaster* после применения лекарственных препаратов в отдельности и в комплексах и влияние на него антиоксидантов.

2. Исследовать влияние лекарств и наиболее часто применяемых в педиатрии их комплексов на уровень кластогенеза у крыс линии Wistar, а также возможность коррекции их генома антимутагенами.

3. Определить содержание металлического яда - висмута, входящего в состав де-нола в органах млекопитающих после курса введения. Исследовать влияние изучаемых витаминов и димефосфона на тканевое распределение металла.

4. Выявить уровень хромосомных aberrаций (ХА) у детей, инфицированных *Helicobacter pylori* (НР), до и после курса антихеликобактерной терапии.

5. Оценить влияние инфекта и лекарственных препаратов на активность ферментов антиоксидантной системы (ІП и каталаза).

**На защиту выносятся:**

- выявленные мутагенные эффекты, индуцированные *in vivo* лекарственными препаратами в генеративных клетках *Drosophila melanogaster*, в соматических клетках крыс и детей; зависимости генотоксического действия изучаемых мутагенов от дозы и схемы воздействия;

- модификация кластогенных эффектов с помощью антиоксидантов;

- экспериментально доказанные закономерности бионакопления висмута в органах крыс в зависимости от дозы и схемы введения; влияние антиоксидантов на выведение  $\text{Bi(III)}$  из организма крыс;

-данные об активности ферментов антиоксидантной системы (церулоплазмينا и каталазы) от физиологического состояния организма детей.

#### **Научная новизна:**

-в комплексных исследованиях выявлены закономерности мутагенной активности ряда лекарственных препаратов (омепразола, де-нола, амоксициллина, метронидазола и дерината) в зависимости от сочетания компонентов и их концентрации; влияние антиоксидантов (ветарона, витамина С, димефосфона) на индукцию лекарствами кластогенных эффектов;

-выявлено распределение висмута в органах крыс (в почках, желудке, печени, селезенке, сердце) после внутрижелудочного введения им де-нола (висмута субцитрат); зависимость бионакопления  $\text{Bi(III)}$  от схемы введения; динамика выведения токсичного металла из организма крыс;

-показана мутагенная активность НР у детей, модификация ее эрадикационной терапией и антиоксидантами;

-изучено влияние инфекта (НР) и эрадикационной терапии на активность церулоплазмينا и каталазы.

#### **Научно-практическое значение.**

В комплексном исследовании в трех тест-системах выявлено мутагенное действие лекарственных препаратов на наследственные структуры клетки. Изучена зависимость генотоксического эффекта препаратов и их комплексов от схемы введения, дозы и времени экспозиции. Показана мутагенная и комутагенная (на фоне терапии) активность инфекта в культуре лимфоцитов детей, инфицированных НР.

В исследованиях, направленных на выявление влияния антимуагенов на индукцию ХА, показаны взаимосвязи между приемом антиоксидантов и уровнем наблюдаемых повреждений клеток, которые зависели от исследуемого антиоксиданта, лекарственного вещества, применяемой схемы и дозы препаратов, что может быть использовано с целью снижения нежелательных эффектов, индуцируемых лекарствами.

Выявлена способность висмута к накоплению во всех исследуемых органах (за исключением костной ткани) после введения де-нола животным. Уровень обнаруживаемых концентраций зависел от дозы, схемы введения и анализируемого органа. Наибольшее содержание данного металла выявлено в почках и в желудке при отдельном введении де-нола, при комплексном применении лекарств возрастал уровень висмута в сердце.

Из исследованных схем наименьшую способность к накоплению данный

металл проявил при введении его в комплексе с омепразолом и амоксициллином. Так как генотоксический эффект при применении данного комплекса также был наиболее низким, то его практическое применение является предпочтительным.

Показана эффективность использования витаминов и димефосфона с целью снижения биоаккумулирования висмута в органах крыс.

У детей, инфицированных НР, показан рост средней активности ферментов (каталазы и церулоплазмينا) по сравнению с контрольной группой и снижение ее после терапии, эти данные могут служить с прогностической целью.

### **Апробация работы.**

Результаты представленной работы были доложены на V международной конференции "Устойчивое развитие горных территорий: проблемы и перспективы интеграции науки и образования" (Владикавказ 2004), на Всероссийской научной конференции "Актуальные проблемы экологии и сохранения биоразнообразия России" (Владикавказ 2005), на II Всероссийской научно-практической конференции "Окружающая среда и здоровье" (Пенза 2005); на Пленуме «Современные проблемы медицины окружающей среды» (Москва, 2005.).

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), описания материалов и методов (Глава 2), результатов исследования (Главы 3, 4, 5), заключения, выводов, списка литературы и приложений, содержащих 31 таблицу. Работа изложена на 154 страницах и содержит 28 рисунков. Библиографический указатель включает 139 источников.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций** подтверждается результатами независимых исследований: учет доминантных летальных мутаций в тест-системе *Drosophila melanogaster*, учет ХА в костном мозге крыс и культуре лимфоцитов детей, обработанных с помощью методов математической статистики.

### **Материалы и методы исследования.**

Эксперименты проводились на следующих тест-системах: низкомутабельной линии Д-32 *Drosophila melanogaster*, белых крысах "Wistar", культуре лимфоцитов периферической крови детей, в плазме и эритроцитарном слое крови детей.

Учет ДЛМ и плодовитости дрозофил проводился в массовых культурах. Особенности биологии развития, разведения, постановки скрещиваний, содержания мух, приготовления и рецептуры корма соответствовали

общепринятым требованиям (Медведев Н.Н. 1968, Шварцман П.Я. 1974 и др.). Препараты для метафазного анализа клеток костного мозга крыс готовились по стандартной методике (Ford E.H., Hamerton I.L. 1965, Бочков П.П. 2004). Анализ накопления висмута в органах млекопитающих производился методом инверсионной дифференциальной импульсной полярографии.

Определение активности церулоплазмينا в сыворотке крови проводилось методом Равина (Камышников В.С. 2003), активность каталазы исследовалась по методу Баха и Зубковой (Справочник по лабораторным методам исследования. Под ред. Л.А. Даниловой 2003).

Для анализа хромосомных aberrаций лимфоциты периферической крови детей культивировали макрометодом общепринятой методики (Moorched P.S. et al. 1960; Захаров А.Ф. и др. 1982).

В ходе исследований было использовано 250 животных. Кариотипирование было проведено для 80 детей, инфицированных НР, а анализ активности ферментов антиоксидантной защиты для 26 больных детей.

Мутагенное действие было изучено у лекарственных препаратов, применяемых с целью эрадикации НР: омепразола (суточная доза 60 мг/кг), де-нола (360 мг/кг), амоксициллина (150 мг/кг), метронидазола (45 мг/кг), а также дерината 1 капля в день. Мутагенный эффект изучался у этих лекарств и при увеличении суточной дозы в 2 раза. Крысам препараты разводились дистиллированной водой и вводились катетером внутрижелудочно. Самцов дрозофил (*imago*) кормили дозами, разведенными в 10 раз 5% сахарозой.

Дети находились на стационарном режиме и получали соответствующую антихеликобактерную терапию.

Исследовалось антимутагенное действие антиоксидантных препаратов: ветагона, витамина С и димефосфона на фоне омепразола, де-нола, амоксициллина и метронидазола, а также при комплексном применении мутагенов. Ветарон, в состав которого входят природные витамины, вводился крысам катетером (по 1 капле в сутки), для мух эта доза разводилась 5% сахарозой в 10 раз. В экспериментах на крысах использовалась 5% аскорбиновая кислота ампульной расфасовки в дозе 0,5 мг/кг веса животного. Димефосфон для животных разводили дистиллированной водой и вводили в дозе 15 мг/кг, для мух эту дозу разводили в 10 раз.

Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента (Лакин П.Ф. 1980).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Оценка генотоксических свойств и способности к бионакоплению ряда лекарственных препаратов, применяемых при лечении детей, инфицированных ИР

Методом учета доминантных леталей у *Drosophila melanogaster* была выявлена мутагенная активность лекарственных препаратов: омепразола, де-нола, амоксициллина и метронидазола.

Деринат в данной тест-системе не проявил мутагенных свойств.

При экспозиции 24 часа омепразол (суточная доза 0,3 мг) показал мутагенную активность, которая проявилась в резком снижении плодовитости в 1,7 раза. При увеличении сроков экспозиции до 7 дней выявлен рост ДЛМ до  $0,7 \pm 0,3\%$ . Увеличение терапевтической дозы в 2 раза (0,6 мг) способствовало росту ДЛМ при выдержке 24 часа до  $0,4 \pm 0,1\%$ , при затравке в течение 7 дней до  $1,04 \pm 0,4$  при  $p < 0,05$  (рис. 1, 2). Обращал на себя внимание тот факт, что самцы во время эксперимента теряли свойственную им подвижность, предпочитая ползать по дну банки, а не летать в ней, что также свидетельствует о негативном воздействии омепразола на их организм.

Цитогенетический анализ у крыс, которым вводили внутривентрикулярно суточную дозу 0,3 мг омепразола выявил рост ХА до  $6 \pm 0,6\%$ , что в 2 раза

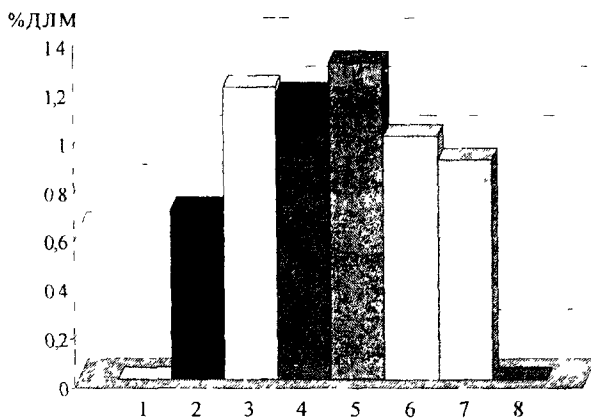


Рис. 1. Уровень ДЛМ при экспозиции 7 дней 1- Контроль; 2-Омепразол; 3-Де-нол; 4-Амоксициллин; 5-Метронидазол; 6-Комплекс 3; 7-Комплекс 4; 8-Деринат

больше контроля (при  $p < 0,001$ ). Был выявлен рост таких патологий хромосом как полиплоидия, одиночные и парные фрагменты, а также диценгрические слияния, что говорит о действии препарата на все стадии митоза

Таким образом, в ходе работы было выявлено действие омепразола на генеративные клетки самцов дрозофил и



соматические клетки костного мозга крыс. Препарат проявил генотоксические свойства, которые проявились в мутагенном действии на сперматозоиды самцов дрозофил и эмбриогенез их потомства. Степень проявления мутагенных свойств зависела от времени воздействия и дозы. В костном мозге крыс омепразол проявил кластогенный эффект, индуцировав рост ХА (рис. 3, 4).

Воздействие другого исследуемого вещества - висмутсодержащего препарата де-нола (в суточной дозе 54 мг) на самцов дрозофил при экспозиции 24 часа вызвало падение численности выхода потомства в 2 раза по сравнению с контролем, однако роста ДЛМ не наблюдалось. При увеличении времени воздействия до 7 дней выявлен рост ДЛМ до  $1,2 \pm 0,5\%$  (при  $p < 0,05$ ). При увеличении времени воздействия

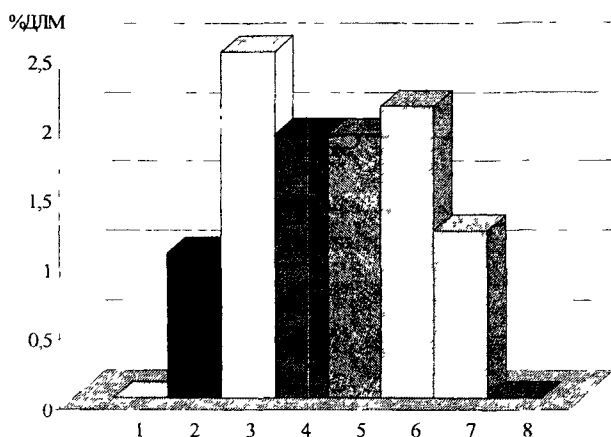


Рис. 2. Уровень ДЛМ при увеличении терапевтической дозы в два раза (экспозиция 7 дней). 1-Контроль; 2-Омепразол; 3-Де-нол; 4-Амоксициллин; 5-Метронидазол; 6-Комплекс 3; 7-Комплекс 4; 8-Деринат.

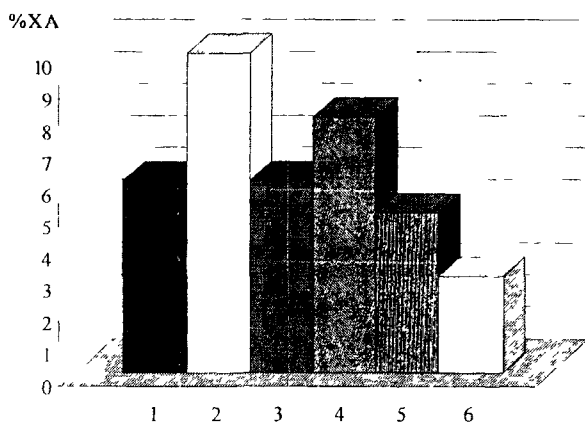


Рис.3 Индукция ХА лекарственными препаратами у млекопитающих. 1 - Омепразол; 2 - Де-нол; 3 -Амоксициллин; 4 - Метронидазол; 5 - деринат; 6 - Контроль.

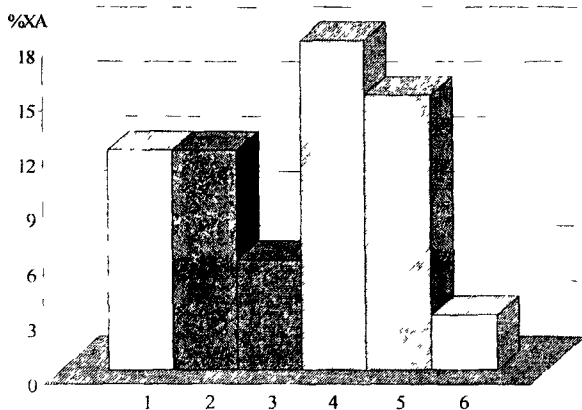


Рис. 4. Индукция ХА у млекопитающих при увеличении терапевтической дозы в два раза. 1 - Де-нол; 2 - Метронидазол; 3 - Комплекс 2; 4 - Комплекс 3; 5 - Комплекс 4; 6 - Контроль.

терапевтических доз (54 мг в сутки) в течение 7 дней до  $10 \pm 0,9\%$ , при  $p < 0,001$ . В спектре ХА преобладают одиночные фрагменты и полиплоидии, также обнаруживались транслокации, парные фрагменты и кольцевые слияния. Очевидно, мутаген действует на все стадии жизненного цикла клетки. Рост полиплоидных клеток свидетельствует о влиянии де-нола на ахроматиновое веретено деления клетки, в результате чего идет нарушение нормального распределения генетического материала между дочерними клетками. Увеличение исследуемой дозы в 2 раза (108 мг) вызвало еще больший рост ХА - до  $12 \pm 1,3\%$ , при  $p < 0,001$ .

Электрoхимический анализ показал (табл. 1) способность висмута, который является основным компонентом де-нола, накапливаться в органах млекопитающих: желудке, почках, печени, сердце и селезенке. В костной ткани металл обнаружен не был, что можно объяснить растворимостью его сульфата и большой разницей ионных радиусов  $\text{Bi(III)}$  и  $\text{Ca(II)}$ . Наибольшие концентрации металла выявлены в почках: 9,5 мг/кг после приема терапевтических доз и 18,7 мг/кг при увеличении этой дозы в 2 раза, наименьшие в селезенке - до 1,7 мг/кг при увеличении дозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что висмут, который является металлическим ядом, не только всасывается в кровь из ЖКТ после приема де-нола, но разносится по всему организму и накапливается в органах. Этот факт,

де-нолом до 14 дней на фоне роста ДЛМ выявлено значительное падение численности общей кладки (на 46%), наблюдалось максимальное угнетение эмбриогенеза. Увеличение дозы де-нола в 2 раза показало рост ДЛМ в не зависимости от времени экспозиции.

В костном мозге млекопитающих де-нол показал наибольший кластогенный эффект среди изученных препаратов - выявлен рост ХА при воздействии

очевидно, обуславливает обнаруженные в ходе экспериментов его генотоксические свойства.

Таблица 1

Содержание висмута в органах млекопитающих (средние значения)

№	вариант эксперимента	желудок мг/кг	почки мг/кг	печень мг/кг	сердце мг/кг	селезенка мг/кг	костная ткань мг/кг
1	де-нол	6,4	9,5	3,1	1,9	следы	-
2	де-нол+ омеппразол	1,8	2,7	0,4	5,4	2,6	-
3	де-нол+ амоксциллин	6,9	2,9	1,4	8,7	6,6	-
4	де-нол+ омеппразол+ амоксциллин	0,9	2,8	0,1	0,4	следы	-
5	де-нол+ амоксциллин+ метронидазол	1,9	10,8	1,2	17,2	следы	-
6	де-нол+ омеппразол+ амоксциллин+ метронидазол	5,8	7,5	0,8	17,6	следы	-

Действие полусинтетического антибиотика амоксициллина на ДЛМ у дрозофил зависело от времени экспозиции: в течение 24 часов достоверного роста не выявлено даже при увеличении терапевтической дозы в 2 раза ( $p>0,05$ ), однако с увеличением времени воздействия до 7 дней уровень гибели эмбриональных клеток вырос под действием терапевтической дозы до  $1,17\pm 0,6\%$  и при увеличении ее в 2 раза до  $1,9\pm 0,8\%$  при  $p<0,05$ .

В экспериментах на млекопитающих амоксициллин проявил кластогенный эффект, вызвав рост ХА до  $6\pm 0,6\%$ , при  $p<0,001$ . Наблюдались аберрации как хроматидного так и хромосомного типов (рис. 5, 6). Анализируя полученные результаты можно сказать, что мутагенная активность амоксициллина ниже, чем у де-нола.

Одним из наиболее распространенных и широко используемых антипротозойных средств является производное 5-нитроимидазола метронидазол. Сведения о его генотоксичности противоречивы и неоднозначны. В наших экспериментах на крысах и дрозофилах

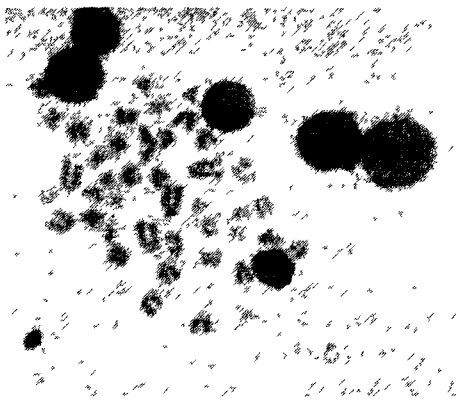


Рис. 5. Нормальный кариотип крысы.

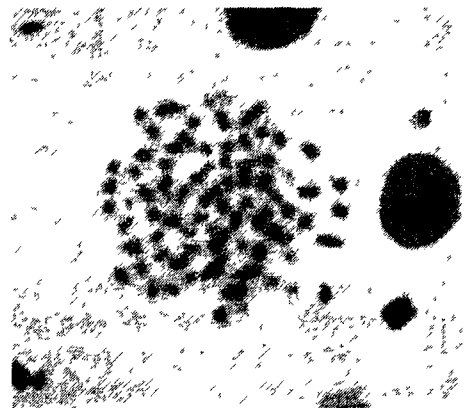


Рис. 6. Кариотип крысы (полиплоидия).

метронидазол проявил кластогенный эффект.

Уровень ДЛМ выявленный после кормления самцов дрозофил метронидазолом зависел от времени воздействия и дозы препарата, с увеличением которых наблюдался рост эмбриональной гибели.

В костном мозге млекопитающих эта тенденция сохранилась: суточная доза 6,75 мг индуцировала рост ХА до  $8 \pm 0,7\%$  при  $p < 0,001$ , увеличение дозы в 2 раза привело к росту ХА до  $12 \pm 1,3\%$  при  $p < 0,001$ . Повреждение наследственного аппарата шло на всех стадиях митоза.

Деринат не индуцировал ДЛМ у дрозофил, однако способствовал росту ХА в костном мозге крыс до  $5 \pm 0,5\%$  при  $p < 0,001$ .

### **Изучение кластогенных свойств и биоаккумуляции лекарственных препаратов при комплексном применении**

Так как в терапевтической практике применяются различные схемы, то мы исследовали их влияние на наследственные структуры.

Цитогенетическое исследование бинарных комплексов показало, что индуцируемый уровень ХА зависит от входящих в состав комплекса лекарств. Наименьшим кластогенным эффектом обладали комплексы "омепразол+амоксациллин" и "амоксациллин+метронидазол", уровень ХА вырос по сравнению с контролем на 1%. Наибольшее мутагенное действие выявлено у комплекса "де-нол+метронидазол", когда уровень ХА вырос до  $8 \pm 0,7\%$ . Другие изученные двойные комплексы: "омепразол+де-нол", "де-нол+амоксациллин" и "омепразол+метронидазол" индуцировали рост ХА

до  $5 \pm 0,5\%$  при  $p < 0,001$  (рис. 7).

Анализ влияния совместного приема де-нола с омепразолом и де-нола с

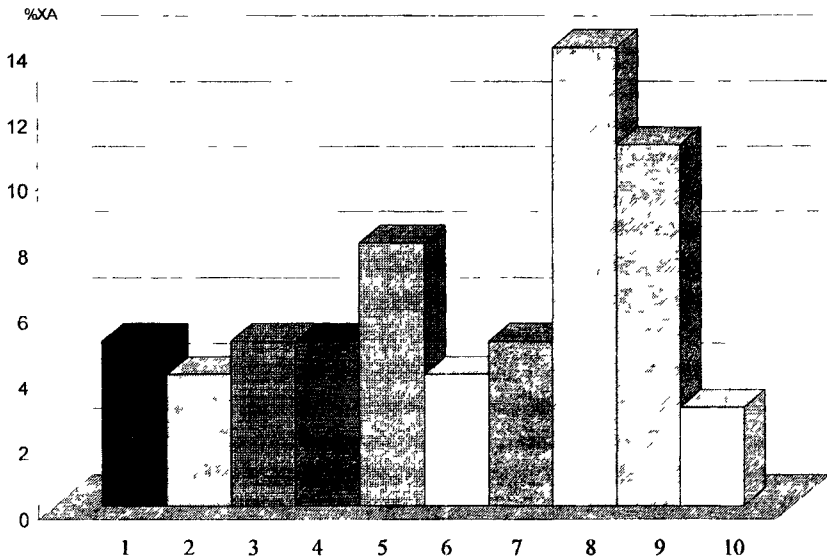


Рис. 7. Индукция ХА препаратами при комплексном применении у млекопитающих. 1 - Омепразол+де-нол; 2 - Омепразол+амоксциллин; 3 - Омепразол+метронидазол; 4 - Де-нол+амоксциллин; 5 - Де-нол+метронидазол; 6 - Амоксициллин+метронидазол; 7 - Омепразол + де-нол + амоксициллин; 8 - Де-нол + амоксициллин + метронидазол; 9 - Омепразол + де-нол + амоксициллин + метронидазол; 10 - Контроль.

амоксициллином на концентрации висмута в органах млекопитающих показал снижение способности металла, при комплексном введении препаратов, накапливаться в почках и печени (в почках в 3,5 и 3,3 раза; в печени в 7,8 и 2,2 раза соответственно) на фоне контроля, и рост содержания его в сердце и селезенке (в сердце в 2,8 и 4,6 раз; концентрации висмута в селезенке выросли со следовых показателей до 2,6 и 6,6 мг/кг соответственно).

Исследование тройных комплексов "де-нол+амоксциллин+метронидазол" (комплекс 3) и "омепразол+де-нол+амоксциллин" (комплекс 2) выявило высокую мутагенную активность первого, во всех изученных тестах, и наименьшую способность к повреждению наследственных структур второго комплекса.

Комплекс 3 индуцировал рост ДЛМ у дрозофил от  $1 \pm 0,7\%$  до  $2,1 \pm 1,2\%$  в

зависимости от дозы и времени экспозиции. В клетках костного мозга крыс комплекс 3 индуцировал рост ХА до  $14 \pm 1,3\%$  при  $p < 0,001$  под действием терапевтических доз и  $18 \pm 1,4\%$  при  $p < 0,001$  при увеличении дозы в 2 раза, что свидетельствует об эффекте синергизма. При исследовании данного комплекса был выявлен рост полиплоидных клеток, что говорит о влиянии комплекса 3 на нормальное распределение генетического материала между дочерними клетками в ходе митотического деления клетки. Кроме того, у крыс после внутрижелудочного введения им комплекса 3 в течение 7 дней, был выявлен рост клеток с множественными повреждениями хромосом, однако при исследовании других схем, включая тетракомплекс, таких повреждений метафазных пластинок обнаружено не было. Экспериментально было доказано, что способность висмута к выведению из организма после внутрижелудочного введения крысам комплекса 3 наименьшая (рис. 8)

Таким образом, в данном сочетании (де-нол+амоксациллин+метронидазол) препараты проявляют максимальную мутагенную активность в сравнении с другими изученными комплексами.

Электрохимический анализ показал большую способность висмута накапливаться в органах млекопитающих после приема комплекса 3 во всех и с с л е д о в а н н ы х образцах.

С увеличением дозы этого комплекса накопление висмута в почках выросло незначительно, тогда как в печени и сердце концентрации металла выросли почти в 2 раза, в селезенке следовых данных до 7,1 мг/кг (табл. 2). Эти данные также свидетельствуют о высоком токсичном действии входящих в комплекс 3 препаратов ( д с - н о л а ,

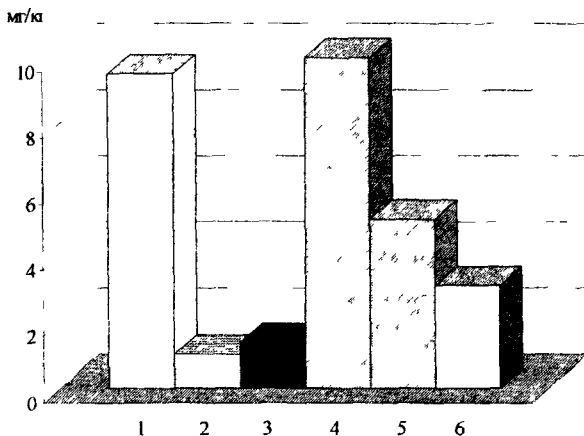


Рис. 8. Остаточные концентрации висмута в почках. 1 - Де-нол; 2 - Де-нол, ветарон (остаточные концентрации); 3 - Де-нол, димефосфон (остаточные концентрации); 4 - Комплекс 3; 5 - Комплекс 3 (остаточные концентрации); 6-Комплекс 3+ветарон (остаточные концентрации).

амоксциллина и метронидазола).

Второй изученный тройной комплекс "омепразол+де-нол+метронидазол" напротив проявил наименьшую способность индуцировать рост ДЛМ у дрозофил (до  $1 \pm 0,5\%$ ) и ХА в костном мозге млекопитающих ( $5 \pm 0,5\%$  -  $6 \pm 0,6\%$  в зависимости от вводимой дозы).

Способность висмута накапливаться в органах млекопитающих, получавших этот комплекс, значительно отличалась не только от концентраций обнаруживаемых после введения других комплексов, но и от содержания металла после воздействия де-нола в отдельности (в почках в 3 раза, в печени в 2,5 раз, в сердце в 4,8 раз), и была ниже, чем в других опытах.

Таблица 2

Средние концентрации висмута в органах при увеличении дозы

№	вариант эксперимента	желудок мг/кг	почки мг/кг	печень мг/кг	сердце мг/кг	селезенка мг/кг	костная ткань мг/кг
1	де-нол	6,4	9,5	3,1	1,9	следы	-
2	де-нол (двойная доза)	14,8	18,7	4,7	3,2	1,7	-
3	комплекс 2	0,9	2,8	0,1	0,4	следы	-
4	комплекс 2 (двойные дозы)	5,2	7,4	0,9	18,3	следы	-
5	комплекс 3	1,9	10,8	1,2	17,2	следы	-
6	комплекс 3 (двойные дозы)	5,9	11,2	2,2	29,7	7,1	-
7	комплекс 4	5,8	7,5	0,8	17,6	следы	-
8	комплекс 4 (двойные дозы)	7,0	19,1	2,5	37,5	6,59	-

С увеличением дозы в 2 раза эта закономерность сохранилась, обнаруживаемые концентрации металла были сопоставимы с воздействием терапевтическими дозами других изученных комплексов.

Таким образом, можно сказать, что комплекс "омепразол+де-нол+метронидазол" обладает относительно низкой мутагенной активностью по сравнению с другими комплексами. Висмут при введении де-нола

совместно с омепразолом и метронидазолом проявил наименьшую способность к накоплению в органах. Следовательно, можно рекомендовать этот комплекс для практического применения как менее генотоксичный.

Тетракомплекс "омепразол+де-нол+амоксциллин+метронидазол" показал высокую мутагенную активность как в тесте на индукцию ДЛМ у дрозофил (от  $0,9 \pm 0,3\%$  до  $2,7 \pm 0,7\%$  в зависимости от дозы и времени экспозиции), так и в костном мозге млекопитающих ( $11 \pm 1,2$  и  $15 \pm 1,5$  в зависимости от дозы, при  $p < 0,001$ ). В данном сочетании препараты, входящие в состав комплекса, проявили высокую мутагенную активность. Генотоксические свойства комплекса выросли с увеличением дозы с  $11 \pm 1,2\%$  ХА до  $15 \pm 1,4\%$ , в спектре ХА при этом наблюдалось значительное снижение количества одиночных фрагментов с 45% до 13%, другие патологии хромосом, которые являются более сложными, выросли. Наиболее значимый рост был выявлен для полиплоидных клеток - с 9% до 30%, что свидетельствует о том, что с увеличением дозы комплекса, мутагенная активность его растет и идет нарушение нормального митотического цикла, возможно, происходит блокирование ахроматического аппарата клетки. Были обнаружены такие патологии хромосом как транслокации и дицентрические слияния, которые терапевтическими дозами комплекса не индуцировались. На это обстоятельство следует обратить внимание при назначении повышенных доз препаратов, которые обладают большим кластогенным эффектом.

Однако обнаруживаемый мутагенный эффект тетракомплекса был ниже, чем при применении тройного комплекса "де-нол+амоксциллин+метронидазол", что свидетельствует о модификации генотоксических свойств при взаимодействии лекарственных препаратов.

Электрохимический анализ показал высокую способность висмута к накоплению в органах млекопитающих при введении тетракомплекса, которая росла с увеличением вводимой дозы.

Анализируя полученные в ходе исследования результаты, следует отметить относительно низкую способность индуцировать ХА у всех изученных двойных комплексов за исключением "де-нола+метронидазола". Также следует подчеркнуть низкую мутагенную активность препаратов при тройном сочетании в комплексе "омепразол+де-нол+амоксциллин" и максимальную в комплексе "де-нол+амоксциллин+метронидазол". Исследование кластогенного эффекта тетракомплекса выявило высокую мутагенную активность входящих в его состав препаратов.



### Анализ протекторных свойств антиоксидантов

Антимутагенная способность димефосфона, витамина С и ветафона в тест-системе *Drosophila melanogaster* зависела от типа медикаментации, исследуемого препарата и комплекса. Димефосфон проявил защитные свойства при совместном кормлении им с де-нолом, при введении его до омепразола и амоксициллина, и после комплекса 3. В других вариантах димефосфон проявил комутагенные свойства и способствовал росту уровня ДЛМ (с комплексами 3, 4, метронидазолом и др.).

Витамин С проявил антимутагенные свойства при кормлении им совместно с омепразолом, при введении после комплекса 3 и во всех экспериментах с амоксициллином. В других исследованиях протекторные свойства витамина были не столь выражены, а в некоторых вариантах сменялись на комутагенные (с комплексами 3 и 4 и др.). Таким образом, в зависимости от типа медикаментации антиоксидантные свойства димефосфона и витамина С в тест-системе *Drosophila melanogaster* могли сменяться на прооксидантные.

Ветарон проявил наиболее выраженные антимутагенные свойства среди изученных антиоксидантов, снизив уровень ДЛМ индуцируемый лекарственными препаратами в большинстве экспериментов (рис. 9, 10).

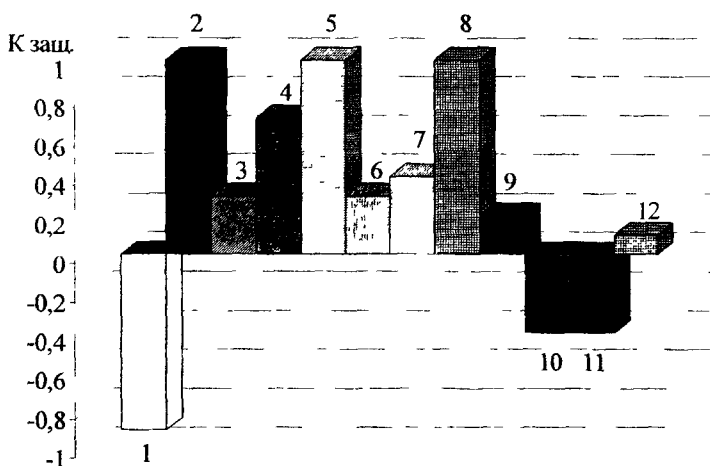


Рис. 9. Влияние ветафона на уровень ДЛМ. 1 - Омепразол+ветафон; 2 - Омепразол, ветафон; 3 - Ветафон, омепразол; 4 - Де-нол+ветафон; 5 - Де-нол, ветафон; 6 - Ветафон, де-нол; 7 - Амоксициллин+ветафон; 8 - Амоксициллин, ветафон; 9 - Ветафон, амоксициллин; 10 - Метронидазол+ветафон; 11 - Метронидазол, ветафон; 12 - Ветафон, метронидазол.

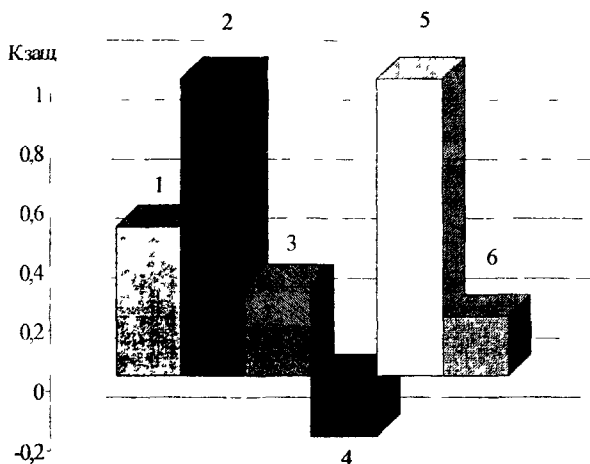


Рис. 10. Влияние ветарона на уровень ДЛМ при комплексном применении лекарств. 1 - Комплекс 3+ветарон; 2 - Комплекс 3, ветарон; 3 - Ветарон, комплекс 3; 4 - Комплекс 4+ветарон; 5 - Комплекс 4, ветарон; 6 - Ветарон, комплекс 4.

Выраженного комутагенного эффекта при его применении не наблюдалось. Следовательно, можно сказать, что ветарон тест-системе *Drosophila melanogaster* проявил наибольшие защитные свойства.

Цитогенетический анализ костного мозга животных, получавших ветарон, также выявил его большую способность проявлять

антимутагенные свойства. Внутривентрикулярное введение подопытным животным ветарона, в состав которого входят природные витамины А и Е, в течение 7 дней способствовало снижению хромосомных повреждений до  $1 \pm 0,4\%$ , тогда как в контрольной группе был зафиксирован уровень ХА равный  $3 \pm 0,3\%$ . При введении ветарона на фоне витамина С уровень мутирования снизился до  $2 \pm 0,9\%$ , что на 1% ниже контрольных данных, однако проявленный антимутагенный эффект в этих экспериментах был ниже, чем при введении ветарона без витамина С. Известно, что лабораторная крыса способна синтезировать в день 2000 мг (2 г) аскорбиновой кислоты (Девис М., Остин Дж., Патридж Д. 1999) и, следовательно, не испытывает недостатка в витамине С. С этим фактом может быть связано то, что ветарон без витамина С проявил более выраженный антимутагенный эффект, так как витамин С синтезируется в организме крыс, то его избыток при прочих неизменных условиях может приводить к смене антиоксидантных свойств на прооксидантные.

Витамины снижали уровень кластогенных эффектов в костном мозге индуцированный комплексами "де-нол+амоксциллин+метронидазол" с

$14 \pm 0,4\%$  до  
 $8 \pm 0,7\%$  при  
 $p < 0,001$  и  
 "омеэспразол+де-  
 нол+амоксациллин+  
 метронидазол" с  
 $11 \pm 0,9\%$  до  $7 \pm 0,7\%$   
 при  $p < 0,01$ . Эти  
 данные позволяют  
 указать на  
 существенную  
 роль витаминов (Е,  
 каротиноидов и С)  
 в регуляции  
 мутагенеза (рис.  
 11).

Результаты электрохимического анализа выявили способность ветарона, витамина С и димефосфона снижать уровень накопления висмута в органах млекопитающих (рис. 12, 13).

Обнаруживаемые остаточные концентрации металла значительно снижаются при введении де-нола с антиоксидантами.

Таким образом, можно сказать, что ветарон и витамин С снижают уровень ХА индуцированный лекарственными препаратами, антиоксиданты

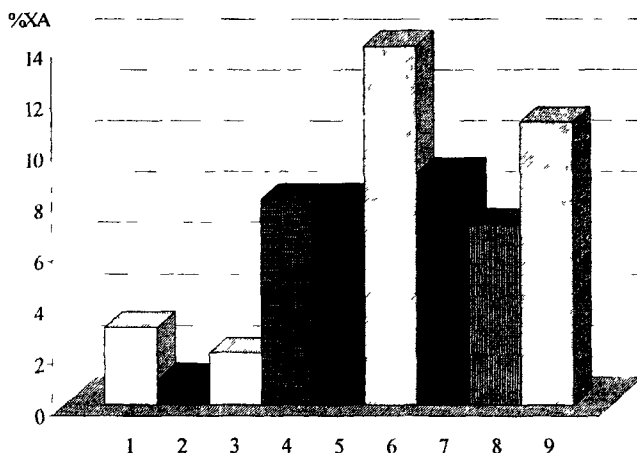


Рис. 11. Влияние витаминов на уровень ХА у млекопитающих. 1 - Контроль; 2 - Ветарон; 3 - Ветарон+вит. С; 4 - Комплекс 3+ветарон; 5 - Комплекс 3+ветарон+вит. С; 6 - Комплекс 3; 7 - Комплекс 4+ветарон; 8 - Комплекс 4+ветарон+вит. С; 9 - Комплекс 4.

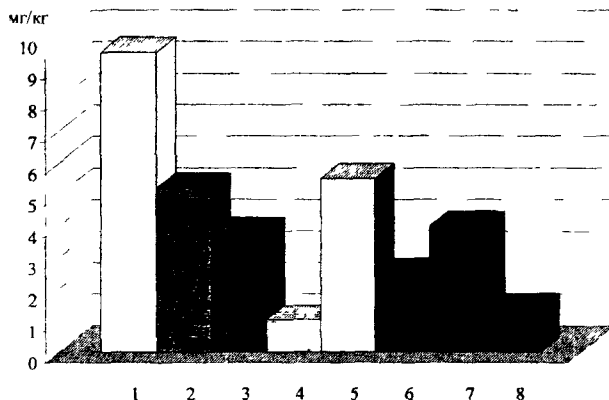


Рис. 12. Влияние антиоксидантов на накопление висмута в почках. 1 - Де-нол; 2 - Де-нол+ветарон; 3 - Ветарон, де-нол; 4 - Де-нол, ветарон; 5 - Де-нол+ветарон+витамин С; 6 - Де-нол+димефосфон; 7 - Димефосфон, де-нол; 8 - Де-нол, димефосфон.

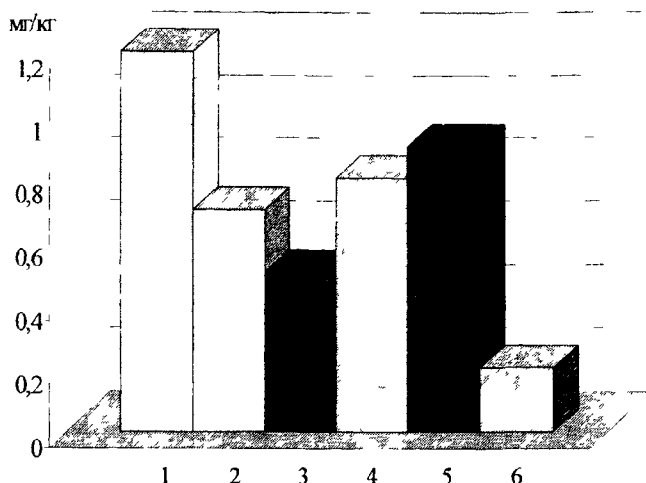


Рис. 13. Влияние витаминов на накопление висмута в печени. 1 - Комплекс 3; 2 - Комплекс 3+ветарон; 3 - Комплекс 3+ветарон+витамин С; 4 - Комплекс 4; 5 - Комплекс 4+ветарон; 6 - Комплекс 4+ветарон+витамин С.

способствуют меньшему накоплению висмута в органах, а также его выведению из организма. Эти факты могут служить основанием для рекомендации приема витаминов с целью снятия мутагенных эффектов от применения лекарственных веществ.

### Хромосомный дисбаланс у детей, инфицированных НР

Кариотипирование детей, инфицированных НР, выявило у них рост среднего уровня ХА в 4,6 раз, анализ спектра ХА показал рост полиплоидных

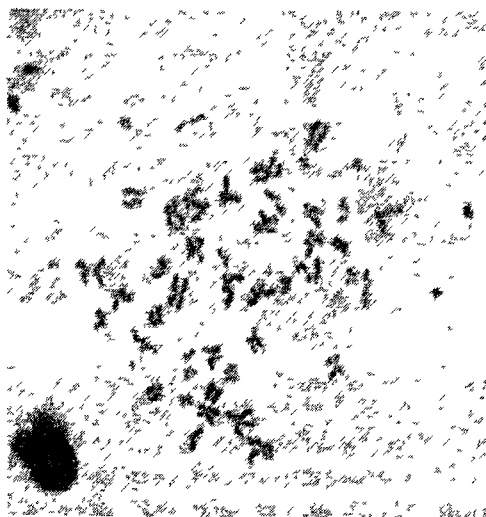


Рис. 14. Кариотип человека (норма).

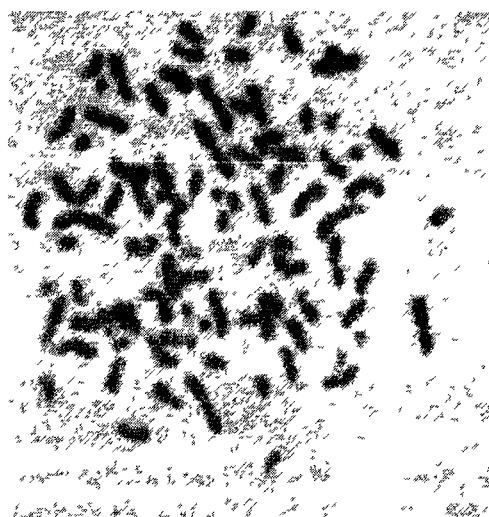


Рис. 15. Кариотип человека (полиплоидия).

клеток до 17% и слияний сестринских хроматид до 7% (рис. 14, 15). Наблюдаемые события свидетельствуют о мутагенном действии инфекга и продуктов его метаболизма на организм, то есть имеет место биологический мутагенез (рис. 16).

Лекарственные препараты, применяемые в ходе лечения, способствовали росту

среднего уровня ХА у детей еще в 1,7 раз. Спектр хромосомных патологий после терапии значительно расширился (рис. 17, 18), появились такие

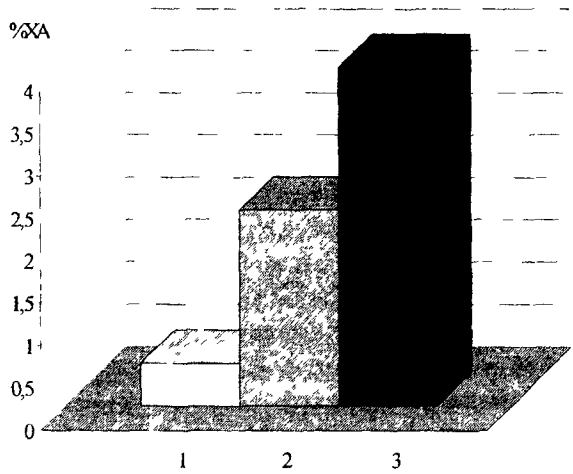


Рис. 16. Уровень ХА у детей. 1 - Здоровые; 2 - Инфицированные ХР; 3 - Инфицированные НР после лечения.



Рис. 17. Кариотип человека. Мультиабберрантная клетка. Показаны кольцевая хромосома и парный фрагмент.

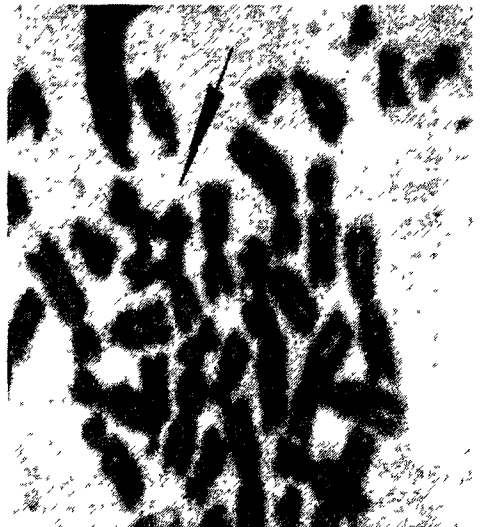


Рис. 18. Кариотип человека. Показан межхромосомный обмен.

патологии как транслокации, дицентрические слияния, кольцевые хромосомы и др. (рис. 19, 20) Следовательно, имеет место кому гагенное взаимодействие НР и лекарств.

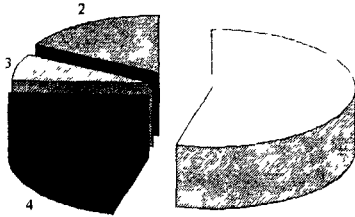


Рис.19. Спектр ХА у детей, инфицированных НР до лечения. 1 - Одиночные фрагменты; 2 - Парные фрагменты; 3 - ССХ; 4 - Полиплоидии.

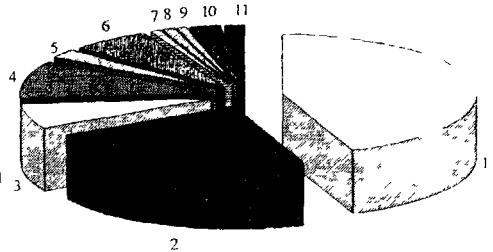


Рис. 20. Спектр ХА у детей, инфицированных НР после лечения. 1 - Одиночные фрагменты; 2 - Парные фрагменты; 3 - ССХ; 4 - Полиплоидии; 5 - Дицентрическое слияние; 6 - Делеция; 7 - Пульверизация; 8 - Кольцо; 9 - Трисомия; 10 - Транслокация; 11 - Эндоредупликация.

Ветарон проявил большие антимуtagenные свойства, чем димефосфон. Терапия совместно с ветароном способствовала снижению среднего уровня ХА с  $4 \pm 1,7\%$  до  $3,2 \pm 1,39\%$  при  $p < 0,05$ , тогда как димефосфон снизил средний уровень мутирования на  $0,4\%$ , при этом у одного ребенка наблюдался рост ХА на  $2\%$ , что говорит об избирательном действии препарата и широком полиморфизме генотипов обследуемых детей.

### Индукция окислительного стресса инфектом и его модификация терапией у детей

Анализ активности ферментов антиоксидантной системы: церулоплазмينا и каталазы, в группе инфицированных НР детей, выявил рост их активности (рис. 19, 20). Этот факт свидетельствует о наличии у больных детей окислительного стресса, что можно объяснить, например, тем, что в биопсийном материале ангрального отдела желудка у пациентов с гастритом, сопровождающимся

инфекцией *Helicobacter pylori*, было установлено повышение уровня 8-гидрокси-2'-диоксигуанозин (8OHdG). Также известно, что 8OHdG является специфичным маркером и свидетельствует о свободнорадикальной атаке ДНК, он же приводит к возникновению точечной мутации в результате трансверсии G> T оснований (Дурнев А. Д., Середенин, 1998). Этими событиями можно объяснить биологический мутагенез у детей, инфицированных НР, который был зафиксирован при их кариотипировании.

Эрадикационная терапия приводит к снижению средней активности церулоплазмينا (на 27,2 мг/л) и каталазы (на 0,73), что говорит о снижении СРР (рис. 19, 20). Однако у некоторых больных снижение активности ферментов выявлено не было, это связано, очевидно, с не эффективностью антихеликобактерной терапии, с тем, что окислительный стресс у них не был снижен. Данный факт может помочь при прогнозе заболевания.

Таким образом, в результате исследований выявлен рост средней активности каталазы и церулоплазмينا у инфицированных детей в острую фазу заболевания и снижение ее после лечения.

С целью выявления отдаленных последствий лекарственных веществ и инфекта проводили кариотипирование и исследование состояния антиоксидантной системы через год после лечения, в период ремиссии

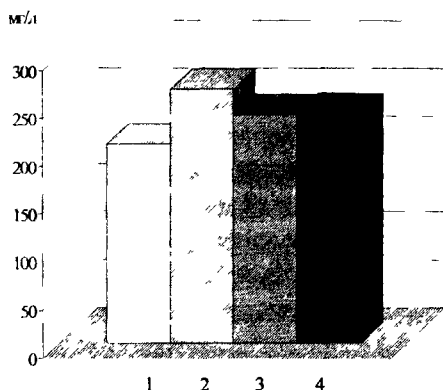


Рис. 19. Средний уровень активности ЦП у детей. 1 - Здоровые; 2 - Инфицированные ХР; 3 - Инфицированные НР после лечения; 4 - Инфицированные НР через год после лечения.

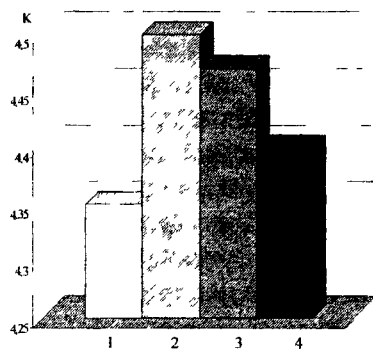


Рис. 20. Показатель каталазы у детей. 1 - Здоровые; 2 - Инфицированные ХР; 3 - Инфицированные НР после лечения; 4 - Инфицированные НР через год после лечения.

болезни. Цитогенетический анализ показал рост уровня ХА по сравнению со здоровыми детьми, но его снижение по сравнению с результатами детей в острую фазу болезни и особенно после лечения.

Анализ ферментов антиоксидантной системы у детей, инфицированных НР в стадию ремиссии, показал рост средней активности церулоплазмينا и каталазы относительно здоровых детей, но снижение ее по сравнению с уровнем, который был зафиксирован у детей в острую фазу заболевания. Таким образом, у детей в стадию ремиссии наблюдается снижение окислительного стресса, но, тем не менее, он имеет место.

## **ВЫВОДЫ**

В диссертации на базе теоретических и экспериментальных работ с использованием цитогенетического и биохимического анализа, учета доминантных леталий, методов математической статистики, экотоксикологических исследований предложены перспективные решения актуальной проблемы сохранения генетических ресурсов. Основные научные выводы и практические результаты работы заключаются в следующем.

1. Лекарственные препараты омепразол, де-нол, амоксициллин, метронидазол во всех применяемых тест-системах проявили мутагенную активность. Выявлены закономерности мутагенного действия от схемы введения, дозы, времени экспозиции, использования различных схем введения. Наименее выраженную мутагенную активность проявил тройной комплекс "омепразол+де-нол+амоксициллин". Деринат в исследованиях на *Drosophila melanogaster* не проявил повреждающего действия, но в костном мозге млекопитающих вызвал рост хромосомных aberrаций (ХА) до 5%.

2. Ветарон проявил наиболее выраженные антимутагенные свойства в доминантно-летальном тесте на *Drosophila melanogaster*, которые зависели от схемы введения препаратов, дозы и типа медикаментации. У витамина С и димефосфона в этом тесте при некоторых типах медикаментации наблюдалась инверсия антиоксидантных свойств на прооксидантные. Витаминные препараты ветарон и аскорбиновая кислота способны значительно снижать уровень ХА в клетках костного мозга крыс, индуцированный комплексами "де-нол+амоксициллин+метронидазол" при  $p < 0,001$  и "омепразол+де-нол+амоксициллин+ метронидазол" при  $p < 0,01$ .

3. Выявлена способность висмута к накоплению в органах млекопитающих (крыс), которая зависела от схемы введения и дозы. Висмут был выявлен во всех исследованных образцах за исключением костной ткани. Наибольшее



содержание данного металла при отдельном введении де-нола выявлено в почках и желудке, при комплексном применении лекарств значительно возрастал уровень обнаруживаемых концентраций висмута в сердце. Показан значительный рост способности висмута к накоплению в органах с увеличением вводимой дозы де-нола в 2 раза, как при отдельном введении, так и при комплексном применении де-нола с другими лекарственными формами.

4. Из исследованных схем, наименьшую способность к накоплению висмут проявил при введении де-нола в комплексе с омепразолом и амоксициллином. Так как в сочетании с этими препаратами висмут проявил значительно более низкую способность к накоплению в органах млекопитающих, а также мутагенную активность, то его применение в терапевтической практике является предпочтительным по сравнению с другими комплексами.

5. Ветарон, витамин С и димефосфон способствовали снижению накопления висмута в органах и тканях подопытных животных как при введении де-нола в отдельности так при комплексном применении.

6. Анализ остаточных концентраций висмута показал, что металл со временем выводится из организма крыс и через неделю его уровень значительно падает. Димефосфон и ветарон способствуют активизации этого процесса, ускоряя скорость выведения висмута.

7. Показан генотоксический эффект *Helicobacter pylori* (НР) у детей и комутагенное взаимодействие его с лекарственными препаратами. Ветарон снижал уровень этих нежелательных взаимодействий.

8. Отмечена повышенная активность ферментов антиоксидантной системы (каталазы и церулоплазмينا) у детей, инфицированных НР. Проведение эрадикационной терапии способствует частичной нормализации показателей. В стадию ремиссии болезни наблюдается снижение активности ферментов. Полученные данные могут использоваться в прогностических целях.

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Чопикашвили Л.В., Дзалаева З., Чшиева Ф.Т. // Биологический мутагенез в организме детей, инфицированных *Helicobacter pylori* // V Международная конференция: "Устойчивое развитие горных территорий: проблемы и перспективы интеграции науки и образования". Владикавказ. 2004. С. 443-444.

2. Сысоева С.Н., Чшиева Ф. Т., Латко Н.Д. // Спонтанный мутагенез как

показатель антропогенного воздействия на генофонд населения г. Владикавказа // V Международная конференция: "Устойчивое развитие горных территорий: проблемы и перспективы интеграции науки и образования". Владикавказ. 2004. С. 369.

3. Чшиева Ф.Т., Пухаева Л.Г., Фарниева С., Латко Н. // Оценка мутагенных эффектов ряда лекарственных препаратов, используемых при лечении детей, инфицированных *Helicobacter pylori*. // Всероссийская научная конференция "Актуальные проблемы экологии и сохранения биоразнообразия России". Владикавказ. 2005. С. 189-190.

4. Чшиева Ф.Т., Дзалаева З., Руруа Ф.К. // Хромосомный дисбаланс, детерминированный инфектом *Helicobacter pylori* и пути его модификации / // Всероссийская научная конференция "Актуальные проблемы экологии и сохранения биоразнообразия России". Владикавказ. 2005. С. 190-192.

5. Чшиева Ф.Т., Чопикашвили Л.В. // Генотоксическое действие некоторых лекарственных препаратов, применяемых с целью эрадикации *Helicobacter pylori* // Вторая Всероссийская научно-практическая конференция "Окружающая среда и здоровье". Пенза. 2005. С. 119-120.

6. Чшиева Ф.Т. // Экоотоксическое действие висмутсодержащего препарата (де-нол). // Вторая Всероссийская научно-практическая конференция "Окружающая среда и здоровье". Пенза. 2005. С. 120-122.

7. Чшиева Ф.Т., Чопикашвили Л.В. Модификация кластогенного процесса в костном мозге млекопитающих // Материалы пленума «Экологически обусловленные ущербы здоровью: методология, значения и перспективы оценки». Москва, 2005. С. 518-520.

8. Скупневский С.В., Чшиева Ф.Т. О возможности применения метода полярографии при проведении фармакокинетических исследований висмутсодержащих препаратов // Материалы пленума «Экологически обусловленные ущербы здоровью: методология, значения и перспективы оценки». Москва, 2005. С. 476-478.

Сдано в набор 18.04.2006 г., подписано в печать 27.04.2006 г.  
Гарнитура Таймс Печать трафаретная Формат 60х84 1/16  
Бумага офсетная Усл. печ. л. 1,25 Тираж 100 экз. Заказ № 27

Типография ООО НПКП «МАВР», Лицензия Серия ПД № 01107,  
362040 г. Владикавказ, ул. Августовских событий 8 тел. 44-19-31

2006A  

---

9837

**# - 9837**