

Г. Н. Золотарева, Л. М. Фонштейн, Э. Н. Исхакова

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПСИХОТРОПНОГО ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ПРЕПАРАТА ТЕГРЕТОЛА (КАРБАМАЗЕПИНА)

Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям химических соединений (Купавна, Московская область)

Введение. Исследование потенциальной генетической активности лекарственных средств является одним из важных аспектов проблемы генетических последствий загрязнения среды обитания человека. Существенное значение имеет при этом разработка подходов к созданию рациональной системы испытаний. Число лекарств, которые необходимо испытать на мутагенную активность, очень велико. Отсюда возникает задача выработки стратегических подходов к очередности испытания препаратов. Анализ данных литературы, приведенных в обзоре Бартельмесса /1/, показал, что уровень совпадения результатов определения мутагенной активности на модельных объектах и выших довольно высок /2/. Поэтому получение данных о наличии мутагенной активности какого-либо препарата на модельном объекте наряду с учетом масштабов его применения и ряда других соображений можно рассматривать как сигнал для проведения развернутого исследования мутагенной активности этого препарата.

Данные о генетической активности группы психотропных препаратов, многие из которых применяются больными с младенческого возраста в течение всей жизни, не многочисленны /3/. Наше внимание привлекла работа Гросса и соавторов /4/, в которой сообщалось о том, что при лечении беременных женщин комбинациями ряда противосудорожных препаратов наблюдались перестройки в лейкоцитах периферической крови женщин и новорожденных. Случаи монотерапии были очень редкими, и авторы не смогли сделать вывода о том, какие из применявшихся препаратов были ответственны за наблюдавшийся цитогенетический эффект.

Проведенный нами предварительный эксперимент по изучению влияния использовавшихся в работе Гросса и др. /4/ препаратов на уровень аберраций хромосом в клетках растений показал, что некоторые из них индуцируют хромосомные мутации. Одним из этих препаратов был тегретол (карбамазепин). Последующий анализ выявил мутаген-

ную активность тегретола на млекопитающих в тесте летальности и при исследовании метафаз клеток костного мозга в условиях *in vivo*. В данной работе приводятся результаты этих экспериментов.

Материал и методика. Тегретол (карбамазепин) — 5карбамоил-5-н-добенз (*i.f'*) азебин — таблетированный препарат фирмы Гейги (Швейцария) с содержанием препарата в таблетке 200 мг.

Цитогенетическую активность исследуемых препаратов (тегретол, бензонал, элениум, люминал, гексамидин, тавор, дифенин, суксилеп) на растительном объекте проводили путем учета aberrантных анафаз в проростках *Allium fistulosum* L. Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге в термостате при 24°C. Через 64 час. от начала замачивания семян отбирали проростки длиной 0,5–0,6 см и в течение двух часов обрабатывали изучаемыми препаратами в концентрации 0,1 и 1 мг/мл. Аминазин и тавор растворяли в воде, остальные препараты — в диметилсульфоксиде (ДМСО). Материал фиксировали смесью Карнуа, препараты окрашивали кармином.

Учет хромосомных aberrаций *in vivo* и доминантный летальный тест проводился на мышах межлинейных гибридов 1 поколения СВА х С 57 В $\bar{C}$ /6, весом 20–25 г, полученные из питомника Столбовая. Препарат вводили животным в дозах 250 мг/кг ($\sim \frac{1}{2}$ дозы /50), 125 мг/кг и 20 мг/кг веса. Последняя доза близка к максимально-переносимой суточной дозе для человека. Препарат, разведенный в 1% растворе крахмала, вводили перорально, однократно. Объем введения — 0,5 мл.

Метафазный анализ клеток костного мозга проводился на 24 час. после введения препаратов. Препараты готовили по модифицированной А. М. Малащенко и соавт. методике /5–6/.

Учет хромосомных aberrаций соответствовал критериям, предложенным Н. П. Бочковым и соавт. /7/. В каждом опытном и контрольном варианте было не менее 4 животных, от каждого готовилось 3–4 стекла и анализировалось по 100–150 метафазных пластинок. Окраска препаратов проводилась азур-эозином.

Индукция тегретолом доминантных летальных мутаций изучалась по общепринятой методике /8, 9/ с учетом чувствительности различных стадий сперматогенеза.

Сразу после введения препарата к самцам подсаживали по 4–5 виргильных самок (те же межлинейные гибриды), которых заменяли новыми через неделю. Замену самок вели в течение 7 недель. Отсаженных самок вскрывали на 14–16 день беременности. При вскрытии подсчитывали живые эмбрионы, мертвые эмбрионы и число желтых тел в яичниках. На основании этих данных вычисляли показатели пре- и постимплантационной гибели, число живых и мертвых эмбрионов на самку и уровень индуцированной летальности.

Экспериментальная часть и обсуждение. Как видно из табл. 1, цитогенетически активными на растениях оказались люминал, бензонал, элениум и тегретол. Обращают на себя внимание данные по гексамидину: препарат вдвое снижал уровень естественного мутирования. Проведенный предварительный эксперимент показал, что гексамидин снижает уровень aberrантных клеток у *Allium*

fistulosum L., обусловленный воздействием на них тегретолом и бензоналом. Эти препараты были отобраны для дальнейшего развернутого исследования. В данной работе приведены результаты изучения генетической активности тегретола.

Таблица 1

Влияние противосудорожных препаратов на уровень перестроек хромосом в клетках *Allium fistulosum* L.

Препараты	Концентрация, мг/мл	Число проанализированных корешков	Количество просмотренных анафаз	Измененные анафазы		
				число	% $\pm m$	
Тегретол	1,0	15	428	191	44,6 $\pm$ 2,4	
Тегретол	0,1	10	408	154	47,7 $\pm$ 2,4	
Бензонал	1,0	15	426	175	41,1 $\pm$ 2,4	
Элениум	1,0	15	403	192	47,6 $\pm$ 2,5	
Люминал	1,0	22	404	98	24,2 $\pm$ 2,1	
Гексамидин	1,0	9	504	33	6,5 $\pm$ 1,1	
Тавор	1,0	12	413	65	15,7 $\pm$ 1,8	
Дифенин	1,0	8	613	67	10,9 $\pm$ 1,3	
Аминазин	0,1	20	251	35	13,9 $\pm$ 2,4	
Суксилеп	1,0	21	363	58	16,0 $\pm$ 1,9	
ДМСО	-	14	602	77	12,8 $\pm$ 1,4	
H ₂ O	-	22	559	61	10,9 $\pm$ 1,3	

Таблица 2

Изучение мутагенной активности тегретола в метафазах костного мозга мышей-гибридов СВА х СС 57 В 6/6

Исходная концентрация, мг/кг	Число животных	Просмотрено метафаз ^х				
		всего	со структурными абберациями		с гемами	
			число	% $\pm m$	число	% $\pm m$
250	5	532	37	6,95 $\pm$ 1,1	4	0,75 $\pm$ 0,37
125	5	508	7	1,37 $\pm$ 0,51	1	0,19 $\pm$ 0,19
20	5	406	7	1,72 $\pm$ 0,645	-	-
Крахмал	5	506	3	0,59 $\pm$ 0,34	3	0,59 $\pm$ 0,34

^х Без учета полиплоидных и гиподиплоидных клеток.

Данные по цитогенетической активности тегретола, полученные в метафазном анализе клеток костного мозга мышей, представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, тегретол в дозе 250 мг/кг веса вызвал статистически достоверное увеличение числа хромосомных

Изучение мутагенной активности тегретола в тесте доминантных летальных мутаций

Таблица 3

Стадия спермиогенеза	Условия опыта	Число ♀	Число желтых тел	Число мест имплантации	Число мест имплантации на ♀	% доимплантационных гибелей ± m	Живые эмбрионы	Живые эмбрионы на ♀	Мертвые эмбрионы	Мертвые эмбрионы на ♀	% постимплантационных гибелей ± m	Выживаемость %	Индукцированная летальность
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
I неделя спермии	Контроль	21	175	171	8,14	2,28±1,13	165	7,85	6	0,28	3,50±1,40	94,2%	
	250 мг/кг	21	189	167	7,95	11,65±2,33	164	7,80	3	0,14	1,80±1,03	86,7%	8,0%
	20 мг/кг	11	83	80	8,18	3,22±1,83	85	7,72	5	0,45	5,56±2,41	91,4%	3,0%
II неделя позд. сперматиды	Контроль	30	233	224	7,46	3,86±1,26	217	7,22	7	0,23	2,86±1,11	93,13%	
	250 мг/кг	32	259	246	7,75	5,02±1,36	236	7,37	10	0,31	4,06±1,26	91,1%	2%
	20 мг/кг	23	211	174	7,56	17,59±2,62	166	7,21	8	0,36	4,59±1,58	78,6%	16%
III неделя, ранние сперматиды	Контроль	31	287	270	8,72	5,83±1,40	254	8,2	16	0,51	5,83±1,44	88,5%	
	250 мг/кг	36	345	311	8,64	9,85±1,61	283	8,15	18	0,5	5,81±1,33	85,0%	4,0%
	20 мг/кг	28	243	221	7,9	9,05±1,84	208	7,4	13	0,46	5,88±1,58	85,6%	3,3%
IV неделя, поздние сперматозиды	Контроль	33	306	273	8,27	10,8±1,78	249	7,55	24	0,73	8,8±1,72	81,5	
	250 мг/кг	37	317	291	7,87	8,2±1,55	275	7,44	16	0,43	5,5±1,33	86,7	-
	20 мг/кг	24	219	197	8,2	10,1±2,04	182	7,6	15	0,62	7,62±1,89	83,0	-
V неделя, ранние сперматозиды	Контроль	41	368	327	7,97	11,15±1,64	289	7,28	28	0,68	8,56±1,55	81,2	
	250 мг/кг	42	392	351	8,35	10,5±1,55	324	7,72	27	0,64	7,79±1,43	82,7	-
	20 мг/кг	36	282	256	7,12	9,22±1,73	239	6,64	17	0,47	6,63±1,56	84,7	-
VI неделя сперматогонии А и В	Контроль	39	338	310	7,95	8,28±1,5	282	7,23	28	0,72	9,03±1,64	83,4	
	250 мг/кг	36	348	320	8,90	8,05±1,46	291	8,08	29	0,81	9,06±1,61	83,5	-
	20 мг/кг	28	253	234	8,36	7,51±1,7	219	7,83	15	0,54	6,41±1,61	86,5	-
VII неделя сперматогонии А и В	Контроль	32	324	286	8,93	11,7±1,79	263	8,23	23	0,72	8,05±1,61	81,2	
	250 мг/кг	36	355	313	8,70	11,8±1,72	287	7,88	26	0,72	8,3±1,56	80,8	-
	20 мг/кг	27	259	232	8,60	10,4±1,9	224	8,30	8	0,3	3,35±1,18	86,5	-

аббераций. При уровне спонтанных хромосомных мутаций $0,59\% \pm 0,34$ в опытном варианте эта величина составила $6,95\% \pm 1,1$. Не выявлено увеличения числа клеток с пробелами (гэпами), а также клеток с измененным числом хромосом.

При использовании более низких концентраций препаратов статистически значимого увеличения числа абберантных клеток не было, хотя и наблюдалась тенденция к этому.

Результаты по доминантному летальному тесту приведены в табл.3. Отсутствие изменений в таких показателях, как число мертвых эмбрионов на беременную самку и процент постимплантационной гибели, свидетельствует об отсутствии явно выраженной мутагенной активности тегретола по этому тесту. Отмечается, что для мутагенов со слабой генетической активностью характерно увеличение в доминантном летальном тесте величины доимплантационных потерь /8/. Мы имели возможность убедиться в этом. Так, на стадии зрелых спермиев и поздних сперматид (I и II недели после затравки животных) наблюдалось статистически достоверное изменение этого показателя с 2,28% в контроле до 11,65% в опыте на максимальной дозе (250 мг/кг веса) по I неделе и с 3,86 до 17,5% на дозе в 20 мг/кг веса по II неделе.

Основным итогом проведенного исследования является демонстрация фактов наличия мутагенной активности тегретола. Полученные данные позволяют отнести препарат к категории слабых мутагенов. С точки зрения популяционной генетики человека контакты больших контингентов с мутагенами представляют опасность в смысле увеличения мутагенного груза популяции. Это следует иметь в виду при оценке реальной генетической опасности применения тех или иных препаратов, с которыми человек встречается систематически /10/.

Другим итогом данной работы является иллюстрация целесообразности использования экспресс-методов, регистрирующих разные категории мутаций на первичном этапе оценки. Проведенная нами предварительная оценка мутагенной активности ряда психотропных препаратов на растительных объектах позволила отобрать часть препаратов для дальнейших испытаний. Развернутое исследование первого же из них выявило наличие мутагенной активности препарата на млекопитающих.

Авторы признательны кандидатам биологических наук М. Д. Померанцевой и А. М. Малашенко за консультации по методикам, использованным в работе.

G. N. Zolotareva, L. M. Fonstein, E. N. Iskchakova

THE STUDY RESULTS OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF CARBAMAZEPINUM

S u m m a r y

The mutagenic activity of some anticonvulsive preparations is studied. Carbamazepinum, benzonalum, chlordiaze-poxidum, phenobarbitalum increased the level of chromosomal aberrations in the cells of *Allium fistulosum* L. The

mutagenic activity of carbamazepinum was investigated on mice hybrids of the first generation CBA x CC57BI/6. The preparation induced the chromosomal aberrations in the cells of mice bone marrow as well as caused the increase of preimplantation fatality in the dominant lethality test.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartelmess A. Mutagenic substance in the human environment. In: Chemical mutagenesis in mammals and man. F. Vogel, L. Rohborn (Eds), Springer-Verlag, Heidelberg, 69, 1970.
2. Фонштейн Л. М., Ревазова Ю. А., Золотарева Г. Н. Сопоставление результатов определения мутагенной активности химических соединений на различных объектах /в печати/.
3. Шапиро Ю. Л., Вайнтриб М. Я., Гринберг К. Н., Журков В. С. Терапевтический и мутагенный эффект некоторых противоэпилептических и психотропных препаратов (обзор литературы). Журнал невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова, 72, 934, 1972.
4. Große, Schwanitz G., Rott H.D., Wibmuller H.F. Chromosomenuntersuchungen bei Bachhandlung mit Anticonvulsiva. Humangenetik, 16, 209, 1972.
5. Суркова Н. И., Малашенко А. М. Действие диэтилсульфата на хромосомный аппарат клеток костного мозга мышей. Генетика, 8, 71; 1972.
6. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate. Squash sequence for mammalian chromosomes. Stain Technol., 31, 247, 1956.
7. Бочков Н. П., Козлов В. М., Севаньяев А. В., Антошина М. М. Анализ анеуплоидии в культурах эмбриональных фибробластов и лейкоцитов человека. Генетика, № 10, 120, 1966.
8. Epstein S., Shasner H. Chemical mutagens in the human environment. Nature, 219, 385, 1968.
9. Röhrborn G. Mutagenicity tests in mice. 1. The dominant lethal method and the control problem. Humangenetik, 6, 345, 1968.
10. Рапопорт И. А. Химические мутагены, опасные для человека. Сб.: Проблемы медицинской генетики, М., "Медицина", 249, 1970.