



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61648 (13) A

(51) 7 G01N33/15, G01N33/18

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

1

2

(21) 2003032462

(22) 21 03 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Архипчук Віктор Володимирович, Гончарук Владислав Володимирович, Черних Валентин Петрович, Гриценко Іван Семенович, Малоштан Людмила Миколаївна

(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ, НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) 1 Спосіб оцінки токсичності лікарських препаратів, який включає введення в розчин лікарського препарату тест-організму і визначення токсичності середовища, який відрізняється тим, що використовують окремий тест-організм і його клітини як модель для аналізу різних типів токсичності, орга-

нізм витримують у середовищі протягом 0,5 години 3 доби, токсикологічний аналіз проводять по параметрах цілого організму, паралельно беруть клітини цього ж організму і здійснюють цитогенетичний аналіз по функціональних і структурних параметрах клітин, а також мутагенний - по розривах ниток ДНК і на основі порівнювального аналізу отриманих результатів з контролем одержують комплексну оцінку токсичності, генотоксичності, цитотоксичності та мутагенності лікарських препаратів

2 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як тест-організм використовують цибулю звичайну Allium sera

3 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як параметри цілого організму застосовують двоїчну оцінку по довжині й вазі коренців тест-організму

Винахід відноситься до галузі медицини, екології навколишнього середовища, зокрема, до методів біотестування водного середовища (розчинів) і може бути використаний для попереднього скринінга нових лікарських препаратів і отримання додаткової інформації для вже існуючих ліків, а також оцінки якості водного середовища

Відомий спосіб оцінки генотоксичності водного середовища (розчинів) по частоті хромосомних аберацій на клітинах цибулі (Fiskesjö G 1997 Allium test for screening chemicals, evaluation of cytological parameters // In Wuncheng Wang, Gorsuch JW, Hughes JS, editors Plants for environmental studies New York Lewis Publ p 307-333) (1) Автор запропонувала аналізувати порушення хромосом (змінення їх кількості, порушення структури) на цитологічних препаратах клітин цибулі, досліджуваних під світловим мікроскопом. Даний метод був використаний, поряд з іншими, стандартними методами, для аналізу генотоксичності лікарських препаратів (Clemenson C, McFarlane-Abdulla E, Andersson M et al 1996 MEIC evaluation of acute systemic toxicity // ATLA (Alternatives To Laboratory Animals) 24 251-311 (2) Показана висока кореляція ($R^2 = 0.68-0.82$, $P < 0.001$) результатів, отриманих за допомогою даного метода, з ре-

зультатами, отриманими з використанням клітин ссавців, зокрема, людини. Отже, можна проводити оцінку генотоксичності лікарських препаратів на клітинах рослин (цибулі) і об'єктивно екстраполювати отримані результати на клітини людини, тобто оцінювати потенційний ризик препарату для здоров'я людини

Розвивая цей підхід, Аль-Сабти (Al-Sabti K 1989 Allium test for air and water borne pollution control // Cytobios 58 71-78) (3) запропонував, крім оцінки генотоксичності на клітинах лука, використовувати довжину їх коренців для моніторингу токсичності водного середовища. Он також експериментально підтвердив коректність використання результатів, отриманих на рослинах, для оцінки потенційного ризику для людини

Відомі способи оцінки (діагностики) якості водних зразків з використанням клітинних біомаркерів - мікроядерцевого тесту для визначення генотоксичності [Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова Н.И., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность - Томск Изд-во Томск Ун-та, 1991 - 272 с.] (4) і ядерцевого біомаркера для визначення цитотоксичності [Архипчук В.В. // Цитология и генетика - 1995 - 29 - с.6-12] (5)

(19) UA (11) 61648 (13) A

Мікроядерцевий тест (4) об'єктивно характеризує частоту хромосомних порушень в ході метотичного процесу (розриви хромосом, відставання окремих хромосом при діленні кліток), тобто мікроядерцевий тест фіксує структурні порушення генома клітки. Головний показник теста - частота виникнення клітин з мікроядрами (мЯ). Другим показником є частота виникнення кліток з подвійними ядрами (2Я), що вказує на порушення утворення дочірніх кліток з материнської.

Ядерцевий біомаркер (5) оснований на досліді ядерцевої активності кліток і характеризує функціональне змінення геномної активності. Ядерці являють собою комплекс функціонуючих рибосомних генів і їх продуктів, що обумовлює їх високу сприйнятливості до зовнішніх впливів. Найбільш інформативними показниками, які застосовуються для оцінки впливу різних факторів на геном кліток рослин та тварин, є розмір поодиноких ядерців та відсоток гетероморфних парних ядерців (ГЯ) - для кліток з малою кількістю ядерців, та кількість ядерців - для багатоядерцевих кліток.

Найбільш близьким аналогом (прототип) до винаходу по технічній сутності та досягаемому ефекту є спосіб оцінки генотоксичності водного середовища (розчинів) по частоті хромосомних аберацій на клітинах цибулі (1).

Сутність способу полягає в наступному. Для оцінки якості водних зразків досліджували вплив токсичності на тест організм, в якості якого беруть цибулини цибулі звичайної, *Allium* сера, пророщують на контрольному середовищі і водних розчинах аналізованих речовин протягом 72-120 годин. Мікроскопічні дослідження виконують на трьох препаратах, виготовлених з кінців коренців цибулі, для кожної досліджуваної концентрації. При максимальному збільшенні світлового мікроскопа (окуляр 10-15^x, об'єктив 100^x) аналізують по 300 митозів (метафаз або анафаз) на одну пробу. Отримані результати класифікують.

Відомий метод дослідження кліток на визначення розривів ниток ДНК (Комета-аналіз), стандартна процедура [N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175: 184-191] (6) із запропонованими пізніше модифікаціями [G. Speit, A. Hartmann 1999. The comet assay (single-cell gel test) — a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols Eukaryotic Systems*, Humana Press, Totowa, NJ, p. 203-212] (7) була використана для готування препаратів. Предметні стекла покривалися 1-1,5% агарозой і залишали сушитися протягом ночі. Клітки оброблялися трипсином (0,125% трипсин-ЕДТА) протягом 2 хв. Потім клітки ресуспендірували в 10⁶ у 0,5% агарозі. 45 мікропітрів розчину розподілялися на предметному склі і покривалися 25 мм покривним склом. Після м'якого видалення покривного скла препарат обробляли лізисним розчином (2,5M NaCl, 100m EDTA, 10m Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH=10, 4°C) протягом 1 години. Після лізису препарату містили в лужний буфер (300m NaOH, 1m EDTA, pH>13, 4°C) на 20 хв, потім вони переносилися в електрофорезну

камеру з лужним буфером і піддавалися впливові електричного поля 0,86 В/см протягом 20хв при 4°C. Після електрофорезу гелі нейтралізували 0,4M Tris (pH=7.5), відмивали, дегідратували в 100% етанолі і сушили всю ніч при кімнатній температурі. Оцінка ефекту проходила відповідно до вимог аналізу мікроскопічних зображень.

Найбільш близьким аналогом до винаходу по технічній сутності й ефектові, що досягається, є спосіб оцінки генотоксичності водного середовища (розчинів) по частоті хромосомних аберацій на клітках цибулі (1).

Сутність способу полягає в наступному. Для оцінки якості водних зразків досліджували вплив токсичності на тест організм, у якості якого беруть цибулину цибулі звичайної, *Allium* сера, пророщують на контрольному середовищі і водних розчинах аналізованих речовин протягом 72-120 годин. Мікроскопічні дослідження виконують на трьох препаратах, приготуваних з кінчиків коренців цибулі, для кожної досліджуваної концентрації. При максимальному збільшенні світлового мікроскопа (окуляр 10-15^x, об'єктив 100^x) аналізують по 300 митозів (метафаз або анафаз) на одну пробу. Отримані результати класифікують у такий спосіб: нормальні метафази й анафази, а також ефекти, що відносяться до хромосомних аберацій: злипли (sticky) хромосоми, фрагменти хромосом і хромосомні мости, відстає (vagrant) і К-митози.

Генотоксичний ефект визначають по росту частоти хромосомних аберацій у дослідних варіантах у порівнянні з контрольним.

Для прототипу, що оцінює генотоксичність водних розчинів по частоті хромосомних аберацій на клітках цибулі, показана висока і достовірна кореляція з даними по генотоксичності розчинів лікарських речовин, отриманими на клітках людини (2).

До недоліків відомого способу відноситься наступне:

- реалізація способу дозволяє визначати тільки токсичність і генотоксичність досліджуваного середовища, не досліджуючи цитотоксичність і мутагенність водного середовища (розчинів лікарських речовин),
- трудомісткість проведення аналізу і реєстрації хромосомних порушень,
- складність мікроскопічного аналізу, наприклад, пред'являються високі вимоги до готування цитологічних препаратів (необхідні хромосомні пластинки високої якості),
- недостатня чутливість способу, для визначення структурних порушень потрібно більш сильний (по дозі або концентрації) і тривалий за часом вплив токсикантів.

Можна сказати, що, виходячи з рівня техніки в області визначення якості водного середовища з використанням біотестів, відомі способи визначення токсичності на організменому або клітинному рівні, кожний окремо, не дозволяє вирішити задачу комплексної, швидкої, дешевої й адекватної оцінки показників різних видів токсичності водних розчинів, що особливо необхідно для скринінга лікарських препаратів.

Винахід, що заявляється, спрямовано на рішення задачі розробки комплексного, швидкого і

дешевого способу оцінки різних типів токсичності і підвищення вірогідності одержуваних результатів, зокрема при проведенні попереднього скринінга нових лікарських препаратів і одержанні додаткової інформації про вже існуючі лікарські препарати за допомогою біотестування, за допомогою якого проводиться комплексне дослідження тест організму, функціональних і структурних параметрів його кліток, який виступає у якості моделі для аналізу різних типів токсичності.

Для рішення поставленої задачі пропонується спосіб комплексної оцінки токсичності лікарських препаратів шляхом використання цілого тест організму і його кліток, що включає введення в досліджуване середовище тест організму, витримування тест організму в досліджуваному середовищі від 0,5-3,0 годин при визначенні цитотоксичності середовища по функціональних параметрах кліток (ядерцеві характеристики) і до 2-3 діб при визначенні токсичності середовища по параметрах організму (довжина й вага корінців), генотоксичності середовища по структурних параметрах (частота мікроядер і подвійних ядер) і мутагенності середовища по структурних параметрах (по розривах ниток ДНК) на клітинному рівні одержують комплексну оцінку різних токсичних властивостей лікарських препаратів. Як тест-організм використовують цибулю звичайну *Allium* *sepa*, представника однодольних рослин.

Спосіб оцінки токсичності лікарських препаратів, що заявляється, заснований на комплексному дослідженні показників тест організму і його кліток, що включає вимір гальмування росту і зниження ваги корінців, аналіз ядерцевих характеристик кліток, облік частоти мікроядер і подвійних ядер кліток, оцінка мутагенності по розривах ниток ДНК і з урахуванням отриманих результатів дозволяє зробити всебічну, об'єктивну оцінку різних токсичних властивостей лікарських препаратів.

Досягається високий результат оцінки різних токсичних властивостей досліджуваного водного середовища за рахунок об'єднання різних методик, сполучення яких можливо при використанні даного тест організму (звичайна цибуля *Allium* *sepa*). Швидкий розвиток корінців у водному середовищі, їхня висока чутливість і двоїчна оцінка по довжині й вазі корінців дозволяють адекватно оцінити рівень токсичності водного середовища, наявність безлічі корінців в одній рослині дозволяє провести весь комплекс клітинних досліджень на обмеженій кількості організмів і збільшує вірогідність результатів (у відмінність, наприклад, від тестів на насіннях рослин, де для достовірної статистичної оцінки необхідне використання безлічі тест організмів), наявність еукариотичного ядра дозволяє провести весь комплекс клітинних і субклітинних досліджень на цито- і генотоксичність, мутагенність, швидка відповідна реакція ядерцеві на токсичний вплив дозволяє одержати результат у перші години тестування, сполучення аналізу ядерцевих характеристик, частоти мікроядер і подвійних ядер у клітках, виникнення розривів ниток ДНК найбільше об'єктивно характеризує різні типи токсичності на клітинному рівні.

Спосіб, що заявляється, скорочує терміни аналізу препаратів (до 1 місяця), тоді як при стан-

дартних методах (тест організм ссавці, а мутагенність і генотоксичність виявляються в черзі поколінь) припускає терміни до 2 років, використання способу приводить до істотного зниження ціни аналізу (для 1 лікарського препарату ціна аналізу зменшується на три-чотири порядки).

Таким чином, за рахунок спрощення й здешевлення методики оцінки токсичного ефекту лікарського препарату пропонується альтернативна (у порівнянні зі стандартними методами) модель дослідження токсичності, гено- і цитотоксичності, мутагенності лікарської речовини на рослинному організмі і його клітках.

Спосіб рекомендується для попереднього скринінга нових лікарських препаратів, при оцінці їхньої можливої токсичності, цито- і генотоксичності, мутагенності, а також одержання додаткової інформації про різні типи токсичності для вже існуючих ліків, екологічного моніторингу водного середовища.

В таблиці 1 наведені порівняльні дані з відомими способами.

Таким чином, сукупність істотних ознак запропонованого способу комплексної оцінки токсичності лікарських препаратів, а саме визначення токсичних ефектів за допомогою рослинного тест-організму в сполученні зі змінами його клітинних параметрів, є необхідного і достатнього для досягнення забезпеченого винаходом технічного результату - значного спрощення методу й поліпшення результатів тестування токсичності лікарських препаратів за рахунок одержання об'єктивної, повної і достовірної оцінки різних видів токсичності токсичності, цитотоксичності, генотоксичності і мутагенності досліджуваних речовин.

Приклади реалізації способу, що заявляється.

Приклад 1

У якості тест організму використовували цибулю звичайну *Allium* *sepa*, представника однодольних рослин.

Як контрольний зразок використовували артезіанську воду.

У відповідності зі стандартною методикою біотестування водних проб [Методи биоиндикации и биотестирования природных вод. Випуск 2 // Под ред. В.А. Бризкало, Т.А. Хорунжей - Л. Гидрометеиздат, 1989 - 276 с.], зразки води, використовуювані для контролю й розчинення лікарських препаратів, після доставки їх з артезіанських свердловин зберігали протягом 1-3 діб у холодильнику (при температурі 5-8°C).

Як досліджуваний зразок узяли розчин аспірину. Цибулю розміщали нагорі пробірок (10шт.) заповнених досліджуваним розчином, причому з розчином контактує тільки зона росту корінців. Цибулини пророщували протягом 72 години на контрольних і дослідних зразках при кімнатній температурі, у захищеному від прямого сонячного світла місці.

Для визначення загальної токсичності порівнювали середню довжину і вагу корінців у контрольному й досліджуваному зразках. Суть цього тесту полягає в гальмуванні росту корінців у випадку токсичного впливу. Дані дослідів, приведені в таблиці 2 свідчать про токсичність досліджуваного зразка в порівнянні з контролем.

Для визначення цитотоксичності (ядерцевий біомаркер), пророщені на контрольній воді корінці цибулі поміщали на 0,5-3,0 години в досліджуваний розчин. Потім клітки корінців цибулі досліджували. Аналізували давлені цитологічні препарати рослинних кліток, пофарбовані 50% розчином азотнокислого срібла (AgNO_3). Показники ядерцевого біомаркера для контролю і кожної проби фіксували періодично через 30 - 180 хв після початку аналізованого впливу. Під світловим мікроскопом (окуляр $10\times$, об'єктив $100\times$, загальне збільшення $1000\times$) визначали наступні показники: число ядерців у клітці, розмір одиночного ядерця, а також відсоток гетероморфних парних ядерців (ГПЯ). Для кожної проби підраховували число ядерців у 1500-1800 кліток і визначали їхній розмір у 200 кліток при максимальному збільшенні світлового мікроскопа. На заключному етапі проводили порівняння результатів у контрольному й дослідному варіантах, після їхньої статистичної обробки дані внесли в табл 2. Слід зазначити, що при незначному відхиленні від контролю середнього числа ядерців у клітці (5,2%) і гетероморфності парних ядерців (4,3%) різко змінився середній обсяг ядерця (182%).

Для визначення генотоксичності (мікроядерний тест) і мутагенності (розриви ниток ДНК) досліджуваного розчину узяті клітки корінців пророщеної у перебігу 3 діб на досліджуваному зразку цибулі.

Показник генотоксичності визначали по мікроядерному тесті (4), що фіксує структурні порушення генома клітки. Визначали частоту структурних порушень у розрахунку на 1000 досліджених кліток, тобто в проміллі. Для однієї проби частоту мікроядер підраховували в 3 - 4 тисяч кліток.

Іншим показником генотоксичності служить частота кліток із подвійними ядрами (5). Частоту кліток з подвійними ядрами визначали також у 3-4 тисяч кліток у кожній пробі, із наступним її перерахуванням на 1000 кліток, тобто величина індексу виражалася в проміллі.

Показником мутагенності є тест на розриви ниток ДНК або Комета-аналіз. Для готування препаратів була використана стандартна процедура (6) і її модифікація (7).

Клітки корінців цибулі аналізували після 48 годин обробки досліджуваним розчином. Цитологічні препарати після обробки лізисним розчином піддавалися електрофорезу в лужному буфері. Під

люмінесцентним мікроскопом визначали відсоток кліток із розривами ниток ДНК, тобто кліток, що відрізняються від нормальних кліток наявністю різної довжини комет-хвостів.

На заключному етапі експериментів проводилося порівняння результатів у контрольних і дослідних варіантах, їхня статистична обробка.

Усі дані про проведені дослідження на клітинному рівні приведені в табл 2.

З приведених даних дослідження можна зробити оцінку впливу аспірину на біологічний об'єкт.

Приклад 2

Для проведення досліджень підготовлені зразки відповідно до технології, що використовували в прикладі 1.

Як контроль узяті артезіанська вода, а як досліджуваний зразок узяті розчин лікарського препарату - анальгін.

Послідовність проведення всіх досліджень проводили аналогічно прикладові 1. Отримані результати відображені в табл 2.

Зіставивши з результатами дослідження аспірину можна сказати про стійке підвищення рівня токсичного впливу анальгін на біологічний об'єкт, підвищена токсичність, генотоксичність, мутагенність за винятком цитотоксичності, де відхилення середнього обсягу ядерця від контролю зменшилося в порівнянні з аспірином.

Аналізуючи результати тестування, згруповані в табл 2, можна сказати, що одна і та ж токсична речовина може викликати різні ефекти по токсичності, генотоксичності, цитотоксичності, мутагенності і урахування тільки одного показника може привести до невірності отриманих результатів і суб'єктивній оцінці впливу токсикантів на клітину і організм. Тільки урахування всіх аналізованих параметрів може дати об'єктивну оцінку впливу токсикантів на організм і його клітини.

Таким чином, запропонований спосіб оцінки токсичності лікарських препаратів, заснований на комплексному підході, що поєднує аналіз токсичності на організменому рівні з аналізом генотоксичності, мутагенності на клітинному і субклітинному рівнях, забезпечує об'єктивну і всебічну оцінку різних видів токсичності лікарських препаратів, що не досягається жодним із відомих способів. Перевага даного підходу полягає також у можливості комплексної оцінки різних токсичних ефектів лікарських препаратів.

Таблиця 1

Порівнювані параметри	Прототип	Спосіб, що заявляється
Реєструємий результат	Токсичність (по зміні довжини корінців рослини) Генотоксичність (по хромосомних абераціях)	Токсичність (по зміні довжини і ваги корінців рослини) Генотоксичність (по мікроядерному тесту) Цитотоксичність (по ядерцевому біомаркеру) Мутагенність (по розривах ниток ДНК)
Терміни виконання тесту	3 - 5 діб для тестів по токсичності і генотоксичності	0,5 - 3,0 години для тесту на цитотоксичність і 2-3 доби для тестів по токсичності, генотоксичності і мутагенності
Вартість тесту (у порівнянні зі стандартними методами оцінки токсичності, гено- і цитотоксичності, мутагенності лікарських препаратів, тому що прототип не пропонували для цих цілей)	1 000 000 умовних одиниць	1 000 умовних одиниць
Чутливість методу	Реєструє порушення структури генетичного апарату (генотоксичність)	Реєструє зміни функціонування генетичного апарату (цитотоксичність), тобто чутливість по первинній відповіді зростає на кілька порядків
Трудомісткість, складність аналізу	Трудомісткий і складний аналіз хромосомних аберацій (генотоксичність)	Простий облік частоти кліток з мікроядрами (генотоксичність)

Таблиця 2

Визначення токсичності, цито- і генотоксичності, мутагенності двох лікарських препаратів (анальгін і аспірин) за допомогою біотестів на клітинах цибулі звичайної Allium sera

Зразки розчинів	Цибуля звичайна Allium sera,											
	токсичність		генотоксичність		цитотоксичність						мутагенність	
	Довжина і вага корінців, %	Відхилення від контролю, %	мЯ відхилення від контролю, %	2Я відхилення від контролю, %	Середнє число ядерця в клітині	Відхилення від контролю, %	Середній об'єм ядерця (мкм ³)	Відхилення від контролю, %	Гетероморфність парних ядерця, %	Відхилення від контролю, %	Процент клітин з комет-хвостами, %	Відхилення від контролю, %
Контроль (питна вода)	100%	0%	0%	0%	1,303	0%	46,6	0%	83,2	0%	1,2	0%
Розчин аспірину	37,9%	62,1%	294%	41%	1,235	5,2%	131,8	182,8%	79,6	4,3%	25,4	24,2%
Розчин анальгину	2,1%	97,9%	420%	153%	1,201	7,8%	84,7	81,8%	70,9	14,8%	29,8	26,6%