

Учреждение российской академии наук
Петербургский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова РАН

«Утверждаю»
Директор Института
Минкин Б.Ю.

Отчет

по исследованию антимуtagenной активности
медицинского
препарата КРИОМЕЛТ МН.

Гатчина 2017г.

Первый этап

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА КРИОМЕЛТ МН В ОТНОШЕНИИ ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ ПРЕДМУТАЦИОННЫХ ИНТЕРМЕДИАТОВ ДНК В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

Криомелт МН - лекарственный препарат, изготовленный из чистого деферментированного меда, используется в медицинской практике как гепатопротектор. При изучении генотоксичности этого препарата было показано, что он обладает антимуtagenным эффектом. Частота спонтанных мутаций в локусах ADE4-ADE8 и CAN1 была понижена в несколько раз, когда клетки дрожжей высевали на среду с Криомелт МН при учете частоты мутаций методом упорядоченного посева. Антимуtagenный эффект не был обнаружен при измерении частоты спонтанного мутагенеза флуктуационным методом медиан. Криомелт МН не изменяет выживаемость дрожжевых клеток, но значительно снижает частоту прямых мутаций в локусах ADE4-ADE8, индуцированных УФ- и гамма-лучами и этилметан-сульфонатом. Изучение антимуtagenного действия Криомелт МН на уровень УФ-индуцированного мутагенеза у штаммов дрожжей, дефектных по репарационным системам rad2, rad51, rad54, rad59, pms1, msh2 и hsm3, показало, что у штаммов дикого типа, rad2, rad54, rad59 и hsm3 наблюдался анти-мутагенный эффект, а у мутантов rad51, pms1 и msh2 он отсутствовал. Это позволяет предположить, что антимуtagenное действие Криомелт МН связано со стимуляцией репарации ошибочно спаренных оснований, возникших в процессе работы рекомбинационной ветви пострепликативной репарации.

Для предотвращения канцерогенеза и других вызываемых мутациями ДНК болезней важно не только избегать факторов риска, но и использовать защитные вещества, снижающие мутагенез или активирующие защитные механизмы клетки. В настоящее время описано много веществ, обладающих антимуtagenным и антиканцерогенным действием [1-5]. Антимуtagenны могут быть подразделены на две группы: десмутагены и биоантимуtagenны [6]. Первые вызывают химическую или биохимическую модификацию мутагенов перед тем как они воздействуют на ДНК клетки. Группа десмутагенов включает редуцирующие агенты, широко распространенные антиоксиданты, ингибиторы транскрипционных факторов и др. К биоантимуtagenнам относятся вещества, влияющие на процессы репарации и репликации ДНК в клетках, подвергнутых воздействию мутагенов. Так, показано, что хлорид кобальта и ванилин понижают частоту мутаций, воздействуя на RecA-контролируемую систему репарации ДНК в клетках *E. coli* [6]. Танниновая кислота и катехинины зеленого чая снижают уровень мутагенеза, стимулируя работу эксцизионной репарации в клетках кишечной палочки, а некоторые из ароматических продуктов, например корица, активизируют свободную от ошибок рекомбинационную ветвь репарации [7]. На культуре клеток человеческой карциномы, дефектных по коррекции ошибочно

спаренных оснований ДНК, был обнаружен сильный антимуtagenный эффект антиоксидантов (витамины С, Е, ликопен и др.) [8].

В данной работе мы обнаружили действие лекарственного препарата Криомелт МН, приводящее к снижению спонтанного и индуцированного мутагенеза в клетках дрожжей. Анализ антимуtagenного действия Криомелт МН на мутантные штаммы с нарушенными репарационными системами ДНК позволяет предположить, что этот эффект связан с репарацией ошибочно спаренных оснований, возникающих как предмутационные интермедиаты в процессе рекомбинационной ветви пострепликативной репарации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. Генотипы штаммов дрожжей, использованных в этой работе, представлены в табл. 1. Штамм 2-LMG-3031 был получен разрушением гена *RAD2* в штамме 5-LMG-3031. Штамм 12-SVK-3032 является мейотическим сегрегантом, выделенным при расщеплении гибрида 11D-3031 x ZS50-30. Штамм 4-SVK-3033 - мейотический сегрегант, полученный при расщеплении гибрида 11А- 3031 x НТУ237, а штамм 8-SVK-3034 - при расщеплении гибрида 11А-3031 x SJR-1486.

Таблица 1. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип	Происхождение
11А-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1</i>	[9]
11D-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1</i>	[9]
LMG-318	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 rad2::TRP1</i>	[10]
LMG-355	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 rad54::URA3</i>	[10]
5-LMG-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 hsm3:: Kan^R</i>	[Н]
2-LMG-3031	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,U2 trp1 rad2::TRP1 hsm3:: Kan^R</i>	Эта работа
2-IVF-312	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 pms1Δ</i>	[9]
ZS50-30	<i>MATa ade2-GT8 ura3 leu2 trp1 lys1-1 his7-2 msh2::KanMx4</i>	J. Kohli
12-SVK-3032	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 lys1-1 msh2:: Kan^R</i>	Эта работа
IVF-317	<i>MATa ade2Δ-248 ura3 -160,188 leu2-3,112 trp1 hsm3-l pol3-01</i>	[12]
7-PG-301	<i>MATa ura4 him1-1</i>	[13]
НТУ237	<i>MATa ade5-1 ura3-52, leu2-3,112 trp1-289 his7-2 rad51::hisG URA3 hisG</i>	Е.А. Namsaraev
4-SVK-3033	<i>MATa ade2A-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 his7-2 rad51::URA3</i>	Эта работа
SJR4-S1486	<i>MATa ade2-101 his3Δ200 ura3(Nhe)-HIS3::intron::cβ2 IR-ura3 (Nhe) lys2ΔRV::hisG leu2-K lys2Δ5'lys2Δ3'-LEU2 rad59::kanGal⁺</i>	R. Spell
8-SVK-3034	<i>MATa ade2Δ-248 ura3-160,188 leu2-3,112 trp1 his7-2 lys1-1 rad59:: Kan^R</i>	Эта работа
PG-155	<i>MATa ade2-45 rad2/ MATaade2-192 rad2</i>	[14]

Среды. Для выращивания дрожжевых культур использовали среду YEPD. Среду полного состава использовали в экспериментах по изучению влияния Криомелт МН на частоту прямых мутаций аденинзависимости в локусах *ADE1* и *ADE2*, а также на частоту митотической сегрегации и митотического кроссинговера [15]. Специальную среду с добавлением этанола, исключющую

рост мутантов с дыхательной недостаточностью, использовали для оценки влияния Криомелт МН на частоту мутаций в локусах *ADE4-ADE8* [16]. Для определения частоты спонтанных мутаций устойчивости к канаванину методом упорядоченного посева использовали среду минимального состава [15] с добавлением аминокислот и азотистых оснований, необходимых для роста тестируемых штаммов, и различных концентраций канаванина. Во флуктуационном методе медиан использовали среду того же состава, но обогащенную полным набором аминокислот (за исключением аргинина) и азотистых оснований и содержащую более высокие концентрации канаванина [12].

Мутагены. Источником УФ-излучения служила лампа БУВ-ЗОЕ с мощностью дозы 2.76 Дж/м²с. В качестве источника гамма-лучей использовали установку “Исследователь” с мощностью дозы ⁶⁰Со 46.5 Гр/мин. Этилметансульфонат (ЭМС) получили от компании INC.USA. Методы обработки клеток дрожжей УФ- и гамма-лучами и ЭМС описаны ранее [13, 16].

Фармацевтический препарат Криомелт МН, используется в медицине как гепатопротектор. Это лекарство приготовлено из водного раствора деферментированного натурального меда.

Мутационные тесты. В экспериментах учитывали три типа мутаций: прямые мутации в генах *ADE1* и *ADE2*, прямые мутации в пяти генах, контролирующих биосинтез аденина, *ADE4-ADE8* [17] и прямые мутации устойчивости к канаванину *CAN^S — CAN^R*.

В коротком тесте для оценки встречаемости спонтанных мутантов *ade4-ade8* в популяции клетки дрожжей высевали на среду YEPD и инкубировали в течение трех дней. Водную суспензию (10⁵ кл/мл) делили на две части: к одной добавляли Криомелт МН в концентрации 30% от объема суспензии, а к другой - такой же объем воды. Эти суспензии инкубировали в течение 24 ч при интенсивном перемешивании. Затем клетки высевали на среду с этанолом. После семи дней инкубации учитывали число мутантов и число посеянных клеток.

Два способа измерения спонтанного мутагенеза - флуктуационный тест медиан и метод упорядоченного посева использовали для оценки влияния Криомелт МН на частоту спонтанных мутаций. Первый метод позволяет определить частоту спонтанных мутаций, возникающих в процессе роста дрожжевых клеток на среде YEPD, поэтому Все эксперименты ставили в 4-5 повторностях.

Таблица 2. Влияние препарата Криомелт МН на спонтанный мутагенез

Штамм	Тестируемая мутация	Обработка	Частота спонтанных мутаций	
			упорядоченный посев	флуктуационный метод
2-LMG-3031 (<i>rad2 hsm3</i>)	<i>ADE4-ADE8</i>	Контроль	(5.4 ± 1.2) × 10 ⁻⁶	
		Криомелт МН	(0.4 ± 0.1) × 10 ⁻⁶	
IVF-317 (<i>pol3 hsm3</i>)	<i>CAN^S → CAN^R</i>	Контроль	(4.2 ± 0.2) × 10 ⁻⁶	(8.8 ± 1.3) × 10 ⁻⁷
		Криомелт МН	(2,1 ± 0,2) × 10 ⁻⁶	(7.4 ± 2.3) × 10 ⁻⁷

Суспензию клеток дрожжей высевали на эту среду с Криомелт МН и без него (контроль). После трех дней инкубации отбирали по 12 отдельных колоний в опыте и контроле, каждую колонию суспендировали в 1 мл воды и высевали на селективную среду, содержащую канавагин в концентрации, при которой не росли канавагин чувствительные клетки. Для определения числа посеянных клеток суспензии разводили и высевали на среду YEPD. Через 3-4 дня инкубации проводили подсчет канавагинустойчивых колоний и числа посеянных клеток. По специальной формуле определяли частоту спонтанных мутаций канавагинустойчивости [18].

Метод упорядоченного посева определяет частоту спонтанных мутаций, появляющихся в процессе медленного роста клеток на селективной среде, содержащей более низкие концентрации канавагина, позволяющие клеткам поделиться 8- 10 раз. Клетки инкубировали в 2 мл полной жидкой среды в течение двух дней, затем 1 мл выросшей культуры разводили в 4 мл воды. Специальный репликатор со 150 штырями погружали в эту суспензию и переносили капли на чашки с селективной средой, содержащей канавагин и Криомелт МН, и на контрольные чашки без Криомелт МН. Канавагино устойчивые мутанты росли быстрее немутантных клеток и выглядели как «бородавки» на фоне ограниченного роста тестируемых культур. После 15 дней инкубации число «бородавок» и общее число выросших на 150 пятнах клеток было подсчитано. Число выросших клеток определяли после их смыва с нескольких отдельных отпечатков, на которых не появлялись бородавки. Частоту мутаций на клетку на клеточное деление определяли при делении числа бородавок на число клеток на всех 150 отпечатках [19]. Таким же методом определяли частоту мутаций в *ADE4-ADE8* локусах.

Для оценки влияния Криомелт МН на частоту индуцированных мутаций и на частоту рекомбинации суспензию клеток, обработанных мутагеном, делили на две части: к одной добавляли Криомелт МН, а к другой - воду в таком же объеме. Затем суспензии высевали на среду полного состава. рисунках приведены средние значения процентов выживаемости и частот мутаций с 95%-ным доверительным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Криомелт МН на частоту спонтанных мутаций. При изучении генотоксичности фармакологического препарата Криомелт МН мы обнаружили, что он не только не увеличивал выход прямых генных мутаций, но заметно снижал их уровень. В коротком тесте мы использовали штамм 2-LMG-3031, высокочувствительный к мутагенному действию различных генотоксикантов, что определяется наличием в клетках этого штамма мутаций *rad2* и *hsm3* [20]. Обработка Криомелт МН клеток штамма 2-LMG-3031 в течение 24 ч привела к снижению частоты встречаемости спонтанных мутаций в генах *ADE4-ADE8* от $(9.5 \pm 1.5) \times 10^{-6}$ при содержании клеток в воде до $(5.5 \pm 2.4) \times 10^{-6}$ при содержании их в Криомелт МН. За это время Криомелт МН не оказывал влияния на размножение клеток.

Для более точной оценки влияния Криомелт МН на частоту спонтанных мутаций были использованы методы упорядоченного посева и флуктуационный тест медиан. Данные этих исследований представлены в табл. 2. Ранее мы показали, что метод упорядоченного посева позволяет предпочтительно измерять частоту спонтанных мутаций, возникающих в результате ошибок в работе репарационных систем [12]. В этих экспериментах мы использовали штаммы 2-LMG-3031 и IVF-317, характеризующиеся повышенной частотой спонтанных мутаций канаванинустойчивости [12]. Криомелт МН снижал частоту спонтанных мутаций в *ADE4-ADE8*-локусах у штамма 2-LMG-3031 в 10 раз, частота мутаций канаванинустойчивости у штамма IVF-317 снижалась в 2 раза под действием Криомелт МН.

Метод медиан в основном регистрирует частоту спонтанных мутаций, появляющихся в результате ошибок репликации ДНК [12]. Как следует из табл. 2, во флуктуационном тесте медиан у штамма IVF-317 мы не наблюдали различий в частоте спонтанных мутаций канаванинустойчивости в контроле и в опыте. Таким образом, у разных штаммов при учете разных типов спонтанных мутаций, на разных средах Криомелт МН понижал спонтанный мутагенез, обусловленный ошибками репарации, но не изменял спонтанный мутагенез, вызванный ошибками репликации.

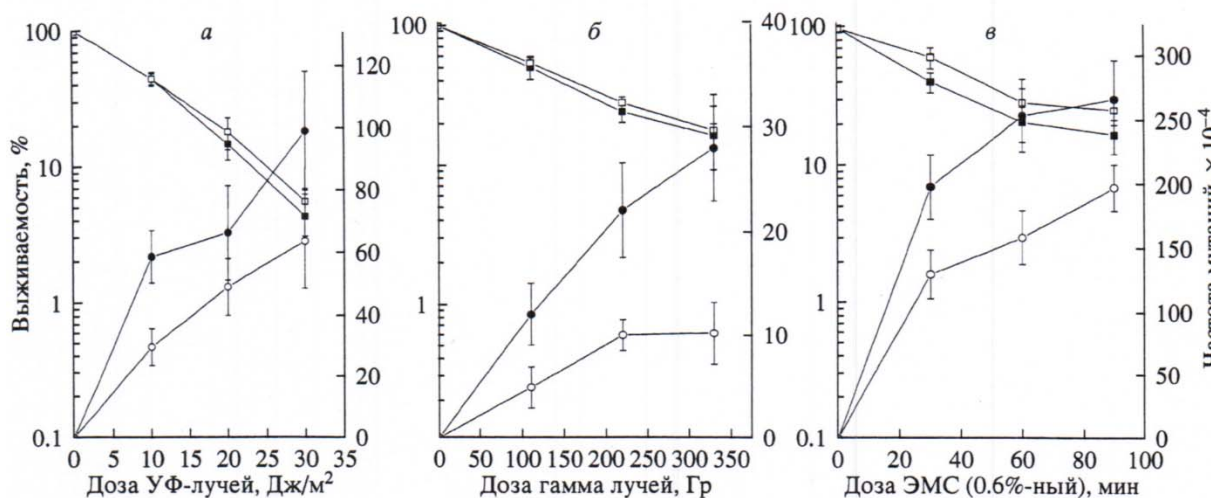


Рис. 1. Влияние Криомелт МН на выживаемость и частоту мутаций, индуцированных УФ-лучами (а), гамма лучами (б) и ЭМС (в) в *ADE4-ADE8*-локусах штамма 2-LMG-3031 (*rad2 hsm3*). Выживаемость (■, □) и мутагенез (●, ○). Закрашенные символы - без Криомелт МН, светлые символы - с Криомелт МН.

Влияние Криомелт МН на частоту индуцированных мутаций. Прежде всего нами были определены условия, в которых проявляется максимальное действие Криомелт МН. Криомелт МН наносили на поверхность питательной среды, на которую высевали обработанные мутагеном клетки. Оптимальная концентрация Криомелт МН была определена при изучении его действия на уровень мутагеназа в *ADE4-ADE8*-локусах на штамме 2-LMG-3031 при облучении его УФ-лучами

в дозе 6 Дж/м². В контроле без Криомелт МН использованная доза УФ- лучей повышала частоту мутаций до уровня $(120.6 \pm 20.9) \times 10^{-4}$ Концентрация Криомелт МН 5 мл/л понижала этот уровень до $(69.0 \pm 11.7) \times 10^{-4}$, 0.5 мл/л - до $(64.4 \pm 8.3) \times 10^{-4}$, а 0.05 мл/л- до $(109.1 \pm 8.8) \times 10^{-4}$. Во всех дальнейших экспериментах по изучению спонтанного и индуцированного мутагенеза использовали среду, концентрация Криомелт МН в которой составляла 0.5 мл/л.

Мы испытали натуральный мед на возможность антимуутагенного влияния. По методу, описанному выше, проверили действие нескольких концентраций меда на УФ индуцированный мутагенез у штамма 2-LMG-3031. Антимуутагенный эффект в этих экспериментах не был обнаружен.

Состав среды не влиял на антимуутагенный эффект Криомелт МН. Так, частота УФ-индуцированных мутаций в локусах *ADE1* и *ADE2* у штамма 7-PG-301 учитывалась на среде полного состава с Криомелт МН. В этих экспериментах УФ-облучение в дозах 84 и 126 Дж/м² вызывало появление мутаций с частотой $(4.4 \pm 1.2) \times 10^{-4}$ и $(8.4 \pm 2.1) \times 10^{-4}$ на среде без Криомелт МН, на среде с Криомелт МН - $(3.2 \pm 0.8) \times 10^{-4}$ и $(4.4 \pm 0.3) \times 10^{-4}$ соответственно.

Три хорошо изученных мутагена - УФ- и гамма-лучи и химический супер мутаген ЭМС, вызывающие различные первичные повреждения ДНК, были использованы для того, чтобы выяснить: распространяется ли антимуутагенное действие Криомелт МН на летальные и мутагенные повреждения, индуцированные этими агентами. Данные рис. 1 показывают, что Криомелт МН практически не изменял выживаемость клеток. При дозе мутагена, вызывающей $\approx 10\%$ выживаемости, Криомелт МН понижал частоту мутаций в *ADE4-ADE8*-локусах у тестерного штамма 2-LMG-3031: при УФ-облучении - в 2 раза, гамма-облучении - в 3 раза и ЭМС - в 1.5 раза.

Влияние Криомелт МН на частоту мутаций у дефектных по репарации мутантов. Однонаправленное действие Криомелт МН на снижение частоты мутаций, индуцированных различными мутагенами, и различное влияние его на репликативный и репарационный мутагенез позволяют предположить, что генетический эффект Криомелт МН может зависеть от генов, контролирующих системы репарации у дрожжей. Для выявления репарационной системы, на которую влияет Криомелт МН, были использованы штаммы дрожжей, несущие мутации, блокирующие разные системы репарации. Во всех экспериментах учитывали частоту УФ- индуцированных мутаций аденинзависимости в локусах *ADE4-ADE8*. Данные рис. 2 показывают, что Криомелт МН понижает частоту мутаций как в клетках штамма дикого типа, так и у мутанта *rad2* с заблокированной нуклеотид-эксцизионной репарацией. При максимальной дозе УФ-облучение снижало выживаемость клеток до 10%, при этом Криомелт МН не оказывал заметного влияния на выживаемость.

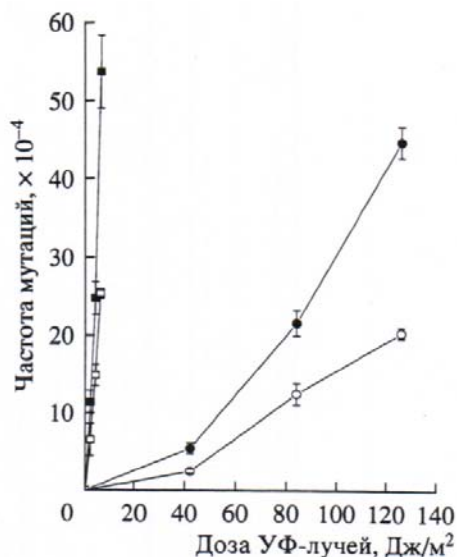


Рис. 2. Влияние Криомелт МН на частоту мутаций в *ADE4-ADE8*-локусах штаммов 11D3031 (дикий тип ●, ○) LMG-318 (*rad2*, ■, □). Закрашенные символы - без Криомелт МН, светлые символы - с Криомелт МН.

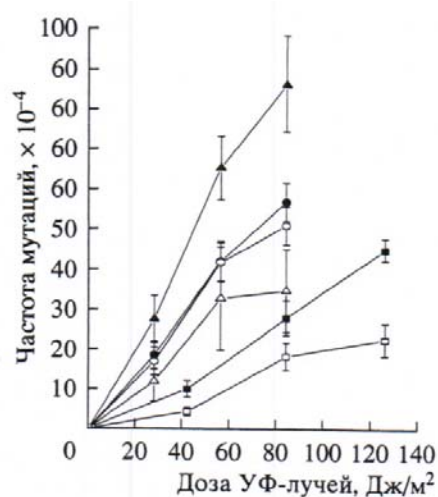


Рис. 3. Влияние Криомелт МН на частоту мутаций в *ADE4-ADE8*-локусах штаммов 4-SVK-3033 (*rad51*, ●, ○), LMG-355 (*rad54*, ▲, △) и 8-SVK-3034 (*rad59*, ■, □). Закрашенные символы - без Криомелт МН, светлые символы - с Криомелт МН.

Влияние Криомелт МН на мутагенез было изучено на трех мутантных штаммах дефектных по рекомбинационной репарации: *rad51*, *rad54* и *rad59* (рис. 3). Криомелт МН значительно понижал частоту мутаций у мутантов *rad54* и *rad59*, но не влиял на частоту мутаций у *rad51*-мутанта. Чтобы исключить влияние различий в генотипах *rad51*-мутантов, являющихся сегрегантами гибридов (см. Материалы и методы), на обработку Криомелт МН, нами было проверено несколько таких сегрегантов. Все проверенные сегреганты не различались по реакции на Криомелт МН. Следовательно, данные рис. 3 свидетельствуют об отсутствии влияния Криомелт МН на уровень мутагенеза у штаммов, несущих мутацию *rad51*. Таким образом, полученные данные не позволяют сделать однозначный вывод о влиянии Криомелт МН на рекомбинационный путь репарации повреждений ДНК. Для решения этого вопроса мы оценили влияние Криомелт МН на индуцированную УФ-лучами митотическую рекомбинацию в прямых экспериментах. Диплоид ПГ-155 позволяет учитывать частоту митотической сегрегации и кроссинговера между геном *ADE2* и центромерой [14]. Результаты экспериментов по изучению влияния Криомелт МН на рекомбинационные процессы представлены на рис. 4. Из этого рисунка видно, что Криомелт МН не изменяет частоты УФ-индуцированной митотической сегрегации и митотического кроссинговера и не влияет на выживаемость диплоидных клеток.

Приведенные выше результаты позволяют предположить, что Криомелт МН влияет на безошибочную рекомбинационную ветвь пострепликативной репарации. Ранее мы показали [12], что ген *HSM3* контролирует репарацию ошибочно спаренных оснований, возникающих в процессе пострепликативной

репарации УФ-повреждений ДНК. При этом HSM3 эффективно конкурирует с генами, контролирующими мисматч-репарацию PMS1 и MSH2 [21], роль которых в УФ-индуцированном мутагенезе в штаммах дикого типа, практически не выявляется, но в мутантах *hsm3* она заметна [12]. На рис. 5 приведены данные о влиянии Криомелт МН на УФ-индуцированный мутагенез у мутантов *hsm3*, *pms1* и *msh2*, дефектных по коррекции ошибочно спаренных оснований. Криомелт МН значительно снижал уровень мутагенеза у мутанта *hsm3*. В то же время Криомелт МН не изменял частоту УФ-индуцированных мутаций у мутантов *pms1* и *msh2*. Таким образом, этапы репарации, блокируемые мутациями *rad51*, *pms1*, *msh2*, необходимы для антимутагенного действия Криомелт МН.

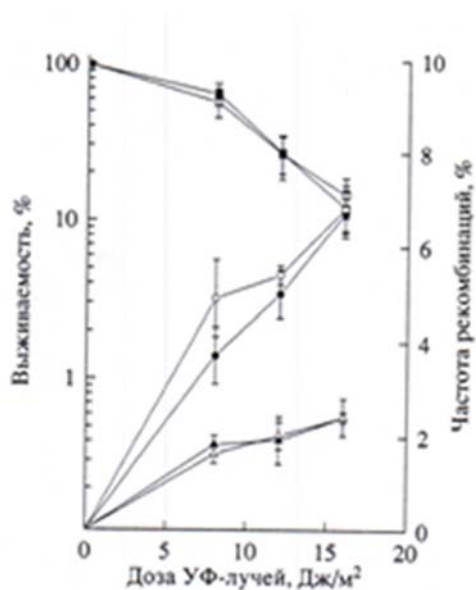


Рис. 4. Влияние Криомелт МН на выживаемость и частоту митотической рекомбинации, индуцированной УФ-лучами в штамме PG-155. Выживаемость (■, □); сегрегация ●,○); кроссинговер (▲, Δ).

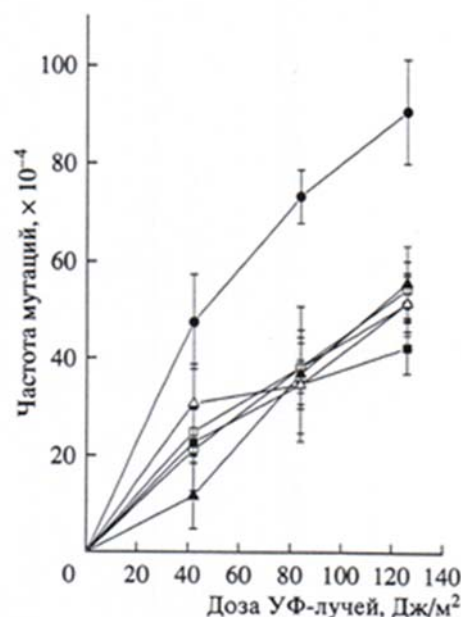


Рис. 5. Влияние Криомелт МН на частоту мутаций в *ADE4-ADE8*-локусах штаммов 5-LMG-3031 (*hsm3*, ●, ○), 2-IVF-312 (*pms1*, ■, □) и 12-SVK-3032 (*msh2*, ▲, Δ). Закрашенные символы - без Криомелт МН, светлые символы - с Криомелт МН.

ВЫВОДЫ

Клетки дрожжей *S. cerevisiae* являются типичными эукариотами. Они не нуждаются в специальных опытах по метаболической активации при изучении действия мутагенов. Мутации в генах HSM3 и RAD2 значительно повышают уровень как спонтанного, так и индуцированного мутагенеза, а также чувствительность к летальному действию многих мутагенных факторов [20]. Эти свойства тестерного штамма 2-LMG-3031 (*rad2 hsm3*) делают его удобным для выявления генетических эффектов потенциальных мутагенов и антимутагенов.

В наших экспериментах Криомелт МН наносился на поверхность питательной среды. Таким образом, клетки использовали этот препарат в процессе роста и состав среды мог играть значительную роль в его антимутагенном эффекте. Мы проанализировали антимутагенный эффект Криомелт МН на трех различных средах: полной, с этанолом и с канаванином. Во всех случаях наблюдался антимутагенный эффект, т.е. он не зависел от состава питательной среды. Криомелт МН практически не влиял на выживаемость клеток после мутагенной обработки УФ- и гамма-лучами и ЭМС в дефектных по репарации гаплоидных и диплоидных штаммах (рис. 1, 4). Антимутагенный эффект наблюдался при использовании трех мутационных моделей: прямых мутаций в локусах ADE1 и ADE2, мутаций в локусах ADE4-ADE8 и мутаций устойчивости к канаванину, т.е. набор мутационных моделей был достаточно широким.

Проверка Криомелт МН на генотоксичность, проведенная быстрым тестом на штамме 2-LMG-3031, показала, что он обладает антимутагенной активностью. Когда клетки дрожжей инкубировались 24 ч в воде, содержащей 30% Криомелт МН, частота мутаций снижалась в 1.5 раза по сравнению с контролем.

Для более точной оценки антимутагенной активности Криомелт МН был использован флуктуационный метод медиан, позволяющий измерять темп спонтанного мутагенеза, обусловленного ошибками репликации. Результаты этих экспериментов показали, что частота спонтанных мутаций не была изменена в клетках, обработанных Криомелт МН (табл. 2). Следовательно, этот препарат не влияет на репликативный мутагенез.

Метод упорядоченного посева предпочтительно измеряет темп спонтанного мутагенеза, вызванного ошибками репарации. Использование этого теста в экспериментах с Криомелт МН показало, что темп спонтанного мутагенеза зависел от использованной мутационной модели и снижался в 2-10 раз. Эти результаты свидетельствуют о том, что Криомелт МН влияет на спонтанный мутагенез, обусловленный ошибками репарации.

Поскольку Криомелт МН снижал спонтанный репарационный мутагенез, мы изучили влияние этого препарата на мутагенез, индуцированный мутагенами, вызывающими повреждения ДНК различной природы. Данные рис. 1 показывают, что Криомелт МН значительно снижает частоту УФ-индуцированных мутаций, в еще большей степени - гамма индуцированных мутаций и в меньшей степени - ЭМС-индуцированных мутаций. Эта работа была проделана на высокочувствительном тестерном штамме 2-LMG-3031. Данные, представленные на рис. 2, показывают, что и у штамма дикого типа 11A-3031 Криомелт МН понижал частоту УФ-индуцированных мутаций. Приведенные выше результаты подтверждают предположение, что действие Криомелт МН связано не с первоначальными повреждениями ДНК, а с процессингом этих повреждений в мутации в течение работы систем репарации.

Чтобы выяснить, какие этапы репарации могли бы быть связанными с антимуtagenным эффектом Криомелт МН, мы изучили его влияние на УФ-индуцированный мутагенез у штаммов, несущих мутации, блокирующие различные пути репарации. Данные рис. 2 показывают, что Криомелт МН снижал частоту мутаций в ADE4-ADE8 локусах примерно в равной степени у штаммов дикого типа и мутанта *rad2*, который дефектен по одному из этапов нуклеотид-эксцизионной репарации [22]. Следовательно, блокирование нуклеотид-эксцизионной репарации не влияет на антимуtagenный эффект Криомелт МН.

Гены RAD51, RAD54 и RAD59 контролируют различные стадии рекомбинационного процесса. Ген RAD51 контролирует раннюю стадию гомологичной рекомбинации - формирование D-петли [23], необходимое как для рекомбинационной репарации, так и для безошибочной ветви пострепликативной репарации. Продукт гена RAD54 участвует в процессе гомологичной рекомбинации на более поздних этапах [24]. В ходе пострепликативной репарации, связанной с рекомбинационным спасением заблокированной репликативной вилки, роль продукта этого гена является минорной на первой стадии поиска гомологичной последовательности, так как сестринские хроматиды оказываются физически сближенными одна с другой [23]. Ген RAD59 контролирует ветвь рекомбинационной репарации, параллельную RAD51-зависимой ветви. Продукт этого гена участвует в отжиге одностранных участков ДНК [25]. Антимуtagenное действие Криомелт МН наблюдалось у мутантов *rad54* и *rad59* и его не было у мутанта *rad51* (рис. 3).

Гены RAD51, RAD54 и RAD59 контролируют различные стадии рекомбинационной репарации, в то время как ген RAD51 задействован также в безошибочной ветви пострепликативной репарации. В связи с этим необходимо определить влияние Криомелт МН на рекомбинационную репарацию в прямых экспериментах. Для этого мы изучили влияние этого препарата на эффективность процесса УФ-индуцированной митотической рекомбинации. Результаты этих экспериментов показывают, что Криомелт МН не влияет на частоту УФ-индуцированного кроссинговера или геной конверсии (рис. 4). Следовательно, Криомелт МН не действует на сам рекомбинационный обмен, но, возможно, влияет на репарацию гетеродуплексов, возникающих в ходе данного обмена.

Мутационными интермедиатами, которые могут устраняться в процессе рекомбинационной репарации, являются ошибочно спаренные основания, возникающие в D-петле после внедрения в сестринскую хроматиду одностранный ДНК с ошибочно включенными основаниями. Последние возникают при попытке репликационных полимераз обойти повреждение ДНК. Ошибочно спаренные основания могут репарироваться MSH2-зависимой репарационной системой. Однако в случае мисматчей, которые возникают в процессе пострепликативной репарации, главную роль в их коррекции играет, по-видимому, система, зависящая от гена HSM3 [9]. В связи с этим мы изучили влияние Криомелт МН на уровень УФ-индуцированного мутагенеза у *hsm3*,

pms1 и msh2 мутантов. Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 5, показывают, что антимуtagenная активность Криомелт МН есть у мутанта hsm3, в то время как у мутантов pms1 и msh2 она отсутствует. Следовательно, продукты генов MSH2 и PMS1 необходимы для антимуtagenного действия Криомелт МН. Таким образом, мы пришли к заключению, что Криомелт МН действует на стадии репарации гетеродуплексов, возникающих в результате образования D-петли. Мы можем предположить, что Криомелт МН стимулирует действие мисматч-репарационной системы в D-петле, хотя в нормальном состоянии эта система играет минорную роль в рекомбинационной репарации.

Известно, что гены, контролирующие репарацию ошибочно спаренных оснований, являются гомологичными у дрожжей и человека [21]. В этой связи Криомелт МН имеет практическое значение в химической и радиационной терапии, снижая уровень нежелательного мутагенеза, индуцируемого этими факторами.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ “КРИОМЕЛТ МН” УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ ПРЕДМУТАЦИОННЫХ ИНТЕРМЕДИАТОВ ДНК В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Novick A., Szilard L. Anti-mutagens // Nature. 1952. V. 170. P. 926-927.
2. Clarke C.H., Shankel DM. Antimutagenesis in microbial systems // Bacteriological Rev. 1975. V. 38. P. 33-53.
3. de Flora S., Bronzetti G., Sobels F.H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity: end-points and systems// Mutat. Res. 1992. V. 267. P. 153-298.
4. von Borstel R.C., Drake J.W., Loeb L.H. (Eds). Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis // Mutat. Res. 1996. V. 350. P. 1-293.
5. Fergusson L.R., Bonzetti G., de Flora S. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer // Mutat. Res. 2005. V. 591. P. 3-7.
6. Kuroda Y., Inoue T. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria // Mutat. Res. 1988. V. 202. P. 387-391.
7. Ohta T., Watanabe M., Shirasu Y., Inoue T. Post-replication repair and recombination in uvrA umuC strains of Escherichia coli are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound // Mutat Res. 1988. V. 201. P. 107-112.
8. Mure K., Rossman T.G. Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants// Mutat. Res. 2001. V. 480-481. P. 85-95.
9. Fedorova I.V., Gracheva L.M., Kovaltzova S.V. et al. The yeast HSM3 gene acts in one of the mismatch repair pathways//Genetics. 1998. V. 148. P. 963-973.
10. Alekseev S.Yu., Kovaltsova S.V., Fedorova I.V. et al. HSM2 (HMO1) gene participates in mutagenesis control in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // DNA Repair. 2002. V. 1. P. 287-297.

11. Kelberg E.P., Kovaltsova S.P., Alekseev S.Y., et al. HIM1, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induced mutagenesis // *Mutat. Res.* 2005. V. 578. P. 64-78.
12. Fedorova I.V., Kovaltzova S.V., Gracheva L.M. et al. Requirement of HSM3 gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mutat. Res.* 2004. V. 554. P. 65-75.
13. Ivanov E.L., Kovaltzova S.V., Korolev V.G. *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhanced induced mutation and altered mitotic gene conversion // *Mutat. Res.* 1989. V. 213. P. 105-115.
14. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Марфин С.В. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для изучения индуцированного мутагенеза и рекомбинации // *Генетика.* 1979. Т. 15. № 1. С. 41-48.
15. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.А., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984. 144 с.
16. Ковальцова С.В., Королев В.Г. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования мутагенов окружающей среды, основанный на взаимодействии мутаций *rad2* и *him1* // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 3. С. 366-372. (Koval'tsova S.V., Korolev V.G. The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain for testing, environmental mutagens based on the interaction between *rad2* and *him1* mutations // *Rus. J. Genetics.* 1996. V. 32. №3. P. 316-321.)
17. Roman FI. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast // *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.* 1956. V. 26. P. 299-314.
18. Lea D.E., Coulson C.A. The distribution of the number of mutants in bacterial populations // *J. Genet.* 1949. V. 49. P. 264-285.
19. Khromov-Borisov N.N., Saffi J., Henriques JA P. Perfect order plating: principal and applications // *ТТО.* 2002. V. I. P. T02638.
20. Ковальцова С.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Гены-мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие мутаций *him* и *hsm* с мутациями, блокирующими три основных пути репарации индуцированных повреждений ДНК // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 8. С. 1061-1067. {Koval'tsova S.K., Gracheva L.M., Evstyukhina TA. et al. Mutator genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Interuaction between mutations *him* and *hsm* and mutations blocking three principal pathways. 1996. V. 32. № 8. P. 921-927.)
21. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair//*J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 30305-30309.
22. Habraken Y., Sung P., Prakash L., Prakash S. Yeast excision repair gene RAD2 encodes a single-stranded DNA endonuclease // *Nature.* 1993. V. 366. P. 365-368.
23. Shinohara A., Ogawa H., Ogawa T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein // *Cell.* 1992. V. 69. P. 457-470.
24. Heyer W.-D., Li X., Rolfmeier M., Zhang X.-P. Rad54: the swiss army knife of homologous recombination? // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4115-4125.
25. Bai Y., Symington L.S. A Rad52 homolog is required for RAD51 -independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 2025-2037.

Второй этап

Доклиническое изучение безопасности препарата Криомелт МН

Исследования препарата проведены на экспериментальной базе Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова.

Все исследования проведены в рамках «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» Государственного фармакологического комитета РФ, Москва, 2005 год.

Под редакцией: Р.У.Хабриева.

1. Острая токсичность на мышах и крысах.

Исследования острой токсичности проводились по методу Литчфилда и Уилкоксона при двух путях введения препарата.

А)- внутривенно

Б) - подкожно.

Препарат вводили однократно. Период наблюдения один месяц после последнего случая гибели животного.

Вид животных:

Мыши BDF₁ (C57Bl x DBA2) самцы и самки, массой 18 -22 грамма.

Крысы Wistar самцы и самки, массой 120- 140 граммов.

Каждая группа насчитывала 6 особей. Оценивали токсический эффект. Учитывали 100% гибель, 0% гибель три промежуточные дозы для возможности построения пробита. Обычно при изучении острой токсичности минимальное количество групп - 6, при поиске доз - может достигать 8-10. Параметры наблюдения:

Состояние и поведение - в 1 сутки каждый час, далее ежедневно на всем протяжении опыта (двигательная активность, состояние шерстного покрова и глазных щелей, наличие поноса).

Количество павших и сроки их гибели - ежедневно.

Масса тела - один раз в неделю.

Вскрытие павших животных и макроскопическая оценка состояния внутренних органов.

Дозы, характеризующие токсичность рассчитываются при помощи программы «Статистика 2005» (метод пробит анализа). В результате проведенного исследования будут определены ЛД₅₀; МЦД; ЛД₀₀ и другие дополнительные дозы, характеризующие токсичность.

Количество животных

Мыши - 120 голов для каждого пути введения (всего 240)

Крысы - 120 голов для каждого пути введения (всего 240).

Продолжительность эксперимента два месяца.

2. Исследование кумуляции препарата.

До проведения исследования по хронической токсичности будет определен Отчет по исследованию антимуутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

индекс кумуляции, который вычисляется как соотношение ЛД50 при однократном введении к ЛД50 при многократном введении. Исследование проводится на крысах при 20- кратном ежедневном подкожном введении и 5-кратном внутривенном введении.

Исследование будет проведено на крысах самцах линии Wistar. Препарат вводить подкожно ежедневно на протяжении 20 дней в разовых дозах, равных 1; 1/2; 1/5; 1/10 и 1/20 от однократной ЛД50 ^{При} подкожном введении. Каждая группа насчитывает 10 особей.

Наблюдение за состоянием и поведением животных проводить ежедневно во время курса введений и в течение трех недель после окончания курса.

Для внутривенного введения использовать дозы, равные 1; 1/2; 1/5 от однократной ЛД50 при внутривенном введении. Каждая группа насчитывает 10 особей.

Наблюдение за состоянием и поведением животных проводить ежедневно во время курса введений и в течение трех недель после окончания курса. При этом проводится учет павших животных и сроки их гибели.

Расчет индекса кумуляции (ИК) производится по формуле:

$$\text{ИК} = \frac{\text{ЛД}_{50} \text{ однократная}}{\text{ЛД}_{50} \text{ многократная}}$$

Всего на эксперимент будет использовано 80 крыс.
Длительность исследования - 2 месяца.

3. Хроническая токсичность на крысах и кроликах.

Исследование проводить на животных обоего пола (самцах и самках).

При исследовании на крысах каждая группа подопытная насчитывает 20 животных и 20 животных контрольные группы (всего 120 крыс).

При исследовании на кроликах - каждая подопытная группа - 6 животных и, соответственно по 6 животных в контрольных группах (всего 36 кроликов).

Препарат вводить внутривенно и подкожно крысам и кроликам ежедневно в течение 15 дней (рекомендуемый курс для клиники - 5 дней).

Испытуемые дозы - суммарная доза, равная однократной МПД при соответствующем пути введения, суммарная доза, равная однократной ДД50.

Параметры исследования:

- состояние и поведение - ежедневно на всем протяжении эксперимента
- масса тела 1 раз в неделю
- клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула) на -3; 5; 10 и 15 сутки в процессе введений препарата. На 3; 5; 7; 10; 14; 20 и 30 сутки после окончания курса введений.
- время свертывания крови у кроликов на 1; 15 и 30 сутки после курса
- биохимическое исследование сыворотки крови при помощи автоматического анализатора TARGA 2000 (Италия) (глюкоза, мочевины, креатинин, билирубин, белок общ., альбумины, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, натрий, калий, кальций, хлориды) на 1; 15 и 30 сутки после курса у кроликов и на 1 и 30 сутки после курса у крыс.

Отчет по исследованию антимутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

- исследование суточного диуреза (выпито жидкости / выделено мочи) и клинического анализа мочи (удельный вес, рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тельца, белок, цилиндры, соли) на 1; 15 и 30 сутки после курса.

- ЭКГ во втором стандартном отведении при помощи электрокардиографа ЭК 1 Т-07 на 1; 15 и 30 сутки после курса.

- Забой для гистологического изучения внутренних органов и тканей на 1 и 30 сутки (по 5 животных из каждой группы).

При забое будут определены массовые коэффициенты внутренних органов (тимус, сердце, печень, почки, селезенка).

Для гистологического исследования будут взяты: щитовидная железа, тимус, сердце, легкие, печень, поджелудочная железа, почки, надпочечники, селезенка, желудок, все отделы кишечника, семенники, яичники, мочевого пузыря и паховые лимфоузлы.

Срезы будут окрашены гематоксилин-эозином по стандартной методике.

Гистологические препараты будут подвергнуты световой микроскопии при помощи микроскопа «Олимпус ВХ41» (Япония).

Для оценки местно-тканевых реакций у крыс дополнительно будет взята кожа с подкожной клетчаткой с места введения. У кроликов будет взята кожа с подкожной клетчаткой с места введения и участок вены с паравенозной клетчаткой. Местно-тканевые реакции будут оценены макроскопически по бальной шкале Школьниковой и гистологически.

Длительность исследования 6 месяцев.

В результате проведенных исследований будут выявлены переносимые и токсические дозы препарата при соответствующем пути введения, определена зависимость токсичности от величины примененной дозы препарата и обратимость токсических изменений органов и тканей, изучена токсикодинамика препарата и выявлены виды лимитирующей токсичности.

4. Оценка алергизирующих свойств и иммунотоксического действия.

А) Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок на морских свинках).

Исследования проводят на морских свинках массой 250 - 300 граммов.

Реакцию анафилаксии оценивают непосредственно после введения разрешающей дозы препарата в течение двух часов и через сутки.

Для выяснения способности самого испытуемого препарата вызывать анафилактический синдром животных сенсibilизируют трехкратным введением препарат по схеме. Первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно в область бедра через день. Дозы препарата - 1 терапевтическая и 10 терапевтических доз. Через 14 дней внутрисердечно вводят разрешающую дозу препарата, равную суммарной сенсibilизирующей. Контрольной группой служат морские свинки, которые получают разрешающую дозу препарата без предварительной сенсibilизации. Каждая группа насчитывает 10 особей.

Учет интенсивности анафилактического шока проводят в индексах по

Weigle.

Всего в эксперименте будет использовано 30 морских свинок.

Продолжительность эксперимента 1 месяц.

Б) Реакция активной кожной анафилаксии на морских свинках

Сенсибилизацию морских свинок массой тела 200 - 250 граммов производят так же, как при изучении общей анафилактической реакции. На 14 день после сенсибилизации на выстриженный участок спины морским свинкам внутрикожно вводят препарат в двукратных разведениях в концентрациях, не вызывающих местно-раздражающих реакций. Через 20 минут после введения разрешающих доз производят внутрисердечную инъекцию 0,5 мл 1% раствора Синего Эванса. Через 30 минут после этого животных забивают путем разрыва шейных позвонков, отсепааривывают кожный лоскут на месте введения испытуемого препарата и производят измерение синего пятна на внутренней поверхности кожи. Контрольной группой служат морские свинки, которые получают разрешающую дозу препарата без предварительной сенсибилизации. Каждая группа насчитывает 10 особей. Всего в эксперименте будет использовано 50 морских свинок.

Продолжительность эксперимента 2 месяца.

В) Конъюнктивальная проба на морских свинках и кроликах

Эксперименты проводят на морских свинках массой 200 - 250 граммов, интактных и предварительно сенсибилизированных подкожным или внутривенным введением испытуемого препарата. На 14 сутки после сенсибилизации на высоте иммунного ответа свинкам наносят на конъюнктиву испытуемый препарат (по 1 капле в глаз). Во второй глаз вводят 1 каплю воды.

Реакцию оценивают непосредственно через 15 минут, через 24 и 48 часов после нанесения препарата на конъюнктиву. Оценку эффекта проводят по бальной шкале.

Подбор концентраций осуществляется путем закапывания в глаз несенсибилизированных животных препарата в различной концентрации.

Общее количество животных составит 30 голов.

Продолжительность - 1 месяц.

Г) Реакция гиперчувствительности замедленного типа на мышях

Эксперименты проводят на мышях F1(CBA x C57B1) самцах, массой 20 - 22 грамма, предварительно иммунизированных внутривенным введением эритроцитов барана в дозе 2×10^5 клеток на мышь. После сенсибилизации мыши получают испытуемый препарат подкожно или внутривенно. На 5-е сутки после сенсибилизации мышам дают разрешающую дозу эритроцитов барана в дозе 1×10^8 клеток на мышь (эритроциты вводят в подушечку лапы). В контрлатеральную лапу мышам вводят физиологический раствор хлорида натрия. Контролем служат интактные мыши, которым в лапу вводят только разрешающую дозу эритроцитов барана. Каждая группа насчитывает 10 животных. Через сутки животных забивают, лапки ампутуют по границе между выступом пяточной и

сочленением мало- и большеберцовой кости. Лапки взвешивают на весах "Сарториус". Индекс реакции вычисляют по формуле:

$$\frac{P_0 - P_k}{P_k} \times 100\%$$

Где P_0 - масса лапки после введения эритроцитов, P_k - масса лапки интактных мышечей после введения разрешающей дозы эритроцитов.

Всего в эксперименте используется 40 мышечей.

Продолжительность эксперимента 1 месяц.

Д) Митостатический и лимфоцитотоксический эффект на мышцах

Изучение митостатического и лимфотоксического действия препарата проводят в постановке реакции трансплантат против хозяина по методу Р.В. Петрова.

В качестве реципиентов используют самцов мышечей F₁(CBA x C57BL). В качестве доноров клеток лимфатических узлов используют мышечей CBA.

Схема постановки опыта:

- 1 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁
- 2 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ клетки л/у мышечей CBA 5 x 10⁵
- 3 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ клетки л/у мышечей CBA 1 x 10⁶
- 4 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ внутривенно препарат в терапевтической дозе
- 5 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ внутривенно препарат в 10 - кратной терапевтической дозе
- 6 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ клетки л/у мышечей CBA 1 x 10⁶ + внутривенно препарат в терапевтической дозе
- 7 гр. Облучение 600 рад мышечей F₁+ клетки л/у мышечей CBA 1 x 10⁶ + внутривенно препарат в 10 - кратной терапевтической дозе

Через 10 суток после введения препарата мышечей забивают путем разрыва шейных позвонков, выделяют селезенки, фиксируют их в смеси спирта с уксусной кислотой (4/1) и подсчитывают количество колоний в каждой селезенке.

Вычисляют среднее число эндоколоний (СЧЭ) в группе и индекс инактивации эндоколоний (ИИЭ).

$$\text{ИИЭ} = 100 \frac{\text{СЧЭ}_0 \times 100}{\text{СЧЭ}_k}$$

Каждая группа насчитывает 10 мышечей.

Всего 70 мышечей F₁ (реципиентов) и 50 мышечей CBA (доноров)

Продолжительность эксперимента 1 месяц.

Е) Влияние на гуморальный иммунитет (определение количества АОК на селезенку мышечей по стандартному методу Канингхема).

В экспериментах используют самцов нелинейных белых мышей. Формируют две группы животных для исследования двух путей введения препарата. По первой схеме препарат вводят подкожно в терапевтической дозе и в 10-кратной терапевтической дозе в течение 15 суток, а иммунизацию проводят одновременно с 15 введением препарата, эритроцитами барана в дозе 5×10^6 клеток на мыш. По второй схеме мыши получают препарат внутривенно в терапевтической дозе и в 10-кратной терапевтической дозе 15 -кратно, а затем одновременно с последним введением проводят иммунизацию. Животные контрольных групп получают по 0,2 мл физиологического раствора подкожно или внутривенно в течение 15 суток. Каждая группа насчитывает по 10 животных. Через пять суток после иммунизации мыш забивают и определяют количество антителообразующих клеток в селезенках и титры антител в сыворотках. Количество антителообразующих клеток в селезенках определяют методом Каннингхема в монослое клеток. Для этого с помощью двухсторонней липкой ленты склеивают два предметных стекла, объем камеры, образующейся при этом, составляет 0,2 мл. В камеру вносят 0,05 мл суспензии селезеночных клеток в 199 или RPMI-1640 (1 селезенка в 5 мл среды), 0,06 мл 10% суспензии эритроцитов барана и 0,04 мл комплемента морской свинки в разведении 1:2 и 0,05 мл среды. Камеры герметизируют парафином, инкубируют 1 час при 37°C и подсчитывают число зон гемолиза. Учитывая разведение суспензии селезеночных клеток, рассчитывают количество антителообразующих клеток, приходящееся на селезенку и на 10^6 ядродержащих клеток.

Титры гемагглютининов определяют, используя 96 луночные круглодонные планшеты для иммунологических реакций. Для этого в лунках планшетов готовят ряд двукратных разведений исследуемой сыворотки и вносят равный объем 1% суспензии эритроцитов барана (0,01 мл разведенной сыворотки смешивают с 0,025 мл эритроцитов). Планшеты инкубируют 1 час при 37°C и 2 часа при $20-22^\circ \text{C}$. При отсутствии реакции агглютинации эритроциты собираются в точку на дне лунки планшета. За титр принимают максимальное разведение сыворотки, при котором еще наблюдается реакция агглютинации.

Всего на опыт необходимо 60 мышей.

Продолжительность опыта 1 месяц.

Ж) Влияние препарата на массу и весовые коэффициенты лимфоидных органов крыс

Непосредственно после окончания курса хронического (в течение 15 суток) применения препарата у забитых для гистологического исследования крыс и кроликов определяют массу тела, массу тимуса, селезенки и паховых лимфоузлов. Рассчитывают их весовые коэффициенты и сравнивают их с этими показателями в группах соответствующих контролей.

Всего на опыт 120 крыс и 36 кроликов.

Продолжительность эксперимента 3 месяца.

З) Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

Эксперимент проводится на мышах BDF₁ самцах, массой 20 - 22 грамма.

Отчет по исследованию антимуtagenной активности медицинского препарата Криомелт МН

Препарат вводят подкожно или внутривенно ежедневно в течение 15 дней в терапевтической дозе и 10-кратной терапевтической дозе. Контрольной группой служат интактные мыши. Каждая группа насчитывает 10 мышей.

Определение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов производят на 3 сутки после курса введений.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов определяют по их способности поглощать и переваривать меченые изотопом эритроциты барана.

Для мечения эритроцитов применяют 6-валентный хром в форме аниона $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$. Анион проникает через оболочку клетки, внутри эритроцита восстанавливается в трехвалентный катион, который затем прочно связывается с гемоглобином.

В шприц, содержащий 3 мл цитратно-глюкозного раствора, состоящего из 2 г двузамещенного цитрата натрия, 2 г глюкозы и 120 мл воды, набирают 10 мл крови барана. Смесь центрифугируют на малых оборотах 10 мин. Надосадочную жидкость используют для приготовления промывного раствора (2% раствор надосадочной жидкости на физиологическом растворе).

К осадку эритроцитов добавляют 100 микроюри $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ и инкубируют в течение 30 минут, периодически помешивая стеклянной палочкой. После инкубации эритроциты отмывают от несвязанного изотопа. Для этого к клеточной взвеси добавляют приготовленный описанным выше способом промывной раствор, помешивают и центрифугируют 10 мин. при 1 тыс. об/мин. Над осадочную жидкость оттягивают пипеткой, снова добавляют промывной раствор и все операции повторяют. Промывание производят не менее пяти раз. Последние промывные воды должны содержать метку не выше уровня фона.

За 30 мин. до забоя мышам внутрибрюшинно вводят 0,2 мл 10% взвеси эритроцитов на физиологическом растворе. После забоя мышам внутрибрюшинно вводят 4,5 мл среды Хенкса с добавлением 5 ед/мл гепарина. После 3-х минутного массажа брюшной стенки из перитонеальной полости шприцем извлекают среду со взвешенными в ней перитонеальными клетками. Взвесь клеток собирают в колбу, которую для предотвращения аутолиза клеток ставят на лед. Количество клеток просчитывают в камере Горяева. Взвесь разводят средой Хенкса до концентрации 5×10^5 клеток в 1 мл. Разведенную взвесь клеток разливают в две группы пробирок. Пробы инкубируют при 37° . В одной группе пробы инкубируют 30 мин., в другой - 2 часа. Перитонеальные клетки, оседающие на стенке пробирки, представляют собой типичные макрофаги. Таким образом, в течение 30 минут инкубации меченых эритроцитов в брюшной полости происходит их максимальное поглощение макрофагами. Находясь 30 минут в пробирке, макрофаги с поглощенными эритроцитами прикрепляются к поверхности стекла и через 2 часа инкубации в пробирке большинство поглощенных эритроцитов переваривается.

Через 30 минут инкубации в обеих группах пробирок содержимое выливают. Перитонеальные клетки, осевшие на поверхности пробирок, отмывают от нефагоцитированных эритроцитов физиологическим раствором. Во вторую группу пробирок наливают по 2 мл чистой среды Хенкса и продолжают инкубацию еще 2 часа.

В каждую пробирку после инкубации наливают по 3 мл физиологического

Отчет по исследованию антимуtagenной активности медицинского препарата Криомелт МН

раствора и палочкой с резиновым наконечником снимают перитонеальные клетки со стенок. По 1 мл клеточной взвеси разливают в ампулы для счета импульсов на у-счетчике. В одном мл клеточной взвеси определяют количество белка по Лоури и пересчитывают количество импульсов на 1 мг белка.

Количество мышей - 30.

Длительность эксперимента 1 месяц.

5. Изучение репродуктивной токсичности препарата

А) Изучение тератогенных и эмбриотоксических свойств препарата.

В опытах используют крыс F1(АМСУ x Wistar) самок массой тела 300 - 350 граммов и самцов Wistar массой 500 - 600 граммов. Для получения самок с диагностированным сроком беременности их вечером (в 19 часов) подсаживают к самцам.

На утро следующего дня исследуют влагалищные мазки. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считают первым днем беременности и таких животных отбирают для опыта.

Применение препарата проводят многократно подкожно или внутривенно в двух дозах (тердоза и суммарная МПД). Режимы введений: с 1 по 6 день - в высшей дозе; с 6 по 16 - в двух дозах; с 16 по 19 день беременности - в высшей дозе. Каждая группа насчитывает 20 беременных самок.

Животных забивают на 20 день беременности (непосредственно перед естественными родами) путем разрыва шейных позвонков. При вскрытии производят визуальный осмотр органов брюшной полости. Выделяют яичники и матку, подсчитывают количество жизнеспособных плодов. Затем матку вскрывают, плоды вместе с плацентами выделяют и подсчитывают количество мест резорбций плодов и общее количество мест имплантации. Эмбрионы отделяют от плацент и при помощи весов "Сарториус" определяют массу плацент и эмбрионов. Измеряют кранио-каудальный размер плодов, подсчитывают соотношение плод/плацента. При помощи бинокулярной лупы МБС-2 подсчитывают количество желтых тел в яичниках. Плоды фиксируют в жидкости Буэна или в 96° спирте для соответствующих исследований по методу Вилсона (определение влияния препарата на развитие внутренних органов) или Доуссона (оценка влияния препарата на развитие скелета).

Часть беременных самок (по 5 голов из каждой группы) оставляют до естественных родов. Подсчитывают количество родившихся крысят, следят за ходом их постнатального развития и через месяц после рождения тестируют их с целью выявления возможных поражений ЦНС. Для этого исследуют поведенческие реакции в тестах "открытое поле", "рефлекс норки" и "удержание на сетке", при помощи актографа определяют количество горизонтальных и вертикальных перемещений в единицу времени.

Всего на исследование необходимо 80 беременных самок и 10 - 15 самцов - производителей. Продолжительность исследования 4 месяца.

Б) Изучение влияния препарата на генеративную функцию крыс

Исследования проводят на нелинейных самках и самцах белых крыс, массой

Отчет по исследованию антимутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

150 — 200 граммов.

Препарат вводят подкожно в дозах, равных терапевтической и суммарной МПД самцам в течение 60 дней, самкам - 15 дней. После завершения периода введения подопытных животных спаривают с интактными самками и самцами. В качестве контроля служат интактные самки и самцы, скрещенные между собой. У подопытных самок перед началом введения, а у контрольных перед спариванием проводят изучение эстрального цикла и в эксперимент берут только эстрирующих самок.

Для скрещивания самок подсаживают к самцам в соотношении 2:1 сроком на 2 эстральных цикла. Оплодотворение регистрируют с помощью вагинальных мазков. Полученных беременных самок разделяют на две группы: одну группу оставляют для рождения и вскармливания потомства (до 21-го дня жизни), самок другой группы забивают на 20-й день беременности, подсчитывают количество желтых тел, мест имплантаций, резорбций, живых и мертвых плодов, рассчитывают пред- и постимплантационную гибель; плоды подвергают внешнему осмотру. У потомства учитывают динамику изменения массы тела и гибели до окончания срока вскармливания. Рассчитывают индекс плодовитости и индекс беременности.

Статистическую обработку результатов проводят, применяя критерий "t" Стьюдента и критерий "U" Вилкоксона-Манна-Уитни; в качестве единицы наблюдения используют помет.

Схема постановки эксперимента:

Группы		Препарат	Доза
1	Самцы 10 голов	препарат	тердоза
	Самки 20 голов	интактные	-
2	Самцы 10 голов	препарат	суммарная МПД
	Самки 20 голов	интактные	-
3	Самцы 10 голов	интактные	-
	Самки 20 голов	препарат	тердоза
4	Самцы 10 голов	интактные	-
	Самки 20 голов	препарат	суммарная МПД
5	Самцы 10 голов	интактные	-
	Самки 20 голов	интактные	-

Всего на эксперимент необходимо 150 крыс.

Продолжительность эксперимента 6 месяцев.

6. Изучение пирогенности препарата.

Исследования проводятся в соответствии с требованиями Госфармакопеи СССР издание 11, выпуск 2, 1990 г, стр 183. Исследования проводят на кроликах породы "Шиншила" самцах и самках, массой 1500 - 2500 граммов

Прежде, чем приступить к испытанию препарата на пирогенность проводят определение переносимых доз и концентраций препарата. Определяют "Тест-дозу" для дальнейшего изучения пирогенных свойств препарата. Это максимальная доза и концентрация, при которой препарат не проявляет никаких токсических свойств при струйном внутривенном введении.

Каждого кролика содержат в отдельной клетке в помещении с постоянной температурой (допустимое отклонение $\pm 3^{\circ}\text{C}$). Взвешивание производят через день до дачи корма, всего не менее 3-х раз. Кролики не должны терять в весе. В течение 3-х суток перед испытанием у каждого кролика измеряют ректальную температуру. Исходная температура подопытных кроликов должна быть в пределах $38,5 - 39,5^{\circ}$. Определение температуры должно проводиться в комнате с постоянной температурой $18 - 22^{\circ}\text{C}$. Накануне вечером перед экспериментом у животных отбирают остатки корма. Вода - без ограничений. Испытуемый раствор вводят подогретым до 37°C .

Испытуемый раствор проверяют на 3-х кроликах. Введение препарата производят не менее, чем через 30 минут после измерения исходной температуры. После введения препарата температуру измеряют три раза с промежутками 1 час. Испытуемый препарат считают непирогенным, если после введения ни у одного из трех кроликов не при одном из трех измерений не наблюдалось повышение температуры более чем на $0,6^{\circ}\text{C}$ по сравнению с исходной температурой и в сумме повышение температуры у всех трех кроликов не превышает $1,4^{\circ}\text{C}$. Если у 1-го или 2-х кроликов температура повысилась более чем на $0,6^{\circ}\text{C}$ и в сумме у трех кроликов повышение температуры составляет более $1,4^{\circ}\text{C}$, испытание повторяют дополнительно на 5 кроликах. Препарат считается непирогенным, если не более, чем у трех из всех восьми кроликов наблюдалось индивидуальное повышение температуры на $0,6^{\circ}\text{C}$ и более и общая сумма повышений температуры у всех восьми кроликов не превышала $3,7^{\circ}\text{C}$.

Количество кроликов - 10.

Продолжительность - 1 месяц.

7. Изучение мутагенных свойств препарата. А) Мутационный тест на *Salmonella tiphimurium* (тест Эймса).

Исследование проводится по стандартной методике.

Термины и определения

Мутационный тест на *Salmonella tiphimurium* является бактериальной тест-системой для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений и (или) их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма. В данном тесте замены пар оснований в молекуле ДНК могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте хромосомы.

Цель исследования и принцип метода

Данный тест предназначен для выявления способности препарата индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella tiphimurium*.

Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без нее. После инкубации подсчитывается количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативного контроля

Отчет по исследованию антимуtagenной активности медицинского препарата Криомелт МН

(необработанные культуры или культуры, обработанные растворителем).

Если препарат обладает мутагенной активностью, то он будет индуцировать обратные мутации от ауксотрофности по гистидину у гистидинзависимых штаммов **Salmonella tiphimurium**.

Процедура тестирования.

Бактерии. В качестве тестерных организмов используются штаммы **Salmonella tiphimurium**. Минимальный набор состоит из штаммов ТА 97, ТА 98 и ТА 100. Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.

Метаболическая активация. В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг однократно внутрибрюшинно за 5 суток до забоя).

Контроля. Негативный - дистиллированная вода. Позитивный должен быть специфичен для каждого тестерного штамма.

Обработка результатов.

Данные представляются в виде количества ревертантных колоний на чашку: количество колоний для каждой чашки, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение.

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимое от дозы увеличение количества ревертантов, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивные результаты указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует генные мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания у данного микроорганизма. Негативные результаты указывают на то, что препарат не мутагенен в данных условиях для использованных штаммов **Salmonella tiphimurium**.

Б) Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.

Термины и определения

Цитогенетическая активность — способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и зародышевых клетках.

Аберрации хромосомного типа - структурные нарушения на уровне идентичных локусов обоих хроматид, выявляемые как парные фрагменты и хромосомные обмены.

Аберрации хроматидного типа - структурные нарушения на уровне одной хроматиды, выявляемые как одиночные фрагменты или хроматидные обмены.

Ахроматические пробелы - определяемые визуально нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

Цель исследования и принцип метода -

выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической

Отчет по исследованию антимуутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

активности фармакологических средств в клетках костного мозга млекопитающих.

В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями, включая ахроматические аберрации, составляет 1-2,5 %.

Процедура тестирования

Лабораторные животные.

Эксперименты проводят на самцах и самках мышей гибридов F1 (СВА х С57 В16/j) двухмесячного возраста массой 24 г. В состав каждой контрольной и экспериментальной группы входит по 5-6 особей.

Животные содержатся при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

Проведение эксперимента.

Учитывая предполагаемый способ применения препарата в клинике, используют внутривенное введение. В экспериментах по изучению потенциальной мутагенной активности используют однократную и 10-кратную терапевтические дозы препарата четырехкратно с интервалом в 24 часа самцам и самкам.

Контроли

Мышам контрольных серий вводят **0,1 мл физиологического раствора.**

Приготовление цитогенетических препаратов

Фиксацию клеток костного мозга производят через 24 часа после окончания курса введения.

За 2-2,5 часа до забоя для накопления метафаз мышам внутрибрюшинно вводят колхицин (0,025% рабочий раствор) по 0,01 мл/г массы животного. Костный мозг из бедренных костей только что забитых мышей быстро вымывают в центрифужную пробирку 1 мл. гипотонического (0,555%) раствора КС1.

Пробирки с костным мозгом помещают в термостатируемую водяную баню на 10 минут, затем центрифугируют в течение 5 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, наслаивают 1 мл свежеприготовленного фиксатора (3 части метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Объем фиксатора доводят до 1 мл и помещают на 10 минут в холодильник, после чего, не взбалтывая осадок, фиксатор сливают, добавляют новую порцию холодного фиксатора того же объема и выдерживают пробирки в холодильнике 20 минут. Затем вновь фиксатор сливают, осадок разбивают ударами пальца о пробирку, добавляют 1 мл нового фиксатора и оставляют в холодильнике до следующего дня. Затем пробирки центрифугируют 5 минут при 1000 об/мин, фиксатор сливают, осадок разбивают и добавляют 0,5 мл фиксатора. Полученную суспензию раскапывают на чистые влажные охлажденные предметные стекла, которые высушивают над пламенем спиртовой горелки.

Препараты окрашивают азур-эозином по Романовскому.

Микроскопический анализ

Отчет по исследованию антимутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

Во всех группах анализируют по 100-200 метафаз на каждого животного. Для анализа отбирают метафазные пластинки правильной формы, с хорошим разбросом хромосом и модульным числом 40.

Учитывают следующие типы aberrаций хромосом: фрагменты (одиночные и парные) и обмены. При наличии в клетке более трех aberrаций ее классифицировали как имеющую множественные aberrации. Ахроматические пробелы оценивают отдельно и не включают в общее число aberrаций.

Оценка результатов

Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными aberrациями в контрольной и опытных сериях эксперимента. Сравнение долей клеток с гепатами и уровень пролиферации рассматривают в качестве дополнительных критериев цитогенетической активности.

Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения между опытными и контрольной сериями по критерию соответствия χ^2

Третий этап

Изучение пирогенности и местнораздражающего действия препарата Криомелт МН на кроликах.

Исследования препарата проведены на экспериментальной базе Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова.

Кролики породы «Шиншилла», массой 1,6 - 1,8 кг получены из питомника РАМН «Рапполово».

Животные содержались в виварии Института в индивидуальных клетках, на стандартном рационе брикетированных экструзированных кормов со свободным доступом к питьевой воде.

После двухнедельного карантина у животных трехкратно ежедневно была измерена ректальная температура.

Накануне эксперимента (вечером предидущего дня) у животных был отобран корм.

В день 0 эксперимента животные были взвешены, и у них была измерена ректальная температура.

Лекарственную форму Криомелта МН вводили однократно в краевую вену уха кроликов в дозе, равной 10 терапевтическим дозам для человека (в пересчете через поверхность тела для кроликов). Она составила 10 мг.

Через 1; 2; 3 часа после введения и через 1 сутки у кроликов была определена ректальная температура.

После введения препарата состояние и поведение животных не изменялось. Кролики хорошо перенесли введение препарата.

Таблица 1.

Изменения массы тела и ректальной температуры кроликов при однократном внутривенном введении препарата Криомелт МН

№ п/п	Фон (сутки перед введением)						День введения(0)					Через сутки
	-3		-2		-1		Исходная		1 ч	2ч	3ч	
	Масса (кг)	t°	Масса (кг)	t°	Масса (кг)	t°	Масса (кг)	t°	t°	t°	t°	
1	1,68	38,6	1,71	39,1	1,75	38,8	1,78	38,2	38,3	37,9	38,1	38,2
2	1,79	39,1	1,78	38,9	1,70	38,5	1,73	38,2	38,2	38,4	38,3	38,4
3	1,65	39,2	1,68	38,7	1,72	38,7	1,74	38,4	38,9	38,6	38,5	38,2
Суммарное повышение температуры									0,6	0,4	0,2	0,2

Препарат пирогенными свойствами не обладает, так как ни у одного кролика повышение температуры не превышало 0,6° С, а суммарное повышение температуры у всех трех кроликов не превышало 1,4° С.

При визуальном осмотре макроскопических изменений в области введения препарата обнаружено не было.

Через трое суток после введения препарата кролики были забиты, и у них

Отчет по исследованию антимуtagenной активности медицинского препарата Криомелт МН

были взяты участки уха с краевой веной для гистологического исследования.

Протокол патоморфологического исследования.

Местно-тканевые реакции при внутривенном введении препарата

Криомелт МН

Исследование проведено на кроликах породы Шиншилла самцах. препарат вводили однократно внутривенно в краевую вену уха в дозе, составляющей 10-кратную терапевтическую для человека, в пересчете на кролика через коэффициент поверхности тела. Она составила 10 мг. На 3 сутки после введения препарата кроликов усыпляли. Участок уха с краевой веной фиксировали в 10% формалине, по стандартной методике заливали в парафин, короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

Микроскопическое исследование показало, что однократное внутривенное введение Криомелта МН не оказывает повреждающего действия на структуру эндотелия вены, мышечного и соединительнотканного слоев стенки сосуда. Изменений структуры волокнистой соединительной ткани дермы и придатков кожи, прилежащих к наружной оболочке вены не выявлено (Фото 1, 2).

Заключение

Однократное внутривенное введение препарата Криомелт МН местно-тканевых реакций не вызывает.

Фото 1 - Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Интактный контроль, х 20

Фото 2 - Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Криомелт МН, 10 мг однократно внутривенно, х 20



Фото 1 Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Интактный контроль. X 20



Фото 2 Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Криомелт МН, 10 мг, однократно внутривенно. X 20

Отчет по исследованию антимутагенной активности медицинского препарата Криомелт МН

**Протокол патоморфологического исследования.
Местно-тканевые реакции при внутривенном введении препарата
Криомелт МН.**

Исследование проведено на кроликах породы Шиншилла самцах. Криомелт МН вводили однократно внутривенно в краевую вену уха в дозе, составляющей 10-кратную терапевтическую для человека, в пересчете на кролика через коэффициент поверхности тела. Она составила 10 мг. На 3 сутки после введения препарата кроликов усыпляли. Участок уха с краевой веной фиксировали в 10% формалине, по стандартной методике заливали в парафин, короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

Микроскопическое исследование показало, что однократное внутривенное введение Криомелта МН не оказывает повреждающего действия на структуру эндотелия вены, мышечного и соединительнотканного слоев стенки сосуда. Изменений структуры волокнистой соединительной ткани дермы и придатков кожи, прилежащих к наружной оболочке вены не выявлено (Фото 1, 2).

Заключение

Однократное внутривенное введение Криомелта МН местно-тканевых реакций не вызывает.

Фото 1 - Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Интактный контроль, х 20

Фото 2 - Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик. Криомелт МН, 10 мг, однократно внутривенно, х 20

Четвертый этап

Острая токсичность препарата Криомелт МН на мышах

Исследования проведены на мышах BDF₁(C₅7B1 x DBA₂) самцах и самках, массой 18 - 22 грамма, полученных из Центрального питомника РАМН «Рапполово».

Животных содержали в условиях вивария Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова на стандартном пищевом рационе брикетированных экструзированных кормов со свободным доступом к корму и питьевой воде.

После двухнедельного карантина животных разбивали на группы по 6 голов в каждой.

Острую токсичность препарата в лекарственной форме исследовали при однократном внутривенном или подкожном введении. Дозировки препарата рассчитывали по максимальному объему, разрешенному для внутривенного или подкожного введения мышам.

При внутривенном введении были испытаны дозы 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл. При этом объем препарата составил 1 мл на мышь.

При подкожном введении испытана доза препарата 1 мг/мл на мышь.

Результаты

На протяжении 14 дней наблюдали за состоянием и поведением животных. Один раз в неделю определяли массу тела животных при помощи весов Сарториус.

Препарат, примененный даже в максимально возможной дозе, не вызвал гибели животных. Состояние и поведение животных не отличалось от этого параметра в группе интактного контроля. Прирост массы тела не отличался от контрольной группы.

Таблица 1.

Динамика массы тела мышей после однократного внутривенного и подкожного введения Криомелт МН

Доза (Мг/мл)	Сутки опыта				
	0	7	14	21	30
0,1 мг в/в	18,2±0,8	18,6±0,9	23,4±0,9	26,9±1,3	29,9±1,6
0,5 мг в/в	18,0±1,1	18,8±1,3	23,3±1,3	26,7±1,6	29,3±1,8
1 мг в/в	18,5±1,8	19,5±1,5	24,9±1,2	27,1±1,1	30,2±1,1
1 мг п/к	18,9±1,3	18,6±0,9	23,8±1,2	26,9±0,8	30,1±1,4
Контроль	18,4±1,1	19,0±0,9	23,9±1,1	27,2±1,3	30,3±1,6

При вскрытии животных, забитых на 30 сутки после введения препарата, макроскопических изменений внутренних органов не обнаружено.

Дозы, характеризующие токсичность, рассчитать не представляется возможным. ЛД₅₀ для мышей при изученных путях введения составляет больше, чем 1 мг.

Острая токсичность препарата Криомелт МН на крысах.

Исследования проведены на крысах самцах и самках линии Wistar, массой 100-120 граммов, полученных из Центрального питомника РАМН «Рапполово».

Животных содержали в условиях вивария Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова на стандартном пищевом рационе брикетированных экструзированных кормов со свободным доступом к корму и питьевой воде.

После двухнедельного карантина здоровых животных разбивали на группы по 6 голов в каждой.

Острую токсичность препарата в лекарственной форме исследовали при однократном внутривенном или подкожном введении. Дозировки препарата рассчитывали по максимальному объему, разрешенному для внутривенного или подкожного введения крысам.

При внутривенном введении была испытана доза 2 мг/мл. При этом объем препарата составил 2 мл на крысу.

При подкожном введении испытана доза препарата 3 мг/мл (5 мл на крысу).

Результаты

На протяжении 14 дней наблюдали за состоянием и поведением животных. Один раз в неделю определяли массу тела животных при помощи весов Сарториус.

Препарат, примененный в максимально возможной дозе, не вызвал гибели животных. Состояние и поведение животных не отличалось от этого параметра в группе интактного контроля. Прирост массы тела не отличался от контрольной группы.

Таблица 2.

Динамика массы тела крыс после однократного внутривенного и подкожного введения препарата Криомелт МН

Доза (мг/мл)	Сутки опыта				
	0	7	14	21	30
2 мг/мл	114,8±5,8	140,2±8,8	175,4±6,9	196,9±11,2	223,7±10,6
3 мг/мл	113,8±5,1	139,1±4,3	173,8±5,9	189,7±12,4	219,8±11,5
Контроль	115,0±6,2	141,0±7,3	171,9±8,4	191,2±8,7	221,3±13,4

При вскрытии животных, забитых на 30 сутки после введения препарата, макроскопических изменений внутренних органов не обнаружено.

Дозы, характеризующие токсичность, рассчитать не представляется возможным. ЛД₅₀ для крыс при внутривенном пути введения превышает 4 мг, при подкожном введении превышает 15 мг.

Исходя из полученных данных, препарат можно отнести к группе препаратов с малой токсичностью.

Пятый этап

Кумуляция токсического эффекта препарата Криомелт МН на крысах

Исследование проведено на крысах самцах линии Wistar, полученных из питомника «Рапполово». на экспериментальной базе Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова на стандартном пищевом рационе брикетированных экструзированных кормов со свободным доступом к корму и питьевой воде.

После двухнедельного карантина здоровых животных разбивали на группы по 10 голов в каждой.

Исследование кумуляции проводили при 20 - кратном ежедневном подкожном введении и 5 - кратном ежедневном внутривенном введении.

Для выяснения кумуляции препарата его вводили подкожно ежедневно в разовых дозах, равных 1; 1/2; 1/5; 1/10 и 1/20 от максимальной дозы при однократном подкожном введении. Соответственно, разовые дозы препарата составили 1 мг, 500 мкг, 200 мкг, 50 мкг.

Для внутривенного введения использовали дозы, равные 1; 1/2 и 1/5 от максимальной дозы при однократном внутривенном введении. Соответственно, разовые дозы препарата составили 500 мкг; 200 мкг и 50 мкг.

Наблюдение за состоянием и поведением животных проводили ежедневно во время курса введений и в течение трех недель после окончания курса.

Показано, что ни в одной группе, ни при одном пути введения гибели животных не наблюдалось.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено, что препарат не обладает кумулятивными свойствами.



Фото 1 Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик.
Интактный контроль. X 20



Фото 2 Краевая вена уха и прилежащие к ней ткани. Кролик.
Криомелт МН 200 мг однократно внутривенно. X 20

Рук. ОМРБ ПИЯФ РАН

Дбн



Королев В.Г.