

ВЛИЯНИЕ ЛИКОПИНА НА ПЛОИДНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ И ОЦЕНКА ЕГО ТОКСИЧНОСТИ

¹Николаевич Л.Н., ²Савицкий В.П., ¹Морозова Е.В., ¹Насек В.М., ¹Жукова И.А.,
¹Жебракова И.В., ¹Нехай А.С.

¹Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», 220141, г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, 2, E-mail: nikolarisa@tut.by;

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, 223040, п. Лесной-2, Минский район, Минская обл.

Ликопин, один из многочисленных каротиноидов, характеризующихся антиоксидантной активностью, свою мощную антиоксидантную функцию сочетает с достаточно широким спектром биологического действия, не связанного с антиокислительной активностью. Конкретные биохимические проявления действия ликопина разнообразны и направлены на различные структурные, метаболические и регуляторные системы организма.

Цель работы: изучение влияния ликопина на плоидность, распределение клеток по стадиям клеточного цикла, апоптоз и частоту клеток с микроядрами в крови, а также оценка его токсичности.

Методы исследования. Были сформированы группы мышей и крыс обоего пола, которым вводили субстанцию ликопина. Использовали субстанцию ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG (DSM Nutritional Products, Швейцария), которую растворяли в 0,9% растворе NaCl. Субстанцию ликопина вводили интрагастрально в дозах 1000 мг/кг, 3000 мг/кг, 4000 мг/кг и 5000мг/кг.

При проведении токсикологических экспериментов руководствовались требованиями и методическими рекомендациями, изложенными в руководящих нормативных документах [1]. Изучение острой токсичности субстанции ликопина выполнено на мышах линии ICR и крысах линии Wistar обоего пола. Спустя 14 дней у животных, которым однократно вводили субстанцию ликопина в дозах 1000 мг/кг (100 мг/кг чистого ликопина), 5000 мг/кг (500 мг/кг чистого ликопина) проводили забор крови для анализа плоидности клеток методом проточной цитометрии.

Метод приготовления ДНК проб из крови млекопитающих для проточной цитофлуориметрии соответствовал общепринятым [2]. Приготовленные образцы крови анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Vantage» («Becton Dickinson», США), оборудованном модулем дискриминации дублетов в программе CellFit. Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер (длина волны 488 нм, 15 мВт). Измерения проводили при скорости до 2000 клеток в 1 с. В одной пробе анализировали не менее 30 000 клеточных ядер. Для оценки плоидности и распределения клеток крови по фазам клеточного цикла проводился анализ относительного содержания ДНК в клетках по интенсивности флуоресценции пропидиума иодида. Клетки дифференцировали по содержанию ДНК на диплоидные (2n2c), тетраплоидные (2n4c) и гиподиплоидные (апоптотические) (менее 2n2c) [3]. По стандартным методикам определяли распределение клеток по фазам клеточного цикла (оценка пролиферативной активности клеток), частоту микроядер (оценка мутагенного эффекта), уровень генетического апоптоза (оценка репродуктивной гибели клеток) [4]. Проллиферативную активность клеток в популяциях оценивали по сумме клеток в стадиях S+(G₂+M).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета Statistica 7.0. Для определения достоверности изменений изучаемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при значении p<0,05.

Результаты исследования. В условиях острого эксперимента на мышах и крысах обоего пола показано, что субстанция ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG, вве-

денная интрагастрально в диапазоне доз 1000–5000 мг/кг, является малотоксичной. Максимально возможная для введения доза 5000 мг/кг (в 2500 раз превышающая эффективную дозу для грызунов) не вызывала гибели животных и развития эрозийно-язвенных изменений в желудочно-кишечном тракте. Отдаленных побочных и токсических эффектов у мышей и крыс обоего пола после однократного введения субстанции ликопина не выявлено.

Кроме того, изучены показатели распределения клеток по фазам клеточного о цикла: G₀/G₁, S и G₂+M, частота апоптотических клеток и клеток с микроядрами в крови крыс, которым вводили субстанцию ликопина в дозах 1000 мг/кг (100 мг/кг чистого ликопина), 5000 мг/кг (500 мг/кг чистого ликопина).

Показано, что по мере увеличения дозы ликопина частота апоптотических клеток и клеток с микроядрами не превышает контрольный уровень. При введении животным субстанции ликопина в дозе 5000 мг/кг наблюдаются низкий уровень пролиферации клеток крови по сравнению с контролем. Частота клеток с микроядрами не превышает контрольный уровень, наблюдается тенденция увеличения количества апоптотических клеток в крови животных.

Заключение. Полученные данные позволяют заключить, что субстанция ликопина redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG относится к VI классу опасности по классификации токсичности веществ в соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (OECD) и является относительно безвредной при однократном внутривнутреннем введении в рекомендуемых дозах. Спустя 14 дней после введения крысам субстанции ликопина в дозах 1000 мг/кг и 5000 мг/кг не наблюдается цитотоксического и мутагенного эффектов в популяции клеток крови.

Литература:

1. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ; под ред. Р.У. Хабриева. - 2-е изд. - М.: Медицина, 2005.- 832с.
2. Flow cytometry: a practical approach / M.G. Ormerod. - N.Y.: Oxford University Press, 1994. - 282 p.
3. Шмаров, Д.А. Проточно-цитометрический анализ пролиферации гемопоэтических клеток. Методологические вопросы / Д.А. Шмаров, Д.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - № 8. - С. 16–18.
4. Practical Flow Cytometry / H.M. Shapiro. - N.Y., 1995. - 155 p.

EFFECT OF LYCOPENE ON BLOOD CELL PLOIDY AND ESTIMATION OF TOXICITY

¹Nikolaevich L.N., ²Savitskij V.P., ¹Morozova E.V., ¹Nasek V.M., ¹Zhukova I.A.,
¹Zhebrakova I.V., ¹Nekhai A.S.

¹State Institution "Science-Production Center "Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus", academician Kuprevich str., 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus;

²Republican Science-Practical Centre for Children oncology and Hematology

The researches carried out on ICR mice of both sexes and Wistar rats allow to conclude that the investigated substance redivivo™ (lycopene) 10% CWS/S-TG belongs to the VI class of danger due to the classification of toxicity of substances according to the modified OECD classification and is relatively harmless under single intragastric administration at recommended doses. Rat substance of lycopene administration at doses of 1000 mg/kg and 5000 mg/kg does not cause cytotoxic and mutagenic effects in animal blood cell (leukocytes) population.