

УДК 616-092

Оценка потенциального риска канцерогенного действия релиз-активных антител к интерферону-гамма в тесте Эймса и цитогенетическом тесте *in vivo*

Эртузун И.А.¹, Бугаева Л.И.², Букатин М.В.², Петров В.И.², Тарасов С.А.³¹ ООО «НПФ Матери Медика Холдинг», 129272, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В процессе сдерживания развития опухолевых процессов иммунной системой немаловажную роль играет цитокин интерферон-гамма (ИФН γ). Антитела в релиз-активной форме (РА АТ) к ИФН γ изменяют конформацию молекулы данного цитокина, оказывают влияние на связывание с рецептором и усиливают его продукцию. Цель настоящего исследования состояла в оценке потенциального риска канцерогенного действия РА АТ к ИФН γ . Методика. Препарат был протестирован в стандартных тестах на канцерогенность (тесте Эймса и цитогенетическом тесте *in vivo*). Результаты. Было показано что тестируемый препарат не вызывает генных мутаций у *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса и хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей. Заключение. Данное исследование не обнаружило предпосылок к предположению о наличии у РА АТ к ИФН γ канцерогенного эффекта.

Ключевые слова: релиз-активность; антитела; интерферон-гамма; канцерогенность; тест Эймса; хромосомные aberrации.

Для цитирования: Эртузун И.А., Бугаева Л.И., Букатин М.В., Петров В.И., Тарасов С.А. Оценка потенциального риска канцерогенного действия релиз-активных антител к интерферону-гамма в тесте Эймса и цитогенетическом тесте *in vivo*. Патогенез. 2018; 16(3): 138–141

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.138-141

Для корреспонденции: Эртузун Ирина Анатольевна, e-mail: heifezia@materiamedica.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 22.08.2018

Assessing potential risk for a carcinogenic effect of release-active antibodies to interferon-gamma with the Ames test and *in vivo* cytogenetic test

Ertuzun I.A.¹, Bugaeva L.I.², Bukatin M.V.², Petrov V.I.², Tarasov S.A.³¹ LLC NPF Materia Medica Holding, Trifonovskaya Str. 47, Bldg. 1, Moscow 129272, Russian Federation² Volgograd State Medical University, Ploshchad Pavshikh Bortsov 1, Volgograd 400131, Russian Federation³ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

During development of a tumor, the cytokine interferon-gamma (IFN γ) plays an important role in resistance of the immune system. The released-active form (RA) of antibodies (Abs) to IFN γ is able to change the conformation of IFN γ molecule to affect its receptor binding and thereby enhance production of this cytokine. The aim of the present study was to assess the risk for a tumorigenic potential of RA anti-IFN γ Abs. Methods. RA anti-IFN γ Abs were studied using standard mutagenicity testing (Ames test and *in vivo* cytogenetic assay). Results. The tested drug induced neither gene mutations in *Salmonella typhimurium* in the Ames test nor chromosomal aberrations in murine bone marrow cells. Conclusion. The present study did not reveal any risk for tumorigenic potential of RA anti-IFN γ Abs.

Key words: released-activity; antibodies; interferon-gamma; tumorigenic potential; Ames test; chromosomal aberrations.

For citation: Ertuzun I.A., Bugaeva L.I., Bukatin M.V., Petrov V.I., Tarasov S.A. [Assessing potential risk for a carcinogenic effect of release-active antibodies to interferon-gamma with the Ames test and *in vivo* cytogenetic test]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(3): 138–141 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.138-141

For correspondence: Ertuzun Irina Anatolievna, e-mail: heifezia@materiamedica.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 22.08.2018

Введение

Релиз-активные антитела (РА АТ) к интерферону-гамма (ИФН γ) входят в состав активного фармацевтического ингредиента нескольких биологических лекарственных препаратов (а именно: Анаферона, Анаферона детского и Эргоферона). Применение РА АТ к ИФН γ приводит к конформационным изменениям в молекуле ИФН γ и оказывает влияние на связывание цитокина с его рецепторами [1], что приводит к увеличению продукции ИФН γ и способствует активации сопутствующих процессов [2].

Практически любые клетки экспрессируют ИФН γ -рецепторы и отвечают на этот цитокин транскрипцией сотен генов, в том числе и большинство видов злокачественных клеток [3]. Существуют данные об использовании ИФН γ для ингибирования роста опухолей и о его применении при комплексном лечении нескольких видов рака [4]. Поэтому влияние РА АТ к ИФН γ на конформацию ИФН γ , его взаимодействие с рецептором и продукцию свидетельствует о необходимости оценки риска канцерогенного эффекта этого препарата. Предварительную оценку возможной канцерогенной активности проводили с помощью теста Эймса (выявляющего генные мутации) и цитогенетического теста (выявляющего хромосомные aberrации).

Материалы и методы исследования

Тесты проводили в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (2012).

Тест Эймса

Тест проводили с использованием индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 и TA97, полученных из ФГБУ ГосНИИгенетика НИЦ «Курчатовский институт», в двух вариантах: с метаболической активацией (МА) и без нее. Для получения микросомальной активирующей смеси (МАС) использовали фракцию S9 гепатоцитов крысы, предобработанной соволом (300 мг/кг однократно внутрибрюшинно). В качестве положительных контролей, специфичных для каждого штамма использовали: азид натрия для TA100, 9-аминоакридин для TA97, 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазопирен (ДДТДП) для TA98 и промутаген циклофосфан для TA100 с МА. РА АТ к ИФН γ испытывали в диапазоне концентраций 0,1–1000 мкг на чашку с фактором разведения 10, в качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду.

На чашки с минимальной средой в трех повторах наносили одновременно бактериальную культуру (100 мкл); МАС или фосфатный буфер (500 мкл); РА АТ к ИФН γ в каждой из концентраций, дистиллированную воду или соответствующий позитивный контроль (100 мкл). После инкубации в течение 48 часов при 37°C проводили учет количества выросших колоний гистиридиновых ревертантов. Сравнивали среднее геометрическое число ревертантов на чашку в опыте и в негативном контроле. Достоверным считали превышение количества ревертантов в опыте над контролем не менее чем в 1,5 раза [5].

Тест на индукцию хромосомных повреждений *in vivo*

Беспородных белых мышей (20–22 г), полученных из ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, разделили на группы, которым вводили: дистиллированную воду (контроль) внутрижелудочно однократно (15 мл/кг: 7 самцов) или в течение 5 дней (15 мл/кг: 5 самцов и 5 самок); РА АТ к ИФН γ внутрижелудочно однократно (15 мл/кг: 7 самцов) или в течение 5 дней (5 мл/кг: 7 самцов и 7 самок; 15 мл/кг: 7 самцов и 7 самок) или диоксидин внутрибрюшинно однократно (300 мл/кг: 5 самцов и 5 самок). Эвтаназию животных и фиксацию клеточного материала проводили через 24 часа после последнего введения препаратов; за 1,5 часа до этого мышам внутрибрюшинно вводили 0,025% раствор колхицина в дозе 0,01 мл/г для накопления метафаз в клетках костного мозга. Клетки костного мозга вымывали из бедренных костей. После осаждения клеток центрифугированием их обрабатывали гипотоническим 1% раствором цитрата натрия в термостате при температуре 37°C в течение 10 минут. Затем клетки подвергали 3-кратной фиксации смесью этанола и ледяной уксусной кислоты, и зафиксированный материал наносили на охлажденные предметные стекла, хранившиеся в этаноле, спирт выжигали. Окрашенные смесью азура-эозина препараты анализировали под масляной иммерсией при увеличении 10 x 2,5 x 90 на микроскопе «ЛЮМАМ-И2». Для анализа отбирали неразрушенные клетки с округлыми метафазными пластинками без наложений хромосом (модальное число 40). Содержание животных и дизайн экспериментов соответствовали директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях; Приказу МЗ РФ от 1 августа 2016 N 199н.

Статистический анализ

Статистический анализ проведен в программе RStudio с помощью пакета R версии 3.5.1. Сравнение групп произведено однофакторным дисперсионным анализом с последующим сравнением средних по критерию Тьюки. Оценка различий в группах по наличию парных фрагментов хромосомных aberrаций проведена с использованием точного критерия Фишера.

Результаты исследования и обсуждение

Тестируемый препарат РА АТ к ИФН γ не индуцировал увеличения количества ревертантных колоний тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса, в то время как положительные контроли значительно увеличивали уровень спонтанных ревертантов у соответствующих штаммов (табл. 1).

Кроме того, не отмечено истощение бактериального газона, что указывает на отсутствие у тестируемого препарата бактерицидных свойств, которые могли затруднить выявление мутагенной активности. РА АТ к ИФН γ не вызывали увеличения aberrаций хромосом и доли клеток с aberrантными хромосомами по сравнению с контролем ни при однократном, ни при курсовом введении (табл. 2). Положительный контроль диоксидин, вызывал резкое увеличение доли клеток с aberrациями хромосом.

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что РА АТ к ИФН γ не вызывают ни генных мута-

Влияние РА АТ к ИФН γ на индикаторные штаммы в тесте Эймса

Соединение	мкг/ чашка	Среднее геометрическое число ревертантов на чашку со штаммами					
		ТА100		ТА98		ТА97	
		Без МА	С МА	Без МА	С МА	Без МА	С МА
Контроль	0	121,0	118,6	45,6	45,1	189,3	191,6
РА АТ к ИФН γ	0,1	119,5	108,3	39,9	43,2	198,6	194,9
	1	119,0	121,9	40,6	50,0	200,0	198,5
	10	122,6	116,8	46,0	52,4	198,6	193,3
	100	129,7	125,5	48,3	51,0	202,6	200,9
	1000	140,6	122,5	51,0	50,3	202,6	198,6
Азид Na	5	1562 *					
ДДДТДП	100			1036 *			
9-амино-акридин	10					1137 *	
Циклофосфан	500		483 *				

Примечание. МА — метаболическая активация. * — превышение количества ревертантов относительно контроля более чем в 1,5 раза, свидетельствующее о наличии мутагенной активности [5]

Таблица 2

Влияние РА АТ к ИФН γ на уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, $M \pm SE$

Группы	Количество метафаз	Доля aberrантных клеток, %
Контроль, 15 мл/кг однократно (самцы)	700	1,6 \pm 0,2
РА АТ к ИФН γ , 15 мл/кг однократно (самцы)	700	1,7 \pm 0,2
Диоксидин, 300 мг/кг однократно (самцы)	500	21,2 \pm 0,9 *
Диоксидин, 300 мг/кг однократно (самки)	500	24,0 \pm 1,3 *
Контроль, 15 мл/кг 5 дней (самцы)	500	2,0 \pm 0,0
Контроль, 15 мл/кг 5 дней (самки)	500	2,0 \pm 0,0
РА АТ к ИФН γ , 5 мл/кг 5 дней (самцы)	700	1,9 \pm 0,1
РА АТ к ИФН γ , 15 мл/кг 5 дней (самцы)	700	2,1 \pm 0,1
РА АТ к ИФН γ , 5 мл/кг 5 дней (самки)	700	2,3 \pm 0,2
РА АТ к ИФН γ , 15 мл/кг 5 дней (самки)	700	2,4 \pm 0,2

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

ций у бактерий в стандартном тесте Эймса, ни хромосомных aberrаций у мышей *in vivo*, что согласуется с опубликованными ранее данными об отсутствии у препарата генотоксичности в тесте соматического мозаицизма у *Drosophila Melanogaster* и, более того, о наличии у него некоторого противомутагенного действия [6]. Эти результаты дают основания предполагать об отсутствии у РА АТ к ИФН γ канцерогенного потенциала.

Список литературы

1. Эпштейн О.И. Релиз-активность (современный взгляд на гомотопию и негомотопию). М.: Издательство РАМН; 2017. 48 с.
2. Жавберт Е.С., Дугина Ю.Л., Эпштейн О.И. Иммунотропные свойства анаферона и анаферона детского. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(5-6): 17-23.
3. Balachandran S., Adams G.P. Interferon- γ -induced necrosis: an antitumor biotherapeutic perspective. *J. Interferon Cytokine Res.* 2013; 33(4): 171-80. DOI: 10.1089/jir.2012.0087
4. Артамонова Е.В. Модификаторы биологических реакций (иммуномодуляторы, интерфероны, интерлейкины) в терапии злокачественных опухолей. *Эффективная фармакотерапия*. 2014; 14: 8-21
5. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.Ф. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды

с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания. М.; 1985. 34 с.

6. Воронова О.Л., Рогозина О.П., Мартюшев А.В., Сергеева С.А., Эпштейн О.И. Сверхмалые дозы антител к интерферону-гамма: изучение цитогенетических эффектов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002; Приложение 4: 73-75.

References

1. Epstein O.I. [Released activity (current view on homeopathy and non-homeopathy)]. Moscow: Publishing Office of the Russian Academy of Medical Sciences; 2017. 48 p. (in Russian).
2. Zhavbert E.S., Dugina Yu.L., Epshtein O.I. [Immunotropic properties of anaferon and anaferon pediatric]. *Antibiotiki i himioterapiya [Antibiotics and Chemotherapy]*. 2013; 58(5-6): 17-23. (in Russian)
3. Balachandran S., Adams G.P. Interferon- γ -induced necrosis: an antitumor biotherapeutic perspective. *J. Interferon Cytokine Res.* 2013; 33(4): 171-80. DOI: 10.1089/jir.2012.0087
4. Artamonova Ye.V. [Modifiers of biologic reactions (immunomodulators, interferons, interleukins) in the therapy of malignant tumours]. *Effektivnaya farmakoterapiya [Effective Pharmacotherapy]*. 2014; 14: 8-21. (in Russian)
5. Fonshtein L.M., Abilev S.K., Bobrinev Ye.F. [Methods for primary detection of genetic activity of environmental pollutants using bacterial test systems: methodological guidelines]. Moscow; 1985. 34 p. (in Russian)

Сведения об авторах:

Эртузун Ирина Анатольевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-аналитического отдела ООО «НПФ Материа Медика Холдинг»

Бугаева Любовь Ивановна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией лекарственной безопасности, ассистент кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Букатин Михаил Владимирович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Петров Владимир Иванович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тарасов Сергей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»