

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК**

На правах рукописи

БЕЛОГОЛОВСКАЯ ЕЛЕНА ГЕННАДЬЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ
АСПАРТАМА И БЕТА-КАРОТИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

03.00.14. – генетика

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.м.н., профессор Дурнев А.Д.

д.т.н., профессор Орещенко А.В.

МОСКВА –2002

О Г Л А В Л Е Н И Е

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1.ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1.Антимутагенная защита организма	9
1.1.1.Медицинские последствия мутагенеза.....	9
1.1.2.Возможности повышение устойчивости организма к мутагенным воздействиям.....	11
1.1.2.1. Витаминны и другие биологически активные вещества органического происхождения как факторы поддержания стабильности генома.....	14
1.1.2.2. Минеральные вещества и их роль в антимутагенной защите организма.....	17
1.1.3. Фармакологическая защита генома.....	18
1.2.Основные группы антимутагенов и механизм их действия	20
1.2.1. Каротиноиды.....	22
1.2.1.1. Биологические и фармакологические свойства каротиноидов.....	22
1.2.1.2. Антимутагенные свойства каротиноидов.....	23
1.2.1.3. Эпидемиологические исследования биологической роли каротиноидов.....	26
1.2.3. Аспартам – антимутагенный дипептид и его фармакологические свойства.....	27
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	31
2.1. Препараты и оборудование	31
2.1.1. Препараты, мутагены и химические реактивы.....	31
2.1.2. Оборудование.....	31
2.2. Животные	32
2.3. Метод учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей <i>in vivo</i>	32
2.3.1. Схема обработки животных.....	32

2.3.2. Дозы исследуемых соединений и модельных мутагенов.....	33
2.3.3. Приготовление цитогенетических препаратов.....	34
2.4. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	35
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	36
3.1. Исследование влияния комбинаций аспартама и бета-каротина на кластогенные эффекты мутагенов в остром эксперименте.....	36
3.1.1. Комбинации аспартама и и бета-каротина в жирорастворимой форме.....	36
3.1.2. Комбинации аспартама и бета-каротина в водорастворимой форме.....	45
3.2. Исследование влияния предобработки животных комбинациями из аспартама и бета-каротина на кластогенные эффекты мутагенов.....	55
3.2.1. Комбинации аспартама и и бета-каротина в жирорастворимой форме.....	55
3.2.2. Комбинации аспартама и бета-каротина в водорастворимой форме.....	64
3.3. Исследование влияния комбинаций аспартама и бета-каротина на кластогенные эффекты мутагенов при совместном многодневном введении.....	74
3.3.1. Комбинации аспартама и бета-каротина в жирорастворимой форме.....	75
3.3.2. Комбинации аспартама и бета-каротина в водорастворимой форме.....	84
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	96
5. ВЫВОДЫ.....	109
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЖБК – жирорастворимый бета-каротин

ВБК – водорастворимый бета-каротин

БК – бета-каротин

РДН – рекомендуемая диетическая норма

РНП – рекомендуемая норма потребления

СОД – фермент супероксиддисмутаза

ОТА – охратоксин А

ПОЛ - перекисное окисление липидов

АФК - активные формы кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Необходимость поиска и изучения антимутогенов неоднократно обосновывалась в современной литературе. Предполагается, что их применение позволит существенно снизить риски возникновения врожденных пороков развития, наследственных и онкологических заболеваний, обусловленных мутационными поражениями [18, 61, 134, 135].

Позитивный опыт применения антимутогенов накоплен при фармакологической защите генома. Введение в комплекс терапии лекарственных средств, обладающих помимо основных, антимутогенными свойствами, устраняло эффекты незаменимых лекарственных мутагенов и снижало хромосомную изменчивость у лиц, страдающих заболеваниями, сопровождающимися увеличением спонтанного мутирования [17,18, 21, 33]. В то же время, очевидно, что подобный подход не может быть использован для масштабной защиты от действия средовых и производственных мутагенов из-за ограниченной возможности назначения лекарственных средств здоровым лицам для предотвращения вероятностных генетических событий. Это определило необходимость поиска антимутогенов среди соединений «двойного назначения», использующихся в равной степени в качестве лечебных или лечебно-профилактических средств и в качестве пищевых добавок. Обращает внимание, что последние все шире используются при приготовлении лекарственных форм в качестве красителей, подсластителей, ароматизаторов, консервантов [64, 138, 124, 38].

Изучение биологически значимых эффектов таких соединений, дозовых и временных особенностей их проявления представляется важным направлением фармакологических исследований [17].

Одним из первых попавших в поле исследований по антимутогенезу среди средств «двойного назначения», является бета-каротин. Первые сведения об его антимутогенной активности у млекопитающих, представленные Raj, Katz [110], Salvadori et al.[118, 119, 120] и Renner [113, 114], были подтверждены и существенно расширены работами,

выполненными в НИИ фармакологии РАМН [29, 15, 67]. В этом же институте были впервые установлены антимуtagenные свойства аспартама [24, 25], подтвержденные в независимых исследованиях [57]. Указанные вещества «двойного назначения» рассматриваются нами как антимутагены, перспективные для профилактического использования человеком. Предполагается, что эти два соединения - подсластитель аспартам и провитамин бета-каротин, обладающий свойствами красителя и консерванта, могут использоваться совместно в качестве дополнительных компонентов лекарственных форм. В то же время об особенностях комбинированного действия антимутагенов у млекопитающих практически ничего неизвестно. Последнее сделало актуальным исследование антимутагенной активности комбинации «аспартам + бета-каротин» не только с практической, но также теоретической точки зрения.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния комбинированного воздействия аспартама и бета-каротина в жирорастворимых формах, применяемых в разных дозах, на уровень кластогенеза, индуцируемого в клетках костного мозга мышей диоксидином и циклофосфамидом. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние комбинаций аспартама и бета-каротина (жирорастворимые формы), применяемых перорально, на цитогенетические эффекты диоксида и циклофосфамида при однократном введении.
2. Исследовать влияние предварительного 5-ти дневного перорального введения животным комбинаций из аспартама и бета-каротина (жирорастворимые формы) в разных дозах на проявление цитогенетических эффектов диоксида и циклофосфамида, инъектируемых однократно.
3. Оценить влияние перорально вводимых комбинаций аспартама и бета-каротина (жирорастворимые формы) на цитогенетические

эффекты диоксидина и циклофосфамида при совместном повторном применении в течение 5 дней.

4. Провести сравнительный анализ антимуутагенного действия аспартама и бета-каротина и их различных комбинаций.

Научная новизна. Впервые установлены антимуутагенные свойства комбинаций аспартама с бета-каротином в жирорастворимой и водорастворимой формах в экспериментах на млекопитающих при использовании в качестве индукторов мутагенеза диоксидина и циклофосфамида. Выявлены качественные и количественные особенности проявления антимуутагенного действия комбинации при использовании аспартама в дозах 0,4 и 4 мг/кг и бета-каротина в дозах 0,15-15 мг/кг при разных режимах совместного перорального введения.

Принципиальных различий между антимуутагенными эффектами комбинаций аспартама с водорастворимой и жирорастворимой формами бета-каротина не отмечено ни в экспериментах с циклофосфаном, ни в экспериментах с диоксидином.

Впервые показано, что при совместном применении двух антимуутагенов (аспартама и бета-каротина), не наблюдается ни синергизма, ни антагонизма защитного эффекта. В то же время, антимуутагены, использованные в комбинации, дополняют действие друг друга при различных режимах введения; их комбинации проявляют антимуутагенный эффект в тех вариантах эксперимента, когда один из ее компонентов неактивен. Данное наблюдение, с одной стороны, косвенно свидетельствует о том, что механизмы антимуутагенного действия аспартама и бета-каротиноидов принципиально различны, с другой, указывает на перспективу направленного поиска комбинаций антимуутагенов более эффективных, чем их составляющие в отдельности.

Практическая значимость. Главным практическим достижением настоящей работы является характеристика особенностей проявления антимуутагенной активности комбинаций аспартама и бета-каротина в жирорастворимой и водорастворимой формах.

и водорастворимых формах в зависимости от доз и режимов их использования.

Установленные результаты в совокупности с данными, свидетельствующими об отсутствии у исследованных комбинаций комутагенных эффектов, открывают очевидную перспективу использования сочетания «аспартам + бета-каротин» для профилактики индуцированного мутагенеза у человека, а уже существующие лекарства и другие продукты, содержащие комбинацию аспартама и бета-каротина, позволяет рассматривать в качестве антигенотоксических. Также существенное практическое значение имеет установление наиболее оптимальных, с точки зрения проявления антимуtagenных эффектов, дозировок аспартама и бета-каротина в составе их комбинаций, что может прямо учитываться при их совместном использовании при разработке лекарственных форм, пищевых и иных продуктов, предназначенных для потребления человеком.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Антимутагенная защита организма

Углубление представлений о роли ДНК-повреждений и мутационных событий в возникновении различных патологий, привело к выводу о необходимости первичной профилактики наследственных патологий [4]. Одна из ее составляющих – охрана окружающей среды, включающая генетический скрининг потенциальных мутагенов и мониторинг генотоксикантов в среде обитания человека, выходят за рамки настоящей работы, другая – антимутагенная защита будет подробно рассмотрена ниже.

1.1.1. Медицинские последствия мутагенеза

Бурное техногенное развитие современного общества привело к появлению в окружающей среде огромного количества ксенобиотиков. В настоящее время известно более 40 тысяч соединений синтетического и природного происхождения, которые потенциально опасны для человека, многие из них являются канцерогенами и мутагенами [27].

Возникновение мутаций в зародышевых клетках приводит к увеличению количества лиц с генетически обусловленными патологиями. На сегодняшний день известно около 4 тысяч наследственных заболеваний, такие как синдром Дауна (встречается с частотой 1 пораженный на 400-800 новорожденных), преждевременное старение (синдром Вернера) и многие другие. Широкое распространение получили болезни с генетической предрасположенностью, такие как диабет и шизофрения. Ежегодно в мире рождается около 4-5 млн. детей с дефектами, имеющими генетическую природу. Спонтанные аборт, вызванные возникновением мутаций в зародышевых клетках, представляют серьезную угрозу, так как показано, что до 50% состоявшихся беременностей прерываются на самых ранних стадиях по причине генетических нарушений еще на стадии зиготы [13, 116]. Причиной, имеющими в основе повреждение генома, объясняется увеличение бесплодия у лиц репродуктивного возраста [130].

Индукция мутаций в соматических клетках, лежит в основе развития злокачественных новообразований. В современной литературе приводятся многочисленные сведения о том, что с разрывами ДНК связана активация онкогенов. Это свидетельствует о тесной связи между явлениями канцерогенеза и индуцированного мутагенеза. Худoley В.В. приводит данные о том, что ежегодно примерно у 6 миллионов жителей планеты выявляются злокачественные новообразования [32].

Воздействие мутагенов на генетический аппарат человека, постоянное увеличение «генетического груза» вредных рецессивных мутаций, которые не проявляются у непосредственных потомков, но по достижении определенной концентрации в геноме популяции резко повышают количество лиц с генетически обусловленными патологиями, ставит под угрозу существование человеческой цивилизации [5].

В силу множества причин исключить контакт человека с мутагенами различной природы практически невозможно. Сегодня мутагены обнаруживаются даже в составе женского молока – из 20 исследованных образцов от 6 до 13 в зависимости от использованного метода анализа продемонстрировали ДНК - повреждающую активность [98].

Таким образом, понимание серьезности и опасности последствий индуцированного мутагенеза привело специалистов медико-генетического профиля к необходимости поиска путей защиты, снижения негативного давления мутагенных средовых факторов на геном человека.

1.1.2. Возможности повышение устойчивости организма к мутагенным воздействиям

Ключевым фактором в определении устойчивости клеток организма к мутагенным и генотоксическим воздействиям может быть питание. Оно определяет важные метаболические и детоксицирующие реакции: то есть подверженность клеток влиянию канцерогенных веществ, поступающих в организм, их детоксикацию/активацию, восстановление ДНК, синтез и репарацию ДНК и т.п. Многие микроэлементы действуют как сопутствующие факторы в реакциях поддержания целостности ДНК. Недостаточные уровни содержания в клетке основных микроэлементов приводят к ослабеванию активности ферментов, требуемой для поддержания геномной стабильности, что приводит к увеличению спонтанного и индуцированного мутирования [93, 72, 41, 50, 88].

Примерно 40 микроэлементов (витаминов, минеральных веществ и других эссенциальных соединений) обязательно должны присутствовать в пищевом рационе человека, причем, в строго определенных количествах для обеспечения равновесия в процессах метаболизма [117]. Недостаток даже одного из соединений приводит к искажению метаболических реакций, что может привести к эндогенным повреждениям ДНК. Однако, оптимальная ежедневная норма потребления микроэлементов для поддержания генетической стабильности неизвестна. Рекомендуемая норма потребления (РНП), разработанная специалистами лечебно-профилактического питания, основывается на результатах изучения сиюминутного влияния соединений на организм человека [136]. Оптимальная доза приема микроэлементов для поддержания геномной стабильности может колебаться в зависимости от возраста, генной конституции, социальных факторов, а также на нее могут оказывать влияние другие компоненты питания [40]. Определение оптимального количества микроэлементов и коррекция их недостаточности для поддержания генетической стабильности на сегодня является актуальной, но мало разработанной проблемой.

Недостаточность таких микроэлементов как фолиевая кислота, витамины В12, В6, С, Е, ниацин, железо и цинк вызывает хромосомные повреждения, связанные с одно- или двунитевыми разрывами в ДНК. Эти нарушения являются факторами, приводящими к возникновению сердечно-сосудистых и онкозаболеваний у человека [48]. В таблице 1 приведены данные, отражающие связь между недостатком в питании основных нутриентов, повреждением ДНК и возникновением различных заболеваний [136].

Таблица 1. Недостаточность некоторых микроэлементов и повреждение ДНК

Микроэлементы	Повреждение ДНК	Манифестирующие патологии
Фолиевая кислота	Разрывы хромосом	Рак толстой кишки; сердечно-сосудистые болезни; дисфункция мозга; врожденные дефекты развития
Витамин В12	Разрывы хромосом	Повреждение, нервных тканей; см. фолиевая кислота
Витамин В6	Разрывы хромосом	См. фолиевая кислота
Витамин С	Окисление ДНК	Катаракта 4Х; рак; сердечные болезни
Витамин Е	Окисление ДНК	Рак толстой кишки; сердечно-сосудистые болезни; иммунная дисфункция
Железо	Разрывы ДНК	Дисфункция мозга; иммунная дисфункция; рак
Цинк	Разрывы хромосом	Дисфункция мозга; иммунная дисфункция; рак
Ниацин	Невозможность восстановления ДНК, (полиАДР-рибоза)	Неврологические симптомы; потеря памяти
Селен	Окисление ДНК	Рак простаты

Ames V.N. [39, 40] полагает, что существует взаимозависимость между наиболее часто встречающимися у человека дефицитами микроэлементов и возросшим увеличением раковых заболеваний. Например,

включение урацила в ДНК, вызванное низким потреблением фолатов, и окисление ДНК-оснований, вызванное низким содержанием антиоксидантов в пище, может независимо, или в совокупности вызвать повреждения ДНК. Последнее исследование, показывающее возрастание риска рака груди у тех, у кого наблюдается полиморфизм в MnСОД (фермент супероксиддисмутаза) и недостаточное потребление в пище антиоксидантов, еще более обращает внимание на важность проблемы взаимодействия на уровне пища – генная структура [38].

Доказательства роли микроэлементов в различных аспектах поддержания ДНК, помощи в предотвращении рака, сердечных болезней, синдрома Альцгеймера и преждевременного старения, и их роль в поддержании геномной стабильности были получены путем экспериментов на млекопитающих и на человеке, в обоих случаях использовались культуры *in vitro* и подходы *in vivo*. Эффективность и необходимая дозировка таких добавок представляется важным направлением исследований фармакогенетики [64, 138, 103, 124, 38].

Рекомендуемая диетическая норма (РДН) микроэлементов традиционно устанавливалась на таких уровнях, которые были необходимы для предотвращения симптомов витаминной недостаточности. Однако, есть много оснований полагать, что более высокие уровни присутствия в организме некоторых биологически активных веществ могут быть необходимы для обеспечения процессов, поддерживающих целостность ДНК, и, следовательно, потребление микроэлементов в рекомендованных РДН дозах может быть недостаточным для обеспечения стабильности генома. Дополнения к обычному рациону питания в виде препаратов витаминов и/или минералов, или отдельных растительных полифенолов становятся все более распространенными среди большей части населения. Однако не существует жесткой нормы по поводу количественного потребления подобных добавок, генотипические индивидуальные различия также не принимаются в расчет.

Теоретическое определение оптимального уровня приема витаминов и минералов в целях поддержания геномной стабильности будет способствовать созданию надежных рекомендаций, нацеленных на профилактику так называемых дегенеративных болезней, вызванных повреждением ДНК. Концепция РДН, направленная на поддержание геномной стабильности, содержит новый подход к определению пищевого рациона, который помог бы предотвратить болезни, вызванные повреждением ДНК [71].

1.1.2.1. Витамины и другие биологически активные вещества органического происхождения как факторы поддержания стабильности генома

Эпидемиологические данные свидетельствуют, что прием пищи, богатой витамином С, связан с сокращением риска сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических заболеваний и разных видов рака [79]. В своем исследовании Halliwell В. указывает, что в настоящее время недостаточно проверенных данных, касающихся прооксидантного эффекта витамина С в дозах, превышающих РДН. Однако автор предполагает наличие у данного вещества способности обеспечивать стабильность генных структур именно из-за его антиканцерогенных качеств [79].

Витамин Е – другой витамин антиоксидант, играющий важную роль в предотвращении перекисления липидов. Claycombe R.J. и Meydani S.N. в своем исследовании показали, что витамин Е играет защитную роль против повреждения хромосом и окисления ДНК. Однако только у одного из пяти участников исследования наблюдалось уменьшение повреждения ДНК после дополнительного приема витамина Е [54].

Ниацин – один из немногих витаминов, который выполняет хорошо изученную роль в синтезе ДНК, восстановлении ДНК и гибели клетки. Ниацин – предшественник НАД⁺, который требуется как субстрат для поли(ADP-рибозы)-полимеразы-1 (PARP). PARP играет решающую роль при восстановлении разрывов в цепи ДНК и при инициации клеточной реакции на повреждение ДНК. Статус ниацина или активность PARP может сыграть

решающую роль в определении, может ли клетка, в которой произошло разрушение ДНК, восстановиться или погибнуть. Hageman G.J. и Steirum R.H. в своем исследовании, посвященном определению воздействия добавочного ниацина на человека *in vivo*, не выявили надежных результатов, которые могли бы определить оптимальную дозу приема этого витамина, но подтвердили его существенную роль в обеспечении стабильности генома [78].

Фолиевая кислота – второй витамин, который играет решающую роль в предупреждении включения урацила в ДНК (что ведет к повреждению хромосом) и гипометилиции ДНК. Было показано, что нехватка как фолиевой кислоты, так и витамина В12, вызывает повреждение хромосом и формирование микроядер у человека *in vivo*. В своем исследовании о влиянии на человека этих двух витаминов *in vivo* Fenech M.[2001] приходит к выводу, что прием избытка (200 мг) фолиевой кислоты и (2 мг) витамина В12 снижает уровень повреждений хромосом [73]. Исследования Skibola C.J. et al.[1999] и Ames B.N [1999] показали, что оптимальная доза приема с пищей для поддержания геномной стабильности данных микроэлементов зависит от возраста и генотипа [39, 127]. Возрастной фактор особенно важен для фолиевой кислоты и витамина В12, потому что способность всасывания этих витаминов заметно снижается с возрастом.

Список микроэлементов, играющих важную роль в метаболизме ДНК, все возрастает, и одним из последних в него добавился витамин Д. Chatterjee M. указывает на роль этого соединения в регуляции экспрессии онкогенов, синтеза кальциево-связанных протеинов, а также отмечает антиоксидантную активность витамина Д и его значение для регуляции уровней эндогенных антимутогенов глутатиона и полиаминов в здоровых клетках и процессов апоптоза раковых клеток. Chatterjee M. заключает, что принятая в данное время РДН – 5мг в день – недостаточна для некоторых людей, и рекомендует пересмотр последней, с учетом возможной роли витамина в профилактике раковых заболеваний [53].

Растительные полифенолы – постоянно присутствуют в пищевом рационе. Они играют решающую роль в модифицировании генной экспрессии, антиоксидантного статуса и, соответственно, риска раковых и сердечно-сосудистых заболеваний у человека. Ferguson L.R. [2001] объясняет биологическую активность различных растительных полифенолов их способностью вызывать и/или предотвращать повреждение ДНК [74].

В группу полифенолов входят флавоноиды, танины, катехины. Большинство сведений о влиянии флавоноидов и других полифенолов на спонтанный и индуцированный мутагенез было получено в экспериментах на микроорганизмах. Исследований, выполненных *in vivo* или *in vitro* на эукариотических клетках, особенно ценных с точки зрения экстраполяции на человека, немного. Галангин в экспериментах *in vivo* и *in vitro* снижал кластогенный эффект блеомицина в клетках мышей [84], а также уменьшал образование микроядер под влиянием митомицина С в ретикулоцитах периферической крови мышей [85]. Повреждающее ДНК действие блеомицина усиливалось под влиянием кверцетина, мирицитина, госсипола. В то же время госсипол ингибировал индукцию микроядер, образующихся в половых клетках самцов мышей под действием нитрозометилмочевины и фотрина [22]. Также ранее было показано, что рутин и комплекс солей флавоноидов шлемника байкальского с аминокислотами уменьшают кластогенное действие хризотил-асбеста и цеолита в культуре клеток человека. Кроме того, флавоноиды обладали аналогичной активностью по отношению к диоксидину [18]. Однако сегодня, по мнению Ferguson L.R., еще недостаточно данных, чтобы было возможно рекомендовать прием флавоноидов с целью предотвращения мутагенеза [74].

1.1.2.2. Минеральные вещества и их роль в антимутагенной защите организма

Селен рассматривается в качестве важного компонента пищи, играющего ведущую роль в регуляции мутагенеза и канцерогенеза. Е-

Ваушму К. показано, что селенит натрия ингибирует мутагенное действие N- нитрозо-2-ацетиламинофлуорена, регистрируемое методами учета СХО и хромосомных aberrаций в культуре клеток китайского хомячка [69]. В то же время другими авторами было показано, что селен обладает мутагенными свойствами и способен усиливать действие ряда химических мутагенов *in vivo* и *in vitro* [47].

Медь является кофактором многих ферментов, цитохромов, супероксиддисмутазы Cu/Zn [95], регулирующих реакции окисления-восстановления. Человеку рекомендуется принимать 1 – 3 мг меди в день, и предполагается, что такой дозы достаточно для поддержания стабильности генома. Прием больших доз этого элемента принципиально может привести к геномной нестабильности за счет усиления прооксидантных реакций, однако, существует гомеостатический контроль уровня меди в плазме крови [94].

Железо, подобно меди, также вовлечено в прооксидантные реакции, и его высокий уровень, скорее всего, усиливает окислительные процессы [63]. Клетки и живые организмы имеют механизмы уменьшения концентрации ионов железа, например, регулируемую межмембранную транспортировку ионов этого металла. Кроме того, существенную роль в предотвращении его негативных эффектов играют ферменты, утилизирующие оксиданты, возникающие при участии железа [63].

Цинк - активный центр фермента супероксиддисмутазы, и это определяет его роль в предупреждении эндогенных и экзогенных повреждений генома, опосредованных через интенсификацию образования АФК и ПОЛ. Однако, уровень его оптимального с точки зрения генетической стабильности поступления в организм еще не определен [65].

Таким образом, на сегодня имеется большое количество сведений о влиянии диетических факторов на генную стабильность, однако их количество и качество недостаточно для того, чтобы окончательно определить необходимый для поддержания здоровья человека уровень

поступления того или иного микроэлемента или их комплексов. Пробелы в знаниях по этим вопросам могут быть ликвидированы только путем проведения соответствующих экспериментов с различными типами пищевых ингибиторов мутагенеза, что приведет к более глубокому пониманию связей между концентрацией микроэлементов и повреждением ДНК.

1.1.3. Фармакологическая защита генома

Наиболее продвинутым направлением в области антимуtagenной защиты организма человека является разработка фармакологических средств защиты генома.

На сегодня имеется достаточно большое сведений о соединениях различной природы, способных в условиях эксперимента снижать или подавлять индуцированный мутагенез. Антимуtagenные свойства в различных тест-системах демонстрируют фармакологические средства различного назначения, такие как бензодиазепиновые транквилизаторы (диазепам, феназепам и другие), актопротекторы – производные 2-меркаптобензимидазола (бемитил и другие), сульфаниламиды (стрептоцид, норсульфазол и другие), индукторы синтеза эндогенных интерферонов, соединения, являющиеся производными 1,4-дигидропирина, 3-оксипиридина, дигидрохинона, фенотиазина, а также тиреоидные гормоны [1, 11, 21, 18, 80, 81, 75]. Эти антимуtagenны по своим физико-химическим характеристикам и функциональным назначениям весьма различны и имеют разные механизмы действия антимуtagenной защиты.

Среди соединений психотропного ряда и актопротекторов, диазепам вызывал снижение хромосомных aberrаций, индуцированных циклофосфаном, в клетках костного мозга мышей, проявляя тем самым антимуtagenные свойства. Феназепам предотвращал цитогенетические последствия эмоционального стресса, снижал выход генных мутаций, индуцируемых фопурином у дрозофилы, редуцировал уровень хромосомных

аберраций, индуцированных фотрином и фопурином в клетках костного мозга мышей [17].

Актопротектор бемитил, снижающий потребление кислорода клетками [2] и антигипоксанта томерзол также продемонстрировали в разных тест-системах антимуtagenные свойства [17]. По мнению авторов, антимуtagenная активность этих соединений сопряжена с их антирадикальными свойствами. Этими же авторами описаны антимуtagenные свойства производного 3-оксипиридина мексидола. В культуре цельной крови человека мексидол ослабляет цитогенетический эффект фотрина, но усиливает цитогенетический эффект диоксида. По отношению к алкилирующим агентам фотрину и фопурину антимуtagenные свойства мексидола были подтверждены в экспериментах на мышах.

Фармакологические средства защиты генома обладают высокой специфичностью и за счет этого большой эффективностью. Так, в ряде случаев удастся полностью устранить мутагенное действие ксенобиотиков [17, 12]. Использование антимуtagenных компонентов в составе лекарственных форм позволяет разрабатывать генетически безопасные лекарства на основе потенциально мутагенных субстанций. Например, лекарственная форма фурадонина в отличие от нативной субстанции не обладает мутагенными свойствами из-за протекторного эффекта глицирама, входящего в ее состав [17].

Однако, применение фармакологических антимутагенов осложнено ограниченной возможностью их назначения здоровым людям для профилактики вероятностных последствий индуцированного мутагенеза.

В этом случае целесообразнее применение веществ <двойного назначения>, то есть антимуtagenных соединений, которые можно использовать одновременно в качестве лекарств и пищевых добавок лечебно-профилактической направленности. Особое внимание в этой связи привлекают такие соединения как каротиноиды, аспартам и некоторые другие пищевые добавки. В рамках настоящей работы важно подчеркнуть, что часто вещества двойного назначения, в том числе и упомянутые аспартам

и бета-каротин употребляются в качестве вспомогательных в составе лекарственных форм. Пример успешного совместного использования глицирама и фурадонина указывает на перспективу использования с аналогичной целью указанных соединений.

1.2. Основные группы антимуутагенов и механизм их действия.

Наиболее полная классификация антимуутагенов в соответствии с предполагаемым механизмом их действия предложена в работе S. De Flora и C. Ramel и представлена в таблице 2 [61].

Таблица 2. Основные группы антимуутагенов и механизм их действия.

Классификация	Пример
1. Внеклеточные механизмы	
<i>1.1. Ингибиторы поглощения мутагенов или их предшественников</i>	
1.1.1. Препятствующие их проникновению в организм	защита тела,
в клетку	жирные кислоты, путресцин, ароматические аминокислоты
1.1.2. Ускоряющие выведение	пищевые волокна
<i>1.2. Ингибиторы эндогенного формирования мутагенов</i>	
1.2.1. Ингибирующие реакции нитрозирования	аскорбиновая кислота, токоферолы, фенолы, серосодержащие соединения
1.2.2. Изменяющие внутрикишечную флору	ферментированные молочные продукты
<i>1.3. Дезактиваторы мутагенов</i>	
1.3.1. в результате физических реакций	сохранение физиологического pH в жидкостях тела, пищевые волокна
1.3.2. в результате химических или ферментативных реакций	кальций, антиоксиданты, C ₁₆ -C ₂₄ ненасыщенные жирные кислоты, овощи с «пероксидазной» или с «НАДФ-Н – оксидазной активностью»
1.4. Ускоряющие абсорбцию на	Витамин Д ₃ и аналоги

<i>защитающие агенты</i>	
2. Внутриклеточные механизмы	
2.1. <i>Стимуляция захвата и детоксикации клетками, являющимися мишенью мутагена</i>	N-ацетил-L-цистеин в эритроцитах и легочных макрофагах
2.2. <i>Модификация трансмембранного переноса</i>	
2.2.1. Ингибирование проникновения в клетку	короткоцепочечные жирные кислоты, путресцин, ароматические аминокислоты, ацилгликозилстероиды, кальций
2.2.2. Стимулирование удаления из клетки	возможные модуляторы множественной лекарственной устойчивости
2.3. <i>Модуляция метаболизма</i>	
2.3.1. Ингибирование активации промутагенов в первой фазе метаболизма	фенолы, арилалкилизотиоцианаты, индолы, моноциклические монотерпеноиды, ретиноиды, флавоноиды, никотинамид, короткоцепочечные жирные кислоты, гемин, хлорофиллин, дисульфирам, диэтилтиокарбомат, бета-каротин
2.3.2. Индукция детоксикации в первой фазе и конъюгации во второй фазе метаболизма или ускорение инактивации реакционноспособных метаболитов	олтипраз и другие дитиолтионы, фенолы, N-ацетил-L-цистеин, индолы, изотиоцианаты и др.
2.3.3. Повышение эффективности детоксикации	N-ацетил-L-цистеин, индол-3-карбинол
2.4. <i>Блокирование взаимодействия с мишенью</i>	
2.4.1. Взаимодействие с электрофилами	N-ацетил-L-цистеин и другие тиолы, олтипраз, тиосульфат натрия, эрготионины, полифенолы, креатинин, никотинамид, гемин, хлорофиллин
2.4.2. За счет антиоксидантной активности и перехвата свободных радикалов	бета-каротин, аскорбат, альфа-токоферол, селен, тиопролин, эрготионеин, мочевиная кислота, дитерпены, полифенолы, флавоноиды, N-ацетил-L-цистеин и другие тиолы, нестероидные противовоспалительные лекарства, ингибиторы синтеза

		простогландина E2, индукторы антиоксидантных ферментов (протеинкиназа С и др).
2.4.3. Защита участков ДНК	нуклеофильных полиамины, ретиноиды	
2.5. <i>Ингибирование репликации</i>	<i>клеточной</i>	ретиноиды, глюкокортикоиды, изотиоцианы, тамоксифен, органические и неорганические соединения селена, кальций и др.
2.6. <i>Модуляция метаболизма и репарации ДНК</i>		
2.6.1. Увеличение репликации и репарации ДНК	точности	хлорид кобальта, арсенит натрия, ингибиторы топоизомераз
2.6.2. Стимуляция репарации и восстановления повреждений ДНК		циннамальдегид, кумарин, ванилин, амбеллиферон, таниновая кислота
2.6.3. Ингибирование репарации	ошибочной	ингибиторы протеаз, пара-аминобензойная кислота
2.6.4. Коррекция гипометилирования		фолиевая кислота, метионин.

1.2.1. Каротиноиды

1.2.1.1. Биологические и фармакологические свойства каротиноидов

Каротиноиды - природные пигменты, синтезируемые микроорганизмами и растениями, представлены во многих фруктах и овощах. На сегодня известно около 1000 представителей каротиноидных пигментов, из которых более 600 структурно идентифицированы [86]. Каротиноиды – это 40-углеродные молекулы, двучленные, с симметрично соединенными полиметилбутадиенами, чья совокупность сопряженных двойных цепей делает их исключительно эффективными при инактивации свободных радикалов и придает им антиоксидантные свойства. Некоторые каротиноиды (включая каротины) являются провитаминами – предшественниками одного из основных микронутриентов - ретинола (витамин А).

Антиоксидантные свойства каротиноидов были показаны разными способами в системах *in vitro* [126].

У человека уровень каротиноидов в крови зависит от их количества в пище, а концентрация ретинола – нет, поскольку витамин депонируется в печени. По концентрации каротиноидов в крови можно судить об обеспеченности ими организма, которая зависит от степени биодоступности каротиноидов. У людей обнаружены значительные индивидуальные различия в уровне бета-каротина в плазме крови, как до, так и после приема каротинсодержащих препаратов [51, 70, 34, 49, 131]. Выявлены возрастные, половые и региональные различия уровня бета-каротина в плазме крови людей, а также установлено, что этот показатель значительно ниже у курящих, алкоголиков, онкологических и кардиологических больных.[108, 128].

Антиоксидантная и провитаминная активности каротиноидов определяют такие их биологические функции и фармакологические свойства, как ингибирование канцерогенеза, возрастных изменений, предотвращение развития катаракты, радиационных поражений, сердечно - сосудистых заболеваний [23, 60, 76, 87, 99].

R. G. Culter [1984], выдвинув теорию о том, что длительность жизни различных индивидуумов может определяться теми же факторами, что и чувствительность к раку, показал, что имеется положительная корреляция между уровнем бета-каротина в плазме крови (но не ретинола) и продолжительностью жизни приматов [58].

1.2.1.2. Антимутагенные свойства каротиноидов и их влияние на повреждение и восстановление ДНК

В настоящее время имеется ряд исследований, демонстрирующих антимутагенные свойства каротиноидов, главным образом, на примере изучения бета-каротина [36, 44, 45, 59, 97, 113, 119, 120, 121, 129].

Влияние каротиноидов на целостность ДНК исследовалось с применением разных тест-систем *in vitro* и *in vivo*.

β -каротин и ликопин при концентрации 1 – 3мМ защищали клетки HT29 (карцинома толстой кишки человека) от ДНК- разрывов, вызываемых генерацией супероксиданиона в системе ксантин/ксантин оксидаза. При исследовании этих веществ в более высокой концентрации защиты не наблюдалось [96]. Конопаска М. [1998] использовал метод ДНК-комет, чтобы проследить воссоединение разрывов ДНК, вызванных γ -лучами. В-каротин (5 мг/мл) в комбинации с витаминами С (1 мг/мл) и Е (5 мг/мл) ускорил восстановление; за 90 мин. 80% разрывов были восстановлены в сравнении с 50% в контроле [90].

Также β -каротин снижал степень повреждения ДНК, вызванное ультрафиолетом [52] или 8-метоксипсораленом и ультрафиолетом [91].

В экспериментах *in vitro* было показано, что бета-каротин и кантаксантин снижают количество микроядер, индуцированных блеомицином в культуре лимфоцитов человека [46]. В том же эксперименте была показана обратная зависимость между уровнем каротиноидов в плазме крови и количеством клеток с микроядрами, индуцированными блеомицином.

Модифицирующее влияние каротиноидов на мутагенное действие ксенобиотиков было показано также в экспериментах *in vivo*. Так, бета-каротин снижал число хромосомных aberrации, индуцированных бензо(а)пиреном и митомицином С в клетках костного мозга мышей [110, 111], а также число микроядер, возникающих при действии бензо(а)пирена [137].

Renner et al. [1985] было показано дозозависимое влияние бета-каротина на уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга китайского хомячка, индуцированных мутагенами прямого действия - метилметансульфонатом, бусульфаном и тио - ТЭФ [113].

В экспериментах, проведенных Salvadori et al. [1991, 1992], было исследовано влияние бета-каротина на цитогенетический эффект непрямого

алкилирующего мутагена - циклофосфида. Пятидневная предобработка бета-каротином приводила к снижению уровня хромосомных aberrаций, индуцированных циклофосфамидом в клетках костного мозга мышей [119-120].

Имеются данные о снижении под влиянием бета-каротина и других каротиноидов канцерогенеза, хромосомных aberrаций, микроядер и aberrантных крипт толстой кишки в случае кормления мышей или крыс химическими канцерогенами или облучения [68, 102].

В некоторых исследованиях у γ -облученных мышей наблюдалось значительное сокращение частоты микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга и в эпителиальных клетках мочевого пузыря на фоне введения β -каротина до или сразу после облучения [90]. Введение смеси β -каротина, витаминов Е и С оказалось более эффективным [91].

S.J. Duthie et al. исследовали влияние добавочного потребления β -каротина добровольцами в течение 10 недель. Было установлено, что лимфоциты крови добровольцев, принимающих единичные, большие дозы β -каротина (25 мг) устойчивы к окислению ДНК, инициированному H_2O_2 [66].

В исследовании, проведенном P. Riso, 10 женщин добровольцев потребляли пищу, богатую томатным пюре (эквивалентную 16,5 мг ликопина в день) в одной группе, а в другой не употребляли вовсе томаты в пищу в течение 21 дня. Лимфоциты, исследуемые у первой группы добровольцев, оказались значительно более устойчивыми к нарушению окислительных процессов, вызванных H_2O_2 in vitro [115].

K. Umegaki et al. изолировали лимфоциты после ежедневного потребления добровольцами 30 мг β -каротина в течение 13 дней. Обработав клетки рентгеновским облучением, авторы обнаружили уменьшение числа микроядер по сравнению с контрольной группой. Более того, до и после приема препарата наблюдалась отрицательная корреляция между количеством микроядер и концентрацией в плазме β -каротина [132].

Прием витаминов С (100 мг) и Е (280 мг), а также β -каротина (25 мг) ежедневно в течение 20 недель группами курящих и некурящих (мужчин в возрасте 50–59 лет) привел к значительному снижению степени эндогенного окисления пиримидина в лимфоцитах ДНК, что доказывает антиоксидантную защиту *in vivo* [66].

В другом исследовании эффективность отдельных каротиноидов – лутеина, ликопина и смеси α - и β -каротина – исследовалась во время 12 – недельного эксперимента. Эффекта от дополнительного приема каротиноидов не было обнаружено при определении эндогенного повреждения ДНК в лимфоцитах, однако зафиксирована отрицательная корреляция между концентрацией каротиноидов в сыворотке крови и степенью окисления ДНК-оснований [55]. Корреляция была достаточно высокой, что позволяет предположить, что защита от повреждения ДНК осуществляется основным уровнем каротиноидов, полученных при сбалансированном питании, или же, что каротиноиды выступают просто в качестве маркеров других, действительно защитных веществ, которые встречаются в тех же продуктах питания, что и каротиноиды.

1.2.1.3. Эпидемиологические исследования биологической роли каротиноидов

Многие эпидемиологические данные указывают на антиканцерогенное воздействие каротиноидов, и β -каротина в особенности [107]. Выявлена связь между потреблением пищи, богатой каротиноидами, и относительно низкой заболеваемостью разными видами рака, включая рак легких, желудка, простаты, мочевого пузыря, пищевода и гортани [140]. Эти данные достоверны, так как подтверждены в нескольких широкомасштабных исследованиях. Например, заболеваемость раком пищевода и желудка в неблагополучных в этом отношении районах Китая заметно снизилась у добровольцев, принимавших витамин Е, β -каротин и селен, по сравнению с другой группой, принимавших плацебо [47]. Имеется также еще целая

группа эпидемиологических доказательств, свидетельствующих о благотворном влиянии каротиноидов на здоровье человека. Они обобщены в соответствующих обзорах [37, 107, 91, 68, 102, 139].

Вместе с этим, недавно появились два настораживающих сообщения. Во-первых, в Финляндии при эпидемиологическом восьмилетнем наблюдении за группой курильщиков (30 000 человек среднего возраста мужского пола), было показано, что дополнительное потребление β -каротина или витамина Е может увеличить риск развития рака легких. Подобный результат был получен при исследовании в США, во время которого курильщикам и/или рабочим асбестовой промышленности назначали ретинол и β -каротин [106]. Эксперимент прекратили преждевременно по этическим соображениям.

Другое исследование по уменьшению риска профессиональных заболеваний не обнаружило влияние β -каротина на здоровье [83].

В настоящее время описанные данные широко дискутируются, однако уже сейчас ясна необходимость тщательного исследования механизмов мутаген- и канцерогенмодифицирующего действия бета-каротина с акцентом на выявление возможных комутагенных и коканцерогенных эффектов.

1.2.3. Аспартам – антимуtagenный дипептид и его фармакологические свойства

Аспартам – пищевой заменитель сахара, представляет собой метиловый эфир дипептида – аспартил-фенилаланина. Аспартам почти в 200 раз слаще сахара, низкокалориен, и в рамках рекомендованного суточного поступления (до 40 мг/кг) безвреден для человека. Рекомендуются для диетического питания, прежде всего больным диабетом и ожирением. Кроме того, аспартам весьма эффективен для модификации вкуса различных лекарственных форм. Также аспартам широко применяется в пищевой промышленности при производстве детского, диетического питания,

напитков, десертов и других продуктов, не требующих термической обработки [35].

Сравнивая метаболизм аспартама у людей и животных Ranney et al. [1976] показал, что в обоих случаях аспартам полностью распадается на аспарат, фенилаланин и метанол в течение нескольких часов. Пик концентрации в плазме наблюдался через 4 – 7 часов [112].

Moller [1991] исследовал метаболизм аспартама у человека. Шесть взрослых мужчин получали по 0,56 г фенилаланина (Phe) в форме 1,0 г аспартама или 12,2 г бычьего альбумина в 200 мл воды или только воду. Образцы венозной крови, собранные до эксперимента и во время последующих 4 часов, были исследованы на предмет уровня в плазме аминокислот (тирозин, триптофан, валин, изолейцин и лейцин), аспартата, инсулина и глюкозы. Кривая, показывающая концентрацию фенилаланина в плазме была на 40% больше после приема аспартама по сравнению с альбумином, хотя это и не считается показательным. Указанные различия могут быть вызваны, значительным повышением инсулина под влиянием альбумина, на который аспартам не оказывает никакого действия. Наблюдалось влияние аспартама на содержание в плазме тирозина, но не триптофана, валина, изолейцина или лейцина [101].

Исследование антимуtagenных свойств аспартама *in vivo* проводилось в лаборатории фармакогенетики НИИ Фармакологии РАМН. Были получены результаты, свидетельствующие о наличии у аспартама цитогенетической активности. Кулакова А.В. показала, что аспартам в диапазоне исследуемых доз 4-40 мг/кг обладает антимуtagenными свойствами по отношению к диоксидину и циклофосфамиду. Выявленная антимуtagenная активность аспартама более выражена при его пятидневном введении до использования мутагена, тогда как при совместном пятидневном введении аспартама с мутагенами подсластитель не влиял на кластогенное действие диоксидина и циклофосфамида [24].

Установленная антимуtagenная активность аспартама была независимо подтверждена Среппу Е.Е., Vaudrimont I., которые исследовали

влияние аспартама на генотоксические эффекты охратоксина А [57]. Аспартам вводился животным отдельно или в сочетании с охратоксином А (ОТА). Анализ с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) показал, что от 10 до 12% аспартама распределяются в неизменном виде в крови, моче и в органах. После введения аспартама крысам в дозе 25 мг/кг уровень его составил 73 ± 6 мкг/г, $1,8 \pm 0,1$ мкг/г, 156 ± 9 мкг/г, 34 ± 2 мкг/г, 66 ± 5 мкг/мл и 19 ± 2 мкг/мл соответственно в почках, печени, мозге, яичке, моче и сыворотке крови. В присутствии ОТА в тех же органах и жидкостях уровень присутствия составил 68 ± 5 мкг/г, $2,1 \pm 0,1$ мкг/г, 105 ± 9 мкг/г, $25 \pm 0,6$ мкг/г, 45 ± 3 мкг/мл и $11 \pm 0,2$ мкг/мл. По мнению авторов это указывает на то, что аспартам связывает ОТА и тем самым препятствует его повреждающему действию [57].

Видимо, это действительно так, поскольку в дополнительных экспериментах было показано, что при совместном шестимесячном введении аспартама и микотоксина концентрация последнего в крови и почках существенно ниже, чем при введении только ОТА.

Эффективность аспартама в качестве протектора выше в тех случаях, когда он присутствует в плазме до ОТА и его количество уменьшается при возрастании концентраций токсинов, последнее также указывает в пользу описанного механизма антимуtagenного действия аспартама.

Генопротекторные свойства аспартама были подтверждены также в экспериментах, направленных на исследование кариомегалии в клетках почечных тканей под действием ОТА [56]. После 6- недельного лечения комбинацией ОТА и аспартама, кариомегалия была предотвращена у 80% животных, а у 20% животных обнаружилось несколько больших ядер в сравнении с животными, которым давался только ОТА. Отсутствие повреждения ДНК показывает наличие защитного эффекта у аспартама, которым не обладает фенилаланин.

Аспартам в неизменном виде (что составляет от 10 до 12 % от данной дозы), который имеет гораздо большую концентрацию, чем охратоксин А в организме в случае естественной контаминации,

предотвращает связывание ОТА с плазмапротеинами, ускоряет выведение ОТА из организма, ускоряет метаболизм ОТА, особенно с менее токсичными и генотоксичными метаболитами. Такой механизм подтверждается уменьшением распределения ОТА в органах, таких как почки, мозг, печень и яичники, и, наконец, уменьшением вызываемой ОТА нефротоксичности и генотоксичности.

Таким образом, обобщая вышесказанное, и каротиноиды и аспартам, обладают антимуtagenными свойствами, однако механизмы защитного действия у этих соединений различны. Совместное использование в фармакологии и пищевой промышленности указанных веществ, делает актуальным исследование их комбинаций на предмет комутагенности, синергизма или антагонизма совместного действия, наличия антимуtagenных свойств, что и определило направление исследований, проведенных в настоящей работе.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Препараты и оборудование

2.1.1. Препараты, мутагены и химические реактивы

Бета–каротин - пищевой каротиновый краситель E160a (Hofmann la Roche, Швейцария) 30 % масляная суспензия (ЖБК) и 10 % водная суспензия (ВБК).

Аспартам (NutraSweet, Швейцария) гранулированный порошок. Представляет собой метиловый эфир L - α - аспартил -L- фенилаланина.

В качестве модельных мутагенов использовали циклофосфамид и диоксидин.

Циклофосфамид (N'- бис (β - хлорэтил)-N'-O-триметиленовый эфир диамида фосфорной кислоты) (Serva, Германия).

Диоксидин (1,4-Ди-N-окись 2,3 бис-(ацетоксиметил)-хиноксалина) (Фармак он, Россия).

Для приготовления цитогенетических препаратов применяли KCl, ледяную уксусную кислоту, этиловый спирт ректифицированный высшей очистки, воду дистиллированную; в процессе окрашивания метафазного материала – NaCl, красители азур-2 и эозин (все реактивы Реахим, Россия). Для изучения препаратов под микроскопом использовали иммерсионное кедровое масло (Россия) и орто-ксилол (Россия).

2.1.2. Оборудование.

Центрифуга ОПН - 3 (Россия)

Микроскоп Standart - 20, (Германия), 10 x 100

Весы лабораторные аналитические ВАД - 200М ГОСТ 24104 - 88, класс точности 2.

2.2. Животные.

В работе использовали мышей-самцов линии C57BL/6 (питомник “Столбовая “ РАМН) в возрасте 8 - 12 недель. Животных содержали при 12-ти часовом световом режиме, на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде в условиях вивария НИЛ фармакологической генетики НИИ фармакологии РАМН. В эксперименте было использовано 720 животных.

2.3. Метод учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *in vivo*.

Метод позволяет учитывать хромосомные повреждения (ахроматические пробелы (гепы) и различные категории хромосомных aberrаций) на стадии метафазы и рекомендован в качестве основного для проведения скрининга мутагенов и антимутагенов среди фармакологических соединений [6]. В отличие от методов *in vitro*, он позволяет учитывать не только эффект исследуемого соединения, но также его метаболитов, и биохимические события, приводящие к образованию эндогенных мутагенов, что обеспечивает надежную экстраполяцию экспериментальных данных на человека.

2.3.1. Схема обработки животных.

Эксперименты по изучению влияния комбинаций каротиноидов и аспартама на индуцированный мутагенез проводили в трех вариантах. Во всех случаях мутаген вводили внутрибрюшинно, комбинации исследуемых препаратов - перорально. Путь введения каротиноидов и аспартама соответствовал наиболее распространенному способу их поступления в организм человека. Кроме того, применение различных путей введения мутагенов и пищевых добавок позволяло исключить их возможное прямое взаимодействие.

2.3.1.1. Острый эксперимент.

Животные получали мутаген и одну из комбинаций каротиноидов (ЖБК, ВБК) и аспартама однократно; забой животных производили через 24 часа после введения соединений.

2.3.1.2. Предобработка.

Животным вводили одну из комбинаций каротиноидов (ЖБК, ВБК) и аспартама пятикратно с интервалом 24 часа, последнее введение сочеталось с однократной инъекцией мутагена; забой животных осуществляли через 24 часа.

2.3.1.3. Подострый эксперимент.

Комбинации каротиноидов (ЖБК, ВБК) и аспартама вводили совместно с мутагеном пятикратно, с интервалом между введениями 24 часа; забой животных производили через 6 часов после последнего введения.

2.3.2. Дозы.

Исследуемые комбинации вводили в двух вариантах. В первом аспартам применяли в дозе 0,4 мг/кг совместно с масляной суспензией бета-каротина в дозах 0,5, 5 и 50 мг/кг или водной суспензией из расчета 1,5, 15, 150 мг/кг, что в обоих случаях при перерасчете на чистый бета-каротин составило 0,15, 1,5 и 15 мг/кг. Во втором - аспартам вводили в дозе 4 мг/кг в сочетании с вышеуказанными препаратами бета-каротина.. С каждой дозой аспартама сочетали три вышеуказанные дозы каротиноидов.

Жирорастворимый ЖБК растворяли в рафинированном растительном масле, ВБК и аспартам - в дистиллированной воде непосредственно перед использованием.

Выбор доз каротиноидов и аспартама определялся исходя из опыта предыдущих исследований в НИИ фармакологии РАМН, направленных на изучение антимуtagenных свойств указанных препаратов, который опирался на существующую практику клинического использования бета-каротина и

аспартама, при котором потребление бета-каротина достигает 180 мг в сутки [8], аспартама 40 мг/кг [9].

Непрямой алкилирующий мутаген циклофосфамид вводили в дозе 20 мг/кг, прямой мутаген прооксидантного типа действия - диоксидин в дозе 300 мг/кг и 100 мг/кг. В указанных дозах эти мутагены наиболее часто используются в экспериментах по изучению модификации индуцированного мутагенеза. Выбор доз мутагенов был обусловлен установленным ранее заключением, что при исследовании на антимутагенность тем выше получение статистически достоверных результатов, чем выше повреждающая активность используемого мутагена [20]. Те же дозы мутагенов применялись в более ранних исследованиях, направленных на изучение антимутагенных свойств аспартама и бета-каротина [3, 25].

Во всех вариантах эксперимента мутагены растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед обработкой животных.

Внутрибрюшинные и пероральные введения осуществляли в объемах, не превышающих 0,25 мл/мышь, с помощью одноразовых микрошприцов.

2.3.3. Приготовление цитогенетических препаратов.

Цитогенетические препараты готовили стандартным суховоздушным способом по Preston et al [1987]. За 2,5 часа до забоя животным вводили 0,025% раствор колхицина из расчета 0,01 мл/г с целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафаз [109].

Забой животных осуществляли смещением шейных позвонков. Затем максимально быстро выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга гипотоническим раствором (0,55 % KCl), предварительно подогретым до 37⁰С. После инкубации при 37⁰С в течение 15 минут клеточную взвесь центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (центрифуга ОПН - 3, Россия). Супернатант сливали, осадок ресуспензировали и добавляли 3 мл предварительно охлажденного фиксатора, состоящего из смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Время инкубации клеток в фиксаторе

составляло 10 минут. Затем проводили повторное центрифугирование и смену фиксатора (3 мл). После этого клетки инкубировали в холодильнике еще 20 минут. Взвесь вновь центрифугировали, удаляли супернатант, осадок ресуспензировали в 0,5 мл вновь добавленного фиксатора и наносили на предварительно обезжиренные и охлажденные стекла, которые высушивали в пламени спиртовой горелки.

Окраску производили азур - эозином. Состав красителя включал: 5 частей азура (0,1 %), 2 части эозина (0,1 %), 10 частей дистиллированной воды с небольшим добавлением 5 % раствора $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$. При цитогенетическом анализе использовали микроскоп Standart - 20, ФРГ, 10x100.

Цитогенетический анализ проводили стандартно на основе рекомендаций Scott et al. [122], при этом учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом, хромосомными обменами и клетки с множественными повреждениями хромосом (более 5 хромосомных повреждений в клетке). На каждое животное анализировали по 100 метафаз, в каждой группе было исследовано 4 -6 животных.

2.4. Статистическая обработка.

Статистическую обработку (χ^2 - критерий) проводили путем сравнения долей аномальных клеток в контрольной и экспериментальных группах [26]. Расчет антимуtagenного эффекта производили по формуле:

$$\text{АЭ} = \frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{M1}} * 100$$

где: АЭ - антимуtagenный эффект (%), M1 - % метафаз с абберациями при действии мутагена, M2 - % метафаз с абберациями при действии мутагена и исследуемой комбинации.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Исследование влияния комбинаций аспартама и бета-каротина на кластогенные эффекты мутагенов в остром эксперименте.

В данной серии экспериментов мутагены и исследуемые комбинации аспартама и каротиноидов вводили совместно однократно, ЖБК и ВБК в дозах - 0,15, 1,5 и 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 или 0,4 мг/кг. В качестве позитивного контроля использовались данные, полученные в экспериментах на животных, которым инъекцировался только мутаген.

3.1.1. Комбинации аспартама и бета-каротина в жирорастворимой форме.

Результаты влияния комбинаций препаратов ЖБК и аспартама на кластогенные эффекты циклофосфамида представлены в таблице 3.

Исследование уровня хромосомных aberrаций, индуцированных при однократном воздействии циклофосфамида в дозе 20 мг/кг выявило $17,8 \pm 1,7$ % поврежденных метафаз, при этом на каждые 100 клеток было зарегистрировано 4,2 клеток с гемами, 11,0 с одиночными фрагментами, 1,8 с парными фрагментами, 0,2 с обманами, 0,6 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

Использование комбинации из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг привело к статистически значимому снижению кластогенного действия циклофосфамида на 28%. Количество поврежденных клеток было равно $12,8 \pm 1,5$ %. Спектр хромосомных повреждений на каждые 100 клеток 1,8 гепов, 9,2 одиночных фрагментов, 1,6 парных фрагментов, метафазы с множественными повреждениями выявлены не были.

После совместного применения циклофосфамида с комбинацией ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг на каждые 100 клеток зарегистрировано 1,4 гепов, 7,6 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагментов, 1,0 обменов, общее количество поврежденных клеток – $10,6 \pm 1,4$ %. Сопоставление этого результата и данных позитивного контроля ($17,8 \pm 1,7\%$) выявило между ними статистически достоверные различия, что свидетельствует об уменьшении эффекта мутагена под влиянием исследуемой комбинации на 40%.

При использовании комбинации из ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг количество клеток с аномалиями, индуцированными циклофосфамидом, составило $8,8 \pm 1,3$ % (0,8 гема, 6,6 одиночных фрагментов, 0,4 парных фрагментов, 1,0 обменов на каждые 100 клеток). Статистическая обработка показала достоверные различия этого результата с установленными значениями позитивного контроля, что свидетельствует о снижении кластогенного эффекта циклофосфамида на 51%.

В этой же таблице представлены результаты, установленные в серии экспериментов с использованием комбинаций аспартама в дозе 4 мк/кг и ЖБК во всем диапазоне используемых доз (0,15-15 мг/кг). Позитивный контроль составил $14,8 \pm 1,8$ % поврежденных метафаз (на 100 клеток приходилось 1,5 гепов, 8,3 одиночных и 1,5 парных фрагментов, 4,5 обменов). При использовании в комбинации ЖБК в дозе 0,15 мг/кг на каждые 100 клеток зарегистрировано 1,2 гепов, 5,0 и 1,4 одиночных и парных фрагментов соответственно, 2,8 обменов. Всего количество поврежденных метафаз составило $9,4 \pm 1,3$ %.

При использовании ЖБК в промежуточной 1,5 мг/кг и максимальной дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг было зафиксировано практически одинаковое снижение количества поврежденных клеток – $8,4 \pm 1,3$ % в первом варианте и $8,2 \pm 1,3$ % во втором. При этом количество повреждений на 100 клеток составило соответственно гепов 1,0 и 0,4, одиночных фрагментов 4,2 и 4,8, парных фрагментов – 1,8 и 1,6, обменов – 1,4 и 1,2. Сравнение всех полученных данных с результатами позитивного контроля выявило между

ними статистически достоверные различия, что свидетельствует о способности исследуемых комбинаций снижать кластогенный эффект ЦФ.

Обобщая совокупность данных, представленных в таблице 3, следует констатировать, что жирорастворимый бета-каротин во всех использованных дозах в сочетании с аспартамом применяемым из расчета 0,4 и 4 мг/кг значительно снижал кластогенное действие циклофосфида на 28-51%.

В таблице 4 представлены данные, полученные при изучении влияния комбинаций аспартама и ЖБК и на цитогенетические эффекты диоксида в дозе 100 мг/кг при их однократном введении.

Отдельно взятый мутаген в дозе 100 мг/кг индуцировал хромосомные повреждения в $7,4 \pm 1,2$ % клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6. При этом спектр хромосомных повреждений на каждые 100 клеток составил: гепов 1,6, одиночных фрагментов 4,2, парных фрагментов и обменов по 0,6, 0,4 метафаз с множественными повреждениями.

При исследовании влияния комбинации ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг на генотоксическое действие диоксида было обнаружено $5,8 \pm 1,1$ % поврежденных метафаз. На каждые 100 клеток приходилось 0,8 гепов, 3,8 одиночных фрагментов, 0,8 парных фрагментов и обменов 0,4. После использования ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг количество индуцированных мутагеном аномальных клеток существенно не отличалось от предыдущего значения и составило $5,3 \pm 1,1$ % (0,3 гепов, 3,5 одиночных фрагментов, 0,4 парных фрагмента на каждые 100 клеток). Статистически достоверных различий между опытными и контрольными результатами не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии снижения мутагенных эффектов диоксида при применении указанных комбинаций.

Применение ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволило зарегистрировать статистически достоверное влияние комбинации на уровень повреждаемых диоксидином метафаз. Количество aberrантных клеток снизилось и составило $4,0 \pm 0,9$ %. При этом спектр хромосомных повреждений был следующий: 0,6 гема, 3,0 одиночных фрагментов, 0,2 парных фрагмента, 0,2 обмена на каждые 100 клеток.

При исследовании комбинаций из препаратов ЖБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг были зарегистрированы результаты сходные с данными серии экспериментов с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг.

Отдельно взятый мутаген индуцировал хромосомные повреждения в $7,0 \pm 1,2$ % клеток. В спектре хромосомных повреждений было выявлено на 100 клеток 6,8 одиночных фрагментов, 0,2 обмена, 0,4 метафазы с множественными повреждениями хромосом.

В эксперименте, направленном на исследование действия комбинации ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом 4 мг/кг на кластогенные эффекты диоксицина зарегистрировано на каждые 100 клеток 3,2 клеток с одиночными повреждениями хромосом, по 0,4 обмена и клеток с множественными повреждениями хромосом. Всего доля поврежденных клеток составила $4,2 \pm 0,9$ %. Эти результаты статистически значимо не отличались от контрольных значений.

При совместном применении сроком на 24 часа диоксицина с комбинацией ЖБК в промежуточной 1,5 и максимальной 15 мг/кг дозах с аспартамом в дозе 4 мг/кг были выявлены практически равнозначные результаты. Всего доля поврежденных клеток составила (соответственно дозам ЖБК) $3,2 \pm 0,9$ % и $3,0 \pm 0,9$ %, в спектре хромосомных повреждений было выявлено на 100 исследованных клеток 2,6 и 2,4 одиночных фрагментов, по 0,6 хромосомы с множественными повреждениями. Статистическая обработка показала достоверный характер снижения мутагенного эффекта диоксицина.

Обобщая результаты эксперимента, можно заключить, что эффект комбинации существенно зависит от доз, в которых используются ее компоненты. Так, наилучший эффект в остром эксперименте с диоксидином (100 мг/кг) достигается при использовании жирорастворимой формы бета-каротина в максимальной дозе (15 мг/кг) и аспартама в дозе 0,4 мг/кг. Увеличение дозы аспартама до 4 мг/кг приводит к уменьшению действия мутагена лишь при условии использования в сочетании с ЖБК в промежуточной 1,5 и максимальной 15 мг/кг дозах. Комбинации с минимальной дозой ЖБК 0,15 мг/кг не эффективны по отношению к действию мутагена.

В таблице 5 представлены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния комбинаций аспартама с ЖБК на кластогенные эффекты диоксида в дозе 300 мг/кг.

Отдельно взятый мутаген индуцировал $20,6 \pm 1,8$ % поврежденных метафаз, при этом на каждые 100 клеток было зарегистрировано 2,2 гепов, 6,2 одиночных фрагментов, по 2,2 парных фрагментов и обменов и 8,8 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

Использование ЖБК с аспартамом, соответственно, в дозах 0,15 и 0,4 мг/кг не привело к статистически значимому снижению кластогенного действия диоксида. Количество поврежденных клеток составило $19,8 \pm 1,8$ %. Спектр хромосомных повреждений практически не отличался от выявленного в позитивном контроле : на каждые 100 клеток приходилось 2,0 гепов, 3,6 одиночных фрагментов, 1,8 парных фрагментов, 2,2 обменов и 10,2 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

После совместного применения диоксида в дозе 300 мг/кг и комбинации из ЖБК в промежуточной 1,5 и максимальной 15 мг/кг дозах с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг количество клеток с аномалиями, индуцированными мутагеном было зарегистрировано примерно на одном уровне и составило, соответственно, $17,0 \pm 1,7$ % и $16,4 \pm 1,7$ % (1,6 и 1,8 гепов, 4,0 и 5,0 одиночных фрагментов, 1,8 и 2,0 парных фрагментов, 2,0 и 1,0

обменов, 7,6 и 6,6 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 клеток). Статистическая обработка показала отсутствие достоверных различий этих результатов с установленными значениями позитивного контроля.

В эксперименте, направленном на исследование действия комбинаций ЖБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на кластогенные эффекты диоксидина в дозе 300 мг/кг, отдельно взятый мутаген индуцировал хромосомные повреждения у $17,2 \pm 1,6$ % клеток. В спектре хромосомных повреждений было выявлено на 100 исследованных клеток 0,2 гема, 4,2 одиночных фрагментов, 0,6 обмена, 12,2 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

При совместном применении сроком на 24 часа диоксидина с ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг спектр хромосомных повреждений практически не отличался от значений позитивного контроля; было выявлено 0,2 гема, 4,2 одиночных фрагмента, 0,4 обмена, 10,2 клеток с множественными повреждениями хромосом. Всего доля поврежденных клеток составила $15,0 \pm 1,6$ %.

Только при использовании ЖБК в промежуточной 1,5 и максимальной 15 мг/кг дозах с аспартамом в дозе 4 мг/кг было зафиксировано статистически достоверное ($P < 0,05$) снижение уровня индуцируемых диоксидином аномальных клеток до $12,6 \pm 1,6$ % в первом и до $12,0 \pm 1,6$ во втором экспериментах. Спектр хромосомных повреждений в этих дозах практически не различался и составил, соответственно : 4,4 и 4,0 одиночных фрагментов, по 0,2 обмена, 7,8 и 7,6 метафаз с множественными повреждениями.

Обобщая результаты экспериментов, можно заключить, что комбинации, содержащие жирорастворимую форму бета-каротина и аспартам в условиях острого эксперимента оказывают влияние на цитогенетические эффекты диоксидина в дозе 300 мг/кг только при использовании исследуемых веществ в максимальных дозах.

3.1.2. Комбинации аспартама с водорастворимым бета-каротином

В таблице 6 представлены результаты влияния комбинаций из водорастворимого бета-каротина (ВБК) и аспартама на кластогенные эффекты циклофосамида (20 мг/кг) при их совместном однократном введении.

Отдельно взятый мутаген индуцировал хромосомные повреждения у $11,2 \pm 1,4\%$ клеток. В спектре хромосомных повреждений было выявлено на 100 исследованных клеток 2,2 гепов, 5,2 одиночных фрагментов, 1,2 парных фрагментов, 0,2 метафазы с множественными повреждениями хромосом.

В эксперименте, направленном на исследование действия комбинации ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг на кластогенные эффекты циклофосамида зарегистрировано на каждые 100 клеток 2,25 гепов, 3,5 одиночных фрагментов, 1,0 обменов. Всего доля поврежденных клеток составила $7,0 \pm 1,2\%$. Эти результаты статистически значимо отличались от значений позитивного контроля.

При совместном применении сроком на 24 часа циклофосфана с комбинацией ВБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг было выявлено 1,25 гепов, 3,8 клеток с одиночными фрагментами, 1,25 клеток с обменами. Общее количество поврежденных клеток – $5,5 \pm 1,1\%$, что свидетельствует о статистически достоверных различиях между опытным и контрольным результатами, и, как и в предыдущем случае, свидетельствует о снижении мутагенного эффекта циклофосфана.

Применение ВБК в максимальной дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг также привело к статистически достоверному ($P < 0,01$) снижению уровня индуцируемых циклофосфаном аномальных клеток до $4,0 \pm 0,8\%$ (1,4 гепов, 2,0 клеток с одиночными фрагментами, 0,2 парных фрагмента, 0,8 обмена).

Эксперименты, направленные на изучение влияния комбинаций препаратов ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на цитогенетические эффекты циклофосфана, позволили установить следующие результаты. Мутаген при однократном введении сроком на 24 часа вызвал повреждения хромосом : гепов 1,0, метафаз с одиночными фрагментами – 7,0, парными – 2,25, обменов – 2,75, клеток с множественными повреждениями 0,75 (на каждые 100 исследованных клеток).

При совместном применении сроком на 24 часа циклофосфана с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг было выявлено статистически значимое ($P < 0,05$) снижение уровня аберрантных клеток до $10,2 \pm 1,4\%$ против $15,25 \pm 1,8\%$ аномальных клеток в позитивном контроле. Спектр хромосомных повреждений был следующий : гепов 1,2, метафаз с одиночными фрагментами – 6,8, парными – 1,4, обменов – 1,8 (на каждые 100 клеток).

После использования комбинации ВБК в промежуточной дозе 1,5 мг/кг с аспартамом 4 мг/кг количество индуцированных мутагеном аномальных клеток составило $12,6 \pm 1,5\%$ (0,6 гема, 9,8 одиночных фрагментов и 1,6 парных, 1,2 обменов). Статистически достоверных различий между опытными и контрольными результатами обнаружено не было.

Применение комбинации с ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом 4 мг/кг позволило зарегистрировать статистически значимое влияние на уровень повреждаемых циклофосфаном метафаз. Количество аберрантных клеток составило $8,2 \pm 1,2\%$ со следующим спектром хромосомных повреждений : 0,2 гема, одиночных фрагментов 4,4, парных фрагментов 1,6 и обменов 1,2 на каждые 100 клеток.

Таким образом, в условиях острого эксперимента комбинации из ВБК с аспартамом практически во всем диапазоне исследуемых доз редуцируют кластогенный эффект циклофосфамида на 33-64 %. Только комбинация из ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг не проявляет указанного действия.

В таблице 7 представлены результаты влияния комбинаций аспартама с водорастворимым бета-каротином на кластогенные эффекты диоксидина (100 мг/кг) при их однократном совместном введении.

В результате обработки мышей диоксидином в дозе 100 мг/кг сроком на 24 часа было зарегистрировано $6,0 \pm 1,2\%$ аномальных клеток (1,2 гепов, 4,2 одиночных фрагментов, 0,4 парных, 0,8 обмена на каждые 100 клеток).

Цитогенетический анализ 500 метафазных пластинок после однократного применения с диоксидином комбинации из ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг позволил обнаружить на каждые 100 клеток 0,8 гепов, 3,6 одиночных и 0,4 парных фрагментов, 0,6 обмена. Общее количество абберрантных клеток составило $5,2 \pm 1,0\%$. Этот результат достоверно не отличался от значений позитивного контроля.

После совместного введения мутагена с комбинацией из ВБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартама 0,4 мг/кг было зарегистрировано $4,6 \pm 0,9\%$ клеток с аномалиями. Спектр хромосомных повреждений составил: 1,0 гепов, 3,8 одиночных и 0,2 парных фрагментов на каждые 100 клеток. Сравнение опытных и контрольных данных, характеризующих уровень поврежденных метафаз, не выявило между ними статистически достоверных различий.

Обработка животных комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг привела к достоверному ($P < 0,05$) снижению числа поврежденных диоксидином клеток. При этом было зарегистрировано $3,6 \pm 0,8\%$ против $6,0 \pm 1,2\%$ в контроле. Качественный состав хромосомных повреждений на каждые 100 метафаз был следующий: 0,6 гепов, одиночных фрагментов 3,2, 0,4 обмена.

После обработки животных комбинацией с увеличенной дозой аспартама до 4 мг/кг были зарегистрированы результаты сходные с серией экспериментов с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг. Отдельно взятый мутаген индуцировал $7,0 \pm 1,1\%$ хромосомных повреждений (1,4 гепов, 4,8 одиночных и 0,6 парных фрагментов, 1,2 обменов на каждые 100 клеток).

При исследовании влияния комбинации из ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг на генотоксичное действие диоксидина было обнаружено $5,0 \pm 0,9\%$ поврежденных метафаз. На каждые 100 клеток приходилось 0,8 гепов, 3,0 одиночных и 0,6 парных фрагментов, 0,8 обмена. Полученный результат статистически значимо не отличался от значений позитивного контроля.

После использования комбинации с дозами ВБК 1,5 мг/кг и аспартама 4 мг/кг количество индуцированных мутагеном аномальных клеток составило $4,4 \pm 0,9\%$ (1,2 гепов, 2,6 одиночных фрагментов, 0,8 обмена). Статистически достоверных различий между опытным и контрольным результатом не обнаружено. Применение комбинации с максимальной дозой ВБК 15 мг/кг и аспартама 4 мг/кг позволило зарегистрировать статистически достоверное снижение кластогенного эффекта диоксидина до $4,0 \pm 0,8\%$ со следующим спектром хромосомных повреждений на каждые 100 клеток: 0,8 гепов, 2,6 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагментов и 0,4 обмена.

Таким образом, уровень клеток, повреждаемых диоксидином в дозе 100 мг/кг, был значимо снижен комбинациями с максимальной дозой ВБК 15 мг/кг и аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и 4 мг/кг. В то же время, комбинации препаратов не влияли на кластогенный эффект мутагена в дозах ВБК 0,15 и 1,5 мг/кг.

В таблице 8 представлены данные, полученные при изучении влияния комбинаций ВБК и аспартама на цитогенетические эффекты диоксидина в дозе 300 мг/кг при их однократном введении.

При изучении мутагенного эффекта диоксидина (300 мг/кг) анализ 400 метафазных пластинок позволил выявить хромосомные aberrации у $14,25 \pm 1,6\%$ исследованных клеток. При этом на каждые 100 метафаз было зарегистрировано 1,25 гепов, 5,75 одиночных фрагментов, 1,75 парных фрагментов, 10,5 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

В результате введения совместно с диоксидином комбинации ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг было зафиксировано $13,0 \pm 1,7\%$ аномальных клеток, что статистически значимо не отличалось от

контрольного значения. В спектре хромосомных нарушений преобладали метафазы с множественными повреждениями и одиночные фрагменты - их было зафиксировано, соответственно, 6,5 и 5,25 на каждые 100 метафаз. Кроме того, присутствовали парные фрагменты – 2,5 и обмены – 3,0 на каждые 100 клеток.

Обработка животных комбинацией ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом 0,4 мг/кг привела к снижению уровня индуцируемых диоксидином абберантных клеток до $12,5 \pm 1,6$ %. При анализе 400 метафазных пластинок в этом опыте хромосомные повреждения были представлены: гемами – 1,4 , одиночными фрагментами – 5,5 , парными фрагментами – 1,75 , обменами – 1,75 , метафазами с множественными повреждениями – 4,75 на каждые 100 клеток. Достоверных различий полученных результатов с показателями позитивного контроля обнаружено не было.

После обработки экспериментальных животных комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом 0,4 мг/кг уровень метафазных пластинок, повреждаемых диоксидином, был снижен до показателя $8,0 \pm 1,4$ %, что значимо ($P < 0,05$) отличалось от аналогичного показателя, характеризующего эффект мутагена и свидетельствует о наличии антимутагенных свойств у исследуемой комбинации. При этом на каждые 100 клеток приходилось: 0,75 гема, 2,75 одиночных фрагментов, 1,75 парных фрагментов, 0,25 обмена и 2,5 метафаз с множественными повреждениями.

При исследовании действия комбинаций из водорастворимого бета-каротина с аспартамом в дозе 4 мг/кг на кластогенные эффекты диоксида в дозе 300 мг/кг, отдельно взятый мутаген индуцировал хромосомные повреждения у $14,4 \pm 1,6$ % клеток. В спектре хромосомных повреждений было выявлено на 100 исследованных клеток 0,8 гема, 6,0 одиночных фрагментов, 1,6 парных фрагментов, 2,8 обменов, 5,2 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

В результате введения совместно с мутагеном с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама 4 мг/кг было зафиксировано $10,25 \pm 1,6$ % аномальных клеток, что статистически значимо не отличалось от значений позитивного контроля. Обработка животных комбинацией с ВБК в дозе 1,5 мг/кг привела к снижению индуцированных диоксидином аберрантных клеток до $8,0 \pm 1,3$ %. При анализе 400 метафазных пластинок в этом опыте хромосомные повреждения были представлены : гема – 0,75, одиночными фрагментами – 3,5, парными фрагментами – 1,25, обментами – 1,5, метафазами с множественными повреждениями – 3,0. Эти данные статистически достоверно отличались от аналогичных показателей, характеризующих эффект мутагена, что свидетельствует о снижении кластогенного действия диоксидина под влиянием исследуемой комбинации. Такой же эффект продемонстрировала комбинация из ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом 4 мг/кг. В этом случае снижение кластогенного действия мутагена было зарегистрировано до уровня $7,6 \pm 1,2$ %, со спектром хромосомных повреждений: гема 0,4, одиночных фрагментов 4,6, парных 1,4, обменов и метафаз с множественными повреждениями по 1,6.

Таким образом, в условиях острого эксперимента комбинация водорастворимой формы бета-каротина в дозе 15 мг/кг с аспартамом в обеих используемых дозах (0,4 и 4 мг/кг) статистически значимо редуцирует мутагенный эффект диоксидина, применяемого в дозе 300 мг/кг и не проявляет подобной активности при использовании ВБК в дозах 0,15 и 1,5 мг/кг.

Совокупность результатов исследования влияния двух серий комбинаций аспартама и каротиноидных препаратов на цитогенетические эффекты диоксидина и циклофосфамида при однократном совместном введении мышам позволило установить следующие экспериментальные факты.

1. Комбинации препарата бета-каротина (жирорастворимая форма) в дозах 0,15 - 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг снижает цитогенетические эффекты циклофосфида.

2. Комбинации препаратов бета-каротина (жирорастворимая форма) в дозах 1,5-15 мг/кг с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и 4 мг/кг уменьшают кластогенный эффект диоксида вводимого в дозе 100 мг/кг.

3. Под влиянием комбинации препарата бета-каротина (жирорастворимая форма) в дозах 1,5-15 мг/кг, сочетаемых с аспартамом в дозе 4 мг/кг уменьшается кластогенный эффект диоксида в дозе 300 мг/кг. При использовании комбинации с меньшей дозой аспартама (0,4 мг/кг) препараты не оказывают значимого воздействия на проявление цитогенетического действия этого мутагена.

4. Комбинации препаратов из водорастворимого бета-каротина в дозах 0,15-15 мг/кг в сочетании аспартамом в обеих используемых дозах (0,4 и 4 мг/кг) значимо снижали кластогенные эффекты циклофосфана.

5. Под влиянием комбинаций из водорастворимого бета-каротина в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 и 4 мг/кг уменьшался кластогенный эффект диоксида, вводимого в дозах 100 и 300 мг/кг. При использовании комбинаций с меньшей дозой бета-каротина они не оказывали значимого воздействия на проявление цитогенетического действия этого мутагена.

Таким образом, можно сделать вывод о наличии у комбинаций из каротиноидов (водо- и жирорастворимой формы) и аспартама антимуtagenной активности и зависимости ее проявления от дозы составляющих компонентов. Кроме того, совокупность полученных данных позволяет сделать вывод об отсутствии у использованных комбинаций комутагенной активности в остром эксперименте в диапазоне применяемых дозировок.

Сравнение результатов исследований комбинаций с установленными ранее данными об антимутагенной активности их составляющих (водо- и жирорастворимая форма бета- каротина и аспартам) открывает дальнейшую перспективу изучения указанных комбинаций на предмет выявления зависимости защитного действия от режима введения.

3.2. Исследование влияния предобработки животных комбинациями из аспартама и бета-каротина на цитогенетические эффекты мутагенов

В экспериментах, представленных в данной части исследования, животные обрабатывались перорально комбинациями из каротиноидов и аспартама в течение 5 дней. Последнее введение сочеталось с однократной внутрибрюшинной инъекцией мутагена. Забой животных осуществляли через 24 часа после последнего введения.

3.2.1. Комбинации аспартама и жирорастворимого бета-каротина

В таблице 9 приведены данные, характеризующие влияние комбинаций из аспартама и жирорастворимого бета-каротина (ЖБК) на цитогенетические эффекты циклофосфамида в условиях предобработки ими животных.

Однократное воздействие циклофосфамида в дозе 20 мг/кг индуцировало хромосомные аномалии у $17,8 \pm 1,7$ % исследованных клеток. При этом на каждые 100 клеток было зарегистрировано: 2,6 гепов, 7,8 одиночных фрагментов, 1,2 парных фрагментов, 4,2 обменов, 2,2 метафаз с множественными повреждениями.

На фоне пятидневной обработки животных комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг циклофосфамид индуцировал 2,8 гепов, 6,8 одиночных фрагментов, 0,8 парных фрагмента, 4,6 обменов, метафаз с множественными повреждениями выявлено не было. Общее количество аномальных клеток составило $14,4 \pm 1,6$ %, что практически не отличается от данных позитивного контроля.

Введение циклофосфамида животным, обработанным в течение 5 дней комбинациями из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом 0,4 мг/кг позволило зафиксировать на каждые 100 клеток 1,8 гепов, 6,8 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагмента, 2,8 обменов; всего $11,6 \pm 1,4$ % поврежденных метафаз. При этом были установлены статистически достоверные отличия от данных, характеризующих эффект мутагена, свидетельствующие о редукции повреждающего эффекта последнего на 35%.

Использование для предобработки животных комбинации с ЖБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг также показало значимое влияние на генотоксичное действие циклофосфамида. Уровень аберрантных клеток составил $10,2 \pm 1,4$ %, что свидетельствует о снижении эффекта мутагена на 43%. На каждые 100 клеток приходилось 6,0 одиночных фрагмента, 0,2 парных фрагмента, 1,6 обменов.

Использование для предобработки животных комбинации из препаратов ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг не привело к статистически значимому снижению уровня циклофосфамид-индуцируемых аберрантных клеток. Он составил $12,75 \pm 1,6$ %. На каждые 100 клеток приходилось: 2,0 гепов, 6,75 одиночных фрагментов, 1,75 парных фрагментов, 2,25 обменов; по данным позитивного контроля в этой серии экспериментов указанный мутаген индуцировал $15,2 \pm 1,6$ % клеток с аномалиями (2,2 гепов, 7,4 одиночных и 1,8 парных фрагментов, 3,0 обменов, 0,8 метафазы с множественными повреждениями хромосом, на каждые 100 клеток).

На фоне пятидневной обработки животных комбинациями из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг циклофосфан индуцировал 2,4

гепов, 6,75 одиночных фрагментов, 1,75 парных фрагментов и 1,0 обменов на каждые 100 исследованных клеток. Общее количество аномальных клеток составило $10,8 \pm 1,4$ %. Сравнение этого результата с данными позитивного контроля не выявило между ними статистически достоверных различий.

Предобработка животных комбинацией из ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг привела к снижению уровня повреждаемых циклофосфаном клеток до $7,4 \pm 1,2$ % ($P < 0,05$). На каждые 100 клеток зарегистрировано 0,8 гепа, 4,0 одиночных фрагментов, 1,2 парных фрагмента, 1,4 обменов.

Таким образом, только комбинации из бета-каротина в жирорастворимой форме в максимальной дозе 15 мг/кг с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и в дозе 4 мг/кг продемонстрировали способность снижать цитогенетический эффект циклофосамида в условиях предобработки.

В таблице 10 представлены результаты, полученные при испытании влияния 5-ти дневной предобработки животных комбинациями из аспартама и ЖБК на кластогенную активность диоксидина в дозе 100 мг/кг.

Диоксидин (100 мг/кг) при однократном воздействии индуцировал хромосомные повреждения у $8,0 \pm 1,2$ % исследованных клеток. Спектр хромосомных повреждений был представлен: гепами -1,6, одиночными фрагментами -4,6, парными фрагментами - 0,8, обменами -0,8, метафазами с множественными повреждениями - 0,2 на каждые 100 клеток.

Использование для предобработки животных комбинации из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг привело к статистически значимому уменьшению уровня диоксидин-индуцируемых аберрантных клеток. Он составил $4,5 \pm 1,0$ %. На каждые 100 клеток приходилось: 0,5 гепа, 4,6 одиночных фрагментов, 0,8 парных фрагмента, 0,8 обмена, 0,2 метафазы с множественными повреждениями.

На фоне пятидневного введения комбинации из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг выявлено достоверное ($P < 0,05$) снижение уровня повреждаемых диоксидином клеток до $4,6 \pm 0,9$ %. Качественный анализ поврежденных метафаз не выявил различий с предыдущей серией эксперимента и позволил обнаружить на каждые 100 клеток 2,2 одиночных фрагментов, 0,8 парных фрагмента и 1,4 обменов.

Предобработка животных комбинацией ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг привела к снижению уровня повреждаемых диоксидином клеток до $3,2 \pm 0,8$ % ($P < 0,01$). На каждые 100 клеток зарегистрировано 0,2 гема, 2,0 одиночных фрагментов, 0,4 парных, 0,6 обменов.

При исследовании влияния пятидневной предобработки комбинациями из ЖБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на цитогенетические эффекты диоксидина в дозе 100 мг/кг, отдельно взятый мутаген индуцировал $6,8 \pm 1,0$ % абберрантных клеток. При этом на каждые 100 клеток было зарегистрировано : 6,2 одиночных фрагментов, 0,2 парных, 0,4 обмена и 0,4 клетки с множественными повреждениями хромосом.

Использование для предобработки животных комбинации из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг не привело к статистически значимому снижению уровня абберрантных клеток, индуцируемых диоксидином. Выявленный результат $3,8 \pm 0,8$ % поврежденных клеток значимо не отличался от данных позитивного контроля. На каждые 100 клеток приходилось 0,25 гема, 2,5 одиночных фрагментов, 0,4 обмена, 0,2 клетки с множественными повреждениями хромосом.

На фоне пятидневной предобработки животных комбинацией из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг выявлено достоверное ($P < 0,05$) снижение уровня повреждаемых диоксидином клеток до $3,0 \pm 0,8$ %. Качественный анализ поврежденных метафаз позволил обнаружить на каждые 100 клеток 2,6 одиночных фрагментов, 0,2 обмена и 0,4 метафазы с множественным повреждением хромосом.

Предобработка животных комбинацией с ЖБК в дозе 15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг привела к снижению уровня повреждаемых диоксидином клеток до $2,4 \pm 0,7$ % ($P < 0,05$). Спектр хромосомных повреждений включал : 2,2 одиночных фрагмента и 0,2 метафазы с множественными повреждениями хромосом на каждые 100 исследуемых клеток.

Таким образом, комбинации бета-каротина в жирорастворимой форме с аспартамом при пятидневной обработке животных практически во всех используемых дозах значительно снижает повреждающее действие диоксида в дозе 100 мг/кг, только комбинация с ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг не влияет на эффект этого мутагена.

В таблице 11 приведены данные, характеризующие влияние комбинаций из ЖБК и аспартама на цитогенетические эффекты диоксида в дозе 300 мг/кг в условиях предобработки ими животных.

Однократное воздействие диоксидином в дозе 300 мг/кг индуцировало хромосомные повреждения у $19,0 \pm 1,8$ % клеток. При этом на каждые 100 клеток были зарегистрировано : гепа 0,8, одиночных фрагментов 6,0, парных фрагментов 2,2, обменов 2,6, клеток с множественными повреждениями хромосом 7,4.

На фоне пятидневной обработки животных комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг уровень поврежденных диоксидином метафаз составил $15,8 \pm 1,6$ %. Было выявлено на каждые 100 клеток 1,0 гепов, 3,2 одиночных и 2,0 парных фрагментов, 2,8 обменов и 6,8 метафаз с множественными повреждениями. Сравнение установленного результата с данными позитивного контроля не выявило статистически значимое снижение кластогенного действия диоксида.

Определение количества хромосомных повреждений после введения диоксида на фоне предобработки животных комбинацией из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволило наблюдать $14,2 \pm 1,6$ % поврежденных метафаз. Спектр хромосомных повреждений был следующим 0,2 гепа, 4,8 одиночных и 1,6 парных фрагментов, 1,8 обменов, 5,8 клеток с

множественными повреждениями на каждые 100 исследуемых клеток. Статистическая обработка показала достоверное снижение мутагенного эффекта диоксидина.

Анализ цитогенетических повреждений, проведенный на мышах, получавших диоксидин после пятидневного введения комбинации из ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг выявил $11,5 \pm 1,4$ % диоксидин-индуцированных клеток: 0,25 гема, 2,5 одиночных и 2,0 парных фрагментов, 1,5 обменов и 4,5 метафаз с множественными повреждениями хромосом на 100 клеток, что значительно ниже аналогичных данных в позитивном контроле и свидетельствует об уменьшении кластогенного действия мутагена.

Данные о влиянии предобработки комбинациями препаратов ЖБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на мутагенные эффекты диоксидина также представлены в таблице 11.

В результате анализа 500 метафаз, полученных после однократной инъекции диоксидина в дозе 300 мг/кг было обнаружено 0,4 гема, 4,4 одиночных фрагментов, 0,4 обмена, 12,0 метафаз с множественными повреждениями хромосом на каждые 100 клеток. Всего $17,2 \pm 1,6$ % поврежденных метафаз.

У животных, обработанных мутагеном после пятидневного введения комбинации с ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг, было выявлено на каждые 100 клеток 5,6 одиночных фрагментов, 0,2 парных фрагмента, 0,6 обмена, 9,2 метафаз с множественными повреждениями хромосом. Общее количество поврежденных метафаз составило $15,6 \pm 1,6$ %, что достоверно не отличается от данных позитивного контроля.

Использование диоксидина на фоне пятидневного введения комбинации ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг привело к статистически значимому снижению количества клеток, повреждаемых мутагеном до $10,0 \pm 1,4$ % ($P < 0,01$). В спектре хромосомных повреждений на каждые 100 клеток было обнаружено 4,2 одиночных фрагмента и 5,8 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

Такой же результат, свидетельствующий о значимом ($P < 0,001$) снижении цитогенетического эффекта диоксида, был установлен после его применения у животных предобработанных комбинацией из ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг. В этом случае общее количество поврежденных клеток составило $7,8 \pm 1,2\%$. При этом значительно уменьшилось количество клеток с множественными повреждениями хромосом до 3,8 (в контроле – 12,0%), одиночных фрагментов было зафиксировано 3,8, гема 0,2 на каждые 100 исследованных клеток..

Таким образом, комбинации бета-каротина в жирорастворимой форме в дозе 1,5 и 15 мг/кг в сочетании с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и в дозе 4 мг/кг при пятидневной обработке животных значимо снижает повреждающее действие диоксида. При использовании ЖБК в дозе 0,15 мг/кг исследуемая комбинация не влияет на эффект применяемого мутагена.

3.2.2. Комбинации аспартама и водорастворимого бета-каротина

Результаты исследования влияния пятидневной предобработки комбинациями из аспартама с бета-каротином в водорастворимой форме (ВБК) на цитогенетические эффекты циклофосфана представлены в таблице 12.

При исследовании 400 метафаз после однократного введения циклофосфана в дозе 20 мг/кг на срок 24 часа было обнаружено на 100 клеток: 0,25 гема, 9,5 одиночных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 2,0 обменов, всего - $12,75 \pm 1,7\%$ аномальных метафаз.

Анализ цитогенетических повреждений, проведенный на мышах, получавших циклофосфан после 5-ти дневного введения комбинации из ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг выявил при пересчете на 100 клеток: 6,8 одиночных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 1,6 обменов, всего зарегистрировано $8,4\% \pm 1,2\%$ поврежденных клеток. Сравнение этого результата с данными позитивного контроля выявило между ними

статистически достоверные различия ($P < 0,05$), свидетельствующие о снижении мутагенного действия циклофосфана.

Определение количества хромосомных повреждений после введения циклофосфана на фоне предобработки животных комбинацией ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволило наблюдать $6,6 \pm 1,1$ % поврежденных метафаз. Спектр хромосомных повреждений включал: 3,6 одиночных фрагментов, 1,8 парных фрагментов, 1,4 обменов на каждые 100 клеток. Сравнение полученного результата с данными позитивного контроля показало статистически достоверное ($P < 0,05$) уменьшение количества метафаз, повреждаемых используемым мутагеном. Такой же результат был зарегистрирован при пятидневной предобработке животных комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг. Общее количество поврежденных метафаз составило $6,4 \pm 1,1$ % (на каждые 100 клеток: 5,6 одиночных фрагментов, 0,2 парных фрагмента, 2,2 обменов).

Результаты, полученные при испытании влияния комбинаций ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на кластогенную активность циклофосфана, позволили установить, что циклофосфан при однократном воздействии индуцировал хромосомные повреждения у $12,2 \pm 1,5$ % исследованных клеток. Спектр хромосомных повреждений был представлен : гепами 1,4, одиночными фрагментами 7,2, парными фрагментами 1,0, обменами 1,6, на каждые 100 клеток.

Использование для предобработки животных комбинации ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг привело к статистически значимому снижению уровня индуцированных циклофосфаном аберрантных клеток. Он составил $6,25 \pm 1,2$ %. На каждые 100 клеток приходилось : 0,75 гепа, 3,75 одиночных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 1,6 обменов.

На фоне пятидневного введения комбинации ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг выявлено статистически достоверное ($P < 0,05$) снижение уровня повреждаемых циклофосфаном клеток до $6,5 \pm 1,2$ %. Качественный анализ поврежденных метафаз позволил обнаружить на каждые 100 клеток 0,5 гема, 4,5 одиночных и 1,0 парных фрагментов, 0,5 обмена.

Определение количества хромосомных повреждений после введения циклофосфана на фоне предобработки животных комбинацией из ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг позволило наблюдать $6,6 \pm 1,1$ % поврежденных метафаз. Спектр хромосомных повреждений включал : 1,2 гемов, 3,4 одиночных фрагментов, 1,2 парных фрагментов, 1,0 обменов на каждые 100 клеток. Сравнение полученного результата с данными позитивного контроля показало статистически достоверное ($P < 0,05$) уменьшение количества повреждаемых используемым мутагеном метафаз и, следовательно, снижение его кластогенного эффекта.

Таким образом, пятидневная обработка экспериментальных животных комбинациями из водорастворимого бета-каротина и аспартама во всем диапазоне используемых дозировок способствует снижению уровня клеток, повреждаемых циклофосфаном.

Результаты исследования влияния пятидневной обработки животных комбинациями из водорастворимого бета-каротина с аспартамом на цитогенетические эффекты диоксида в дозе 100 мг/кг приведены в таблице 13.

Цитогенетическое исследование влияния диоксида на уровень поврежденных клеток костного мозга мышей линии С57В1/6 показало, что отдельно взятый мутаген в дозе 100 мг/кг индуцировал хромосомные повреждения у $6,8 \pm 1,1$ % клеток. При этом качественный состав хромосомных повреждений был следующий: 1,2 гемов, 4,8 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагмента, 1,0 обменов на каждые 100 исследованных клеток.

Предобработка животных комбинацией с ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг не оказывала значимого влияния на проявление мутагенного эффекта диоксидина. Зарегистрированный результат – $6,0 \pm 1,1$ % поврежденных клеток - не отличался от аналогичного показателя, характеризующего эффект отдельно взятого мутагена. Спектр хромосомных повреждений на каждые 100 клеток также был сходен с таковым в позитивном контроле: гепов 1,2, одиночных фрагментов 3,75, парных фрагмента 0,75, обменов 0,5, метафаз с множественными повреждениями выявлено не было.

На фоне предобработки животных комбинациями из ВБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг уровень поврежденных диоксидином метафаз составил $5,2 \pm 1,0$ %. Было выявлено на каждые 100 клеток 3,8 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагмента, 1,2 гепов. Установленные результаты также не выявили статистически значимого снижения уровня клеток, повреждаемых диоксидином.

Результат, свидетельствующий о значимом ($P < 0,05$) уменьшении цитогенетического эффекта диоксидина, был установлен после его применения у животных предобработанных комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг. В этом случае общее количество поврежденных клеток составило $3,8 \pm 0,8$ % (на каждые 100 клеток приходилось 1,2 гепов, 3,4 одиночных и 0,2 % парных фрагментов).

Результаты экспериментов, направленных на исследование влияния предобработки комбинациями из ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на кластогенные эффекты диоксидина в дозе 100 мг/кг, показали что 500 метафаз, полученных после однократной инъекции диоксидина в дозе 100 мг/кг содержат всего поврежденных клеток $6,0 \pm 1,1$ %. Причем на каждые 100 клеток было обнаружено 0,2 гепа, 2,6 одиночных и 1,0 парных фрагментов.

Введение экспериментальным животным в течение 5 дней комбинации с ВБК в минимальной (0,15 мг/кг) и промежуточной (1,5 мг/кг) дозах с

аспартамом в дозе 4 мг/кг не выявило статистически достоверного снижения уровня диоксидин – индуцируемых клеток. В первом случае было зарегистрировано $4,8 \pm 0,9$ % поврежденных метафаз. Во втором – $3,75 \pm 0,9$ %.

У животных, предобработанных комбинацией с ВБК в максимальной дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг, диоксидин вызвал повреждение у $3,25 \pm 0,8$ % исследованных клеток. Качественный состав метафаз на каждые 100 исследуемых клеток был следующий: гепов 0,5, одиночных фрагментов 2,5, парных фрагментов 0,25. Этот результат статистически достоверно ($P < 0,05$) отличался от данных позитивного контроля, что позволяет сделать вывод о снижении мутагенного эффекта диоксида.

Таким образом, в условиях предобработки животных комбинациями с водорастворимой формой бета-каротина в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозах 0,4 и 4 мг/кг значительно снижает цитогенетические эффекты диоксида в дозе 100 мг/кг и не влияет на них при использовании ВБК в минимальной и промежуточной дозах.

Данные о влиянии предобработки комбинациями из водорастворимого бета-каротина и аспартама на мутагенные эффекты диоксида в дозе 300 мг/кг представлены в таблице 14.

В результате анализа 450 метафаз, полученных после однократной инъекции диоксида в дозе 300 мг/кг было обнаружено 1,1 гепов, 11,3 одиночных и 0,4 парных фрагмента, 1,6 обменов, 6,2 метафаз с множественными повреждениями хромосом на каждые 100 клеток. Всего - $15,55 \pm 1,7$ % поврежденных метафаз.

У животных, обработанных мутагеном после пятидневного введения комбинации из ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг было выявлено на каждые 100 клеток 7,0 одиночных фрагментов, 0,75 парных фрагментов, 1,25 обменов и 5,25 метафаз с множественными повреждениями. Общее количество поврежденных метафаз составило $11,75 \pm 1,5$ %, что достоверно не отличается от результата позитивного контроля.

Использование диоксидина на фоне пятидневного введения комбинации с ВБК в дозе 1,5 мг/кг привело к статистически значимому снижению количества клеток, повреждаемых мутагеном до $9,8 \pm 1,4$ % ($P < 0,05$). В спектре хромосомных повреждений было обнаружено 8,2 клеток с одиночными и 0,6 парными фрагментами, 0,2 клеток с обментами и 3,2 клеток с множественными повреждениями.

У животных, предобработанных комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг, диоксидин вызвал повреждение у $8,0 \pm 1,3$ % исследованных клеток, что, при сравнении с данными позитивного контроля, свидетельствует о снижении цитогенетического действия мутагена. Качественный состав поврежденных метафаз : 1,4 гепов, 5,0 одиночных 1,0 парных фрагментов, 0,8 обмена, 2,8 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 клеток.

Таблица 14 также содержит результаты аналогичных экспериментов, направленных на изучение комбинаций с водорастворимым бета-каротином и аспартамом в дозе 4 мг/кг.

Диоксидин при однократном воздействии индуцировал хромосомные повреждения у $18,0 \pm 1,7$ % исследованных клеток. Спектр хромосомных повреждений был представлен : гепами 0,75, одиночными фрагментами 10,75, парными фрагментами 0,75, обментами 1,75, метафазами с множественными повреждениями хромосом 10,0 на каждые 100 клеток.

Использование для предобработки животных комбинации ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг не привело к статистически значимому снижению уровня индуцированных диоксидином аберрантных клеток. Анализируемые показатели по качественному и количественному составу не отличались от контрольных, уровень повреждений составил $15,0 \pm 1,6$ %. На каждые 100 клеток приходилось : 0,2 гепы, 10,6 одиночных и 1,2 парных фрагментов, 1,8 обменов, 7,2 метафаз с множественными повреждениями.

Использование для предобработки комбинаций с ВБК в более высоких дозах 1,5 и 15 мг/кг, позволило зарегистрировать статистически значимое снижение уровня индуцируемых диоксидином клеток. В результате анализа

400 метафаз, полученных после однократной инъекции диоксидина в дозе 300 мг/кг было обнаружено (соответственно дозам ВБК) 3,0 и 2,8 гепов, 8,75 и 8,0 одиночных фрагментов, 0,75 и 1,0 парных фрагментов, 3,0 и 2,4 метафаз с множественными повреждениями хромосом. Общее количество поврежденных метафаз составило $11,0 \pm 1,6$ % и $8,4 \pm 1,2$ %.

Таким образом, при предварительном пятидневном введении комбинаций из водорастворимого бета-каротина в дозах 1,5-15 мг/кг с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и в дозе 4 мг/кг значительно снижают мутагенный эффект диоксидина в дозе 300 мг/кг. Комбинации аспартама с ВБК в минимальной дозе 0,15 мг/кг не эффективны по отношению к эффектам мутагенов.

Совокупность данных, полученных при изучении цитогенетических эффектов циклофосфида и диоксидина, у животных, предварительно получавших комбинации из каротиноидов и аспартама в течение 5 дней, позволяет отметить следующие экспериментальные факты.

1. Предобработка животных комбинациями препаратов из жирорастворимого бета-каротина в дозе 15 мг/кг (но не в дозах 0,15-1,5 мг/кг) с аспартамом в дозах 0,4 мг/кг и 4 мг/кг приводит к ослаблению эффектов циклофосфида.

2. Комбинации препаратов из жирорастворимого бета-каротина в дозах 0,15-15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг после предварительного пятидневного введения уменьшают кластогенный эффект диоксидина в дозе 100 мг/кг. Также действуют комбинации из ЖБК в дозах 1,5-15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг. При использовании в данной комбинации ЖБК в минимальной дозе 0,15 мг/кг препарат не активен.

3. Предобработка животных комбинациями из препаратов жирорастворимого бета-каротина в дозах 1,5-15 мг/кг с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и 4 мг/кг значительно влияет на уровень клеток с хромосомными повреждениями, при использовании в качестве

мутагена диоксида в дозе 300 мг/кг. Но при использовании в комбинациях ЖБК в дозе 0,15 мг/кг они не снижают цитогенетический эффект этого мутагена.

4. Комбинации препаратов водорастворимого бета-каротина в дозах 0,15-15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг после предварительного пятидневного введения уменьшают кластогенный эффект циклофосфана. Также эффективны комбинации из препаратов ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг.

5. Предобработка животных комбинациями с ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг и 4 мг/кг приводит к ослаблению эффекта диоксида в дозе 100 мг/кг, но не эффективна при использовании в комбинациях ВБК в меньших (0,15-15 мг/кг) дозах.

6. Комбинация препарата водорастворимого бета-каротина в дозе 0,15 мг/кг в сочетании с аспартамом в дозах 0,4 и 4 мг/кг не оказывает значимого влияния на кластогенные эффекты диоксида в дозе 300 мг/кг. Увеличение дозы ВБК в комбинациях с аспартамом до 1,5-15 мг/кг делает их активными по отношению к используемому мутагену, снижая его цитогенетический эффект.

3.3. Исследование влияния комбинаций из аспартама и бета-каротина на кластогенные эффекты мутагенов при совместном многодневном введении.

В этой серии экспериментов комбинации каротиноидов и аспартама вводили совместно с мутагенами в течение 5 дней. Забой животных осуществляли через 6 часов после последнего введения. В качестве позитивного контроля использовалась группа животных, которой вводился только мутаген в течение 5 дней в той же, что и в опыте дозе.

3.3.1. Комбинации аспартама с жирорастворимым бета-каротином

Результаты, полученные при цитогенетическом обследовании животных, получавших циклофосфамид отдельно или совместно с комбинацией ЖБК и аспартама в течение 5 дней, представлены в таблице 15.

В контрольной группе, где животные обрабатывались только циклофосфамидом, мутаген в условиях пятидневного введения индуцировал хромосомные аномалии у $19,2 \pm 1,8$ % клеток костного мозга мышей. При этом было зарегистрировано 0,2 гема, 15,8 одиночных фрагментов, 0,8 парных фрагментов, 1,4 обменов и 4,2 клеток с множественными повреждениями на каждые 100 исследованных метафаз.

После совместного введения циклофосфамида с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг в сочетании с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг в течении 5-ти дней уровень абберантных клеток снизился до $16,2 \pm 1,6$ %, однако, достоверных различий с данными позитивного контроля установлено не было. Спектр хромосомных повреждений на каждые 100 исследованных клеток был следующий: 0,2 гема, 14,6 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагмента, 1,2 обменов, 2,0 метафаз с множественными повреждениями.

В следующей серии эксперимента циклофосфамид вводили совместно с комбинацией ЖБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг. Анализ 500 метафазных пластинок позволил выявить повреждения у $13,6 \pm 1,5$ % клеток. При этом в спектре хромосомных повреждений преобладали одиночные фрагменты – 12,8 на каждые 100 исследованных метафаз, кроме этого было зарегистрировано 0,2 гема, 0,6 парных фрагмента и 1,8 метафазы с множественными повреждениями. При статистической обработке были выявлены достоверные различия между установленными экспериментальными данными и значениями позитивного контроля с уровнем значимости $P < 0,05$, свидетельствующем о снижении эффекта мутагена.

Анализ 500 метафазных пластинок, полученных от животных после пятидневного введения циклофосамида с комбинацией ЖБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволил выявить $12,4 \pm 1,5$ % аномальных метафаз. При этом на каждые 100 исследованных клеток наблюдалось 0,2 гема, 10,6 одиночных фрагментов, 0,4 парных фрагмента, 1,0 обменов и 0,8 метафазы с множественными повреждениями. Сравнение полученного результата с данными позитивного контроля выявило между ними статистически достоверные различия ($P < 0,05$), что позволяет сделать вывод об антимуtagenной эффективности исследуемой комбинации по отношению к цитогенетическим эффектам мутагена.

Увеличение дозы аспартама до 4 мг/кг в комбинациях с ЖБК не привело к изменению действия комбинации на мутагенные эффекты циклофосамида в условиях подострого эксперимента. Отдельно взятый мутаген, вводимый экспериментальным животным в течение 5 дней индуцировал $18,2 \pm 1,7$ % аномальных клеток (2,8 гемов, 8,4 одиночных и 1,4 парных фрагментов, 4,0 обменов, 2,6 метафаз с множественными повреждениями хромосом на каждые 100 клеток).

Анализ 500 метафазных пластинок, полученных от животных после пятидневного совместного введения циклофосфана с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг позволил выявить $14,8 \pm 1,6$ % аномальных метафаз. При этом на каждые 100 клеток приходилось 3,4% гемов, 6,6 одиночных фрагментов, 0,8 парных, 3,3 % обменов, 0,6% метафаз с множественными повреждениями хромосом. Эти значения статистически достоверно не отличались от данных позитивного контроля.

В следующих 2-ух сериях экспериментов циклофосфан вводили совместно с комбинациями из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг и 15 мг/кг в сочетании с аспартамом в дозе 4 мг/кг. Анализ 400 и 500 (соответственно дозам ЖБК) метафазных пластинок позволил выявить повреждения у $12,8 \pm 1,7$ % клеток в первом случае и у $10,8 \pm 1,4$ % клеток во втором. Спектр хромосомных повреждений, в зависимости от дозы ЖБК, практически не различался и составил на 100 исследованных клеток: гемов в обоих случаях 2,0,

одиочных фрагментов 7,0 и 6,4, парных фрагментов 2,0 и 1,4, обменов 1,8 и 1,0, метафаз с множественными повреждениями хромосом в первом случае – 0,5, во втором зарегистрировано не было. Статистически достоверное снижение уровня индуцированных циклофосфаном аберрантных клеток в этих экспериментах свидетельствует о значимом снижении эффектов данного мутагена.

Таким образом, результаты, зарегистрированные после совместного пятидневного введения циклофосфамида и комбинаций с жирорастворимым бета-каротином в дозе 1,5 мг/кг и 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 или 4 мг/кг, позволяют сделать вывод об антимуtagenной эффективности исследованных комбинаций по отношению к эффектам циклофосфамида.

Данные полученные при анализе клеток костного мозга животных, получавших диоксидин (100 мг/кг) отдельно и совместно с комбинациями из ЖБК в дозах 0,15, 1,5 и 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг или с комбинациями из аспартама в дозе 4 мг/кг в сочетании с вышеуказанными дозами ЖБК, представлены в таблице 16.

В первой серии экспериментов для исследования комбинаций с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг, диоксидин при 5-ти дневном введении вызывал хромосомные повреждения у $11,4 \pm 1,4$ % исследованных клеток. В спектре хромосомных повреждений преобладали метафазы с одиочными фрагментами - 7,0 на каждые 100 клеток, обнаружены также парные фрагменты – 1,4 и незначительное количество обменов - 0,2 и гепов 1,6 на каждые 100 клеток.

После совместного введения диоксидина с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг было обнаружено $8,0 \pm 1,2$ % поврежденных клеток. Качественный состав метафазного материала был следующим: 1,4 гепов, 4,8 одиочных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 0,6 обмена на каждые 100 клеток. Сравнение полученного результата с данными позитивного контроля не выявило между ними статистически достоверных различий.

Анализ 500 метафазных пластинок, полученных от животных, обработанных диоксидином и комбинацией ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволил выявить $6.6 \pm 1,1$ % aberrантных клеток. Хромосомные повреждения были представлены одиночными фрагментами 4,8, парными фрагментами 1,0, обменом 0,6, на каждые 100 клеток. Статистический анализ полученных результатов с данными позитивного контроля выявил значимое уменьшение эффектов диоксицина.

Аналогичным было действие комбинации аспартама с ЖБК в максимальной дозе 15 мг/кг при ее совместном пятидневном применении с диоксидином. Общее количество клеток, индуцируемых мутагеном снизилось до $5,25 \pm 1,1\%$. При этом на каждые 100 клеток было зарегистрировано 0,25 гема, 3,75 одиночных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 0,25 обменов.

Во второй серии экспериментов для исследования комбинаций препаратов ЖБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг при их совместном 5-ти дневном применении с диоксидином в дозе 100 мг/кг, отдельно вводимый мутаген индуцировал $9,2 \pm 1,3$ % клеток с аномалиями. В спектре хромосомных повреждений преобладали клетки с одиночными фрагментами повреждений хромосом – 8,2 на каждые 100 клеток, кроме этого было выявлено 0,8 гема, по 0,2 парных фрагмента и обмена, 0,6 метафазы с множественными повреждениями хромосом.

Совместное применение мутагена с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартамом в дозе 4 мг/кг в течение 5-ти дней не привело к снижению кластогенного эффекта диоксицина. Общее количество поврежденных клеток практически не отличалось от данных позитивного контроля и составило $9,0 \pm 1,3$ % (0,6 гема, 8,4 одиночных и 0,2 парных фрагментов, 0,6 метафазы с множественными повреждениями хромосом каждые 100 клеток).

Влияние комбинации с каротиноидом и аспартамом в дозе 4 мг/кг на цитогенетические эффекты диоксицина при их совместном пятидневном

введении оказалось достоверным ($P < 0,05$) лишь в случае использования ЖБК в дозах 1,5 и 15 мг/кг. При этом уровень аберрантных клеток практически не различался и составил (соответственно дозам ЖБК) $7,6 \pm 1,2$ % и $7,0 \pm 1,2$ %. При этом было в первом случае зафиксировано 0,2 гема, 7,2 одиночных фрагментов и 0,2 метафазы с множественными повреждениями, во втором – 6,8 одиночных фрагментов, 0,2 парных фрагмента, 0,2 обмена и 0,2 метафазы с множественными повреждениями на каждые 100 клеток.

В таблице 17 представлены данные полученные при анализе клеток костного мозга животных, получавших диоксидин (300 мг/кг) отдельно и совместно с комбинациями из ЖБК в дозах 0,15, 1,5 и 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг или с комбинациями из аспартама в дозе 4 мг/кг в сочетании с вышеуказанными дозами ЖБК.

При исследовании 400 метафаз после пятидневного введения диоксида в дозе 300 мг/кг было обнаружено по 1,75 гемов и парных фрагментов, 10,0 одиночных фрагментов, 2,5 обменов, 14,5 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 исследованных клеток, всего – $30, \pm 2,3$ % аномальных клеток.

Анализ метафазного материала животных, получавших диоксидин совместно с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 и аспартама в дозе 0,4 мг/кг мг/кг в течение 5 дней, позволил выявить $29,3 \pm 2,3$ % поврежденных клеток. На каждые 100 исследованных метафаз приходилось 1,25 гемов, 10,25 одиночных фрагментов, 1,5 парных фрагментов, 14,25 метафаз с множественными повреждениями. Сравнение этого результата с данными позитивного контроля не выявило между ними статистически достоверных различий.

В результате совместной обработки животных диоксином и комбинацией из ЖБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг уровень поврежденных мутагеном метафазных пластинок составил $25,8 \pm 1,9$ %. В спектре обнаруженных хромосомных аномалий были выявлены одиночные фрагменты – 7,6, парные фрагменты - 0,5, обмены - 0,75 и метафазы с множественными повреждениями – 14,2 на каждые 100 клеток. Этот

результат также статистически не отличался от данных позитивного контроля.

Только при использовании совместно с диоксидином в течение 5-ти дней комбинации из ЖБК в максимальной дозе с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг позволило зарегистрировать статистически достоверные результаты, свидетельствующие о снижении эффекта мутагена. Анализ 400 метафазных пластинок выявил при перерасчете на 100 исследованных метафаз 2,25 гепов, 7,5 одиночных фрагментов, 0,5 парных фрагмента, 0,75 обмена, 9,75 хромосом с множественными повреждениями метафаз. Всего $20,25 \pm 2,0$ % поврежденных клеток.

Повышение дозы аспартама до 4 мг/кг в комбинациях с ЖБК привело к значимому снижению уровня индуцируемых диоксидином клеток во всем диапазоне доз каротиноида.

Отдельно мутаген в данной серии экспериментов индуцировал хромосомные аномалии у $34,8 \pm 2,1$ % клеток. При этом зафиксировано 8,6 одиночных фрагментов, 0,2 парных фрагмента, 0,4 обмена, 25,6 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 исследованных клеток.

Анализ 500 метафазных пластинок, полученных от животных после пятидневного введения диоксидаина совместно с комбинацией из ЖБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартамом. позволил выявить $27,6 \pm 2,2$ % аномальных метафаз. Спектр хромосомных повреждений при этом составил : 17,2 метафаз с одиночными фрагментами, 0,8 обменов, 9,6 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

Увеличение в комбинации с аспартамом дозы каротиноида до 1,5 и 15 мг/кг не повлияло на результаты эксперимента. Также наблюдалось статистически значимое ($P < 0,05$) снижение уровня индуцируемых диоксидином клеток.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует, что при совместном введении диоксидина с комбинацией из жирорастворимого бета-каротин в дозах 0,15, 1,5 и 15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг уровень цитогенетических повреждений статистически значимо ниже, чем результат, полученный после обработки животных только диоксидином. При использовании аспартама в меньшей дозе 0,4 мг/кг снижение эффектов мутагена происходит только при использовании в комбинации ЖБК в максимальной дозе 15 мг/кг.

3.3.2. Комбинации аспартама с водорастворимым бета-каротином

Результаты модифицирующего влияния комбинаций из ВБК и аспартама на мутагенные эффекты циклофосамида в условиях подострого эксперимента, представлены в таблице 18.

Эксперимент по определению цитогенетической активности циклофосамида в дозе 20 мг/кг выявил хромосомные aberrации у $10,8 \pm 1,4$ % исследованных клеток. При этом в спектре хромосомных повреждений было обнаружено 1,8 клеток с гепами, 5,4 клеток с одиночными фрагментами, 1,0 клеток с парными фрагментами, 1,4 клеток с обменов, 0,8 клеток с множественными повреждениями.

В клетках костного мозга животных, получавших циклофосамид совместно с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 0,4 мг/кг было зарегистрировано $8,6 \pm 1,3$ % поврежденных клеток. Качественный состав повреждений в метафазных пластинках был следующим: 1,8 гепов, 3,8 одиночных фрагментов, 1,2 парных фрагментов, 1,6 обменов, метафаз с множественными повреждениями выявлено не было на каждые 100 клеток.

Сравнение этого результата с данными позитивного контроля не выявило между ними статистически достоверных различий.

Увеличение в комбинации дозы ВБК до 1,5 мг/кг не привело к существенным изменениям в состоянии наблюдаемых параметров. Анализ 500 метафазных пластинок позволил выявить $8,0 \pm 1,2$ поврежденных клеток, что практически не отличалось от значений предыдущей серии эксперимента. Спектр хромосомных повреждений также был аналогичным: на каждые 100 клеток 2,0 гепов, 4,2 одиночных фрагмента, 1,0 парных фрагментов, 0,8 обмена.

Только совместное применение комбинации ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг привело к статистически значимому снижению уровня аберрантных клеток, индуцируемых циклофосфаном до $7,2 \pm 1,0$ % против $10,8 \pm 1,4$ % установленных в позитивном контроле, что свидетельствует о значимом уменьшении цитогенетического эффекта мутагена.

При исследовании комбинаций из ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг, вводимых совместно в течение 5 дней с циклофосфаном, отдельно взятый мутаген индуцировал $13,4 \pm 1,5$ % клеток с аномалиями. При этом на каждые 100 исследуемых клеток приходилось : 2,0 гепов, 7,0 клеток с одиночными и 1,6 парными фрагментами повреждений хромосом, 1,8 обменов, 0,8 метафазы с множественными повреждениями хромосом.

Применение совместно с циклофосфаном в течение 5 дней комбинации из ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг не привело к значимому ослаблению эффекта мутагена - общее количество индуцируемых им клеток составило $9,75 \pm 1,5$ мг/кг, что статистически не отличалось от данных позитивного контроля.

Уровень поврежденных клеток равный $7,4 \pm 1,2$ % был зарегистрирован у животных после пятидневного введения циклофосфамида совместно с комбинацией из ВБК в дозе 1,5 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг.

Хромосомные повреждения были представлены гемами - 0,8, одиночными фрагментами – 4,4, парными фрагментами – 1,0, с обменами 1,4 на каждые 100 клеток. Сравнение суммарного показателя с аналогичным значением позитивного контроля выявило между ними статистически достоверные ($P < 0,05$) различия, которые указывают на уменьшение мутагенного эффекта циклофосфана под действием исследуемых комбинаций препаратов.

В результате обработки животных циклофосфамидом и комбинацией с ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в течение 5 дней количество aberrантных метафаз составило $6,2 \pm 1,1$ %. На каждые 100 исследованных клеток было выявлено 0,8 клеток с гемами, 3,6 клеток с одиночными фрагментами, 0,6 клеток с парными фрагментами, 1,8 клеток с обменами. Статистический анализ также показал снижение кластогенного эффекта мутагена.

Таким образом, в случаях, предусматривающих введение циклофосфамида совместно с комбинациями из водорастворимого бета-каротина в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозах 0,4 и 4 мг/кг, уровень цитогенетических повреждений оказался ниже, чем в позитивном контроле. Использование комбинаций с ВБК в минимальной дозе не влияло на цитогенетический эффект мутагена.

Данные, полученные при цитогенетическом исследовании клеток животных, получавших диоксидин в дозе 100 мг/кг отдельно или совместно с комбинациями из ВБК и аспартама, приведены в таблице 19.

Диоксидин (100 мг/кг) в данной серии экспериментов индуцировал хромосомные аномалии у $10,2 \pm 1,4$ % клеток. При этом зафиксировано 2,6 гепов, 6,2 одиночных фрагментов, 0,6 парных фрагмента, 1,2 обменов, 0,2 метафазы с множественными повреждениями на каждые 100 исследованных клеток.

После совместного введения диоксидина с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг уровень хромосомных повреждений составил $8,8 \pm 1,2$ %. На каждые 100 исследованных клеток приходилось 6,4 одиночных фрагментов, по 0,2 парных фрагмента и обмена. Полученный результат значимо не отличался от результата, зарегистрированного в позитивном контроле.

Значение количества аномальных метафаз при введении в течение 5 дней диоксидина и комбинации ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг составило $6,6 \pm 1,1$ % (0,2 гема, 5,0 одиночных фрагментов, 0,2 обмена на каждые 100 клеток). Достоверных различий с данными позитивного контроля установлено не было.

При совместном пятидневном применении с диоксидином комбинации из ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг уровень аберрантных клеток составил $5,0 \pm 1,0$ %. В спектре хромосомных повреждений преобладали метафазы с одиночными фрагментами – 3,2 на каждые 100 клеток, генов обнаружено 1,6 %, обменов – 0,4 на каждые 100 клеток. Статистический анализ выявил достоверное снижение уровня диоксидин-индуцируемых клеток, что позволило сделать вывод об эффективности исследуемой комбинации препаратов по отношению к снижению мутагенного действия диоксидина.

При проведении серии экспериментов, направленных на изучение влияния пятидневного совместного с диоксидином введения комбинаций из препаратов ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг, отдельно инъектируемый животным мутаген индуцировал хромосомные повреждения у $9,25 \pm 1,4$ % исследуемых клеток. При этом было зафиксировано на каждые 100 клеток 2,25 генов, 5,75 одиночных фрагментов, 0,75 парных фрагмента, 1,5 обменов.

Введение диоксидина совместно с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг в течение 5 дней не оказывало какого-либо влияния на уровень повреждаемых мутагеном метафаз. Значение количества аберрантных клеток составило $6,6 \pm 1,1$ %. Спектр хромосомных повреждений

мало отличался от такового в позитивном контроле: 2,0 гепов, 3,75 одиночных фрагментов, 0,5 парных фрагмента, 0,75 обмена на каждые 100 клеток.

После пятидневного использования диоксидина и комбинации из ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 4 мг/кг количество поврежденных метафаз составило $6,0 \pm 1,1$ % (0,75 гепа, 3,75 одиночных фрагментов, 0,75 метафазы с обментами, 0,5 с парными фрагментами). Полученный результат статистически значимо не отличался от данных позитивного контроля.

Влияние комбинации из ВБК с аспартамом в дозе 4 мг/кг на цитогенетические эффекты диоксидина при их совместном пятидневном введении оказалось достоверным ($P < 0,05$), свидетельствующим о снижении мутагенного действия диоксидина, лишь в случае использования каротиноида в дозе 15 мг/кг. Уровень аберрантных клеток составил $5,0 \pm 1,1$ %. При этом было зафиксировано 0,75 гепа, 2,0 одиночных фрагментов, 0,75 обмена на каждые 100 клеток.

Таким образом, при совместном пятидневном введении комбинация из водорастворимого бета-каротина в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг снижает уровень повреждаемых диоксидином клеток на 49 %, в комбинации с аспартамом в дозе 4 мг/кг – на 54 %. При использовании в комбинациях с аспартамом ВБК в меньших дозах они не оказывают значимого влияния на кластогенные эффекты мутагена.

Данные о воздействии комбинаций из ВБК и аспартама на повреждающее действие диоксидина в дозе 300 мг/кг условиях подострого эксперимента представлены в таблице 20.

При исследовании 400 метафаз после пятидневного введения диоксидина в дозе 300 мг/кг было обнаружено 15,0 одиночных и 1,5 парных фрагментов, 1,25 обменов, 26,5 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 исследованных клеток, всего - $32,75 \pm 2,6$ % аномальных клеток.

Анализ метафазного материала животных, получавших диоксидин совместно с комбинацией ВБК в дозе 0,15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг в течение 5 дней, позволил выявить $29,8 \pm 2,5$ % поврежденных клеток.

На каждые 100 исследованных метафаз приходилось 1,75 гепов, 15,25 одиночных фрагментов, 1,0 парных фрагментов, 20,5 метафаз с множественными повреждениями. Сравнение этого результата с данными позитивного контроля не выявило между ними статистически достоверных различий.

При применении совместно с диоксидином комбинации ВБК в дозе 1,5 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг количество аберрантных клеток составило $27,25 \pm 2,4$ % (14,5 одиночных и 1,0 парных фрагментов, 1,5 обменов, 19,5 метафаз с множественными повреждениями на каждые 100 клеток), что также значимо не отличалось от результата позитивного контроля.

Использование в течение 5 дней диоксида с комбинацией ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом привело к статистически значимому ($P < 0,05$) снижению количества клеток, повреждаемых мутагеном до $26,5 \pm 2,3$ %. При этом на каждые 100 исследованных метафаз приходилось 0,75 гема, 13,5 одиночных и 0,5 парных фрагментов, 3,0 обменов, 13,4 клеток с множественными повреждениями. Эти результаты позволили сделать вывод о значимом снижении кластогенного эффекта диоксида при использовании комбинаций из бета-каротина и апартама.

Увеличение в исследуемых комбинациях дозы аспартама до 4 мг/кг позволило зарегистрировать следующие результаты. Отдельно вводимый животным в течении 5 дней мутаген индуцировал хромосомные повреждения у $32,25 \pm 2,6$ % клеток. В спектре хромосомных повреждений на каждые 100 клеток приходилось 0,75 гема, 15,25 одиночных фрагмента, по 1,5 парных фрагментов и обменов, 20,25 метафаз с множественными повреждениями хромосом.

Анализ метафазного материала, полученного от животных, получавших совместно с мутагеном в течении 5 дней комбинацию из ВБК в

дозе 0,15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг, позволил выявить $29,0 \pm 2,5$ % аберрантных клеток. Спектр хромосомных повреждений составил: гепов 1,5, одиночных фрагментов 21,75, парных фрагментов 1,5, обменов 1,75, метафаз с множественными повреждениями хромосом 17,0. Результат статистически не отличается от данных позитивного контроля и свидетельствует об отсутствии у исследуемой комбинации свойства, редуцирующего эффект мутагена.

Обратный результат наблюдается при использовании совместно с диоксидином комбинаций с препаратом ВБК в промежуточной 1,5 мг/кг и максимальной 15 мг/кг дозах. Количество аберрантных клеток снизилось до $25,5 \pm 2,2$ % в первом случае и до $25,25 \pm 2,2$ % во втором. Спектр хромосомных повреждений практически не различался и составил (соответственно дозам ВБК): гепов по 1,25, одиночных фрагментов 22,5 и 23,5, парных фрагментов 1,25 и 1,5, обменов 4,5 и 4,75, метафаз с множественными повреждениями хромосом 14,0 и 12,75. Статистический анализ результатов показал достоверное снижение цитогенетических эффектов диоксида.

Таким образом, комбинации из водорастворимого бета-каротина и аспартама в дозе 0,4 мг/кг в условиях подострого эксперимента значимо снижают цитогенетическую активность диоксида только в максимальной дозе каротиноида 15 мг/кг, в дозах 0,15-1,5 мг/кг не оказывают влияния на действие мутагена. Увеличение в комбинациях дозы аспартама до 4 мг/кг в сочетании с ВБК в дозе 0,15 мг/кг также не изменяет кластогенный эффект мутагена, но в сочетании с ВБК в дозах 1,5-15 мг/кг усиливает антимуtagenные свойства комбинаций, снижая цитогенетическую активность диоксида в дозе 300 мг/кг.

Совокупность выше указанных данных, полученных при изучении влияния комбинаций из каротиноидов и аспартама на проявление цитогенетических эффектов циклофосфамида и диоксида (в дозах 100 и 300 мг/кг) в условиях совместного пятидневного введения изучаемых соединений мышам C57Bl/6 позволяет сделать следующие заключения:

1. При совместном применении циклофосфамида с комбинациями из препаратов ЖБК в дозах 1,5 и 15 мг/кг с аспартамом как в дозе 0,4 мг/кг, так и в дозе 4 мг/кг наблюдается значимое уменьшение регистрируемого количества клеток с хромосомными повреждениями. Аналогичные явления наблюдаются при использовании в качестве мутагена диоксидина в дозе 100 мг/кг совместно с комбинацией из ЖБК в дозах 1,5 - 15 мг/кг и аспартама в обеих исследуемых дозах.
2. Результаты, характеризующие цитогенетический эффект диоксидина в дозе 300 мг/кг, при совместном введении с комбинацией из ЖБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг оказались значимо ниже значений, соответствующих позитивному контролю. Комбинации с меньшими дозами ЖБК оказались неактивными по отношению к снижению эффектов данного мутагена. В случае использования в исследуемых комбинациях аспартама в дозе 4 мг/кг, они проявили выраженный антимуtagenный эффект со всеми дозами ЖБК (0,15, 1,5, 15 мг/кг).
3. Цитогенетические эффекты циклофосфамида в сочетании с комбинациями из ВБК в дозе 15 мг/кг и аспартамом в дозе 0,4 мг/кг, регистрируемые по числу клеток с хромосомными повреждениями, были значимо ниже, чем показатели, соответствующие позитивному контролю. Однако такого результата не наблюдалось при использовании совместно с мутагеном комбинаций с меньшими дозами ВБК – 0,15 и 1,5 мг/кг. Увеличение дозы аспартама до 4 мг/кг расширило защитные возможности исследуемых комбинаций. В этом случае значимое снижение кластогенного действия циклофосфана наблюдалось при использовании ВБК не только в максимальной, но и промежуточной дозах 1,5 мг/кг.
4. При совместном применении диоксидина в дозе 100 мг/кг с комбинациями из ВБК и аспартама в дозе 0,4 мг/кг, снижение

кластогенного действия мутагена наблюдается только в случае использования ВБК в максимальной дозе 15 мг/кг. Увеличение дозы аспартама до 4 мг/кг не привело к изменению характера антикластогенного действия комбинаций.

5. Комбинация из ВБК в дозе 15 мг/кг с аспартамом в дозе 0,4 мг/кг после совместного применения с диоксидином в дозе 300 мг/кг снижает его мутагенную активность, но не проявляет подобных эффектов при использовании ВБК в меньших дозах. Протекторные свойства комбинации расширяются при увеличении дозы аспартама до 4 мг/кг. В этом случае цитогенетические эффекты диоксида уменьшаются при использовании его совместно с комбинациями, в которых доза каротиноида составляет 1,5 или 15 мг/кг.
6. Ни в одной серии эксперимента совместное введение диоксида и циклофосфида с изучаемыми комбинациями из каротиноидных соединений и аспартама не привело к увеличению цитогенетического эффекта мутагенов.

Таким образом, установлено, что изучаемые комбинации из каротиноидных препаратов и аспартама в условиях совместного пятидневного введения с мутагенами способны значительно уменьшать их повреждающее действие на генетические структуры клеток костного мозга мышей, то есть обладают антимуtagenными свойствами. Проявление антикластогенной активности комбинаций зависит от доз составляющих их компонентов, в которой они используются. Комуtagenной активности исследуемых комбинаций в диапазоне использованных доз не установлено.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день имеется значительное количество сведений о различных видах антимуутагенов с отличающимся механизмом защитного действия. Однако данных об эффектах совместного применения антимуутагенов практически нет. В этой связи становятся актуальными исследования комбинаций антимуутагенов с целью создания на их основе фармакологических и лечебно-профилактических средств защиты генетических структур человека.

Проведенное в данной работе исследование посвящено изучению влияния комбинаций аспартама и бета-каротина (жиро- и водорастворимых формах) на индуцированный мутагенез у мышей линии C57BL/6. Анализ и обсуждение всей совокупности полученных результатов составили содержание настоящего раздела диссертационной работы.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии антимуутагенных свойств у исследуемых комбинаций аспартама и каротиноидов и дают возможность обсудить следующие вопросы:

- Зависимость <доза-эффект> антимуутагенного действия комбинаций аспартама и каротиноидов;
- Влияние комбинаций аспартама и каротиноидов на кластогенные эффекты различных мутагенов и зависимость антимуутагенных эффектов комбинаций от режима их использования;
- Сравнительный анализ эффективности антимуутагенного действия комбинаций аспартама с бета-каротином в жирорасстворимой форме и аспартама с бета-каротином в водорастворимой форме;
- Антимуутагенная активность комбинаций в сравнении с отдельно взятыми каротиноидами и аспартамом;
- Перспективы применения исследуемых комбинаций аспартама и каротиноидных соединений для профилактики индуцированного мутагенеза.

Совокупный анализ части поставленных вопросов может быть проведен на основании сравнения данных таблицы №21, в которой

приведены обобщенные, преимущественно собственные, результаты, а также литературные данные, опубликованные в работах НИИ фармакологии РАМН НИЛ генетики мутагенеза, полученные при изучении влияния комбинаций аспартама и каротиноидов и их составляющих на кластогенные эффекты циклофосфамида и диоксидина.

В условиях острого эксперимента было установлено, что комбинации аспартама в дозе 0,4 мг/кг и жирорастворимого или водорастворимого бета-каротина снижают цитогенетический эффект циклофосфамида на 28-51 % и 38-64 %, соответственно. Наблюдаемый защитный эффект отчетливо зависит от дозы бета каротина и возрастает с ее увеличением. Обращает внимание, что ни аспартам, ни бета-каротин в обеих использованных формах, взятые в тех же дозах, в которых использовались в составе комбинации, по отдельности не влияют на проявление кластогенного эффекта циклофосфамида. Это создает впечатление, что сочетание двух не антимутагенных при данной схеме обработки компонентов рождает принципиальное новое антимутагенное свойство. Однако, это не так, на что указывает сравнительный анализ описанных результатов с данными, полученными при испытании комбинации жирорастворимого бета-каротина с аспартамом, применяемым из расчета 4 мг/кг. В этом случае, комбинации этих соединений при использовании бета-каротина в жирорастворимой форме вызывают 37 – 45 %, а при применении в водорастворимой форме 33-46 % редукцию кластогенного эффекта циклофосфамида. А отдельно взятый аспартам уменьшает эффект мутагена на 41 %.

Опираясь на последний результат и рассматривая в совокупности данные вышеописанных экспериментов можно прийти к заключению, что антимутагенного потенциала аспартама при его однократном применении в дозе 0,4 мг/кг недостаточно для модификации эффекта мутагена, тогда как введение в систему бета-каротина создает необходимые предпосылки для манифестации его антимутагенной активности в наименьшей из использованных доз. Важно, что данное наблюдение по существу является первым свидетельством, указывающим на возможность усиления антимутагенного эффекта одного соединения за счет его комбинирования с другим, не активным в избранных условиях эксперимента, веществом.

В следующей серии острого эксперимента в качестве мутагена был использован диоксидин в дозе 100 мг/кг. Эффект мутагена был снижен на 46 и 40 % под действием комбинации из аспартама (0,4 мг/кг) и, соответственно, жирорастворимого бета-каротина в дозе 15 мг. Обращает внимание, что в тех же условиях эксперимента отдельно взятый в той же дозе аспартам снижал цитогенетический эффект мутагена на 45 %.

Сходные по структуре данные были получены при использовании аспартама в дозе 4 мг/кг. Отдельно взятое соединение редуцировало эффект мутагена на 66 %, тогда как комбинации аспартама с жирорастворимым бета-каротином проявляли антимутагенную активность только при использовании последнего в дозах 1,5 и 15 мг/кг, соответственно, 54 и 57 % редукции мутагенного эффекта. В комбинации с водорастворимым бета-каротином только при его использовании дозе 15 мг/кг – 43 % снижение эффекта.

Обобщающий анализ экспериментов с диоксидином обращает внимание, что при сочетанном использовании аспартама и бета-каротина антимутагенный эффект приобретает избирательный характер и не проявляется у большей части исследованных комбинаций. Создается впечатление, что одновременное применение бета-каротина с аспартамом с пороговой дозовой зависимостью препятствует проявлению антимутагенности последнего. В то же время комбинация не приобретает

комутагенной активности, что практически важно, и при оптимальном подборе доз проявляет искомые антимуtagenные свойства. Последнее в полной мере подтверждается анализом данных, полученных при испытании исследованных комбинаций в острых экспериментах, предусматривающих применение диоксидина в дозе 300 мг/кг, в которых их антимуtagenные свойства были полностью подтверждены.

Важно отметить, что с момента начала систематических исследований по антимуtagenезу подавляющее большинство экспериментов было сделано в условиях однократного введения сочетаний мутагена и предполагаемого модификатора. Однако, последние 5-7 лет усилиями отдела фармакологической генетики (руководитель академик РАМН С.Б. Середенин) и входящей в его состав лаборатории фармакологии мутагенеза НИИ фармакологии РАМН было показано, что проявление эффектов отдельно взятых антимуtagenов может существенно зависеть от режима их применения относительно мутагена [3, 10, 25]. Каких-либо сведений об изучении в этом аспекте антимуtagenных комбинаций в предшествующих опубликованных работах не содержится, не смотря на то, что этот вопрос имеет очевидный теоретический и практический интерес. Данные, восполняющие этот пробел были получены в настоящей работе и проанализированы ниже, на примере экспериментов предусматривающих предварительное повторное введение антимуtagenных комбинаций перед введением мутагенов (предобработка) и повторное совместное введение антимуtagenных комбинаций с использованными мутагенами (совместное введение).

В условиях предобработки было установлено, что комбинации аспартама в дозе 0,4 мг/кг и жирорастворимого бета-каротина, применяемого из расчета 1,5 и 15 мг/кг редуцировали эффект циклофосфамида на 35 и 43%, соответственно. При использовании в составе комбинации водорастворимого бета-каротина антимуtagenный эффект был еще более выражен и наблюдался во всех вариантах эксперимента на уровне 34 – 50 % уменьшения цитогенетического эффекта мутагена. Также как в серии с

однократным введением, в условиях предобработки наблюдаемый защитный эффект отчетливо зависел от дозы бета каротина и возрастал с ее увеличением.

На фоне пятидневной предобработки животных аспартамом в дозе 4 мг/кг и жирорастворимого бета-каротина снижение цитогенетического эффекта циклофосамида было обнаружено только при использовании провитамина в максимальной из использованных доз 15 мг/кг. При использовании в составе комбинации водорастворимого бета-каротина были выявлены более выраженные эффекты. В этом случае, все варианты комбинации сходным образом на 46-49 % уменьшали проявление цитогенетического эффекта мутагена. При более детальном анализе становится очевидным, что оптимум дозировок исследованных форм бета-каротина в составе использованных комбинаций не зависит от дозы аспартама и лежит в области 1,5 – 15 мг/кг. Существенно, что комбинации аспартама с бета-каротином в дозе 0,15 мг/кг не влияют на цитогенетический эффект мутагена.

В аналогичных по способу выполнения экспериментах с диоксидином в дозе 100 мг/кг было установлено, что эффект мутагена на фоне предобработки животных комбинациями аспартама (0,4 мг/кг) и жирорастворимого бета-каротина уменьшается на 44, 43 и 60 %, соответственно, при использовании провитамина из расчета 0,15, 1,5 и 15 мг/кг. Тогда как при использовании водорастворимой формы бета-каротина антимуtagenный эффект наблюдается только при его применении в дозе 15 мг/кг.

В экспериментах по изучению влияния предобработки комбинациями, в которых доза аспартама была увеличена до 4 мг/кг, эффекты снижения цитогенетического действия мутагена были отмечены только при использовании жирорастворимой формы бета-каротина в дозах 1,5 и 15 мг/кг и водорастворимой – в дозе 15 мг/кг.

При испытании влияния предобработки комбинациями на цитогенетическую активность диоксидина используемого в дозе 300 мг/кг

был получен пул достаточно однородных данных, свидетельствующий о том, что антимуtagenным эффектом (от 25 до 55 % уменьшения цитогенетического эффекта) обладают все использованные комбинации, за исключением тех, в которых бета-каротин представлен в наименьшей из исследованных доз – 0,15 мг/кг (табл.21).

Таким образом, в экспериментах с диоксидином, также как в экспериментах с циклофосфамидом, выявлена существенная специфичность проявления антимуtagenных эффектов изучаемых комбинаций в зависимости от доз составляющих компонентов. При этом, во всех вариантах эксперимента было отмечено, что бета-каротин в обеих формах в дозе 15 мг/кг в сочетании с аспартамом в обеих дозах практически с одинаковой эффективностью редуцирует цитогенетические эффекты использованных мутагенов. Также обращает внимание, что при данном способе обработки антимуtagenный эффект комбинаций ни в одном случае не превышает эффекта ее отдельно взятых компонентов, что однозначно указывает на отсутствие аддитивности в действии избранных антимуtagenенов.

С точки зрения теории и практики антимуtagenных исследований принципиальную важность имеет вопрос о влиянии экзогенных антимуtagenенов на проявление генотоксических эффектов мутагенов в условиях повторного совместного введения. Результаты, полученные в экспериментах с циклофосфамидом, демонстрируют, что комбинации, включающие бета-каротин в жирорастворимых формах в дозах 1,5 и 15 мг/кг и аспартам в дозах 0,4 и 4 мг/кг, способны редуцировать эффект мутагена на 30 – 54 %. При этом антимуtagenное действие несколько в большей степени выражено в случаях использования аспартама в дозе 4 мг/кг.

Комбинации аспартама в дозе 0,4 мг/кг с жирорастворимой формой бета-каротина, применяемой из расчета 1,5 и 15 мг/кг, редуцировали мутагенный диоксидина (100 мг/кг) на 42 и 54 %, соответственно. Комбинации аспартама с водорастворимой формой провитамина оказались эффективны только при использовании последнего в дозе 15 мг/кг (51 %

редукция эффекта). В случае применения аспартама в дозе 4 мг/кг в комбинации с провитамином обе формы бета-каротина проявили антимуtagenное действие только при использовании в дозе 15 мг/кг. Эффективность комбинации с водорастворимой формой бета-каротина была выражено в большей степени - 46 % редукции мутагенного эффекта против 24 % в случае применения жирорастворимой формы.

В экспериментах, предусматривающих использование диоксидина в дозе 300 мг/кг, антимуtagenные свойства продемонстрировали только те комбинации аспартама (0,4 мг/кг) с бета-каротином в жирорастворимой и водорастворимой формах, в которых провитамин был использован из расчета 15 мг/кг. Повышение дозы аспартама до 4 мг/кг позволило выявить антимуtagenные эффекты его комбинаций с жирорастворимым бета-каротином во всех вариантах дозировок последнего, тогда как водорастворимая форма оказалась эффективной только в дозах 1,5 и 15 мг/кг. Ни в одном из упомянутых вариантов редукция эффекта мутагена не превышала 32 % при отсутствии дозовых зависимостей антимуtagenных эффектов.

Анализ совокупности материалов изложенных выше позволяет указать сделать несколько обобщающих заключений.

Во-первых, антимуtagenный эффект исследованных комбинаций независимо от режима обработки животных и использованных мутагенов проявляется при сочетанном использовании аспартама в дозах 0,4 и 4 мг/кг и бета-каротина в жиро- и водорастворимой формах в дозе 15 мг/кг.

Во-вторых, комбинации аспартама в дозах 0,4 и 4 мг/кг с бета-каротином в водо- и жирорастворимых формах во всем диапазоне использованных доз снижают мутагенное действие циклофосфида в остром эксперименте. Тогда как в условиях предобработки аналогичным эффектом обладают только комбинации с водорастворимой формой бета-каротина.

В-третьих, ни в одном варианте эксперимента не выявлено превосходство какой-либо комбинации над любым из составляющих ее

компонентов в эффективности антимуутагенного действия. Следовательно, в антимуутагенности исследованных соединений отсутствует аддитивность эффектов. Однако, при сравнении по таким показателям как зависимость антимуутагенного эффекта от режима обработки животных или использованного мутагена становится очевидным, что спектр антимуутагенной активности комбинаций более широк, чем у ее отдельных компонентов. Комбинации эффективны даже в тех случаях, когда их компоненты не эффективны по отдельности (графа 1, 2, табл. 21). Более того, при анализе данных с приоритетным учетом режима обработки животных становится очевидным, что аспартам и бета-каротин выгодно дополняют действие друг друга. Особенно показательно эта тенденция проявляется в случае использования комбинаций, включающих аспартам в дозе 4 мг/кг (см. табл.).

Таблица 22. Сравнительная эффективность антимуутагенного действия комбинаций «аспартам+бета-каротин» и ее компонентов.

Соединения	Однократно	Предобработка	Совместно
Аспартам	+/-	+	+/-
ЖБК	-	+/-	+
ВБК	+/-	+/-	+
Комбинации	+	+	+

+ -статистически достоверная редукция эффектов мутагена при применении антимуутагенов во всех используемых дозах

+/- -антимуутагенный эффект проявился только при использовании соединений в одной максимальной дозе и/или только по отношению к одному мутагену

- - отсутствие антимуутагенного эффекта

В-четвертых, ни в одном варианте эксперимента не выявлено проявления комутагенных эффектов или антагонизма в действии соединений в исследованных комбинациях. Это, в сочетании со сведениями, изложенными выше, указывает на перспективность совместного использования аспартама и бета-каротина.

Одним из центральных вопросов, касающихся теоретического осмысления перспективы практического использования антимуутагенов является вопрос о специфичности и универсальности их действия.

Рассматривая полученные данные с этой позиции, следует выделить два момента (1) отсутствие специфичности в качественном отношении – антимутагенная модификация достаточно, на среднем уровне 40-60 %, выражена в отношении эффектов обоих мутагенов и (2) очевидную зависимость антимутагенных эффектов комбинаций от доз, в которых используются ее компоненты, т.е. по существу отсутствие специфичности по отношению к разным мутагенам и совершенно отчетливую зависимость (специфичность) действия по отношению к этим мутагенам, в зависимости от доз использованных компонентов и в меньшей степени от режима их использования. При этом практически важным является выявление тех доз компонентов комбинаций, в которых их сочетанное применение нивелируют зависимость проявления антимутагенных эффектов от режима обработки. А именно - аспартам в дозе 0,4 и 4 мг/кг и бета-каротин в дозе 15 мг/кг.

Рассматривая предложенные дозировки как оптимальные, обеспечивающие наибольшую универсальность в проявлении защитных эффектов, важно сравнить в какой форме предпочтительнее использовать бета-каротин.

Анализ данных, представленных в табл. 21, с этой точки зрения показывает, что не имеется принципиальной разницы между антимутагенными эффектами комбинаций, содержащих ту или иную форму бета-каротина при их использовании в максимальной дозе. Однако, некоторое преимущество жирорастворимой формы выявляется при анализе данных, полученных в экспериментах с диоксидином с различными способами обработки животных. Интересно, что при сравнении данных, полученных в экспериментах с использованием циклофосфамида, такой закономерности не наблюдается, комбинации с обеими формами бета-каротина практически не различаются по антимутагенному эффекту. Представляется, что это может трактоваться как одно из проявлений специфичности антимутагенного действия исследованных комбинаций.

Одной из заявленных целей обсуждения явилось сравнение антимутагенной эффективности исследованных комбинаций и других

антимутагенов. Наибольший интерес в этом плане вызывает сопоставление эффектов комбинаций с эффектами их составляющих уже описанное выше. Сравнение антимутагенных эффектов исследованных комбинаций с данными других исследований достаточно затруднено, поскольку представленная работа является первой, в которой экспериментально исследуются эффекты сочетанного применения двух антимутагенов. Тем не менее, очевидно, что, в целом, антимутагенный эффект исследованных комбинаций не превышает 50 %, что вполне сопоставимо с эффектами большинства известных природных антимутагенов или антимутагенов синтетических, но аналогичных природным по химическому строению, исчерпывающую информацию о которых можно найти в монографиях и статьях обзорного характера [30, 31]. Уровень в 50 % защиты был ранее признан как минимально достаточный для признания антимутагена перспективным к дальнейшей разработке [6]. В нашем случае на эту роль вполне могут претендовать комбинации, обеспечивающие поступление в организм бета-каротина из расчета 15 мг/кг и, в меньшей степени 1,5 мг/кг, а также аспартама в дозе 0,4 и 4 мг/кг.

Отдельно следует отметить, что по степени проявления антимутагенных эффектов исследованные комбинации, а также, как было отмечено ранее Л.С. Большаковой [1998] и А.В. Кулаковой [1998], их компоненты не уступают фармакологическим индукторам интерферона, бензодиазепиновым транквилизаторам, но очевидно проигрывают синтетическим антимутагенам производным 2-меркаптобензимидазола (бемитил, афобазол), с помощью которых возможно полное устранение повреждающего действия отдельных мутагенов [17, 19]. Однако не следует забывать, что эти соединения направлены разработывались в качестве специфических фармакологических средств защиты генома, тогда как комбинации соединений, исследованных в настоящей работе, следует рассматривать как не специфически повышающие устойчивость к мутагенным воздействиям. Их очевидным преимуществом является то, что для их использования в качестве антимутагенов не требуется специальных разрешений директивных органов. Более того, по существу они уже сегодня

широко используются в качестве дополнительных компонентов в составе пищевых продуктов, в том числе продуктов лечебно-профилактического назначения [28], а также имеют очевидные перспективы использования в качестве дополнительных компонентов в составе ряда современных лекарственных форм; сиропы, эмульсии и пр.. Определенный вклад в подбор оптимального качественного и количественного состава дополнительных компонентов (красителей и подсластителей) в составе таких форм призваны сыграть вышеописанные результаты. В этой связи следует указать, что на сегодняшнем фармацевтическом рынке имеется достаточно большое количество лекарственных препаратов, в которых наряду с бета-каротиновыми красителями в качестве подсластителя используется сахарин. Генотоксическая безопасность применения последнего находится под сомнением, имеется достаточно большое количество исследований, в которых были обнаружены его ДНК-повреждающие и мутагенные свойства [15, 16, 43]. Вероятно, назрела необходимость замены этого явно неудачного сочетания на комбинации бета-каротина с аспартамом, которые безопасны с генетической точки зрения. Более того, в составе одной лекарственной формы с потенциально генетическим агентом, примером которого может служить парацетамол, широко применяемый именно в составе эмульсий, выявленные нами антимуtagenные комбинации могут заметно снизить риск проявления его повреждающего действия. Примеры, подобного использования антимутагенов имеются в современной литературе. В частности, на основе мутагенного нитрофурадониона была создана его безопасная лекарственная форма, включавшая помимо активного вещества антимутаген глицирам [17].

Открытым остается вопрос о том, каким образом исследованные комбинации будут воздействовать на эффекты других мутагенов. Учитывая, что наблюдается определенный параллелизм в модификации эффектов мутагенов, обладающих сходными механизмами мутагенного действия [17] можно ожидать, что они будут способны уменьшать мутагенные эффекты не только циклофосамида, но и других промутагенов алкилирующего типа

действия, не только диоксида, но и других прооксидантов. Следовательно, исследованные комбинации могут быть эффективны по отношению к большинству известных мутагенов, поскольку указанные механизмы мутагенного действия, прежде всего прооксидантный, присущи большинству известных генотоксикантов [30].

С другой стороны очевидно, что среди названных классов мутагенов практически неизбежно будут выявлены соединения, эффект которых не будет модифицироваться предлагаемой комбинацией. В этой связи необходимым этапом практического внедрения антимутагенов в качестве средств коррекции мутагенных эффектов того или иного фактора, должна являться специальная экспериментальная проверка эффективности их антимутагенной активности.

Совокупность выше изложенных результатов позволяет заключить, что исследованные комбинации бета-каротина в жирорастворимой форме с аспартамом обладают антимутагенными эффектами, проявление которых зависит от дозовых соотношений использованных компонентов и режимов обработки экспериментальных животных. При совместном использовании бета-каротина и аспартама не обладают комутагенным воздействием и дополняют антимутагенные свойства друг друга при разных режимах применения, но не обладают аддитивностью эффектов.

Совокупность полученных результатов позволяет сделать следующие выводы.

5.ВЫВОДЫ

1. Методом учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей С57В1/6 установлены антимуtagenные свойства комбинаций аспартама (0,4 и 4 мг/кг) и бета-каротина (0,15, 1,5 и 15 мг/кг) в жирорастворимой формах.
2. Антимуtagenный эффект комбинаций в качественном и количественном выражениях существенно не зависит от того, в какой водо- или жирорастворимой формах использован бета-каротин.
3. Антимуtagenный эффект комбинаций специфически зависит от доз компонентов, входящих в состав комбинаций. Только при использовании бета-каротина в дозе 15 мг/кг и аспартама в дозе 4 мг/кг защитное действие проявляется при всех режимах обработки животных по отношению к кластогенным эффектам обоих использованных мутагенов.
4. Антимуtagenные эффекты комбинаций сходным образом проявляются при разных уровнях мутагенного воздействия диоксидином, применяемым в дозах 100 и 300 мг/кг
5. Комбинации аспартама и бета-каротина в отличие от отдельно взятых компонентов обладают антимуtagenными свойствами при всех использованных режимах обработки животных.
6. Антимуtagenный эффект комбинаций в количественном выражении ни в одном варианте эксперимента не превышает эффекта ее отдельно взятых компонентов.
7. Исследуемые комбинации аспартама и бета-каротина не обладают комутагенной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алекперов У.К. // Антимутагенез. Теоретические и прикладные аспекты./ М.: Наука, 1984 г., 100 стр.
2. Бобков Ю.Г.//Изучение фармакокинетики биметила/ Фармак. и токсикол.- №5.-1984.-54-56.
3. Большакова Л.С.// Сравнительное исследование влияния каротиноидов на цитогенетические эффекты циклофосфамида и диоксида у мышей/ Автореф. диссер. кандид. биол. наук. Москва, 1998.
4. Бочков Н.П. Современная клиническая генетика и здоровье человека. Доклад. 2001.
5. Бочков Н.П. и др.//Мониторинг врожденных пороков развития/ Росс. Вест. перинатол.- 1996.-№2.-20-26.
6. Бочков Н.П., Катосова Л.Д.//Генетический мониторинг популяций человека при реальных химических и радиационных нагрузках./Вестн.РАМН.-1992.-№ 4.-10-14.
7. Бочков Н.П.,Дурнев А.Д.,Журков В.С. и др.// Система поиска и изучения соединений с антимутагенными свойствами. (Методические рекомендации)/ Хим.-фарм.жур, -1992,- N.9 - 10, .42 - 46.
8. Букин Б.В. // Эпидемиологические вопросы витаминопрофилактики рака / Вопросы онкологии, 1990, т. 36, № 6, стр. 643-652
9. Булдаков А.С.// Пищевые добавки. Справочник./С.-Петербург, "Ut".- 1996.-240 с.
- 10.Георгиев В.Н. // Фармакологическое изучение антимутагенных свойств убихинона-10. / Вестн. Рос. АМН. – 1997. - №7. – С.3-8.
- 11.Гончарова Р.И.//Антимутагенез как генетический процесс./ Вестник РАМН.-1993.- № 1.-26-33.
- 12.Даугель-Дауге Н.О., А.Д. Дурнев, А.В. Кулакова и др.// Корпускулярный мутагенез и его профилактика./Вест. Рос. АМН, 1995, N 1, стр. 29 - 37.
- 13.Дубинин Н.П. // Новое в современной генетике. /М., "Наука". - 1986. - 206с.

14. Дурнев А.Д. //Мутагены и антимутагены в продуктах питания./ Генетика.- 1997.-Т.33.-2.-165-176
15. Дурнев А.Д. и соавт.//Мутагенмодифицирующие эффекты бета-каротина in vivo./Генетика.-1997.-№5.-717-721.
16. Дурнев А.Д., Орещенко А.В., Саришвили Н.Г. // Продукты питания и индуцированный мутагенез. Обзор./ Хран. и перераб. с/х сырья.-1995.- №5.-21-23.
17. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены.- М.: Медицина, 1998.-328.
18. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Фармакологическая защита генома. - М.: ВИНТИ, 1992. - 159 с.
19. Жанатаев А.К.// Экспериментально-фармакологическое изучение антимутагенной активности афобазола/ Автореф. диссер. кандидат. биол. наук. Москва, 2001.
20. Журков В.С., Сычева Л.П.// Роль системы митохондриальных монооксигеназ в модификации эффектов мутагенов/ Вестник РАМН, 1993, № 1, стр. 41-46
21. Засухина Г.Д.// Проблемы практического использования антимутагенов. / В сб.: "Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека", часть 2, Москва. - 1994. - 192-214.
22. Захидов С.Т., Баршак Т.Л., Смирнова О.Б. и др.// Модифицирующие цитогенетические эффекты госсипола и его производных./ Изв.Акад.Наук, серия Биология.-1994.-№ 4.-694-700.
23. Капитанов А.Б., Пименов А.М. // Каротиноиды как антиоксидативные модуляторы клеточного метаболизма. /Успехи современной биологии. - 1996.- № 2. - 179-193.
24. Кулакова А.В. и соавт.//Антимутагенная активность аспартама./ Экспер. и клинич. Фармакология.-1999. Т62.-№4.-48-50.
25. Кулакова А.В.// Фармакологическое исследование модифицирующих эффектов циклофосфамида и диоксидина/ Автореф. диссер. кандидат. биол. наук. Москва, 1998.

26. Лакин Г.Ф. Биометрия : Учеб. пособие для биол. спец. вузов – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352с.
27. Новиков А.В. Экология, окружающая среда и человек.-М: Наука.- 2001.- 306с.
28. Орещенко А.В. Пищевая комбинаторика и генетическое здоровье человека. М.: ПИЩЕПРОМИЗДАТ, 1999, 206с.
29. Орещенко А.В., Тюрина Л.С., Гусева Н.В., Дурнев А.Д. //Влияние апокаротина на спонтанный и индуцированный мутагенез у мышей./Тезисы докладов росс.конф. "Мутагены и канцерогены окружающей среды."- Казань.-1996.-34.
30. Порошенко Г.Г., Абилов С.К.// Антропогенные мутагены и природные антимутагены./Итоги науки и техники. Сер. общ.генет., ВИНТИ.-1988.- т. 12.-1-206.
31. Порошенко Г.Г.//Антимутагены: подходы к классификации и перспективы поиска активных соединений./Вестник РАМН.-1995.- № 1.- 38-44.
32. Худолей В.В.//Модификации мутагенеза и антиканцерогенез / Вестник РАМН, 1993, № 1, 34-41
33. Черепнев и соавт.// Общие вопросы антимутагенной защиты организма/ Вестник РАМН.- 1999.-№1.
34. Якушина Л.М., Малахова Э.Н., Шкарина Т.Н. и др. . Вопр. мед. химии.- 1995.- 41(4).- 36-41.
35. Регистр Лекарственных средств России.- 1998.-1234с.
36. Abraham S.K., S.Mahajan ,Kesavan P.C. // Inhibitory effects of dietary vegetables on the in vivo clastogenicity of cyclofosphamide. / Mutat. Res. - 1986.-172.-51-54.
37. Alpha-tocoopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study Groop, The effect of Vitamin E and Beta-carotene on the insidence of lung cancer/ N. Engl. J. Med.-330.-1994.-1029-1035.

38. Ambrosone C.B., Freudenheim J.L.//Manganese superoxide dismutase genetic polymorphisms, dietary antioxidant and risk of breast cancer.// *Cancer Res.*-59(3).-1999.-602-606.
39. Ames B.N.// Cancer prevention and diet: help from single nucleotide polymorphisms/ *PNAS* 96.-1999.- 12216–12218.
40. Ames B.N.// Micronutrient deficiencies: a major cause of DNA damage, in: H.L. Bradlow, J. Fishman, M.P. Osborne (Eds.)// *Cancer Prevention: Novel Nutrient and Pharmaceutical Developments, Annals of The New York Academy of Sciences.*- New York.- 2000.- 87–106.
41. Ames B.N.//Micronutrients prevent cancer and delay ageing/ *Toxicol. Lett.*-102-103.-1998.-5-18.
42. Ames Bruce N. // DNA damage from micronutrient deficiencies is likely/ *Toxicol. Lett.*-98.-1999.-23-36.
43. Arnold D.L., Boyes B.G. // The toxicological effects of sacharin in short-term genotoxicity assay./ *Mut. Res.* 1989.V.221.-69-132.
44. Azuine M.A., Goswam U.C., Kagal J.S., Bhile S.V. // Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. / *Nutr. Cancer.* - 1992. - 173.- 287-295.
45. Belisario M.A., Pecce R. et al. // Inhibition of cyclofosphamide mutagenicity by beta- carotene. / *Biomed. Pharmacother.* - 1985. - 39. - 445-448.
46. Bianchi L., Tateo F., Pizzala R. et al. // Carotenoids reduce the chromosomal damage induced by bleomycin in human cultured lymphocytes. / *Anticancer Res.* - 1993. - 7. - 1007-1010.
47. Blot W.J., J.-Y. Li, P.R. Taylor, W. Guo, S. Dawsey, G.-Q. Wang, C.S. Yang, S.-F. Zheng, M. Gail, G.-Y. Li, Y. Yu, B. Liu, J. Tangrea, Y. Sun, F. Liu, J.F. Fraumeni, Y.-H. Zhang, B. Li// Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population/ *J. Natl. Cancer Inst.* 85.-1993.- 1483–1492.
48. Bonassi S., L. Hagmar, U. Strumberg, A.H. Montagud, H. Tinnerberg, A. Forni, P. Heikkilä, S. Wanders, P. Wilhardt, I.-L. Hansteen, L.E. Knudsen, H.

- Norppa// Chromo-somal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens group on cytogenetic biomarkers and health/ *Cancer Res.*-60.- 2000.- 1619–1625.
49. Bowen P.E., Garg V., Stasewicz-Sapuntzakis M. et al. *Ann. NY Acad. Sci.*- 1994.- 691.- 241-243.
50. Boyonoski A.C., Gallacher L.M. et al.//Niacin deficiency increases sensitivity of rars to the stort and long term effects of treatment/*Mol. Cell. Biochem.*-193.- 1999.-83-87.
51. Brown E.D., Micozzi M.S., Craft N.E. et al.. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989.-49(6), 1258-1265.
52. Bohm F., R. Edge, L. Lange, T.G. Truscott// Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids/ *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 44.-1998.- 211–215.
53. Chatterjee Malay //Vitamin D and genomic stability/ *Mutation Research* 475.- 2001.- 69–88.
54. Claycombe Kate J., Meydani S. N. //Vitamin E and genome stability// *Mutation Research*- 475.-2001.- 37–44/
55. Collins A.R.// Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer// *BioEssays.*- 21.-1998.- 238–246.
56. Creppy E.E. et al.// Prevtntion of Nephrotoxiccity Of Ochratoxin A and food contaminant// *J. Toxicol. Lett.*- 82/83.-1995.- 56-63.
57. Creppy E.E., Baudrimont I. and A.-M. //Haw Aspartame Prevents The Toxicity Of Ochratoxin A/ *J. Toxicol. Sciences.*- 23(II).-1998.- 689-877.
58. Culter R.G. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7627-7631.
59. Darroudi F.,Targa H., Natarajan A.T. // Influence of dietary carrot on the cytostatic drug activity of cyclophosphamide and its main directly acting metabolite: Induction of sister-chromatid exchanges in normal human lymphocytes, Chinese hamster ovary cells, and their DNA repair-deficient cell lines./*Mutat. Res.* - 1988. - 198. - 327-337.

60. Davison A., Ronssean E., Dunn B. // Putative anticarcinogenic action of carotenoids: nutritional implication./ *Can. J. Physiol. Pharmacol.*-1993.-71.-732-745.
61. De Flora S. // Mechanismus of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis / *Mutat.Res.*, 1998, 402, 151-158.
62. De Flora S. //Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis/ *Mutat. Res.* - 1992.- 23. -67-73.
63. De Freitas J.M., R. Meneghini //Iron and its sensitive balance in the cell/ *Mutation Research.*- 475.-2001.
64. Dixon L.B. et al. //Difference in energy, nutrient and food intakes in a US sample of Mexican-American women and men/*Am. J. Epidemiol.* 152(6).-2000.-548-557.
65. Dreosti I.E. //Zinc and the gene/ *Mutation Research.*- 475.-2001.
66. Duthie S.J., A. Ma, M.A. Ross, A.R. Collins// Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes/ *Cancer Res.* 56.-1996.- 1291–1295.
67. Durnev A.D. at el // The influence of two carotenoid food dyes on clastogenic activities of CYPF and DN in mice./ *Food and Chem. Toxic.*-36.-1998.-1-5.
68. Duthie S.J., A.R. Collins, G.G. Duthie// The role of carotenoids in modulating DNA stability and lipid peroxidation: importance for human health/ *Subcell. Biochem.*- 30.-1998.- 181–207.
69. El-Bayoumy K.//Protective role of selenium on genetic damage and on cancer/ *Mutation Research.*- 475.-2001.
70. Erdman J.W., Bierer T.L., Gugger E.T.. *Ann. NY Acad. Sci.* -1994.- 691, 76-85.
71. Fenech M.// Recommended dietary allowances (RDAs)/ *Mutat. Res.*-5(1).-2000.-251-256.
72. Fenech M.//Chromosomal damage rate, ageing and diet/ *Ann. NY Acad. Sci.*-854.-1998.-23-36.
73. Fenech. M.// The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells// *Mutation Research* 475 (2001) 57–67.

74. Ferguson Lynnette R. //Role of plant polyphenols in genomic stability/ Mutation Research.- 475.-2001.- 89–111.
75. Gasiorowski K. Et al.// A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals/ Mutat. Res. 2001, 488, pp. 151–169.
76. Gaveral H., Friedman S., Alberts D., Ramsey L. // Oral cancer prevention : the case for carotenoids and antioxidation nutrients. / Prev. Med. - 1993. - 22.- 701-707.
77. Giovannucci E.// Selenium and risk of prostate cancer/ Lancet.- 352.-1998.- 755–756.
78. Hageman G.J., Stierum R.N.//Niacin, poly(ADP-ribos)polymerase-1 and genomic stability// Mutation Research.- 475.- 2000.- 36-41.
79. Halliwell B. //Vitamin C and genomic stability// Mutation Research.- 475.- 2001.- 29–35.
80. Hartman P.E., Shankel D.M.// Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules ./Environ. and Mol. Mutagenes.-1990.- 15.- 145-182.
81. Hayatsu H., Negishi T., Arimoto S., Hayatsu T. // Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens./Mutat. Res. - 1993. - 290.-79-85.
82. Hayatsu H., Sakae Arimoto, Tomoe Negishi.// Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis./ -Mutat.Res.-1988.-202.-429-446.
83. Hennekens C.H., Buring J.E., J.M. Gaziano, Antioxidant vitamins and cardiovascular disease, in: A. Bendich, R.J.// Deckelbaum (Eds.), Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals/ Humanae Press.- Totowa, NJ.- 1996.- pp. 171–180.
84. Heo M.Y., Jae L.H., Jung S.S. 1996
85. Heo M.Y., Lee S.J. et al.// Modification affects Galangin 1994
86. Isler O. Carotenoids. - Basel , 1997.
87. Iwama Y., Nishimura S., Katoh K., Sano K. //Atherosclerosis.-1994.-109.-1,2.- 26.

88. Jacobson E.L., Shiek W.M.//Mapping the role of NAD metabolism in prevention of cancerogenesis/ Mol. Cell. Biochem.-193.-1999.-69-74.
89. Konopacka M., M. Widel, J. Rzeszowska-Wolny// Modifying effect of b-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells// Mutat. Res.- 417.-1998.- 85–94.
90. Konopacka M., J. Rzeszowska-Wolny// Modifying effect of Vitamins C, E and b-carotene against DNA damage in mouse cells/ Mutat. Res.- 418.-1998.- 57–63.
91. Kornhauser A., W.G. Wamer, L.A. Lambert, R.R. Wei// b-Carotene inhibition of chemically-induced toxicity in vivo and in vitro/ Food Chem. Toxicol.- 32.-1994.- 149–154.
92. Levander O.A., P.D. Whanger// Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for selenium and iodine dietary recommendations/ J. Nutr. 126.-1996.- 2427S–2434S.
93. Lindahl T., Wood R.D.//Quality control by DNA repair/Science.-286.-1999.- 1897-1905/
94. Linder M.C.//Copper and genomic stability in mammals/ Mutation Research.- 475.-2001.
95. Linder M.C.//Copper: in Present Knowledge in Nutrition/ ILSI Press, DC.-1996.-307-319.
96. Lowe G.M., L.A. Booth, A.J. Young, R.F. Bilton// Lycopene and b-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses/ Free Rad. Res. -30.-1999.- 141–151.
97. Manoharan K., Banerjee I. // Beta-carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammaly cells in organ culture. / Cell Biol. Int. Rep. - 1985. - 9. - 783-789.
98. Martin F., Coli K., Phillips D.// Genotoxicity of human milk extracts and detection of DNA damage in cells recovered from breast milk/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 257(2): 319-320.
99. Mayne S.T. // Beta-carotene, carotenoids and clisease prevention in human. / Faseb J. - 1996. - 10,7. - 690-701.

100. Meyers D.G. // The iron hypothesis — does iron cause atherosclerosis?/
Clin. Cardiol.- 19.-1996.- 925–929.
101. Moller S.E. // Effect of Aspartam and protein, administered in
pyrenylalanine-equivalent doses, on plasma neural/ Pharm. And Tox. 68.-1991.-
408–412.
102. Moon R.C., A.I. Constantinou// Dietary retinoids and caro-tenoids in rodent
models of mammary tumorigenesis/ Breast Cancer Res. Treatment.- 46.-1997.-
181–189.
103. Morris M.C. at. El. //Vitamin E and Vitamin C supplement use and risk of
incident Alzheimer disease./ Alzheimer Disease & Associated Disorders.-
12(3).-1998.-121-126.
104. Olson J.A. . J. Nat. Cancer Inst. -1984.-73(6).- 1439-1444.
105. Omenn G.S., Goodman G.E. et al. //Effects of a combination of beta-
carotene and vitamin A on lung cancer disease/ N. Engl. J. Med.-334.-1996.-
1150-1155.
106. Omenn G.S.// Chemoprevention of lung cancer: the rise and demise of b-
carotene/ Ann. Rev. Public Health.- 19.-1998.- 73–99.
107. Peto R., R. Doll, J.D. Buckley, M.B. Sporn// Can dietary b-carotene
materially reduce human cancer rates?/ Nature 290.-1981.- 201–208.
108. Polan P.R., Mikalm.S., Basu J., Romney S.L. Nutr. Cancer.- 1991.- 15(1).-
13-20.
109. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S. et al// Mammalian in vivo cytogenetic
assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells./ Mutat.Res.
-1987.-189.- 157-165.
110. Raj A.S., Katz M. // Beta-carotene as an inhibitor of a benzo(a)pyrene and
mitomycin C induced chromosomal breaks in the bone marrow of mice. /Can.
J. Genet and Cytol. - 1985. - 27. - 598-602.
111. Raj A.S. // Beta-carotene as an inhibitor of mitomycin C induced
chromosomal breaks in mice. /Can. J. Genet and Cytol. - 1985. - 26. - 78-86.

112. Ranney et al.// Aspartam status and hematological findings in predominately black elderly persons from urban low-income households/ *Am. J. Clin. Nutr.* 32.-1976.- 2346–2353.
113. Renner H.W. // Anticlastogenic effect of beta-carotene in Chinese hamster. Time and dose response studies with different mutagens./*Mutat. Res.*-1985.- 144.-251-256.
114. Renner H.W., Knoll M.//Antimutagenic effects of carotenoids on male germ cells of mice./*Mutat.Res.*-1984.-140.-127-129.
115. Riso P., A. Pinder, A. Santangelo, M. Porrini// Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage?/*Am. J. Clin. Nutr.*- 69.-1999.- 712–718.
116. Rosenkranz M., Zierler H.//Chromosomenanalysen bei Abortus./ *Wien. Med. Wochenschr.*- 1990.-140.-545-547.
117. Saltman P., J. Gurin, I. Mothner, *Nutrition Book*, The University of California, San Diego, Little Brown & Company, Boston, 1993.
118. Salvadori D.M., Ribeiro L.R., Oliveira M.D. et al. // Beta-carotene as a modulator of chromosomal aberrations induced in mouse bone marrow cells. / *Environ. Mol. Mutagen.* - 1992. - 20. - 206-210.
119. Salvadori D.M., Ribeiro L.R., Oliveira M.D. et al. // The protective effect of beta-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. / *Mutat. Res.* - 1992. - 265. -237-244.
120. Salvadori D.M.. // Anticlastogenic effects of beta -carotene in mammals. / *Rev. Bras. Genet.* - 1991. - 14. - 1095-1096.
121. Starvic B.// Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review./ *Food and Chem. Toxicol.*- 1992.-32.- 977-994.
122. Scott D., Danford N.D., Dean B.J. et al. Chromosome aberration assay in mammalian cells in vitro. // Report of the UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. / Ed. Dean B.J. United Kingdom Environmental Mutagen Society, Swinsea , 1983. - 43-64.

123. Scott D., Galloway S., Marshall R.R. et al. // Genotoxicity under extreme culture conditions. / *Mutat. Res.* - 1991. - 257. - 147-204.
124. Selhaub J., Bagley L.C.//B vitamins, homocysteine and neurocognitive function in the elderly/ *Am. J. Clin. Nutr.* 71(2).-2000.-614-620.
125. Shibata A., Sasaki R., Ito Y. et al. (1989). *Int. J. Cancer*, 44, 48-52.
126. Sies H., W. Stahl, A.R. Sundquist// Antioxidant functions of vitamins: Vitamin E and C, b-carotene and other carotenoids/ *Ann. N.Y. Acad. Sci.*-669.-1992.- 7–20.
127. Skibola C.F., M.T. Smith, E. Kane, E. Roman, S. Rollinson, R.A. Cartwright, G. Morgan, Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults/ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* -1999.-12810-12815.
128. Smith A.H., Waller K.D. *Am. J. Epidemiol.*- 1991.- 133(7).- 661-671.
129. Stich H.F., Dunn B.P. // Relationship between cellular level of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. / *Int. J. Cancer.* - 1986. - 38. - 713-717.
130. Taillemite J.L.// Cytogenetique et troubles de la reproduction./ *Contracept. Fertil.Sex.*-1981.-9.-741-744.
131. Tangney Ch.C., Shekelle R.B., Raynor W. et al. *Am. J. Clin. Nutr.*- 1987.- 45.- 764-769.
132. Umegaki K., S. Ikegami, K. Inoue, T. Ichikawa, S. Kobayashi, N. Soeno, K. Tomabechi// b-Carotene prevents X-ray induction of micronuclei in human lymphocytes/ *Am. J. Clin. Nutr.* 59.-1994.- 409–412.
133. Van Rensburg C.E., Tberon A., G.A. Richards et al. // Investigation of the relationships between plasma levels of ascorbate, vitamin E and beta-carotene and frequency of sister-chromatid exchanges and release of reactive oxidants by blood leukocytes from cigarette smokers. / *Mutat. Res.* - 1989. - 215. - 167-172.
134. Waters M.D., Stack H.F., Jackson M.A. //Inhibition of genotoxic effects of mammalian germ cell mutagens/ *Mutat. Res.* - 1998.-v. 402.- 129-138.

135. Weisburger J.H. // Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future/ *Mutat. Res.*-2001.-480.- 23-35.
136. Wilson J.W., C.W. Enns, J.D. Goldman, K.S. Tippett, S.J.Mickle, L.E. Cleveland, P.S. Chahil//Data Tables: Combined Results from USDA's 1994 and 1995 Continuing Survey of Food Intakes By Individuals and 1994 and 1995 Diet and Health Knowledge Survey, USDA/ARS Food Surveys Research Group, Beltsville Human Nutrition Research Center, Riverdale, MD, 1997.
137. Wolterbeek A.P., Roggeband R., van Moorsel C.J., Baan R.A., Koeman J.H., Feron V.J., Rutten A.A. // Vitamin A and beta-carotene influence the level of benzo(a)pyrene-induced DNA adducts and DNA-repair activities in hamster tracheal epithelium in organ culture. / *Cancer Lett.* - 1995. - 91. - 205-214.
138. Watkins M.L., Erickson J.D.// Multivitamin use and mortality in a large prospective study/ *Am. J. Epidemiol.* 152(2).-2000.-149-162.
139. Wang X-D, Liu Chin-Kum // Diet and Gastric Cancer / *G1 Cancer: An International Journal of Gastrointestinal Oncology*, 1998.
140. Ziegler R.G. // A review of epidemiological evidence that carotenoids reduce the risk of cancer, *J. Nutr.* 119.-1989.- 116–122.