

**ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOG POTENCIJALA LEVAMIZOL
HIDROHLORIDA NA ČELIJAMA KOSTNE SRŽI PACOVA
WISTAR SOJA*****INVESTIGATIONS OF GENOTOXIC POTENTIAL OF LEVAMISOLE
HYDROCHLORIDE IN BONE MARROW CELLS OF WISTAR RATS****M. Kulić, Z. Stanimirović, Biljana Marković, S. Ristić****

Eksperiment je izveden u in vivo uslovima na ćelijama kostne srži pacova Wistar soja. Testirane su doze levamizol hidrohlorida i to: terapijska doza od 2.2 mg/kg, t.m., zatim doza od 4,4 mg/kg t.m., LD₅₀ do 25% mg/kg t.m. i LD₅₀-75% mg/kg t.m.. Praćen je uticaj levamizol hidrohlorida na kinetiku ćelijskog ciklusa i pojavljivanje strukturnih i numeričkih promena na hromozomima u ćelijama kostne srži. Terapijska doza levamizola od 2,2 mg/kg t.m. pokazala je sposobnost povećanja mitotske aktivnosti posmatranih ćelija, tako potkrepljujući saznanja o imunostimulativnom efektu ove doze leka u in vivo uslovima. Ostale testirane doze levamizola u ovom eksperimentu, posmatrano u odnosu na kontrolnu grupu, imale su suprotan efekat, tj. uslovile su smanjenje mitotske aktivnosti ćelija kostne srži. Sve ispitivane doze in vivo pokazuju sposobnost indukcije numeričkih (aneuploidija i poliploidija) i strukturnih (lezije, prekidi i insercije) aberacija hromozoma. Na osnovu toga može da se zaključi da ispitivane doze imaju genotoksični efekat.

Ključne reči: genotoksičnost, citotoksičnost, aneuploidije, poliploidije lezije, prekidi, insercije

Uvod / Introduction

Primena različitih antibiotika, sulfonamida, antiparazitika i drugih hemoterapijskih sredstava u lečenju životinja i čoveka, pored mnogih pozitivnih efekata, prouzrokovala je neke negativne efekte koji mogu da se ispolje i u promena u naslednom materijalu. Jedan od takvih lekova je levamizol hidrohlorid koji

* Rad primljen za štampu 31. 10. 2005. godine

** Mr Milan Kulić, Katedra za humanu genetiku, Medicinski fakultet, Foča; dr Zoran Stanimirović, profesor, dr Biljana Marković, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr Siniša Ristić, Katedra za fiziologiju, Medicinski fakultet, Foča

ima široku primenu u veterinarskoj i humanoj medicini kao antiparazitik. Naročito je efikasan u lečenju infekcija gastrointestinalnog i respiratornog trakta izazvanih predstavnicima klase *Nematoda*. Međutim, pored ove primarne funkcije, poznato je i njegovo imunostimulirajuće dejstvo [1, 2]. Levamizol je pokazao sposobnost smanjenja učestalosti pojavljivanja tumora i metastaza kod tretiranih životinja [3, 4, 5]. Pored ovih pozitivnih efekata, levamizol hidrohlorid poseduje i toksični efekat izazivajući kod pasa hemolitičnu anemiju i leziju CNS [6], kod ptica slabiju inkoordinaciju pokreta i regurgitaciju hrane, pa čak i uginuće [7]. Kod ljudi kao neželjeni efekti terapije ovim lekom javljaju se agranulocitopenija, leukoreja, anoreksija i nauzeja [8], fotosenzibilna kožna reakcija [9] i kutani nekrotični vaskulitis [10]. Pored ovih prolaznih i relativno benignih poremećaja, ustanovljeni su i slučajevi oštećenja bubrega [11].

Levamizol hidrohlorida u *in vitro* i *in vivo* eksperimentu povećava učestalost razmena sestrinskih hromatida (SCE), hromozomskih i hromatidnih prekida [12, 13].

Materijal i metode / *Materials and methods*

Eksperiment je izveden *in vivo* na pacovima Wistar soja, muškog pola, uzrasta od 45 do 50 dana i telesne mase od 150 do 200 grama. Eksperiment smo postavili tako što smo ispitivali pet eksperimentalnih grupa: kontrolna grupa koja je dobijala fiziološki rastvor, I eksperimentalna grupa tretirana je terapijskom dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m, II eksperimentalna grupa tretirana je dozom levamizola od 4,4 mg/kg t.m, III eksperimentalna grupa tretirana dozom od LD₅₀ do 25 posto mg/kg t.m. i IV eksperimentalna grupa tretirana je dozom od LD₅₀-75 posto mg/kg telesne mase. Izvedeno je osam eksperimentalnih ciklusa sa intraperitonealnom sedmodnevnom aplikacijom ispitivanih doza leka.

Nakon sedmodnevnog tretmana, životinje su žrtvovane, a materijal za citogenetičke analize dobijen je u skladu sa procedurom koju su postavili Hsu i Patton [14], modifikovano po Zimonjiću *et al.* [15]. Tehnika G-traka je obavljena po metodi Seabrighta *et al.* [16], modifikovano po Zimonjiću *et al.* [15]. Procena citogenetičkih efekata (proliferativna aktivnost ćelija), kao i sposobnost levamizol hidrohlorida da indukuje transformacije kariotipa (strukturne i numeričke aberacije) obavljena je na ćelijama kostne srži. U tu svrhu analizirano je 100 metafaznih figura po životinji. Statistička obrada dobijenih podataka je urađena primenom Studentovog t-testa.

Rezultati i diskusija / *Results and discussion*

Rezultati ispitivanja uticaja odgovarajućih doza levamizol hidrohlorida na srednje vrednosti mitotskog indeksa, kao mere proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži pacova prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Srednje vrednosti mitotske aktivnosti ćelija kostne srži pacova Wistar soja kontrolne grupe i eksperimentalnih grupa pri tretmanu rastućim dozama levamizol hidrohlorida

Table 1. Mean values of mitotic activity in bone marrow cells of Wistar rats of control group and experimental groups treated with increasing doses of levamisole hydrochloride

| Ponavljanja / Repetitions | Kontrola / Control | 2,2 mg/kg t.m. | 4,4 mg/kg t.m. | LD ₅₀ -25% mg/kg t.m. | LD ₅₀ -75% mg/kg t.m. |
|------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 6,20 | 8,82 | 6,00 | 3,50 | 2,20 |
| 2 | 6,00 | 8,15 | 5,40 | 3,60 | 2,60 |
| 3 | 5,80 | 7,78 | 5,60 | 2,30 | 1,80 |
| 4 | 5,75 | 7,62 | 5,80 | 2,70 | 1,90 |
| 5 | 6,01 | 8,20 | 6,20 | 2,80 | 2,80 |
| 6 | 6,22 | 8,84 | 6,40 | 2,50 | 3,10 |
| 7 | 6,31 | 9,11 | 5,40 | 3,10 | 2,00 |
| 8 | 6,27 | 9,01 | 5,60 | 2,95 | 2,28 |
| X | 6,07 | 8,45 | 5,80 | 2,93 | 2,34 |

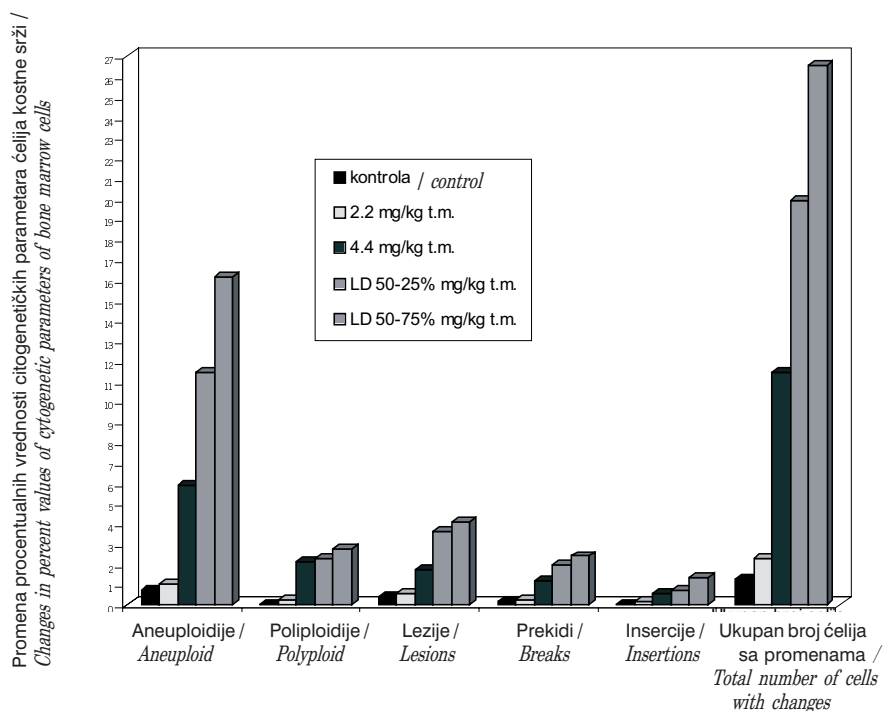
Terapijska doza levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. omogućila je povećanje proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži, dok ostale testirane doze smanjuju proliferativnu aktivnost ćelija kostne srži. U kontrolnoj grupi životinja, srednja vrednost mitotičke aktivnosti (mitotski indeks=MI) bila je 6.07. Kod životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. srednja vrednost je MI=8.45. U grupi životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 4,4 mg/kg t.m. srednja vrednost je MI=5.80. Kod životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od LD₅₀ do 25 posto mg/kg t.m. srednja vrednost je MI=2.93, dok je kod doze od LD₅₀ do 75 posto mg/kg t.m. srednja vrednost MI=2.34.

Primenom t-testom utvrđene su visoko statistički značajne razlike ($p < 0,001$) u povećanju vrednosti mitotskog indeksa kod grupe životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. u odnosu na kontrolnu grupu koja je primala fiziološki rastvor. Isto tako, t-testom smo utvrdili visoko statistički značajne razlike, kao u smanjenju vrednosti mitotskog indeksa između kontrolne grupe i svih ostalih eksperimentalnih grupa životinja, kao i između samih eksperimentalnih grupa životinja.

Naši rezultati ukazuju na imunostimulativni efekat levamizol hidrohlorida, jer on podstiče umnožavanje ćelija kostne srži, što se manifestuje povećanjem vrednosti mitotskog indeksa. Ovako shvatanje je istovremeno u saglasnosti sa nalazima Symoentsa [1] i Al-Ibrahima [2]. Pored toga, naši rezultati ukazuju da je levamizol hidrohlorid ciklus-specifični agens koji na ćeliju deluje u tačno određenoj fazi ćelijskog ciklusa, ostvarujući svoj citotoksični ili citostatski efekat na najosetljivijim ćelijama, tako da u prvo vreme u životu opstaju samo one ćelije koje su najmanje osetljive ili neosetljive na datu dozu u određenoj fazi ce-

lijskog ciklusa. Manje osetljive ćelije uvećavaju svoju ćelijsku populaciju, jer nesmetano prolaze kroz ćelijsku deobu sve dok se tokom vremena i povećavanjem doze ne ostvari potpun citostatički ili citotoksični efekat. Ovakvo shvatanje je u saglasnosti sa nalazima više autora [17, 18, 19, 20, 21, 22] i ono daje vrlo prihvatljivo objašnjenje povećanja proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži pacova tretiranih ispitivanim dozama levamizol hidrohlorida. Povećan broj ćelija u mitozu može da ukaže na sposobnost levamizol hidrohlorida da ubrza ćelijski ciklus, tj. smanji vreme njegovog trajanja što utiče na smanjenje vrednosti replikacije, a smanjena vrednost replikacije ima kao posledicu mutabilnost [23], što je u saglasnosti sa našim nalazima o povećanju učestalosti prekida na hromozomima i pojavljivanje specifičnih strukturnih aberacija.

Pored uticaja na mitotsku aktivnost ćelija kostne srži ispitivane doze levamizol hidrohlorida pokazale su sposobnost da indukuju kako numeričke promene tipa aneuploidija i poliploidija, tako i strukturnih aberacija hromozoma tipa lezija, prekida i insercija (grafikon 1).



Grafikon 1. Prikaz citogenetičkih parametara ćelija kostne srži pacova kod kontrolne i eksperimentalnih grupa

Graph 1. Graphic presentation of cytogenetic parameters of bone marrow cells in rats of control and experimental groups

Kod životinja koje su tretirane dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg telesne mase procentne vrednosti numeričkih aberacija tipa aneuploidija bile su 1,02 posto, a poliploidija 0,23 posto, dok su za strukturne hromozomske aberacije tipa lezija te vrednosti 0,52 posto, prekida 0,27 posto i insercija 0,14 posto. Kod životinja koje su tretirane dozom levamizola od 4,4 mg/kg telesne mase vrednost ovih parametara su: za numeričke aberacije tipa aneuploidija 5,90, poliploidija 2,08 posto, dok su za strukturne hromozomske aberacije tipa lezija 1,75 posto, prekida 1,21 posto i insercija 0,52 posto. Prilikom tretmana sa dozom levamizola od LD₅₀ - 25 posto mg/kg telesne mase vrednost ovih parametara bile, za numeričke aberacije tipa aneuploidija 11,42 posto, poliploidija 2,29 posto, strukturne aberacije tipa lezija 3,58 posto, prekida 1,94 posto i insercija 0,68 posto. Konačno, kod životinja koje su tretirani dozom levamizola LD₅₀ - 75 posto mg/kg telesne mase procentne vrednosti ispitivanih promena su bile, za numeričke aberacije tipa aneuploidija 16,14 posto, poliploidija 2,73 posto, strukturne aberacije tipa lezija 4,10 posto, prekida 2,39 posto i insercija 1,35 posto.

Dobijeni rezultati ukazuju da levamizol hidrohlorida omogućava visoko statistički značajno povećanje ($p < 0,001$) učestalosti numeričkih i strukturnih promena hromozoma u ćelijama kostne srži u odnosu na kontrolu. U ovom testu postoji linearni odnos doze i efekta što znači, ako su doze leka veće, to je i njihov efekat na naslednu osnovu veći. Posebno je značajno istaći pojavu insercija na hromozomu prvog para autozoma, nastalu kao posledica indukovane amplifikacije segmenta između traka q 21 i q 22, što predstavlja specifičnu promenu pod uticajem levamiza-hidrohlorida [21, 22, 24].

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata može da se zapazi da levamizol hidrohlorid u *in vivo* uslovima omogućava značajno povećanje proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži i ima sposobnost indukcije numeričkih aberacija (aneuploidije i poliploidije) i strukturnih (lezije, prekidi i insercije), izazivajući transformaciju kariotipa životinja koje se ispituju. Na osnovu navedenog može da se zaključi da ispitivane doze leka imaju genotoksični efekat. Ovakav zaključak je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja genotoksičnog efekta levamizol hidrohlorida na humanim limfocitima iz kulture ćelija primenom SCE i mikronukleus testa [12, 13, 25].

Literatura / References

1. Symoens J., Rosenthal M.: Levamisole in the modulation of the immune response. The current experimental and clinical state. *Journal Of The reticuloendothelial Society*, 21, 175-221, 1977. - 2. Al-Ibrahim M. S., Chirigos M. A.: Immune modulation and control of neoplasia by adjuvant therapy. *In vitro* efekts of levamisole on human mononuclear cells. *Progress In Cancer Res. And Therapy*, 7, 39-47, 1978. - 3. Renoux G., Renoux M.: Levamisole inhibits and cures a solid malignant tumor and its pulmonary metastases in mice.

Nature, 240-217, 1972. - 4. Sadowsky J., M., Rapp F.: Inhibition by levamisole of metastases by cells transformed by Herpes simplex virus type I (33776). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149-219, 1975. - 5. Aleksić S., Dmodovski F., Bloom A., *et al.*: Effect of levamisole on malignant experimental neuroma grown subcutaneously in a young rat: Brief communication. Journal Of National Cancer Institute, 59, 1565, 1977. - 6. Atwel R. B., Johnson I., Read R., *et al.*: Haemolytic anemia in two dogs suspected to have been induced by levamisole. Aust. Vet. J., 55, 292-294, 1979. - 7. Buys S. B., Van der Made H. N.: The toxicity of levamisole as a parenteral treatment for birds. Journal Of South African Veterinary Association, 48-284, 1977. - 8. Veys E. M., Mielants H., Verbruggen G.: Levamisole-induced adverse reactions in HLA B27-positive rheumatoid arthritis. Lancet, 1-148, 1978. - 9. Ferguson M. M., Macdonald D. G.: Photosensitive skin reaction to levamisole. Br. Dent. J., 144, 29, 1978. - 10. MacFarlane D. G., Bacon P. A.: Levamisole-induced vasculitis due to circulating immune complexes. Br. Med. J., 1, 407-408, 1978. - 11. Hansen T. M., Petersen J., Halberg P. *et al.*: Levamisole-induced nephropathy. Lancet, 2, 737, 1978. - 12. Berger R., Bernheim A., Feingold J. *et al.*: The effects of levamisole on human chromosomes. Pathol. Biol., 28, 323-324, 1980. - 13. Aleksić N.: Genotoksikološka *in vitro* karakterizacija nekih savremenih antiparazitika. Doktorska disertacija, Beograd, 1993. - 14. Hsu T. C., Patton J. I.: Bone marrow preparations for chromosome studies. In Benirschke, V. (ed) Comparative mammalian cytogenetics, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York., 454-460, 1969. - 15. Zimonjić D., Savković B., Anđelković M.: Genotoksični agensi: efekti, principi i metodologija detekcije. Naučna knjiga, Beograd, 1990. - 16. Seabright M.: A rapid banding technique for human chromosomes, Lancet II, 971, 1971. - 17. Madoc-Jones H., Mauro F.: Site of action of cytotoxic agents in the cell life cycle. Antineoplastic and Immunosuppressive 1, Edited by A.C. Sartorellia and G. Johns, Springer-Verlag New York, 205-219, 1974. - 18. Beutler E.: Chemical toxicology of the erythrocyte. Toxicology of the Blood and Bone Marrow. Edited by R. D. Irons. Raven press-New York, 39-50.S, 1985. - 19. Vučinić Marijana: Komparativno izučavanje površinski aktivnih dezinfekcionih sredstava na citogenetičke promene limfocita čoveka i svinja „*in vitro*”. Magistarska teza, Beograd, 1992. - 20. Vučinić Marijana, Soldatović B., Stanimirović Z.: Novi citogenetički efekti „Rosola”. U zborniku radova V simpozijum DDD o zaštiti životne sredine, Subotica –Palic, 1994. - 21. Stanimirović Z., Soldatović B., Dimitrijević S., Vučinić Marijana, Đokić D.: Aberantni kariotip laboratorijskog kunića (*Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus, 1758) sa heterozigotnim prvim parom autozoma. Acta Veterinaria, 43, 55-60, 1994. - 22. Stanimirović Z., Vučinić Marijana, Soldatović B., Vučicević M.: Veliki akrocentrični hromozom iz prvog para autozoma prirodnih populacija vrste *Mus musculus*, Linnaeus 1758. Acta Veterinaria, 45, 155-160, 1995. - 23. Mihajlović A.: Ispitivanja genotoksičnog uticaja levamizol hidrohlorida na ćelije kostne srži u *in vivo* uslovima kod *Rattus norvegicus*, Wistar soja. Magistarska teza Univerzitet u Beogradu, 1996. - 24. Stanimirović Z., Vučinić Marijana, Soldatović B.: Cytogenetic changes in bone marrow cells of Wistar rats induced by levamisole hydrochloride. Acta Veterinaria, 48, 255-262, 1998. - 25. Bakrač T.: Ispitivanje genotoksičnosti nekih savremenih antihelminatika mikronukleus testom *in vitro*. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, 1996.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF GENOTOXIC POTENTIAL OF LEVAMISOLE HYDROCHLORIDE IN BONE MARROW CELLS OF WISTAR RATS

M. Kulic, Z. Stanimirovic, Biljana Markovic, S. Ristic

An experiment was performed under *in vivo* conditions on bone marrow cells of Wistar rats. The following doses of levamisole hydrochloride were tested: a therapeutic dose of 2.2 mg/kg bm, a dose of 4.4 mg/kg bm, LD₅₀-25% mg/kg bm, and LD₅₀-75% mg/kg bm. We followed the effect of levamisole hydrochloride on kinetics of the cell cycle and the appearance of structural and numeric changes in chromosomes in bone marrow cells. The therapeutic dose of levamisole of 2.2 mg/kg bm exhibited a capability to increase mitotic activity in the observed cells, thus confirming knowledge of the immunostimulative effect of this dose of the medicine under *in vivo* conditions. The other tested doses of levamisole in this experiment, observed in comparison with the control group, had an opposite effect, namely, they caused a reduction in the mitotic activity of bone marrow cells. All the examined doses *in vivo* exhibited the ability to induce numeric (aneuploid and polyploid) and structural (lesions, breaks and insertions) chromosomal aberrations. It can be concluded on the grounds of these findings that the examined doses have a genotoxic effect.

Key words: Genotoxicity, cytotoxicity, aneuploid, polyploid lesions, breaks, insertions

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛЕВАМИЗОЛЬ ГИДРОХЛОРИДА НА КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС WISTAR ШТАММА

М. Кулич, З. Станимирович, Биляна Маркович, С. Ристич

Эксперимент выведен в *in vivo* условиях на клетках костного мозга крыс Wistar штамма. Тестированы следующие дозы левамизоль гидрохлорида а именно: терапевтическая доза от 2,2 мг/кг, м. т., затем доза от 4,4 мг/кг м. т., LD₅₀-25% мг/кг м. т. Слежено влияние левамизоль гидрохлорида на кинетику клеточного цикла и явление структурных и нумерических изменений на хромосомах в клетках костного мозга. Терапевтическая доза левамизоля от 2,2 мг/кг м. т. показала способность увеличения митотической активности наблюдаемых клеток, так подкрепляя знания о иммуностимулирующем эффекте этой дозы лекарства в *in vivo* условиях. Остальные тестированные дозы левамизоля в этом эксперименте нами наблюано в отношении контрольной группы, имели противоположный эффект т.е. обусловили уменьшение митотической активности клеток костног мозга. Все испытанные дозы *in vivo* показывают способность индукции нумерических (анеуплодии и полиплоидии) и структурных (повреждения, разрывы и инсерции) aberrаций хромосом. На основе этого можно следать вывод, что испытанные дозы имеют генотоксический эффект.

Ключевые слова: генотоксичность, цитотоксичность, анеуплоидии, полиплоидии, повреждения, разрывы, инсерции