

**IN VIVO ISPITIVANJE KLASTOGENOG EFEKTA LEVAMIZOL
HIDROHLORIDA NA ČELIJAMA KOSTNE SRŽI MIŠEVA
BALB/c SOJA*****IN VIVO INVESTIGATIONS OF CLASTOGENIC EFFECT OF
LEVAMISOLE HYDROCHLORIDE ON BONE MARROW CELLS OF
BALB/c MICE****M. Kulić, Z. Stanimirović, S. Ristić, Biljana Marković****

Obavljena su citotoksična i genotoksična ispitivanja levamizol hidrohlorida (2.2 mg/kg t.m., 4,4 mg/kg t.m, LD₅₀-25% mg/kg t.m. i LD₅₀-75% mg/kg t.m) na ćelijama kostne srži miša BALB/c soja. Praćen je uticaj levamizol hidrohlorida na kinetiku ćelijskog ciklusa i pojavu 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. usloville su smanjenje mitotske aktivnosti ćelija kostne srži. Sve ispitivane doze in vivo pokazuju sposobnost indukcije numeričkih (aneuploidije i polipleidije) i strukturnih (lezije, prekidi i insercije) aberacija hromozoma. Na osnovu toga može da se zaključi da ispitivane doze imaju genotoksični efekat.

Ključne reči: citotoksičnost, genotoksičnost, mitotski indeks, strukturne aberacije, numeričke aberacije

Uvod / Introduction

Levamizol hidrohlorid je dejstvena supstancija većeg broja preparata koji se primenjuju u lečenju nematodoza životinja i čoveka. Naročito je efikasan u lečenju infekcija gastrointestinalnog i respiratornog trakta izazvanih predstavni-

* Rad primljen za štampu 24. 10. 2005. godine

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

cima klase *Nematoda*. Pored ove primarne funkcije, poznato je i njegovo imuno stimulatивно dejstvo [1, 2], kao i sposobnost smanjenja učestalosti pojavljivanja tumora i metastaza kod tretiranih životinja [3, 4, 5]. Levamizol hidrohlorid poseduje i toksični efekat izazivajući kod pasa hemolitičku 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].

Grupa autora [12, 13] je ispitivala genotoksičnost levamizol hidrohlorida i ustanovili su da primenjene doze u *in vivo* i *in vitro* eksperimentu povećavaju učestalost nastajanja SCE (Sister Chromatid Exchange – razmena sestričkih hromatida), hromozomskih i hromatidnih prekida.

Materijal i metode / *Materials and methods*

U eksperimentu je korišćen laboratorijski beli miš BALB/c soja vrste *Mus musculus*, muškog pola, uzrasta od 45 do 50 dana i telesne mase od 18 do 20 grama. Formirano je pet eksperimentalnih grupa: kontrola (dobijala je fiziološki rastvor), I eksperimentalna grupa tretirana je terapijskom dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m, II eksperimentalna grupa tretirana je dozom levamizol hidrohlorida od 4,4 mg/kg t.m, III eksperimentalna grupa tretirana je dozom levamizol hidrohlorida od LD₅₀-25 posto mg/kg t.m i IV eksperimentalna grupa tretirana je dozom levamizol hidrohlorida od LD₅₀ do 75 posto mg/kg t.m. Izvedeno je osam eksperimentalnih ciklusa sa intragastričnom sedmodnevnom aplikacijom ispitivanih doza leka.

Nakon sedmodnevnog tretmana, životinje su žrtvovane, a materijal za citogenetičke analize dobijen je u skladu sa procedurom Hsu i Pattona [14], modifikovano po Zimonjiću *et al.* [15]. G-banding hromozoma je obavljen po metodi Seabrighta *et al.* [16], modifikovano po Zimonjiću *et al.* [15]. Procena citogenetičkih efekata, kao i sposobnost levamizol hidrohlorida da indukuje transformacije kriotipa, obavljena je na ćelijama kostne srži. U tu svrhu analizirano je 100 metafaznih figura po životinji. Statistička obrada podataka urađena je primenom Studentovog *t*-testa.

Rezultati i diskusija / *Results and discussion*

Praćena je mitotička aktivnost ćelija kostne srži ispitivanih životinja za svaku primenjenu dozu. Rezultati ispitivanja uticaja odgovarajućih doza levamizol hidrohlorida na vrednosti mitotskog indeksa, kao mere proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži miša prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Srednje vrednosti mitotske aktivnosti ćelija kostne srži miševa BALB/c soja kontrolne grupe i eksperimentalnih grupa pri tretmanu rastućim dozama levamizol hidrohlorida /

Table 1. Mean values of mitotic activity of bone marrow cells in BALB/c mice of control group and experimental groups treated with increasing doses of levamisole hydrochloride

Ponavljanja / Repetitions	Negativna kontrola / Negative 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	6,25	8,50	4,32	3,41	3,15
2	6,15	8,28	3,60	3,68	3,00
3	5,57	7,75	4,00	3,52	3,10
4	5,40	7,15	4,40	3,78	2,80
5	5,90	7,32	3,10	2,81	2,60
6	6,30	8,62	4,20	3,89	3,20
7	6,00	7,82	3,81	2,91	2,30
8	6,05	8,20	4,10	2,99	2,40
X	5,95	7,95	3,94	3,37	2,82

Iz navedene tabele uočava se da doza levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. povećava proliferativnu aktivnost ćelija kostne srži, dok ostale doze smanjuju proliferativnu aktivnost ćelija kostne srži. U kontrolnoj grupi životinja, srednja vrednost mitotičke aktivnosti (mitotski index=MI) bila je 5.95. Kod životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. srednja vrednost MI bila je 7.95. U grupi životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 4,4 mg/kg t.m. srednja vrednost MI je 3.94. Kod životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od LD₅₀-25 posto mg/kg t.m. srednja vrednost MI bila je 3.37, dok je kod doze levamizol hidrohlorida od LD₅₀-75 posto mg/kg t.m. srednja vrednost MI bila 2.82.

T-testom smo utvrdili visoko statistički značajne razlike ($p < 0,001$) u povećanju vrednosti mitotskog indeksa između kontrolne grupe životinja koje su primale fiziološki rastvor i grupe miševa tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. Takođe, primenom t-testa utvrđene su visoko statistički značajne razlike u smanjenju vrednosti mitotskog indeksa kod svih eksperimentalnih grupa miševa u odnosu na kontrolu, kao i između samih eksperimentalnih grupa miševa.

Ovako dobijeni rezultati ispitivanja proliferativne aktivnosti ćelija kostne srži, u zavisnosti od doze, mogu da se tumače trojako:

1. Dobijeni rezultati ukazuju na imunostimulativni efekat levamizol hidrohlorida, jer on podstiče umnožavanje ćelija kostne srži, što se manifestuje povećanjem vrednosti mitotskog indeksa. Ovako shvatanje je ujedno u saglasnosti sa nalazima Symoentsa [1], i Al-Ibrahima [2], mada smatramo da za ovakvo tvrđenje treba da se obave uporedna fiziološko-imunološka, toksikološka i geno-

toksikološka istraživanja primenom širokog spektra priznatih naučno-istraživačkih metoda.

2. Dobijeni 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 ostaju samo one ćelije koje su najmanje osetljive ili neosetljive na datu dozu u određenoj fazi ćelijskog ciklusa. Manje osetljive ćelije uvećavaju svoju ćelijsku populaciju, jer nesmetano prolaze kroz ćelijsku deobu, sve dok se tokom vremena (produžavanjem vremena uticaja agensa) 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 miša tretiranih ispitivanim dozama levamizol hidrohlorida.

3. Dobijeni rezultati, odnosno 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 (tabela 2).

Kod životinja tretiranih dozom levamizol hidrohlorida od 2,2 mg/kg t.m. procentne vrednosti numeričkih aberacija tipa aneuploidija iznose 0.87 posto i poliploidija 0.00 posto, dok za strukturne hromozomske aberacije tipa lezija 0.71 posto, prekida 0.41 posto i insercija 0.00 posto. Kod životinja tretiranih levamizolom od 4,4 mg/kg t.m. vrednost ovih parametara su: numeričke aberacije tipa aneuploidija 11.18 posto, poliploidija 1.75 posto, dok za strukturne hromozomske aberacije tipa lezija 0.92 posto, prekida 1.77 posto i insercija 1.50 posto. Prilikom tretmana životinja sa dozom levamizola od LD₅₀-25 posto mg/kg t.m. vrednost ovih parametara su bile, za numeričke aberacije tipa aneuploidija 18.54 posto, poliploidija 1.73 posto, strukturne aberacije tipa lezija 1.06 posto, prekida 1.08 posto i insercija 6.40 posto. Konačno, kod životinja tretiranih levamizolom od LD₅₀-75 posto mg/kg t.m. procentne vrijednosti ispitivanih promena su bile, za numeričke aberacije tipa aneuploidija 21.69 posto, poliploidija 3.00 posto, strukturne aberacije tipa lezija 5.50 posto, prekida 1.85 posto i insercija 6.58 posto.

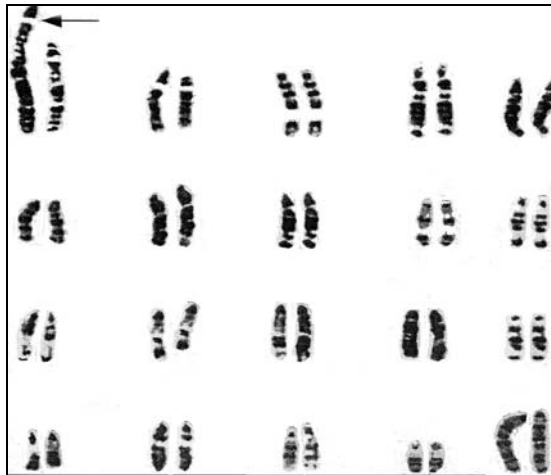
Citogenetičkom analizom je utvrđeno da intragastrični sedmodnevni tretman rastućim dozama levamizol hidrohlorida uzrokuje visoko statistički signifikantno povećanje ($p < 0,001$) pojavljivanja numeričkih i strukturnih promena na hromozomima u ćelijama kostne srži u odnosu na kontrolu. Takođe, zapazili smo da što su doze leka veće, to je i njihov efekat na naslednu osnovu veći. Posebno je značajno da se istakne pojavljivanje insercija na hromozomu prvog para auto-

Tabela 2. Citogenetički parametri ćelija kostne srži kod kontrolne i eksperimentalnih grupa miševa /
Table 2. Cytogenetic parameters of bone marrow cells in control and experimental groups of mice

Citogenetički parametri / Cytogenetic parameters	GRUPE MIŠEVA / GROUP OF MICE									
	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.		
	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	X±SD i %	
Aneuploidije / Aneuploid	4,50±1,07 0,75	5,25±1,04 0,87	67,13±3,31 11,18	111,25±6,37 18,54	130,13±4,02 21,69					
Poliploidije / Polyploid	0,00±0,00 0,00	0,00±0,00 0,00	10,50±1,31 1,75	10,38±1,77 1,73	18,00±1,51 3,00					
Lezije / Lesions	3,25±0,71 0,54	4,25±0,71 0,71	5,50±0,93 0,92	6,37±1,06 1,06	33,00±2,07 5,50					
Prekidi / Breaks	1,38±0,74 0,23	2,50±0,71 0,41	10,63±1,06 1,77	6,50±0,76 1,08	11,13±1,64 1,85					
Insercije / Insertions	0,00±0,00 0,00	0,00±0,00 0,00	9,00±1,60 1,50	38,38±1,69 6,40	39,50±6,72 6,58					
Ukupan broj ćelija sa promenama / Total number of cells with changes	9,12±1,89 1,52	12,00±1,98 2,00	102,75±4,06 17,12	172,88±7,73 28,81	231,76±16,23 38,62					

zoma, nastalu kao posledica indukovane amplifikacije segmenta između traka q 21 i q 22, što predstavlja specifičnu citogenetičku promenu nastalu pod uticajem levamizol hidrohlorida [21, 22, 24].

Na osnovu dobijenih rezultata, došli smo do navedenih zaključaka:



Slika 1. Aberantni kariotip miša BALB/c soja tretiran dozom levamizol hidrohlorida od 4,4 mg/mg t.m. sa dve insercije na prvom paru autozoma /

Figure 1. Aberrant karyotype of BALB/c mouse treated with a dose of levamisole hydrochloride of 4.4 mg/kg bm, with two insertions in the first pair of autosomes

Zaključak / Conclusion

1. Terapijska doza levamizol hidrohlorida 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.

2. Ostale ispitivane doze levamizola korišćene u ovom eksperimentu posmatrano u odnosu na kontrolnu grupu, imale su suprotan efekat, tj. uslovile su smanjenje mitotske aktivnosti ćelija kostne srži.

3. Sve ispitivane doze *in vivo* pokazuju sposobnost indukcije numeričkih (aneuploidije i polipleidije) i strukturnih (lezije, prekidi i insercije) aberacija hromozoma.

Na osnovu toga može da se zaključi da ispitivane doze 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* effects 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 DG. 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 CD. 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, Palić, 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 genotoksicnog 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., Marijana Vučinić, Soldatovi B.: Cytogenetic changes in bone marrow cells of Wistar rats induced by levamisole hydrochloride. *Acta Veterinaria*, 48, 255-262, 1998. - 25. Bakrač T.: Ispitivanje genotoksicnosti nekih savremenih antihelminatika mikronukleus testom *in vitro*. Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, 1996.

ENGLISH

IN VIVO INVESTIGATIONS OF CLASTOGENIC EFFECT OF LEVAMISOLE HYDROCHLORIDE ON BONE MARROW CELLS OF BALB/c MICE

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

Cytotoxic and genotoxic examinations were performed of the effect of levamisole hydrochloride (2.2 mg/kg bm, 4.4 mg/kg bm, LD₅₀-25% mg/kg bm and LD₅₀-75% mg/kg bm) on bone marrow cells of mice of the BALB/c strain. The effect of levamisole hydrochloride on kinetics of the cellular cycle and the appearance of structural and numerical changes in chromosomes of bone marrow cells were followed. The therapeutic dose of levamisole of 2.2 mg/kg bm showed the ability to increase the mitotic activity of 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, i.e. they caused a reduction in the mitotic activity of bone marrow cells. All the examined doses *in vivo* showed the ability of inducing numeric (aneuloid and polyploid) and structural (lesions, breaks and insertions) chromosomal aberrations. On this basis, it can be concluded that the examined doses have a genotoxic effect.

Key words: Cytotoxicity, genotoxicity, mitotic index, structural aberrations, numerical aberrations

РУССКИЙ

IN VIVO ИСПЫТАНИЕ КЛАСТОГЕННО ЭФФЕКТА ЛЕВАМИЗОЛЬ ГИДРОХЛОРИДА НА КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ BALB/c ШТАММА

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

Сделаны цитотоксические и генотоксические испытания левамизоль гидрохлорида (2.2 мг/кг, м.т., 4,4 мг/кг м.т., LD₅₀-25% мг/кг м.т. и LD₅₀-75% мг/кг м.т.) на клетках костного мозга мыши *BalB/c* штамма. 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 сознания о иммуностимулирующем эффекте этой дозы лекарства в *in vivo* условиях. Остальные тестируемые дозы левамизоля в этом эксперименте нами наблюдали в отношении контрольной группы, имели противоположный эффект т.е. обусловили уменьшение митотической активности клеток костного мозга. Все испытанные дозы *in vivo* показывают способность индукции нумерических (анеуплоидии и полиплоидии) и структурных (повреждения, разрывы и инсерции) aberrаций хромосом. На основе этого можно сделать вывод, что испытанные дозы имеют генотоксический эффект.

Ключевые слова: цитотоксичность, генотоксичность, митотический индекс, структурные aberrации, нумерические aberrации