

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА – РАПИТАЛАМ

¹Авдеева Н.В., ¹Покровский М.В., ¹Корокин М.В.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, e-mail: 7400468@mail.ru

Исследование проводилось на базе центра доклинических исследований Белгородского государственного национального исследовательского университета. В ходе исследования проведено выявление и количественная оценка щелоче-лабильных сайтов и разрывов ДНК в лейкоцитах периферической крови мышей-самцов. В основе данного метода лежит оценка целостности ДНК в лейкоцитах цельной крови животных. Для анализа использовали периферическую кровь мышей. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали показатель %TDNA - %ДНК в хвосте «кометы». А также изучалась цитогенетическая активность лекарственного средства «Рапиталам» с помощью микроядерного теста в полихроматомных эритроцитах костного мозга. Работа проводилась на мышцах *in vivo*. Рапиталам вводился животным в соответствии с двумя схемами: однократно в субтоксической дозе (1/5 от полудетальной дозы, равной 413 мг/кг) и 4 дня внутрижелудочного введения терапевтической дозы 3 мг/кг. Группе негативного контроля вводили по 0.3 мл 5% раствора диметилсульфооксида, а в качестве позитивного контроля животных облучали в дозе 20 сГр рентгеновского излучения, обладающего известным цитогенетическим действием. Цитогенетическое повреждение клеток костного мозга оценивалось по появлению полихроматофильных эритроцитов, содержащих микроядра. В результате данного исследования установлено, что уровень повреждений ДНК лейкоцитов крови (%TDNA) в группах при острой дозе препарата Рапиталам статистически достоверно отличается от таковых значений в контрольной группе животных, что свидетельствует о наличии ДНК-повреждающей активности у препарата Рапиталам в острой дозе. Анализ уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови (%TDNA) в группах животных, получавших терапевтическую дозу субстанции Рапиталам, показал достоверные различия между животными, получавшими растворитель (диметилсульфоксид), и животными, получавшими растворенный в диметилсульфооксиде Рапиталам. Обращает на себя внимание тот факт, что для терапевтической дозы наблюдается существенное снижение уровня повреждений в ДНК как по сравнению с острой дозой, так и группами, получавшими только растворитель. Это позволяет сделать предположение о том, что препарат Рапиталам в терапевтической дозе может оказывать влияние на процессы внутриклеточного метаболизма и выступать в качестве протектора. В результате проведенных исследований не было выявлено цитогенетической активности препарата Рапиталам в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при однократном в субтоксической дозе и 4-дневном в терапевтической дозе пероральном введении животным.

Ключевые слова: Рапиталам, болезнь Паркинсона, метаболитные глутаматные рецепторы, модуляторы mglur4 рецепторов цитогенетической активности рапиталама, микроядерный тест, полихроматофильные эритроциты костного мозга, разрыв ДНК в лейкоцитах, щелоче-лабильные сайты.

STUDY OF THE MUTAGENIC ACTION OF THE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE OF THE DRUG - RAPITALAM, WHICH IS A MODULATOR OF THE MGLUR4 RECEPTOR

¹Avdeeva N.V., ¹Pokrovskiy M.V., ¹Korokin M.V.

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: 7400468@mail.ru

The research was conducted at the centre for preclinical studies, Belgorod State National Research University, which carried out the identification and quantitative assessment of alkali-labile sites and DNA strand breaks in leukocytes of peripheral blood of male mice treated with Rapitalam. The method is based on the assessment of the integrity of DNA in leukocytes of the whole blood of animals. Rapitalam was administered to animals orally according to 2 schemes: a single acute dose (413 mg/kg, which corresponds to 1/5 LD50 dose) and once daily in a therapeutic dose (3 mg/kg) for 4 days. For analysis we used peripheral blood of mice. As an indicator of DNA damage there was used the value of %TDNA. The goal of the experiment was to study the cytogenetic activity of the drug 'Rapitalam' with the help of the polychromatic micronucleus test in erythrocytes of the bone marrow. Rapitalam is a modulator of mgluR4 receptors - a kind of metabotropic glutamate receptors. The work was carried out on mice *in vivo*. The drug was administered according to two schemes: a single sub-dose (1/5 of the lethal dose, equal to 413 mg/kg) and 4 days of intragastric injection of a therapeutic dose of 3 mg/kg. The

negative control group of animals received 0.3 ml of a 5% solution of dimetilsulfoksid, while the positive control animals were irradiated at a dose of 20 cGy of X-rays which is known to have a cytogenetic effect. The cytogenetic damage of bone marrow cells was assessed by the appearance of polychromatic erythrocytes containing micronuclei. Rapitalam is a drug that is a modulator of the mglur4 receptor - a kind of metabotropic glutamate receptors. Into BelSU Clinical and Preclinical Studies Centre there was performed experimental research, The results of this study established that the level of DNA damage of blood leukocytes (%TDNA) in the groups with acute dose of Rapitalam statistically significantly different from those values in control group of animals, indicating the presence of DNA-damaging activity of Rapitalam in the acute dose. Analysis of the level of DNA damage of blood leukocytes (%TDNA) in groups of animals treated with therapeutic dose of Rapitalam showed significant differences between animals treated with solvent (dimethyl sulfoxide) and animals treated with Rapitalam dissolved in DMSO. Conspicuous is the fact that there is observed a significant reduction in DNA damage in the therapeutic dose of Rapitalam as compared to the acute dose and the group receiving only the solvent. This suggests that Rapitalam in a therapeutic dose can influence on the processes of intracellular metabolism and acts as a protector. The experiment did not show any cytogenetic activity of Rapitalam in the mice bone marrow polychromatic erythrocytes after the drug was administered orally in a single subtoxic dose and a 4-day therapeutic dose.

Keywords: rapitalam, parkinson's disease, metabotropic glutamate receptors, the mglur4 receptors modulator, cytogenetic activity of the drug 'Rapitalam', polychromatic erythrocytes in the bone marrow, DNA strand breaks in leukocytes, alkali-labile site.

Основными признаками болезни Паркинсона, нейродегенеративного заболевания головного мозга, являются нарушение координации движений, скованность и замедленность при ходьбе, тремор рук, ног, подбородка. Чаще всего болезнь Паркинсона поражает людей пожилого возраста [3]. Ее развитие напрямую обусловлено гибелью нейронов, которые несут ответственность за выработку дофамина. Вначале этот процесс происходит в черной субстанции, а затем затрагивает и прочие отделы центральной нервной системы. Основным подходом в лечении болезни Паркинсона в настоящее время является заместительная терапия дофамина. Однако препараты леводопы не замедляют продолжающуюся дегенерацию дофаминергических нейронов, функциональная активность которых обуславливает превращение леводопы в дофамин под действием дофа-декарбоксилазы. Также препараты леводопы имеют достаточно большое количество побочных эффектов, а со временем дозировка должна увеличиваться, иначе они перестают действовать [11]. Поэтому перед лечащим врачом пациента, страдающего болезнью Паркинсона, стоят две основные задачи: приостановить отмирание ганглий, содержащих дофамин, и уменьшить проявление симптомов болезни [5]. Прогресс в понимании анатомии и функции базальных ганглиев дал возможность для разработки новых препаратов для лечения и замедления прогрессирования болезни Паркинсона [9]. Хотя болезнь Паркинсона и пытаются лечить, специалистам удается лишь частично устранить ее симптомы, но не саму причину. Сегодня все усилия ученых направлены на поиски лекарственных средств, которые не только смягчают симптомы болезни, но и останавливают дегенеративные процессы, ответственные за ее прогрессирование. Так, рецепторы глутамата были предложены в качестве перспективных терапевтических мишеней, поскольку воздействие на них позволяет менять как нормальную, так и патологическую нейротрансмиссию, характерную для

паркинсонического мозга.

Рапиталам является модулятором mglur4 рецепторов [8]. Mglur4 это разновидность метаботропных рецепторов глутамата [10]. Рецепторы глутамата играют огромную роль в регуляции функционирования и развития нервной системы. Например, глутамат играет роль в гибели нейронов в условиях гипоксии – в таких условиях транспортёр глутамата не способен осуществлять обратный захват нейромедиатора в клетку. Поэтому при массовой гибели нервных клеток количество высвободившегося глутамата растёт в геометрической прогрессии, вызывая эксайтотоксичное возбуждение в ещё живых нейронах, которые тоже могут умереть из-за этого. Глутаматэргическая система мозга – это одна из самых широкоспециализированных сигнальных систем в нашем мозге и нервной системе, и её роль действительно сложно переоценить [9]. Вышеизложенные данные указывают на целесообразность доклинического изучения Рапиталама, модулятора mGluR4 рецепторов, для создания на его основе лекарственного средства, обладающего антипаркинсоническим действием [4].

Цель исследования

Выявление и количественная оценка щелоче-лабильных сайтов и разрывов ДНК в лейкоцитах периферической крови мышей-самцов, а также потенциальной цитогенетической активности фармацевтической субстанции препарата Рапиталам в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на самцах нелинейных мышей популяции SHK весом 24-28 г. Источник животных – виварий Белгородского государственного университета. Уход и содержание животных производился в соответствии с нормативами, данными в руководстве [7], и правилами [1]. Время адаптации составило 10-14 дней. Животные содержались в условиях центра доклинических исследований НИУ БелГУ, на стандартной диете, при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище. В каждой экспериментальной и контрольной группе было по 6 рандомизированно распределенных животных. В качестве негативного контроля использовали животных, которым вводился растворитель. В этой серии эксперимента исследовали вещество Рапиталам (формула - $C_{20}H_{18}ClN_3O_3$, химическое название - *N*-[(4-chlorophenyl)methyl]-1,6-dihydro-4-methoxy-1-(2-methylphenyl)-6-oxo-3-pyridazinecarboxamide) при однократном (субтоксической) и 4-дневном пероральном введении терапевтической для человека доз. Субтоксическая доза рассчитывалась как 1/5 от полулетальной дозы, равной 413 мг/кг. Терапевтическая доза рассчитывалась из концентрации 3 мг/кг, которая была выявлена в более ранних исследованиях по фармакокинетике. Исследуемое соединение – фармацевтическая

субстанция препарата Рапиталам - растворяли в диметилсульфоксиде до конечной концентрации растворителя 5%.

Для оценки целостности ДНК в лейкоцитах цельной крови животных использовали периферическую кровь мышей, получаемую при надрезании кончика хвоста. Взятие аликвот крови (10 мкл) у каждого животного проводилось не позднее 24 ч после завершения приема препарата. Периферическую кровь отбирали в пробирки, содержащие фосфатный буфер (136.7 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ KH₂PO₄, pH 7.2-7.4) и 1 мМ ЭДТА, перемешивали на вортексе для предотвращения свертывания и сразу же использовали для приготовления агарозных слайдов [10].

Аликвоты разведенной крови смешивали с равным объемом 1%-ной легкоплавкой агарозы (Sigma Chem. Co., США) при температуре 37 °С и наносили на подготовленный агарозный слой. После застывания агарозы, содержащей клетки, сверху наносили новый слой 0.5%-ной легкоплавкой агарозы. Слайды помещали в лизирующий раствор (2.5 моль/л NaCl, 0.1 моль/л ЭДТА, 0.01 моль/л трис-HCl, pH 10, 1% Тритон X-100) при 4-6 °С на 1 ч. Затем слайды перемещали на 20 мин в щелочной раствор (0.3 моль/л NaOH, 0.001 моль/л ЭДТА, pH >13), переносили в электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Россия) и подвергали электрофорезу в свежей порции щелочного раствора (250 мл) в течение 20 мин при 4-6 °С (напряжение 27 В, сила тока 260-270 мА, напряженность электрического поля 2 В/см).

После электрофореза слайды промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 1 ч в растворе, содержащем 2.0 мкг/мл бромистого этидия. Препараты анализировали, используя флуоресцентный микроскоп «ЛЮМАМ И-3» («ЛОМО», Санкт-Петербург, Россия). Захват изображений проводили цифровым фотоаппаратом Nikon CoolPix 995 (Япония) с последующей передачей их в компьютер. Обработку микрофотографий выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, где реализованы алгоритмы расчета стандартных параметров «комет». На каждую экспериментальную точку брали по 6 мышей, готовили по 3 слайда с цельной кровью от каждого животного и фотографировали по 50 «комет» на слайде, то есть на каждый микропрепарат рандомизированно анализировали не менее 150 ДНК-комет без наложений хвостов. Анализ параметров ДНК-комет проводился с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали показатель %TDNA - % ДНК в хвосте «кометы». Статистический анализ проводили с использованием критерия Стьюдента ($p < 0.05$). Средние значения представлены как $M \pm SD$.

Метод определения цитогенетической активности фармацевтической субстанции препарата Рапиталам в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. В экспериментальной группе

каждому животному вводили перорально по 0.3 мл раствора вещества, группе негативного контроля вводили по 0.3 мл 5% раствора диметилсульфоксида, а в качестве позитивного контроля животных облучали в дозе 20 сГр рентгеновского излучения, обладающего известным цитогенетическим действием. В ходе исследования оценивалось цитогенетическое повреждение клеток костного мозга по появлению полихроматофильных эритроцитов, содержащих микроядра. Эвтаназию мышей проводили декапитацией через 24 ч после введения исследуемого вещества и облучения. По стандартной методике, рекомендованной в соответствующих руководствах, готовили цитологические препараты костного мозга [1]. Препараты окрашивали краской Гимза по Романовскому. Подсчет полихроматофильных эритроцитов с микроядрами осуществляли при помощи светового микроскопа с иммерсионным объективом при увеличении в 1000 раз. На каждую экспериментальную точку использовали 6 животных, анализировали по 3 препарата от одной мыши по 1000 полихроматофильных эритроцитов в каждом препарате. Критерием уровня цитогенетического повреждения служил процент клеток с микроядрами. При статистической обработке вычисляли стандартную ошибку среднего, а статистическую значимость между группами оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты

Данные о показателях ДНК-повреждений для индивидуальных мышей, определенных после приема исследуемого вещества Рапиталам и/или 5% раствора диметилсульфоксида (ДМСО), приведены в таблицах 1 и 2. В таблице 3 приведены средние показатели ДНК-повреждений по группам при приеме препарата и/или растворителя для этого препарата.

Таблица 1

Уровень ДНК-повреждений в клетках периферической крови животных при приеме ДМСО и/или субстанции Рапиталам в острой дозе (M ± SD)

ДМСО			Рапиталам		
Номер животного	Проанализировано клеток	%TDNA	Номер животного	Проанализировано клеток	%TDNA
1	150	12,77±1,3	7	150	24,5±6,5
2	150	17,75±8,4	8	150	27,37±3,5
3	150	21,34±5,4	9	150	23,63±4,0
4	150	19,5±2,5	10	150	24,51±5,3
5	150	15,89±3,9	11	150	22,07±9,1
6	150	11,81±8,5	12	150	17,39±3,8

Примечание: нет достоверных различий между значениями %TDNA для ДМСО и субстанции Рапиталам у индивидуальных животных.

Таблица 2

Уровень ДНК-повреждений в клетках периферической крови животных при приеме ДМСО и/или субстанции Рапиталам в терапевтической дозе ($M \pm SD$)

ДМСО			Рапиталам		
Номер животного	Проанализировано клеток	%TDNA	Номер животного	Проанализировано клеток	%TDNA
1	150	10,69±2,4	7	150	2,06±1,6*
2	150	16,16±5,8	8	150	3,37±1,0
3	150	14,04±5,1	9	150	3,99±0,3
4	150	16,34±4,4	10	150	1,22±0,6*
5	150	26,62±5,4	11	150	1,00±0,3*
6	150	16,78±5,5	12	150	1,56±0,5*

Примечание: * - достоверно отличается от значения %TDNA для ДМСО ($p < 0,05$).

Таблица 3

Влияние субстанции Рапиталам на уровень повреждений ДНК в лейкоцитах периферической крови мышей ($M \pm SD$)

Параметры	Острая доза, 1/5 LD50, 413 мг/кг		Терапевтическая доза, 3 мг/кг	
	%TDNA	p	%TDNA	p
Рапиталам	23,25 ± 3,35	0,008	2,2 ± 1,22 *	0,0009
ДМСО, 5%	16,51 ± 3,75		16,77 ± 5,3	

Примечание: различия между значениями %TDNA для ДМСО и субстанции Рапиталам как в острой дозе, так и в терапевтической дозе достоверны;

* - достоверно отличается от значения %TDNA для острой дозы субстанции Рапиталам ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание тот факт, что для терапевтической дозы наблюдается существенное снижение уровня повреждений в ДНК как по сравнению с острой дозой, так и группами, получавшими только растворитель. Это позволяет сделать предположение о том, что субстанция Рапиталам в терапевтической дозе может оказывать влияние на процессы внутриклеточного метаболизма и выступать в качестве протектора.

Основные показатели влияния Рапиталама на выход полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (ПХЭ с МЯ) в костном мозге мышей при однократном и 4-дневном пероральном вариантах воздействия представлены в таблице 4.

Таблица 4

Выход полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (ПХЭ с МЯ) в костном мозге

мышей при однократном и 4-дневном пероральном вариантах

Варианты	Число мышей	Число анализ ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	ПХЭ с МЯ, %
Контроль	6	18000	42	0,23±0,015
5% ДМСО однократно per os	6	18000	47	0,26±0,015
Рапиталам однократно per os в субтоксической дозе	6	18000	53	0,29±0,007
5% ДМСО 4-кратно per os	6	18000	49	0,27±0,014
Рапиталам 4-кратно per os в терапевтической дозе	6	18000	53	0,30±0,014
20 сГр рентгеновского излучения	6	18000	175*	0,97±0,093*

В результате проведенных исследований не было выявлено цитогенетической активности субстанции Рапиталам в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при однократном в субтоксической дозе и 4-дневном в терапевтической дозе пероральном введении животным. Значения количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами не отличались достоверно от необработанного контроля и контроля растворителя, достоверное различие наблюдалось при облучении в дозе 20 сГр рентгеновского излучения (позитивный контроль).

Выводы

1. Анализ уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови (%TDNA) в группах при острой дозе вещества Рапиталам (табл. 3) показал достоверные различия между животными, получавшими растворитель, и мышами, получавшими растворенный в ДМСО препарат Рапиталам ($p = 0,008$). Это свидетельствует о наличии ДНК-повреждающей активности у Рапиталама в острой дозе.
2. Анализ уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови (%TDNA) в группах при терапевтической дозе субстанции Рапиталам показал достоверные различия между животными, получавшими растворитель, и животными, получавшими растворенное в ДМСО вещество Рапиталам ($p = 0,0009$) (табл. 3).
3. Анализ цитогенетической активности Рапиталама в полихроматофильных эритроцитах костного мозга показал отсутствие таковой как при проведении исследования на мышах при однократном введении в субтоксической дозе и при 4-дневном пероральном введении в терапевтической дозе.
4. Субстанция Рапиталам статистически значимо не влияет на количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге.

Список литературы

1. ГОСТ 31886-2012. Принципы надлежащей лабораторной практики [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200101144>.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян и др. - М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
3. Avdeeva N.V., Nikitina V.A., Kochkarova I.S., Litvinova A.S. The possibility of administration of glutamate receptors antagonists in the treatment of parkinson's disease // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2016. – Vol. 2, №3. – P. 86-94.
4. Avdeeva N.V., Kulikov A.L., Pokrovskii M.V., Avtina T.V. Pharmacokinetic studies of new antiparkinsonian drug Rapitalam // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2016. – Vol. 2, №4. – P. 3-8.
5. Chen J.J., Swope D.M. Pharmacotherapy for Parkinson's disease // Pharmacotherapy. – 2007. - № 27. – P. 161-173.
6. Conn P.J., Battaglia G., Marino M.J., Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptors [in the basal ganglia motor circuit] // Nat Rev Neurosci. – 2005. - № 6 (10). – P. 787-798.
7. Guide for the care and use of laboratory animals // Washington D.C.: National Academy press, 2011 [Электронный ресурс]. – URL: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>.
8. Karaban I.N. Use of Glutamate Receptor Blocker Amantadine in Neurology // International neurological journal. – 2012. – № 2. – P. 195-201.
9. Kari A. Johnson, P. Jeffrey Conn, Collen M. Niswender «Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease» // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2009. - № 8 (6). – P. 475-491.
10. Kravchenko D.V., Avdeeva N.V., Korokin M.V. Assessment of the DNA damage level in peripheral blood leukocytes of mice treated orally with Rapitalam in acute and therapeutic doses // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2016. – Vol. 2, №4. – P. 9-11.
11. Olanow C.W., Stern M.B., Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson's disease // Neurology. – 2009. - V. 72. - P. 149.